



**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Ibn Khaldoun de Tiaret**  
**Faculté des Sciences de la nature et de la vie**  
**Département de nutrition et technologies agro-alimentaires**  
**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de « Master**  
**Académique »**

**Domaine : Sciences de la nature et de la vie**  
**Filière : Sciences Agronomiques**  
**Spécialité : Production Animale**

## *THÈME*

# **ETUDE DES TECHNIQUES DE LA GESTION DE LA SEMENCE À LA JUMENTERIE DE TIARET**

**Présenté et soutenu publiquement par :**

**Missoum Ali**

**Rouabhi Abdelkader**

**Jury :**

**Président : NIAR.A Pr**

**Examineur : - HEMIDA. H Dr**

**- ACHIR. M Dr**

**Encadreur : Mme BENCHAI.B F Pr Université Ibn khaldoun-Tiaret**

**Année universitaire : 2019/2020**

# Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Nous tenons à remercier sincèrement professeur BENCHAIB Fatima qui, en tant que encadreur de ce mémoire, s'était toujours montré à l'écoute et était très disponible tout au long de la réalisation de ce travail, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle avait bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Nos remerciements s'adressent à Monsieur Achir le responsable de la spécialité de « Production animale » pour ses efforts et ses conseils et à tous nos honorables professeurs. Nos remerciements s'adressent également à madame Belkhoudja Khadija, directrice de « l'antenne du cniaag Tiaret » pour sa générosité et sa grande patience dont elle avait fait preuve malgré ses responsabilités administratives.

Nous exprimons notre gratitude à tous les consultants et internautes rencontrés lors des recherches effectuées et qui avaient accepté de répondre à nos questions avec gentillesse, Nous n'oublions pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, Nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous avaient toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.



# Table des matières

Liste de figure.....	.....
Liste de tableau.....	..
Résumé.....	.....
Introduction .....	1
I – Rappels anatomiques et physiologiques.....	4
I -1 – Anatomie de l’appareil reproducteur de l’étalon .....	4
I -1.1 – Disposition de l’appareil génital mâle .....	4
I -1.2 – Les différentes enveloppes testiculaires .....	4
I -1.2.1 - Les enveloppes testiculaires superficielles .....	4
I -1.2.2 – Les enveloppes testiculaires profondes.....	4
I -1.3 – Les testicules d’étalon.....	5
I 1.3.1 – Moyens de fixité.....	5
I -1.3.2 – Conformation intérieure et structure .....	6
I -1.3.3 – La fonction endocrine du testicule .....	7
I -1.4 – Les voies spermatiques extra-testiculaires.....	8
I -1.4.1 – L’épididyme.....	8
I -1.4.2 – Le conduit déférent : .....	9
I -1.4.3 – L’urètre .....	9
I -1.5 – Les glandes annexes de l’appareil génital mâle.....	10
I -1.5.1 – Les vésicules séminales .....	10
I _1.5.2 – La prostate .....	10
I -1.5.3 – Les glandes de Cowper .....	10
I -2 – Physiologie sexuelle de l’étalon .....	10
I -2.1 – La saison sexuelle de l’étalon .....	10
I -2.2 – Evaluation de la libido et de l’aptitude au chevauchement .....	11
II – Le sperme de l’étalon : de la production à la fécondation .....	13
II-1 – Aspect externe et composition.....	13
II-1.1 – Aspect externe .....	13
II -1.1.1 – Volume .....	13
II -1.1.2 – Couleur et consistance .....	13
II-1.2 – Composition chimique.....	14
II -2 – Spermatogénèse et spermiogénèse .....	15

II- 2.1 – Spermatogénèse .....	15
II -2.2 La spermiogénèse .....	16
II-3 – Structure du spermatozoïde .....	17
II -3.1 – La tête .....	17
II -3.2 – La région intermédiaire .....	17
II -3.3 – Le flagelle .....	17
II-4 – Devenir des spermatozoïdes .....	18
II-4.1 – La maturation dans l'épididyme .....	18
II- 4.2 – La remontée des voies génitales femelles .....	19
II -4.2.1 - La capacitation .....	19
II-4.2.2 - La sélection des spermatozoïdes : l'origine des pertes .....	19
II. Matériel et méthodes.....	22
.....	23
III.1. Effectif de l'expérimentation.....	23
III-2-Organisation et enregistrement du suivi de la reproduction des juments à la jumenterie de Tiaret : .....	24
III. -2-1-Suivi de la jument à la barre : .....	24
III-2-2-En pratique : .....	25
III-3-Insémination artificielle en semence fraîche : .....	25
III-3-1Déroulement des récoltes .....	25
III-3-2-Préparation du vagin artificiel .....	26
III-3-3-Préparation d'étalon.....	27
III-3-4-Récolte : .....	27
III-4-1-Evaluation des semences après la récolte .....	28
III-4-1-Examen macroscopique.....	28
a. Volume .....	29
b. Couleur et aspect .....	29
Détermination de la concentration.....	29
Examen microscopique .....	30
a. Mobilité.....	30
III-4-2-1Préparation de la jument : .....	31
III-4-2-2-Cathétérisme du col et insémination : .....	31
IV – Les techniques d'analyse de sperme .....	33
IV -1 – Prélèvement de sperme d'étalon .....	33

IV-1-1– Le vagin artificiel.....	33
IV-1-1-1– Choix du vagin artificiel.....	33
IV-1.1.2 – Préparation du vagin artificiel.....	35
IV-2 – Techniques générales de manipulation de la semence.....	36
IV -3- Evaluation macroscopique de la semence .....	38
IV-4– Détermination de la concentration en spermatozoïdes .....	39
IV-4.1 – Utilisation de la cellule hématimétrique .....	39
IV-4.2 – Utilisation du spectrophotomètre .....	41
IV-4.3 – Utilisation du compteur de particules .....	41
IV--4.4 – Détermination du nombre total de spermatozoïdes par éjaculat.....	41
IV-5 – Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes .....	42
IV5.1 – Méthode classique .....	42
IV -5.1.1 - Dilution .....	42
IV-5.1.2 – Evaluation visuelle.....	42
IV5.1.3 – Conservation de la semence .....	43
IV-6 – Etude morphologique des spermatozoïdes.....	43
6.1 – Diversité des méthodes possibles .....	43
IV6.1.1 – Les différents colorants .....	43
IV 6.1.2 – La microscopie électronique .....	44
IV6.2 – Evaluation et classification.....	45
IV-6.3 – Interprétation de la qualité de la semence .....	46

# Liste des figures

Figure 1 : Schéma des organes génitaux de l'étalon ( <a href="http://www.omafra.gov.on.ca">www.omafra.gov.on.ca</a> ).....	5
Figure 2 : aspect du sperme d'étalon après centrifugation .....	14
Figure 3 : La spermatogenèse (Thibault, 2001) .....	15
Figure 4 : formation de l'acrosome au cours de la spermiogénèse .....	16
Figure 5 : structure d'un spermatozoïde (Thibault, 2001) .....	18
Figure 6 : Schéma de structure du CNIAAG Tiaret .....	23
Figure 7 : Jument à la barre et échographe .....	25
Figure 8 : préparation de vagin artificiel .....	26
Figure 9: Préparation d'étalon.....	27
Figure 10 : Récolte de la semence .....	28
Figure 11: filtration et calcule de semence .....	29
Figure 12 : spectrophotomètre .....	30
Figure 13 :micro pipete .....	30
Figure 14 : microscope optique .....	30
Figure 15 : diluere.....	30
Figure 16 : préparation d'un vagin artificiel de type Missouri (mise en place du manchon de protection à usage unique à l'intérieur et remplissage d'eau) .....	35
Figure 17 : cuve pour bain-marie contenant le milieu de dilution et les récipients allant accueillir le sperme, à température corporelle (36.8°C). .....	37
Figure 18 : cellules de Thoma (d'après les laboratoires Fiers) : les spermatozoïdes .....	39
Figure 19: représentation de l'image obtenue lors de l'observation des spermatozoïdes sur une cellule de Thoma (d'après Milian Swiss) .....	40
Figure 20: représentation schématique des anomalies chromosomiques possibles .....	35

# Liste de tableau

<b>Tableau 1 : première insémination fécondante (CNIAAG).....</b>	<b>24</b>
<b>Tableau 2 : Les différents types de vagins artificiels (Barrier Battut et al, 2014)</b>	<b>34</b>

### **Résumé :**

La présente étude s'est intéressée à la gestion de la semence de l'étalon c'est-à-dire, aux étapes, aux conditions de manipulation, de conservation et d'analyse (techniques d'évaluation) de la collecte jusqu'à l'insémination. Parmi les techniques d'évaluation, on cite :

- l'évaluation macroscopique de la semence
- la détermination de la concentration en spermatozoïdes (cellule hématimétrique)
- l'estimation de la mobilité des spermatozoïdes (évaluation visuelle)
- la morphologie des spermatozoïdes (colorations de la semence)

**Mots clés :** étalon, semence, techniques d'évaluation

### **Abstract:**

The present study was undertaken to show the different stages (handling conditions, analysis preservation and evaluation techniques) through which the semen of the stallion goes from collection to artificial insemination. Among the evaluation techniques, we have:

- macroscopic evaluation of the semen
- determination of the sperm concentration (hematimetric cell)
- the estimation of the mobility of the sperm (visual assessment)
- the morphology of the spermatozoa (coloration of the semen)

**Keywords:** stallion, semen, evaluation techniques

ملخص

من بين تقنيات دراسة السائل المنوي للفحل من الجمع الى التلقيح ما يلي

\_التقييم المجهرى للسائل المنوي

\_تحديد تركيز الحيوانات المنوية

\_تقدير حركة الحيوانات المنوية (التقييم البصري)

\_مورفولوجية الحيوانات المنوية (تلوين السائل المنوي)



## **Introduction**

La fertilité de l'étalon conditionne la productivité de l'élevage et sa bonne santé économique. Elle dépend principalement de la qualité de sa semence, de la technique de monte utilisée et de la qualité du suivi de la monte.

Une analyse complète et détaillée de la semence permet d'estimer le statut reproducteur de l'étalon. Cette évaluation sera notamment nécessaire lors de l'introduction d'un nouvel étalon au sein d'un centre d'insémination ou de prélèvement. Lorsque le statut reproducteur de l'étalon sera bien connu, seuls les critères de base (volume de l'éjaculat, concentration en spermatozoïdes, morphologie et mobilité des spermatozoïdes) seront le plus souvent évalués.

Cette étude bibliographique comporte quatre chapitres, le premier est sous forme de rappels anatomo-physiologiques permettant de comprendre l'origine des éventuels désordres de fertilité, le deuxième décrit la semence de l'étalon : « de la production à la fécondation », le troisième comporte les étapes du protocole expérimental initialement prévu (non complètement réalisé faute de confinement suite au « covid 19 ») et le Quatrième chapitre détaille les techniques d'analyse de la semence.



**Chapitre :01**

**Rappels anatomiques et  
physiologiques**

## **I – Rappels anatomiques et physiologiques :**

### **I -1 – Anatomie de l'appareil reproducteur de l'étalon :**

#### **I -1.1 – Disposition de l'appareil génital mâle :**

L'appareil génital mâle est divisé en trois parties qui possèdent des fonctions Différentes (**Barone, 2001**) .

- une partie glandulaire, à savoir les deux testicules dont le rôle est la formation des spermatozoïdes et l'élaboration des hormones mâles.

- une partie tubulaire, à savoir les voies spermatiques qui acheminent les spermatozoïdes à l'intérieur des testicules puis à l'extérieur par l'épididyme et le conduit déférent jusqu'à l'urètre.

- une partie uro-génitale, commune aux voies urinaire et génitale, composée elle-même de deux parties : l'urètre pelvien, situé dans le bassin, où de nombreuses glandes sécrétrices se terminent et qui joue un rôle dans la maturation des spermatozoïdes ; et l'urètre pénien qui aboutit au méat urinaire et auquel s'ajoutent des formations érectiles annexes volumineuses.

#### **I -1.2 – Les différentes enveloppes testiculaires :**

##### **I -1.2.1 - Les enveloppes testiculaires superficielles :**

Le testicule comprend deux enveloppes superficielles

- le scrotum qui se situe en région sous-inguinale, sous l'anneau superficiel et qui est constitué de deux parties :

- la peau qui contient de nombreuses glandes sébacées.
- le dartos, constitué de fibres élastiques et musculaires lisses et de collagène, Qui joue un rôle dans le réchauffement des testicules.

Le fascia spermatique externe.

##### **I -1.2.2 – Les enveloppes testiculaires profondes :**

Le testicule comprend trois enveloppes profondes (**Barone, 2001**) :

- le muscle crémaster, composé de fibres striées à motricité volontaire, qui sort de l'interstice inguinal et entoure en partie le corps testiculaire. Sa contraction provoque la remontée des testicules et de ses enveloppes contre l'anneau inguinal superficiel.

- le fascia spermatique interne.

- la tunique vaginale.

### I -1.3 – Les testicules d'étalon :

Les testicules sont peu volumineux par rapport à la taille de l'animal (environ 200g, 10x6x5 cm) (**figure 1**). Ils sont doués d'une double fonction : la fonction germinale (la spermatogenèse) au niveau des tubes séminifères grâce aux cellules de Sertoli et la fonction endocrine, c'est-à-dire la synthèse d'hormones sexuelles par les cellules de Leydig (**Barone, 2001**).

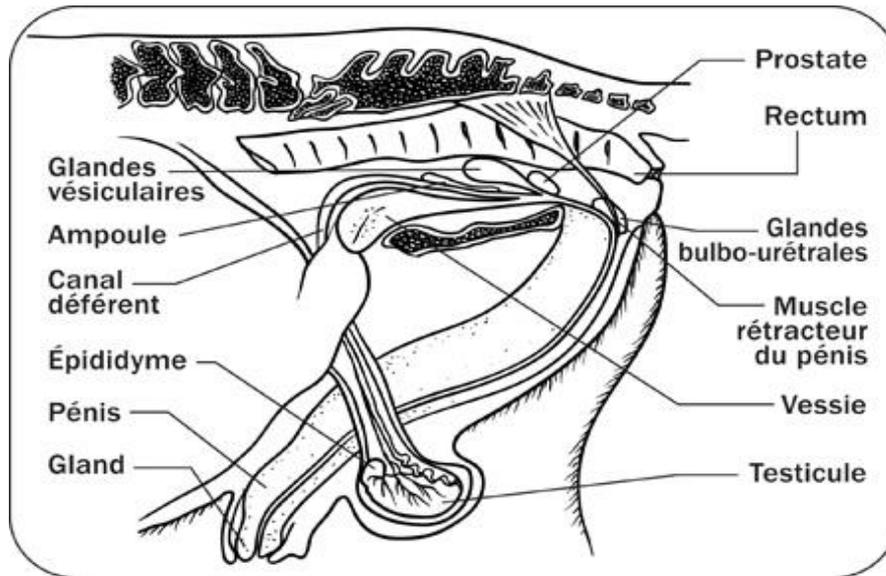


Figure 1 : Schéma des organes génitaux de l'étalon ([www.omafra.gov.on.ca](http://www.omafra.gov.on.ca))

#### I 1.3.1 – Moyens de fixité :

Les moyens de fixité sont :

- les enveloppes
- le cordon spermatique, formé par le canal déférent, l'artère spermatique, l'artère déférentielle, les veines spermatiques et les nerfs du testicule
- les ligaments : le ligament de la tête de l'épididyme, le ligament propre, le ligament de la queue de l'épididyme et le ligament scrotal.
- la tunique vaginale.

**I -1.3.2 – Conformation intérieure et structure :**

On retrouve un parenchyme, de couleur jaune-ocre chez le cheval, entouré par une charpente fibreuse solide, l'albuginée, dans laquelle se trouvent les vaisseaux testiculaires. A la périphérie, recouvrant l'albuginée, se trouve un revêtement séreux.

L'albuginée envoie des expansions à l'intérieur du testicule : elles forment des cloisons qui délimitent des lobules testiculaires (200 à 300). Ces cloisons interlobulaires se rejoignent au centre du testicule, formant le *mediastinum testis*. Chaque lobule est donc composé de plusieurs tubes séminifères entre lesquels se trouve un tissu conjonctif lâche très vascularisé. C'est au sein de ce tissu interstitiel que l'on trouve les cellules de Leydig (cellules endocrines sous forme d'îlots **(Barone, 2001)**).

**- Les tubes séminifères :**

Les tubes séminifères mesurent 2 à 3 mètres de long. Chaque tube est d'abord composé d'une partie contournée, puis se termine par une partie rectiligne (tube droit).

L'ensemble des tubes droits s'anastomosent et viennent s'aboucher dans le *rete testis*, qui est ensuite drainé par des canaux en communication avec la tête de l'épididyme. Si on considère un tube séminifère, on observe une lumière avec des cellules qui ont desquamé et un épithélium de revêtement pluristratifié qui comprend des cellules de Sertoli et des cellules de la lignée germinale à différents stades de maturation. Le liquide contenu dans les tubes séminifères assure le transport des spermatozoïdes relargués dans la lumière **(Barone, 2001)**.

**- Les cellules de Leydig :**

L'espace entre les tubes séminifères et les cloisons de tissu conjonctif dense est comblé par du tissu conjonctif lâche qui contient les cellules de Leydig. Elles synthétisent la testostérone qui passe dans la circulation générale grâce au grand nombre de vaisseaux sanguins situés entre les cellules de Sertoli.

**- Les cellules de Sertoli :**

La cellule de Sertoli est une grande cellule pyramidale qui s'étend sur toute la hauteur de l'épithélium séminifère. Le corps cellulaire repose sur la lame basale de la gaine périlitubulaire. Ses faces latérales sont en contact étroit avec les cellules de Sertoli adjacentes et les cellules germinales aux divers stades de la spermatogénèse. Chaque cellule est connectée aux cellules adjacentes par des jonctions serrées disposées au pôle basal limitant deux compartiments : un compartiment basal, périphérique, qui contient les spermatogonies et les spermatocytes I et un compartiment central ou adjacent à la lumière qui contient les spermatocytes II et les spermatides. D'autres types de jonctions relient les cellules de Sertoli entre elles et avec les cellules germinales **(Barone, 2001)**.

Elles sécrètent les éléments de nutrition et synthétisent l'ensemble du liquide où baignent les spermatozoïdes. L'évolution des spermatogonies en spermatozoïdes a donc lieu entre les cellules de Sertoli, qui possèdent divers rôles :

- La sécrétion du fluide testiculaire : un liquide albumineux ambré dans lequel baignent les spermatozoïdes, composé de solutés, d'eau, et d'éléments nutritifs.
- La sécrétion de liquide interstitiel.
- La synthèse et la libération de protéines spécifiques : inhibine, activine, protéines de transport des androgènes.
- Le contrôle de la maturation et de la migration des cellules germinales en assurant la phagocytose des cellules dégénérescentes.
- La participation à la formation de la barrière hémotesticulaire.

#### - Les voies spermatiques intra-testiculaires :

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

- Les tubes droits : courts et rectilignes, ils prolongent les tubes séminifères et sont bordés par un tissu épithélial simple formé de cellules cubiques qui sont équivalentes aux cellules de Sertoli des tubes séminifères. Au niveau des tubes droits, on ne trouve par contre plus de cellules de la lignée germinale, à l'exception d'amas de spermatozoïdes en cours de migration.
- Le *rete testis* est bordé d'un épithélium simple et cubique
- Les canaux efférents : ils cheminent dans le tissu conjonctif. Après la traversée de l'albuginée, ils prennent le nom de cônes efférents qui, par fusion, forment le canal épидидymaire unique. Ils ont un rôle de conduction et de progression des spermatozoïdes.
- Le liquide du *rete testis* véhicule des spermatozoïdes immobiles. Il ne serait qu'une sécrétion tubulaire remaniée, probablement du fait d'échanges avec les veines testiculaires superficielles (**Barone, 2001**).

#### I -1.3.3 – La fonction endocrine du testicule :

Les cellules de Leydig synthétisent des androgènes dont les différents rôles sont les suivants :

- effets sur les caractères sexuels : primaires (développement des canaux de Wolff et régression des canaux de Müller lors de la période embryonnaire), secondaires (à partir de la puberté) et tertiaires (comportement sexuel).

- stimulation de l'anabolisme protéique ce qui se traduit par un développement de la masse musculaire.

- régulation de la spermatogenèse : une partie des hormones mâles passe dans la circulation, une autre pénètre dans les tubes séminifères. La testostérone est alors convertie en dihydrotestostérone, la forme active, dans les cellules de Sertoli. Une partie se fixe sur des récepteurs spécifiques des cellules de Sertoli. Cette fixation active ces dernières qui vont alors synthétiser et sécréter l'ensemble des molécules nécessaires à la nutrition et à la maturation des cellules germinales. Il y a donc activation de la spermatogenèse par la dihydrotestostérone, **(Barone, 2001)**.

#### **I -1.4 – Les voies spermatiques extra-testiculaires :**

##### **I -1.4.1 – L'épididyme :**

La différenciation des gamètes mâles s'effectue dans le testicule. Cependant à leur sortie les spermatozoïdes ne sont pas matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds. La différenciation se poursuit en dehors de la gonade, dans le tube épидидymaire et constitue la maturation des spermatozoïdes. Dans cet organe, les spermatozoïdes continuent à se transformer en subissant plusieurs modifications notamment biochimiques, qui les rendront aptes à reconnaître et à féconder un ovocyte **(Barone, 2001)**.

L'épididyme est un long canal de 80 mètres composé de trois parties : la tête, le corps, et la queue **(figure 3)**. Il relie les canaux efférents (à la sortie du testicule) au canal déférent au niveau de la jonction épидидymo-déférentielle. Le conduit déférent est palpable dans le cordon spermatique **(Barone, 2001)**.

L'épididyme est composé d'une albuginée et de nombreux canaux commençant par une quinzaine de canalicules issus du *rete testis* qui forment la tête puis qui convergent en un conduit très sinueux, le conduit épидидymaire, qui devient ensuite plus épais et moins sinueux au niveau de la queue, formant par la suite le conduit déférent **(Barone, 2001)**.

L'épididyme possède plusieurs fonctions **(Thibault, 2001)**:

- la progression des gamètes par contraction des cellules musculaires.
- la réabsorption de liquides (eau, ions et protéines), essentiellement dans les premières régions épидидymaires, ce qui entraîne une augmentation de la concentration en spermatozoïdes.

- la concentration de substances provenant du sang dans la lumière du tube (carnitine, inositol). La carnitine est captée par les spermatozoïdes et transformée en acétylcarnitine qui sera utilisée comme substrat énergétique pour la mobilité.

L'inositol provient du testicule, de la synthèse épидидymaire et du sang. Son rôle est incertain.

- la sécrétion dans la lumière de petites molécules organiques et d'enzymes

Glycérylphosphorylcholine, phosphatases, protéases, glycosidases) permettant de maintenir les gamètes en vie, de stabiliser leur membrane plasmique et de leur conférer leur mobilité et leur fertilité. La composition protéique du fluide épидидymaire est en constante évolution tout au long de l'organe, les protéines épидидymaires pouvant être très différentes de celles du sang et du testicule. Ainsi, à la sortie de l'épидидyme, les spermatozoïdes sont fertiles et mobiles.

#### **I -1.4.2 – Le conduit déférent :**

Le conduit déférent a un rôle de conduction des spermatozoïdes, qui migrent grâce à leur flagelle et aux contractions des fibres musculaires de la paroi. Ils sont ensuite stockés dans des ampoules du conduit déférent, juste avant l'urètre. Ce stockage ne doit pas être trop long car les spermatozoïdes perdent leur pouvoir fécondant en 72h. S'il n'y a pas d'éjaculation, ils dégènèrent et sont résorbés ou passent dans l'urine. S'il y a éjaculation, le canal déférent libère le sperme final, à savoir les spermatozoïdes, le fluide testiculaire et les sécrétions des glandes annexes (**Thibault, 2001**).

Le conduit déférent est constitué de trois parties : une partie funiculaire (située dans le cordon spermatique), une partie abdomino-pelvienne (après l'interstice inguinal) et l'ampoule (Au-dessus de la vessie), (**Barone, 2001**).

#### **I -1.4.3 – L'urètre :**

L'urètre pelvien débute au-delà du col de la vessie et se termine au-dessus du col ischiatique. Il est composé d'une partie prostatique et d'une partie membranacée contenant un muscle sphincter. La prostate déverse son produit de sécrétion dans l'urètre pelvien via de nombreux petits conduits Prostatiques. Les glandes de Cowper sont portées par l'urètre pelvien et présentent de nombreux abouchements (**Barone, 2001**).

L'urètre pénien débute en regard de l'arcade ischiatique par un renflement et s'attache aux autres éléments érectiles. Il se situe au sein du corps spongieux (**Barone, 2001**).

## **I -1.5 – Les glandes annexes de l'appareil génital mâle :**

### **I -1.5.1 – Les vésicules séminales :**

Ce sont des glandes tubulo-alvéolaires. Les vésicules séminales (ou glandes vésiculaires) et le conduit déférent se terminent par un conduit commun : le conduit éjaculateur qui débouche ensuite dans l'urètre. Les cellules épithéliales des vésicules séminales sécrètent des protéines (enzymes, inhibiteurs d'enzymes, protéines structurales) et un mucus gélatineux, épais et blanc, composé entre autres de fructose et de prostaglandines.

Les prostaglandines jouent un rôle dans les contractions des voies génitales femelles, et favorisent donc la migration des spermatozoïdes dans ces voies femelles (**Barone, 2001**).

### **I -1.5.2 – La prostate :**

C'est une glande unique bilobée qui se situe sur le col de la vessie de part et d'autre de l'urètre. Dans chaque lobule, des glandes tubulo-alvéolaires de type séreux forment les éléments sécrétants. Leurs sécrétions sont déversées dans la lumière puis sont acheminées par des canaux dans l'urètre (**Barone, 2001**).

### **I -1.5.3 – Les glandes de Cowper :**

Elles déversent leur contenu au niveau de l'urètre membraneux. Le liquide qu'elles sécrètent est un liquide albumineux transparent. L'érection comprime les glandes de Cowper, favorisant ainsi l'élimination de leur contenu lors de l'éjaculation (**Barone, 2001**).

## **I -2 – Physiologie sexuelle de l'étalon :**

### **I -2.1 – La saison sexuelle de l'étalon :**

L'étalon peut se reproduire physiologiquement toute l'année mais de par la saisonnalité de la jument, il exprime son comportement sexuel en même temps que cette dernière. Il est par contre possible de prélever des étalons toute l'année soit pour effectuer une analyse de la semence lors de problème de fertilité, soit pour congeler des paillettes de sperme (**Tibary et Bakkowy, 2005**).

Possible de prélever des étalons toute l'année soit pour effectuer une analyse de la semence lors de problème de fertilité, soit pour congeler des paillettes de sperme (**Tibary et Bakkowy, 2005**).

**I -2.2 – Evaluation de la libido et de l’aptitude au chevauchement :**

Une semence de très bonne qualité n’est intéressante que dans la mesure où elle est accompagnée d’une bonne libido et d’une aptitude à chevaucher la jument. Le comportement sexuel de l’étalon est jugé en le mettant en présence d’une jument en oestrus : un étalon avec une bonne libido manifeste immédiatement une attirance intense pour la jument, caractérisée par de l’agitation, du piaffer, des vocalisations, une activité pré copulatrice intense avec flairage, léchage, mordillements de la jument.

la manifestation du reflexe du lehm en (retroussement de la lèvre supérieure en réaction initiale au flairage de la région génitale ou Del ‘urine de la jument) et l’entrée en érection. Une cause très fréquente de baisse de la libido est une mauvaise gestion de la conduite des saillies telle qu’une surexploitation de l’étalon (**Blanchard, 2003**).

L’aptitude d’un étalon à avoir un comportement sexuel normal (érection , chevauchement, intromission, mouvements copulatoires et éjaculation) doit être déterminée lors de l’évaluation du statut reproducteur d’un étalon (**Blanchard ,2003**).

# **Chapitre :02**

## **Le sperme de l'étalon**

**II – Le sperme de l'étalon : de la production à la fécondation :**

Le sperme est composé des spermatozoïdes, du fluide testiculaire et des sécrétions des glandes annexes. Il est éliminé par le méat urinaire lors de l'éjaculation, à raison d'une moyenne de 100 (20 à 300) cm<sup>3</sup> de sperme par éjaculat en moyenne (**Knobil et Neill, 1999**).

**II-1 – Aspect externe et composition :****II-1.1 – Aspect externe :****II -1.1.1 – Volume :**

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

**II -1.1.2 – Couleur et consistance :**

La couleur normale de l'éjaculat équin est grisâtre à blanchâtre selon la concentration en spermatozoïdes (**figure 2**). Cette couleur peut devenir rose, rougeâtre ou rouge vif lorsque le sperme contient du sang (hémospermie). Une couleur jaunâtre peut signaler la présence d'urine (urospermie) ou de pus (pyospermie). L'éjaculat est homogène et de consistance aqueuse sauf Lorsqu'il contient une partie de la fraction gélatineuse. Il peut paraître trouble (**Blanchard, 2003 ;Tibary et Bakkowy, 2005**).

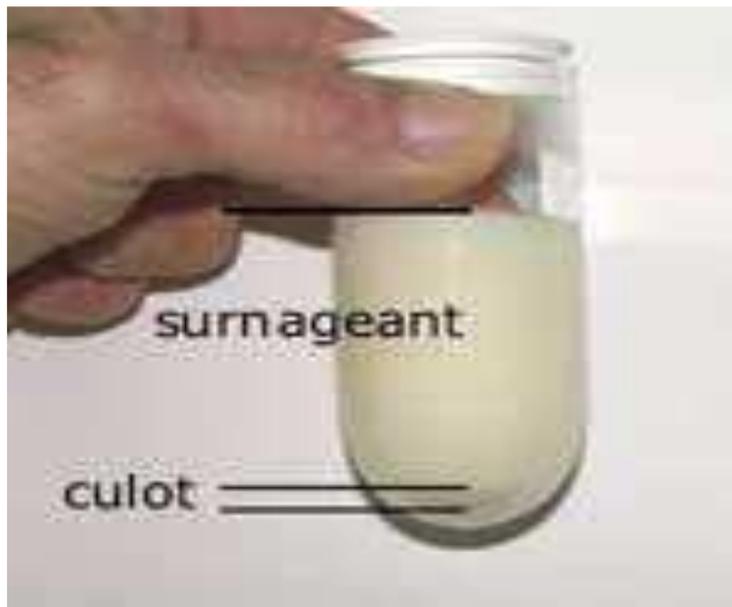


Figure 2 : aspect du sperme d'étalon après centrifugation

### II-1.2 – Composition chimique :

La composition chimique du sperme est la suivante :

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

II -2 – Spermatogénèse et spermiogénèse ;

La formation du spermatozoïde se fait en deux étapes : la spermatogénèse et la spermiogénèse, qui débutent au niveau des tubes séminifères puis se déroulent dans l'épididyme, pour finir dans les voies génitales femelles. La durée de la formation du spermatozoïde est de 49 jours chez l'étalon. La connaissance de cette durée est importante pour la préparation de l'animal en vue d'une saison de monte. De même un incident influençant la production des spermatozoïdes peut avoir des répercussions sur l'aptitude reproductrice 49 jours plus tard (Heymon et Vignon, 2005).

II- 2.1 – Spermatogénèse :

La spermatogénèse commence dans les testicules, en tout premier lieu dans les tubes séminifères. Elle se met en route après la puberté sous l'action d'Hormone sur les cellules de Leydig et de cellules de Sertoli(Thibault,2001 ;Heymon et Vignon, 2005).

La lignée germinale mâle est constituée de deux types de spermatogonies : les spermatogonies de type A (cellules souches) et les spermatogonies de type B issues de ces dernières (figure 3) [Thibault, 2001).

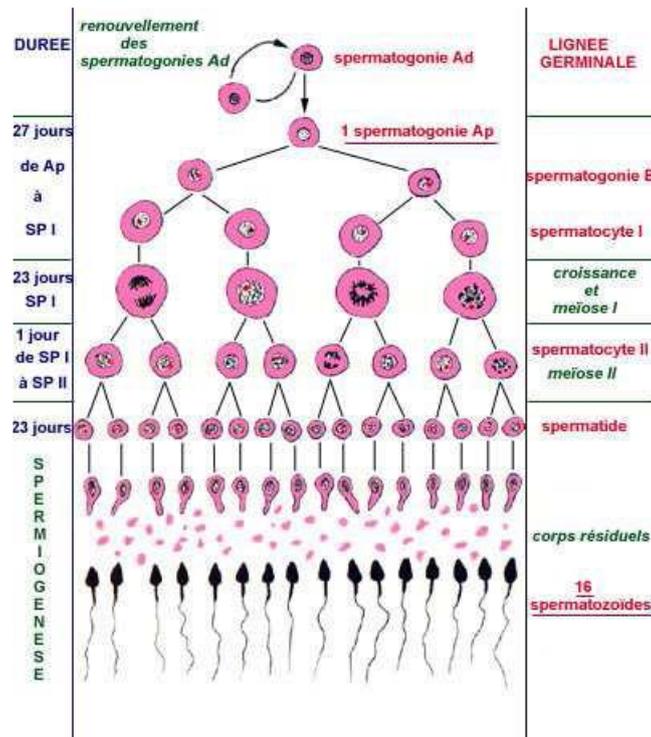


Figure 3 : La spermatogénèse (Thibault, 2001)

II -2.2 La spermiogénèse :

La spermiogénèse permet le passage de la spermatide (cellule arrondie ayant une organisation cytoplasmique banale) au spermatozoïde (petite cellule très effilée, mobile, pauvre en cytoplasme et en réserves). Elle est caractérisée par (Thibault, 2001 ;Heymon et Vignon, 2005) :

- une condensation nucléaire : les histones riches en lysine sont éliminées et remplacées par des protamines, protéines basiques de faible poids moléculaire riches en arginine et cystéine. Le nucléole disparaît, les ARNm nucléaires sont éliminés et le noyau se déshydrate : l'ensemble du noyau devient une masse compacte d'hétérochromatine.

- la formation de l'acrosome : il se forme progressivement par confluence de vésicules golgiennes ; il y a d'abord mise en place d'une vésicule arrondie, la vésicule proacrosomiale, qui se positionne à l'opposé de l'appareil cinétique et donne la vésicule acrosomiale puis l'acrosome. Il continue à grossir par apport de vésicules golgiennes ; puis il s'étale sur la partie supérieure du noyau et finit par coiffer complètement le noyau (figure 4).

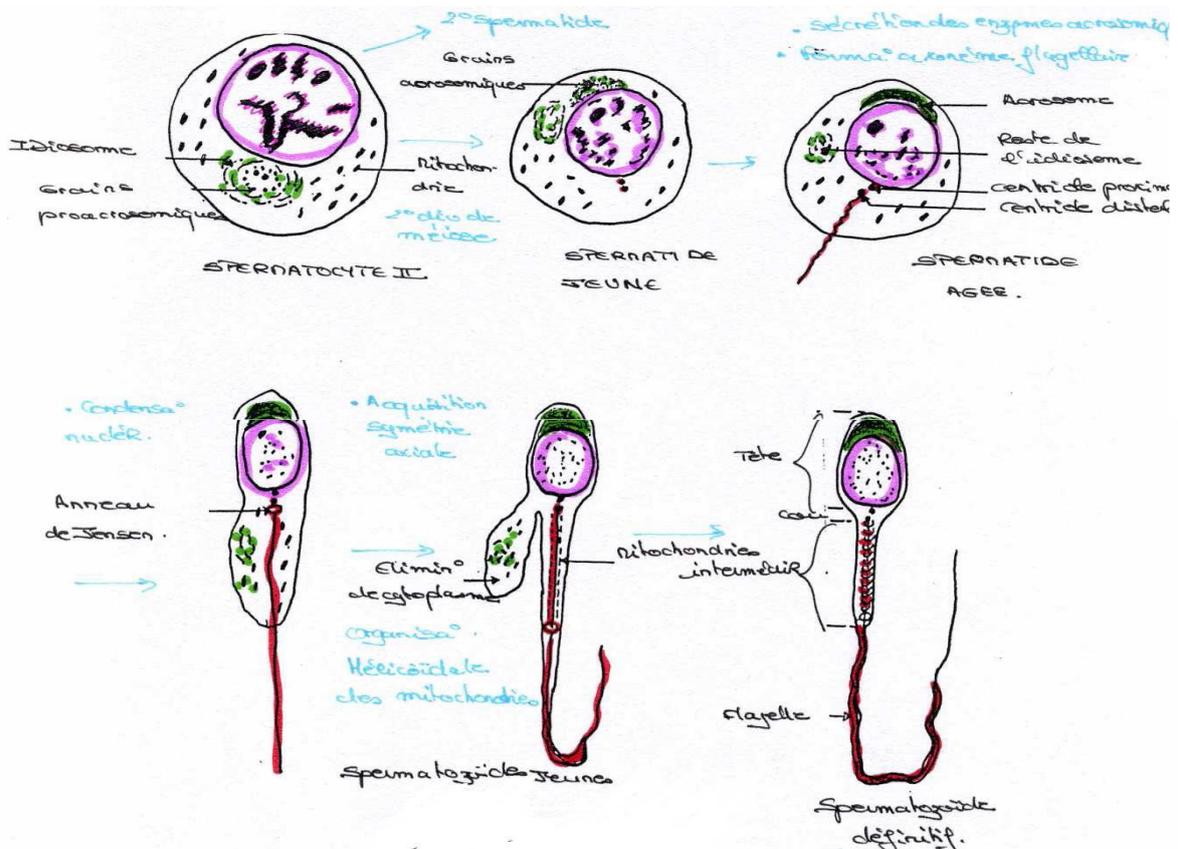


Figure 4 : formation de l'acrosome au cours de la spermiogénèse

### II-3 – Structure du spermatozoïde :

Le spermatozoïde assure trois fonctions successives : le transport du contenu chromosomique mâle jusqu'au gamète femelle, la pénétration du génome mâle dans le gamète femelle et la fusion des deux noyaux gamétiques (ou caryogamie) aboutissant au zygote (Knobil et Neill, 1999).

#### II -3.1 – La tête :

Le cytoplasme est très peu présent et l'essentiel de l'espace est occupé par le noyau et l'acrosome. Le noyau présente exclusivement de l'hétérochromatine, qui est particulièrement condensée grâce à des protéines particulières : les protamines.

Il s'agit de protéines riches en arginine et cystéine capables d'établir entre elles des ponts disulfures. Sous cette forme la chromatine est également protégée contre les altérations possibles lors du stockage ou lors du transfert dans les voies génitales femelles.

L'acrosome est une poche limitée par une membrane. A l'avant, la membrane est accolée contre la membrane plasmique et à l'arrière, la membrane épouse la forme du noyau. Son contenu est riche en enzymes protéolytiques (figure 5) (Knobil et Neill, 1999).

#### II -3.2 – La région intermédiaire :

Le cou comporte deux centrioles : le centriole proximal, bien individualisé et situé derrière le noyau et le centriole distal, incorporé à la base de l'axonème. La pièce intermédiaire comporte l'axonème dans sa partie centrale entourée d'un faisceau de fibres et d'un manchon de mitochondries. Ces dernières sont le reflet d'un métabolisme aérobie et assurent une production importante d'ATP (Adénosine Tri Phosphate) utilisée dans le fonctionnement de l'axonème. Chez les mammifères l'approvisionnement énergétique, en l'absence de toute réserve intracellulaire, est assuré par le liquide séminal (sous forme de fructose) (figure 5) (Knobil et Neill, 1999).

#### II -3.3 – Le flagelle :

Le flagelle est la formation locomotrice qui permet d'amener le contenu chromosomique mâle jusqu'au gamète femelle. La pièce principale est constituée de neuf faisceaux de fibres denses ainsi que d'une gaine protéique fibreuse périphérique. La pièce terminale n'est constituée que de l'axonème enfermé dans la membrane plasmique (figure 5) (Knobil et Neill, 1999).

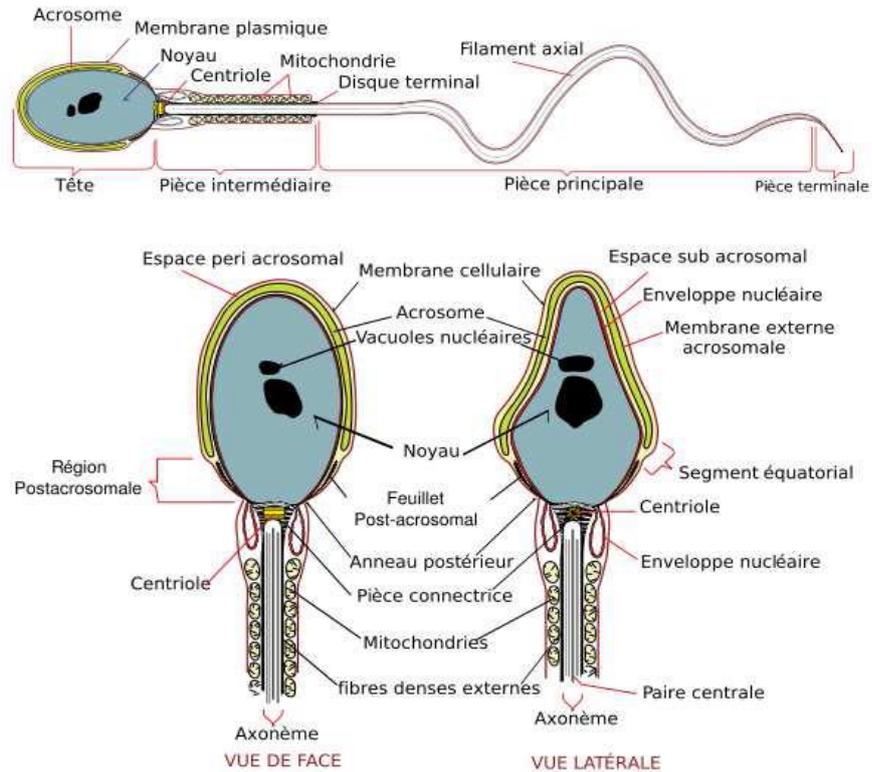


Figure 5 : structure d'un spermatozoïde (Thibault, 2001)

## II-4 – Devenir des spermatozoïdes :

### II-4.1 – La maturation dans l'épididyme :

Au niveau de l'épididyme, plusieurs modifications se produisent (Thibault, 2001)

- la condensation de la chromatine se poursuit par augmentation des ponts disulfures
- l'hélice mitochondriale achève sa mise en place, parallèlement, le spermatozoïde acquiert la Capacité de se déplacer suivant une trajectoire rectiligne
- la membrane plasmique est remaniée dans sa composition lipidique et protéique ; les protéines qui interviennent dans la reconnaissance du gamète femelle lors de la fécondation se mettent en place.

- l'acrosome prend sa forme définitive, et des sécrétions de l'épididyme neutralisent les enzymes de l'acrosome évitant toute agression des voies génitales mâle ou femelle en cas de lyse de spermatozoïdes.

### **II- 4.2 – La remontée des voies génitales femelles :**

Les spermatozoïdes remontent les voies génitales femelles grâce à leur mobilité propre grâce aux contractions du tractus génital. Une source d'énergie extracellulaire, constituée de glycine, est nécessaire (Thibault, 2001 ;Heymon et Vignon, 2005).

#### **II -4.2.1 - La capacitation :**

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

#### **II-4.2.2 - La sélection des spermatozoïdes : l'origine des pertes :**

Seules quelques centaines de spermatozoïdes arrivent dans la partie antérieure de l'oviducte. Les pertes ont plusieurs causes : le milieu vaginal acide défavorable aux spermatozoïdes et la glaire cervicale sécrétée par le col de l'utérus qui n'est favorable aux spermatozoïdes qu'au moment de l'ovulation (Thibault, 2001 ;Heymon et Vignon, 2005).



# **Chapitre :03**

## **Matériel et méthode**

**II. Matériel et méthodes :****Objectifs de l'étude :**

1-Définir les différents tests d'évaluation de la semence depuis la collecte jusqu'à l'insémination

2-Démontrer leurs avantages et inconvénients par rapport à l'amélioration de la reproduction.

**Lieu de l'étude :** Centre régional de l'insémination artificielle et de l'amélioration génétique (cniag) , antenne de Tiaret.

**Etapas de l'étude :**

1-Morphologie de l'étalon (description)

2-Age, état de santé et régime alimentaire suivi

3-Fertilité de l'étalon (qualité de la semence et technique de monte)

4-Technique de monte : en liberté, monte en main, iasf, iasr, iasc (ia insémination artificielle avec sperme frais, réfrigéré, congelé)

5-Qualité de la semence (analyse par un spermogramme)

6-Calculs de fertilité (par chaleur, fin de saison, apparente), comment elle est calculée ?  
(Tableau)

7-Examen mesure des testicules

8-Conditions de collecte de sperme (équipements minimums et conditions de stockage)

9-Gestion de la semence : conditions de manipulation, insémination, gestation

10-Conservation de la semence (conditions de la conservation).



Figure 6 : Schéma de structure du CNIAAG Tiaret

### III.1. Effectif de l'expérimentation :

L'expérimentation a été réalisée durant la saison de monte 2020 (saison administrative du 16 février au 12 Mars) sur la semence de deux étalons de race « Barbe » Ghiouane un cheval âgé de 12 ans, un étalon Jeremy âgé de 7 ans et 7 juments.

Les deux étalons étaient maintenus dans des boxes individuels au niveau du centre et recevaient quotidiennement chacun, une ration composée de 2 kg d'orge et 5 kg de foin, avec de l'eau qui est distribuée à volonté.

Leur fertilité était connue grâce aux résultats d'insémination en monte naturelle obtenus dans les années précédentes et aussi grâce aux résultats d'insémination artificielle en semence fraîche obtenus en 2020.

Le 16/4/2018 une première insémination fécondante sur une jument avait été réalisée avec semence fraîche d'un étalon appartenant au CNIAAG :

Tableau 1 : première insémination fécondante (CNIAAG)

Jument	Date d'insémination	Origine	Type d'insémination
Messaouda	16/4/2018	Privé	Semence fraîche
Lamia	20/5/2018	Cniaag Tiaret	Semence fraîche

### III-2-Organisation et enregistrement du suivi de la reproduction des juments à la jumenterie de Tiaret :

90% de juments étaient issues de la jumenterie de Tiaret et le reste appartenait secteur privé de différentes régions du pays. Le suivi de reproduction était assuré par le praticien, à partir du moment où on observait des chaleurs jusqu'au diagnostic de gestation précoce à J14 suivi de sa confirmation. Le suivi des juments se faisait par examen échographique. Ces examens déterminaient la fréquence du suivi, la réalisation d'examens complémentaires supplémentaires, les inséminations et/ou les traitements.

Les modes de reproduction utilisés étaient la monte naturelle et l'insémination artificielle (semence fraîche, semence réfrigérée, semence congelée). Le choix de l'étalon et l'achat de la semence étaient réalisés par le propriétaire. Et parfois par Le vétérinaire, pour des raisons pratiques.

Les données de suivi de reproduction étaient enregistrées sur des feuilles pré-imprimées Comprenant pour chaque jument, son nom, son propriétaire, l'étalon choisi. Le statut de chaque jument était : suitée (avec poulain), vide ou maiden (première mise à la reproduction). Des encadrés pour chaque visite effectuée permettaient de répertorier les éléments des examens gynécologiques sous forme de dessins et de notes ainsi que les traitements administrés.

#### III. -2-1-Suivi de la jument à la barre :

Pour une jument suivie uniquement à la barre (**figure 7**), il est conseillé de la faire saillir ou inséminer toutes les 48 heures pendant la durée des chaleurs et jusqu'au refus. C'est la façon la plus fiable pour « couvrir l'ovulation », c'est à dire que l'apport de semence de l'étalon dans le tractus génital était réalisé dans les jours qui précédaient l'ovulation.



**Figure 7 : Jument à la barre et échographe**

### **III-2-2-En pratique :**

Fréquence conseillée des examens échographiques en fonction de la taille du plus gros follicule (F).

- $F < 19 \text{ mm} \Rightarrow$  2 fois par semaine
- $20 < F < 24 \text{ mm} \Rightarrow$  3 fois par semaine
- $25 < F < 29 \text{ mm} \Rightarrow$  toutes les 48 heures
- $30 < F \Rightarrow$  toutes les 24 heures jusqu'au constat de l'ovulation.

### **III-3-Insémination artificielle en semence fraîche :**

#### **III-3-1Déroutement des récoltes :**

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

La récolte du sperme avait été faite à l'aide d'un vagin artificiel de type Missouri, immédiatement avant la récolte la chambre à eau du vagin artificiel était remplie avec de l'eau

à 45-50°C, et la pression à l'intérieur du vagin artificiel était ajustée de 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.

### **III-3-2-Préparation du vagin artificiel :**

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

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



**Figure 8 : préparation de vagin artificiel**

**III-3-3-Préparation d'étalon :**

Le cheval était ensuite déplacé par un opérateur de son boxe vers la zone de récolte où il était stimulé dans un premier temps par la vue de la jument en œstrus.



**Figure 9: Préparation d'étalon**

**III-3-4-Récolte :**

La récolte était faite dans une zone de monte spéciale. Le travail se faisait toujours en équipe, de trois ou quatre soigneurs, jamais seul, avec celui qui tenait l'étalon et le collecteur du même côté du cheval (côté gauche de la jument). Une fois qu'il était monté, la verge du cheval était alors détournée par l'opérateur qui l'insérait dans le vagin artificiel et le sperme était recueilli dans le biberon de récupération du sperme. Cela durait quelques secondes, le vagin était ensuite retiré soigneusement du pénis, il était mis en position verticale et vidé de l'eau chaude pour essayer de récupérer la totalité de l'éjaculat et éviter un contact prolongé de l'éjaculat avec la paroi interne Du vagin chaud, puis il était directement acheminé vers le laboratoire qui se trouvait juste à côté de la zone de collecte. L'étalon était ensuite remis à son boxe.



**Figure 10 : Récolte de la semence**

### **III-4-1-Evaluation des semences après la récolte :**

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

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

### **III-4-1-Examen macroscopique :**

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

**a. Volume :**

Le volume en ml était 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



**Figure 11: filtration et calcule de semence**

**b. Couleur et aspect :**

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

**Détermination de la concentration :**

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



Figure 12 : spectrophotomètre

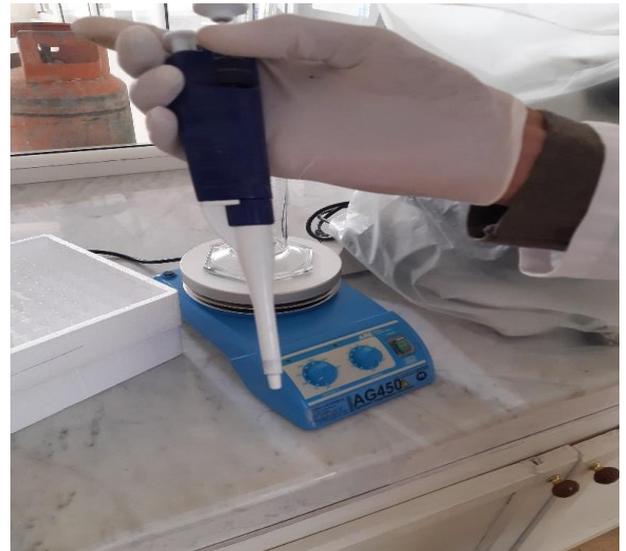


Figure 13 : micro pipete

**Examen microscopique :**

**a. Mobilité :**

Immédiatement après évaluation macroscopique, le volume de la semence exempt de gel était analysé par le dépôt d'une goutte de sperme entre lame et lamelle propres, sèches, chauffées à environ 37°C et placées par la suite sous le microscope optique (OLYMPUS CX21)



Figure 14 : microscope optique



Figure 15 : dilueur

**III-4-2-1Préparation de la jument :**

La jument était contenue, sa queue était entourée d'un gant ou d'un papier absorbant à sa base, et attachée en l'air pour éviter la souillure de la zone à nettoyer. Un lavage chirurgical (du centre vers la périphérie) et une désinfection soignée de la vulve et de la région périnéale en périphérie était réalisé. La povidone iodée était utilisée la plupart du temps (Vétédine savon) en frottant à la main, avec des gants, ou avec une éponge type « scrub ». Trois lavages successifs étaient effectués, en rinçant à l'eau entre chaque lavage.

**III-4-2-2-Cathétérisme du col et insémination :**

Pour ce faire, le vétérinaire enfile d'abord un gant de fouille propre sur le bras Opérateur, puis le lubrifie à l'aide de gel non toxique pour les spermatozoïdes. Il saisit alors la sonde d'insémination, dans sa gaine sanitaire, et maintient son extrémité dans le creux de sa main. Avant, il faut replier sur lui-même le bout de l'emballage plastique s'il n'est pas scellé. La main couvrant l'instrument est ensuite introduite dans les voies génitales postérieures, délicatement, jusqu'à pouvoir palper le col.

# **Chapitre :04**

## **Résultats et Conclusion**

**IV – Les techniques d’analyse de sperme :****IV -1 – Prélèvement de sperme d’étalon :**

Le prélèvement de sperme est une phase essentielle lors de l’analyse de la semence. Il devra être fait dans les meilleures conditions de sécurité et d’efficacité avec comme objectif principal de ne pas détériorer la qualité de la semence (**Blanchard, 2003**).

**IV-1-1– Le vagin artificiel :**

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

**IV-1-1-1– Choix du vagin artificiel :**

Le choix du vagin artificiel et sa préparation conditionnent l’efficacité et la qualité de la semence récoltée. De nombreux modèles de vagins artificiels sont disponibles, et présentent des particularités qui sont à privilégier selon les besoins spécifiques de l’étalon, le mode de traitement de semence, et la préférence du manipulateur. Les paramètres à prendre en compte lors de l’achat d’un vagin artificiel sont le prix d’achat, le coût d’entretien et d’utilisation, la longévité, le poids, la capacité à garder la température adéquate pendant une durée plus ou moins longue et la quantité de sperme « perdu » à chaque récolte du fait de la configuration (**tableau 1**) (**Blanchard, 2003**).

Tableau 2 : Les différents types de vagins artificiels (Barrier Battut et al, 2014)

Technique	Avantages	Inconvénients
<b>INRA Où COLORADO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-économique</li> <li>-permet la collecte à vagin ouvert</li> <li>-facilement démontable donc désinfection complète possible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-tube PVC cassant</li> <li>-poignées cassantes</li> <li>-lourd</li> </ul>
<b>INRA Où COLORADO Mousse</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-plus de confort pour l'étalon</li> <li>-légèreté du vagin artificiel</li> <li>-ne nécessite pas de poignées fragiles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-il faut automatiquement utiliser une capote en latex</li> <li>-se refroidit très vite</li> <li>-montage plus délicat</li> </ul>
<b>MISSOURI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-souple donc plus confortable</li> <li>-facile à monter</li> <li>-convient aux étalons délicats</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-s'use assez vite donc prix de revient augmenté</li> <li>-difficile à nettoyer si utiliser sans capotes à usage unique</li> <li>-la partie rigide en cuir devient rapidement très sale</li> </ul>
<b>VAGIN OUVERT</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-augmentation de la concentration de l'éjaculat donc effet bénéfique escompté sur la conservation</li> <li>-élimination du gel</li> <li>-diminution du nombre de germes contaminants dans l'éjaculat</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-les étalons doivent être habitués à cette technique</li> <li>-la perte de spermatozoïde peut être importante si la technique est mal maîtrisée</li> <li>-certains étalons n'acceptent pas</li> </ul>

**IV-1.1.2 – Préparation du vagin artificiel :**

Immédiatement avant le prélèvement de sperme, il convient de remplir la chambre à eau du vagin artificiel avec de l'eau à 45-50°C. La pression à l'intérieur du vagin artificiel rempli d'eau doit être ajustée pour fournir un contact uniforme et étroit tout au long du pénis, sans gêner la pénétration ou la dilatation de la verge à l'intérieur de l'instrument. La totalité du pénis est introduite dans le vagin artificiel au moment de la première poussée copulatrice pour permettre au gland de se dilater à l'extrémité du vagin artificiel et éviter ainsi une éjaculation dans l'instrument qui entraînerait un contact prolongé de l'éjaculat avec les parois chaudes du manchon. La température et la pression du vagin artificiel doivent être maintenues relativement constantes pendant le prélèvement pour obtenir un résultat optimal en termes de stimulation de l'éjaculation et de récupération de spermatozoïdes. Les trois paramètres essentiels de la récolte de sperme sont donc le modèle de vagin, la température et le volume d'eau (**Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005**).



**Figure 16: préparation d'un vagin artificiel de type Missouri (mise en place du manchon de protection à usage unique à l'intérieur et remplissage d'eau)**

Avant le prélèvement, la surface interne du vagin artificiel est lubrifiée avec un lubrifiant stérile et non spermicide. Le récipient de récupération du sperme est placé à température corporelle pendant la durée du prélèvement et de l'acheminement de l'échantillon jusqu'au laboratoire, ceci afin d'éviter d'éventuels chocs thermiques. Il est également préférable de protéger la semence de la lumière (**Blanchard, 2003**).

Afin d'augmenter le nombre de spermatozoïdes récupérés et réellement utilisables à chaque prélèvement, un filtre à sperme est placé à l'entrée du récipient de récupération de l'éjaculat.

Il permet de séparer la partie liquide de l'éjaculat, qui renferme les spermatozoïdes, de la partie épaisse et gélatineuse, le gel, qui correspond à la dernière fraction de l'éjaculat.

Les filtres en nylon sont plus intéressants que les filtres en polyester car ils piègent moins les spermatozoïdes. Le filtre contenant le gel doit être retiré immédiatement du flacon pour éviter tout écoulement dans la partie spermatique [**Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005**].

#### **IV-2 – Techniques générales de manipulation de la semence :**

Immédiatement après le prélèvement, la semence est rapidement transportée au laboratoire pour réduire les risques d'altération liée à l'action de la lumière ou à un choc thermique (température ambiante trop froide ou trop chaude). Tout le matériel entrant en contact avec la semence, ainsi que les milieux de dilutions, doivent être préalablement chauffés à température corporelle. Lorsqu'il n'y a pas de filtre de semence placé lors du prélèvement au niveau de l'entrée du récipient de recueil une filtration de l'échantillon au travers d'un filtre non toxique doit être immédiatement réalisée, afin d'éliminer le gel et les débris. La partie gélatineuse du sperme peut également être éliminée par aspiration avec une seringue mais la perte en spermatozoïdes est alors en général plus importante (**Blanchard, 2003**).



**Figure17: cuve pour bain-marie contenant le milieu de dilution et les récipients allant accueillir le sperme, à température corporelle (36.8°C)**

La concentration en spermatozoïdes, le volume, la couleur de la fraction sans gel de l'éjaculat et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles progressifs sont ensuite déterminés. L'ensemble des caractéristiques de l'éjaculat est enregistré sur des fiches d'évaluation de l'éjaculat qui sont archivées ou stockées sous forme de fichiers informatiques. Le sperme est dilué dans un milieu adapté quelques minutes après la récolte afin de maintenir au maximum la viabilité des spermatozoïdes. Si la semence n'est pas stockée plus d'une ou deux heures (à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière), une dilution d'un volume de sperme pour un ou deux volumes de dilueur est en général correcte. Il est également possible de placer le dilueur chauffé à 37°C directement dans le flacon de récolte fixé au vagin artificiel pour assurer une protection et des éléments nutritifs aux spermatozoïdes dès l'éjaculation. Cette méthode est rarement nécessaire, excepté pour quelques étalons dont le plasma séminal semble réduire la mobilité et la durée de survie des spermatozoïdes (**Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005**).

Pour mesurer de manière fiable la concentration de l'échantillon, le dilueur utilisé doit être transparent si la mesure est faite à l'aide d'un spectrophotomètre ou d'un densimètre. Sinon la mesure est soit effectuée manuellement à l'aide d'une cellule hématimétrique, soit

déterminée à partir d'une goutte de sperme frais non dilué (**Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005**).

Les dilueurs de semence augmentent la durée de survie des spermatozoïdes et sont le plus souvent à base de lactose ou de lait. L'ajout d'antibiotiques favorise l'élimination des bactéries qui contaminent de manière systématique les échantillons de sperme au moment du prélèvement. Les antibiotiques les plus couramment employés sont le sulfate de polymixine B (concentration de 200 à 1000 UI/ml), la pénicilline cristalline (100 à 1500 UI/ml), le sulfate de gentamicine (100 à 1000 µg/ml), le sulfate d'amikacine (100 à 1000 µg/ml) et la ticarcilline (100 à 1000 µg/ml). Lorsque la gentamicine ou l'amikacine sont utilisées, il faut ajouter dans le dilueur du bicarbonate sodique afin d'ajuster le pH du milieu. Un pH variant entre 6,6 et 7,2 est optimal pour conserver la mobilité des spermatozoïdes tout en évitant une capacitation prématurée. L'association pénicilline G potassium (1000 UI/ml) et sulfate d'amikacine (1000 µg/mL) dans un dilueur à base de lait conserve la mobilité des spermatozoïdes dans des conditions optimales tout en offrant une activité antibactérienne à large spectre (**Blanchard, 2003**).

#### **IV -3- Evaluation macroscopique de la semence :**

L'évaluation de la semence doit être réalisée de manière méthodique et minutieuse par une personne expérimentée et dans un laboratoire correctement équipé. Le volume de la fraction sans gel, la couleur et l'aspect macroscopique sont notés. La mesure du volume est utile pour calculer le nombre total de spermatozoïdes contenus dans l'éjaculat et se fait généralement à l'aide d'une éprouvette graduée de 100 ml.

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

Et de la couleur de l'éjaculat permet de détecter la présence éventuelle de sang, d'urine ou de pus dans l'éjaculat (**Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005**).

Le pH de la fraction sans gel du sperme peut être mesuré rapidement à l'aide d'un papier pH, mais il est préférable d'utiliser un pH-mètre précis. Le pH doit être mesuré dès que possible après la récolte pour éviter le biais dû aux produits issus du métabolisme des spermatozoïdes. Le pH normal du sperme d'étalon varie entre 7,2 et 7,7. Il subit des variations physiologiques selon la saison, la fréquence des éjaculations et la concentration. Un pH supérieur à 7,7 indique souvent une infection ou une inflammation de l'appareil génital interne, une contamination par de l'urine ou un autre produit alcalin tel que le savon ou une éjaculation incomplète. Le pH peut

également être affecté par la méthode de récolte et par le type de lubrifiant éventuellement utilisé. Les changements de pH et d'osmolarité provoqués par l'urospérme ont un effet négatif sur la mobilité des spermatozoïdes (Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005).

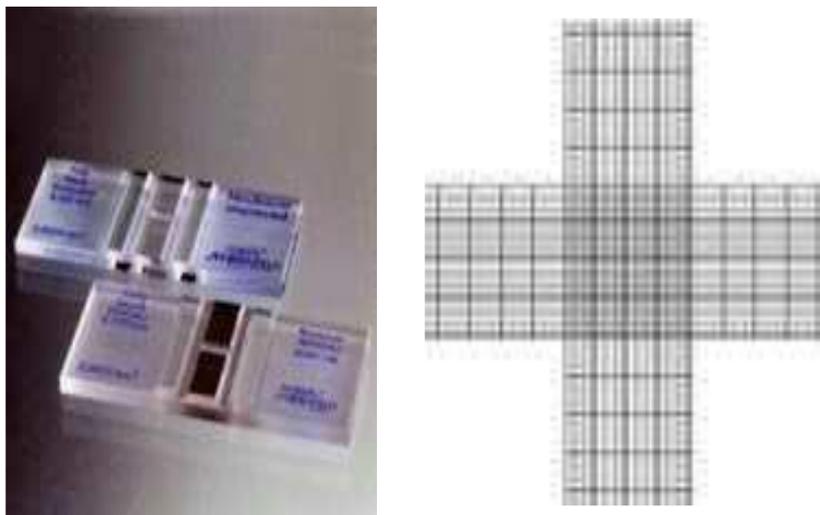
#### IV-4– Détermination de la concentration en spermatozoïdes :

La mesure de la concentration en spermatozoïdes de l'échantillon permet de calculer le nombre total de spermatozoïdes de l'éjaculat. Elle se réalise selon trois techniques principales: la cellule hématimétrique, le spectrophotomètre et le compteur électronique de particules (Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005).

##### IV-4.1 – Utilisation de la cellule hématimétrique :

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

L'utilisation de la cellule hématimétrique (cellule de Thoma (**figure 22**) ou cellule de Malassez) est assez fiable lorsque la dilution (en général au 1/100<sup>ème</sup>) est faite de façon précise à l'aide d'une pipette de dilution pour le comptage des leucocytes et des plaquettes (l'Unopette system®).



**Figure18 : cellules de Thoma (d'après les laboratoires Fiers) : les spermatozoïdes présents dans les grands carrés sont comptés.**

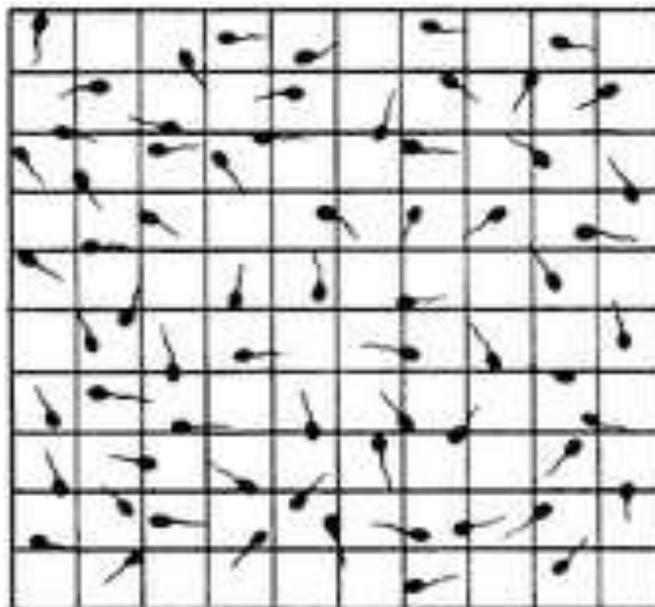
Les étapes de la préparation sont les suivantes (**Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005**) :

- Après avoir bien agité l'échantillon, le sperme est aspiré par capillarité jusqu'à la graduation 1.
- La pipette est ensuite remplie jusqu'à la graduation 100 avec une solution formolée.
- La semence ainsi diluée est mélangée en retournant la pipette puis placée au niveau des deux chambres des cellules de Toma (après avoir éliminé les cinq premières gouttes).

La lame est laissée à sédimenter pendant 5 à 10 minutes avant de commencer le comptage.

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

De nombreux laboratoires réalisent leurs comptages sur un nombre bien plus important de carrés, afin d'avoir une mesure plus juste.



**Figure 19 :représentation de l'image obtenue lors de l'observation des spermatozoïdes sur une cellule de Thoma (d'après Milian Swiss)**

#### **IV-4.2 – Utilisation du spectrophotomètre :**

L'acquisition d'un spectrophotomètre est justifiée pour les praticiens spécialisés ou les grands haras, surtout quand l'insémination artificielle est utilisée. Cette technique est basée sur la corrélation entre la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et sa concentration. Les spectrophotomètres peuvent être plus ou moins sophistiqués et doivent être calibrés pour le sperme d'étalon. La courbe standard est généralement établie à l'aide de dilutions sériées d'un échantillon donné dont la concentration est calculée à l'aide d'une cellule hématimétrique. L'appareil est calibré pour une utilisation avec une lumière d'une longueur d'onde de 550 nm. Un réétalonnage régulier des appareils est nécessaire. L'estimation de la concentration en spermatozoïdes d'un éjaculat par mesure de la densité optique doit être considérée comme assez juste et utilisable en routine pour la préparation de doses d'insémination, mais pouvant être soumise à des biais de mesure (**Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005**).

#### **IV-4.3 – Utilisation du compteur de particules :**

La concentration du sperme peut être déterminée à l'aide d'un appareil comptant des particules de taille connue (« Coulter counter » tels que le SpermCue®, le modèle 10 spermcounter® ou le Micro-Reader®). Cette méthode est surtout utilisée dans les laboratoires de recherche. Les analyseurs informatisés de la semence sont capables de donner la concentration de l'échantillon lorsque le volume utilisé est précis et l'appareil bien calibré (**Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005**).

#### **IV--4.4 – Détermination du nombre total de spermatozoïdes par éjaculat :**

Le nombre total de spermatozoïdes de l'éjaculat, calculé en multipliant son volume par la concentration, est un paramètre important pour évaluer la fertilité d'un étalon. Il est soumis

À des variations saisonnières, mais dépend également de nombreux facteurs tels que la fréquence des prélèvements et donc des éjaculations, l'âge, la taille des testicules, le rendement de la fonction de spermatogenèse (c'est-à-dire la quantité de spermatozoïdes produits par unité de poids de testicule), la quantité de spermatozoïdes contenus dans le réservoir extra gonadique que constitue la queue de l'épididyme, et les différentes affections génitales possibles.

Le nombre total de spermatozoïdes dans un éjaculat d'un étalon mature est en général compris entre 4 et 12 milliards. Chez les étalons pour lesquels un faible nombre de spermatozoïdes est dénombré dans l'éjaculat, il est conseillé de chercher à évaluer la production

spermatique journalière (DSO ou « Daily Sperm Output »). Pour cela, un prélèvement de sperme quotidien est réalisé pendant 7 à 10 jours de suite avec une mesure du nombre total de spermatozoïdes dans chacun des éjaculats. Une fois que la réserve extra gonadique en spermatozoïdes s'est stabilisée (4 jours pour les étalons ayant de petits testicules et 5 à 6 jours pour ceux ayant de gros testicules), il est possible d'estimer la DSO en faisant la moyenne du nombre de spermatozoïdes des éjaculats recueillis pendant 3 jours consécutifs. Lors d'une utilisation régulière comme reproducteur, l'étalon devrait ainsi pouvoir éjaculer chaque jour ce nombre de spermatozoïdes. Cette production quotidienne de

Spermatozoïdes par les testicules varie en fonction de la saison, de l'âge, de la taille des testicules, et de la présence ou non de troubles de la fonction testiculaire (**Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005**).

#### **IV-5 – Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes :**

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

##### **IV5.1 – Méthode classique :**

###### **IV -5.1.1 – Dilution :**

La mobilité des spermatozoïdes est d'abord évaluée au niveau de la semence « pure » (non diluée) afin de déterminer un éventuel effet délétère du dilueur de semence sur la semence : elle apporte une indication de la performance des spermatozoïdes dans leur milieu naturel. Elle peut cependant être difficile à évaluer lors de concentration spermatique élevée de par l'agglutination de spermatozoïdes sur la lame de verre. La mobilité des spermatozoïdes est ensuite évaluée après dilution de la semence dans un dilueur adapté. La fiabilité et la répétabilité de cette évaluation sont ainsi généralement nettement améliorées. Il est préférable d'effectuer une dilution à une concentration définie (par exemple 20 millions de spermatozoïdes par millilitre) à l'aide d'un dilueur de semence identique afin de limiter les biais d'observation (**Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005**).

###### **IV-5.1.2 – Evaluation visuelle :**

L'évaluation visuelle de la mobilité des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante et comporte une estimation de :

- la mobilité totale, à savoir le pourcentage de spermatozoïdes mobiles

- du pourcentage de spermatozoïdes fléchants, à savoir de spermatozoïdes présentant une trajectoire linéaire rapide - la vitesse des spermatozoïdes : une note est attribuée (0=immobiles à 4=rapides)

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

#### **IV5.1.3 – Conservation de la semence :**

La mobilité peut être affectée par des conditions environnementales défavorables (températures excessives, lubrifiants, désinfectants, osmolarité ou pH de la solution de dilution). Il est donc indispensable de protéger la semence de ces conditions extérieures avant l'analyse. L'évaluation de la conservation de la mobilité se fait sur plusieurs échantillons dilués à 20 millions de spermatozoïdes par millilitre conservés à température ambiante (20-25°C) et réfrigérés (4-6°C). La conservation de la mobilité est améliorée dans la durée pour le sperme réfrigéré. Le « Manuel d'évaluation de la qualité du sperme d'étalon » publié par la Société de Theriogenology (**Pesch et al., 2006**) considère qu'un échantillon de sperme conservé à l'abri de la lumière, à température ambiante pendant 6 heures s'il est « pur » ou pendant 24 heures s'il est « dilué », doit avoir une mobilité minimale de 10% (**Blanchard, 2003, Tibary et Bakkowy, 2005**).

#### **IV-6 – Etude morphologique des spermatozoïdes :**

##### **6.1 – Diversité des méthodes possibles :**

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

##### **IV6.1.1 – Les différents colorants :**

Les colorants cytologiques classiques à usage multiple, comme le Wright's, le Giemsa, l'hématoxyline-éosine, sont utilisés pour mettre en évidence les cellules germinales ou somatiques sur les frottis de sperme. Ils permettent une coloration différentielle des différentes

parties du spermatozoïde et une identification d'autres éléments cellulaires telles que les bactéries ou les leucocytes. Une modification de la coloration Giemsa/Wright est disponible dans le commerce et permet la coloration de frottis en quelques secondes par passage des lames dans trois solutions différentes : solution de fixation, solution d'éosine Y et solution de bleu de méthylène (**Tibary et Bakkowy, 2005**).

Les colorants de fond, comme l'éosine-nigrosine ou l'encre d'Inde, sont les colorants les plus largement employés de par leur facilité d'utilisation. Une goutte de sperme et une goutte de colorant sont mélangées sur la lame avant d'être étalées pour obtenir un frottis qui est séché à l'air puis observé au microscope avec objectif à immersion.

La visualisation des détails de la structure du spermatozoïde est considérablement améliorée par fixation des cellules dans une solution tamponnée de formol ou dans un fixatif similaire tel que le glutaraldéhyde (**Wessel et Althouse, 2006**), ainsi que par l'utilisation d'un montage en milieu humide avec un microscope à contraste de phase ou un microscope à contraste interférentiel.

La coloration à l'éosine-nigrosine est utilisée pour l'étude morphologique des spermatozoïdes ainsi que pour la détermination du taux de spermatozoïdes vivants et morts. Ce colorant est constitué d'un mélange à parts égales d'une solution d'éosine à 5% et d'une solution de nigrosine à 10%. Les spermatozoïdes vivants apparaissent blancs alors que ceux qui sont morts sont colorés en rouge ou rose suite à la perméabilité de leur membrane à l'éosine. La coloration à l'encre de chine est une préparation permettant d'avoir un meilleur contraste entre les spermatozoïdes (blanc) et la lame (fond noir), (**Tibary et Bakkowy, 2005**).

#### **IV 6.1.2 – La microscopie électronique :**

L'observation du spermatozoïde au microscope électronique, à transmission ou à balayage, est parfois nécessaire pour caractériser une anomalie à un plus fort grossissement que celui apporté par la microscopie optique. Cette technique offre un fort pouvoir de résolution pour l'observation des détails morphologiques et permet ainsi un examen structural approfondi.

Elle a été utilisée avec succès pour identifier et décrire avec précisions les anomalies ultra structurales au niveau de l'acrosome, de la jonction entre la tête et la pièce intermédiaire et au niveau des microtubules de l'axonème.

Le nombre de spermatozoïdes observables à l'aide de cette technique est limité d'où la nécessité que l'anomalie suspectée soit très fréquente dans l'échantillon (**Tibary et Bakkowy, 2005**). La microscopie à balayage apporte une vision en trois dimensions des spermatozoïdes alors que la microscopie électronique à transmission permet l'observation en coupes de l'ultrastructure interne des spermatozoïdes (**Blanchard, 2003 ;Tibary et Bakkowy, 2005**).

La préparation de la semence est la suivante (Jasko et al.1991) :

(1) le sperme est fixé dans une solution de glutaraldéhyde 4% - cacodylate sodium à 0.1 mol/l, à pH 7,4, contenant du sucrose 5%, pendant une heure

(2) les échantillons sont lavés trois fois à l'aide d'une solution tampon cacodylate à 0.1 mol/L puis fixés au tétroxyde d'osmium 1% - cacodylate 0.1 mol/L pendant une heure

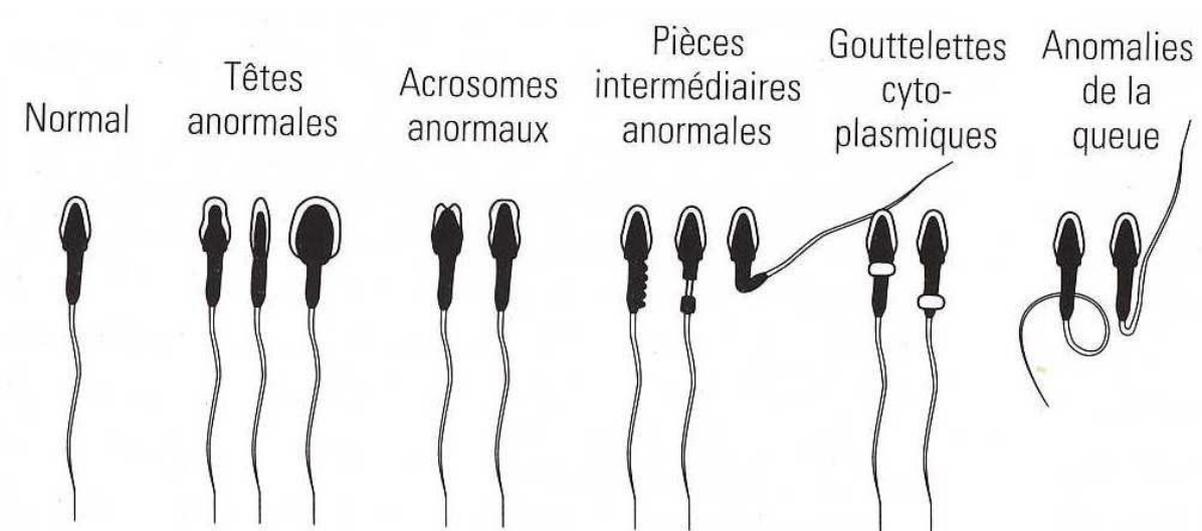
(3) trois lavages avec le tampon cacodylate sont ensuite réalisés et les échantillons sont déshydratés par passage successifs dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes

(4) l'inclusion se fait dans le Polybed 812 ND et les coupes sont montées sur une grille de nickel et colorées à l'aide d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb.

#### **IV6.2 – Evaluation et classification :**

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont traditionnellement classées en anomalies primaires, secondaires et tertiaires. Les anomalies primaires sont considérées comme celles résultant d'une perturbation au cours de la spermatogenèse et par conséquent ayant une origine testiculaire. Les anomalies secondaires auraient pour origine des altérations au moment de leur passage dans les voies génitales excrétrices. Les anomalies tertiaires se produiraient *in vitro*, du fait d'une mauvaise technique de récolte ou d'une mauvaise manipulation au laboratoire. Un minimum de 100 spermatozoïdes doit être observé pour évaluer ces défauts de morphologie (**Blanchard, 2003 ; Varner, 2008**).

A l'heure actuelle, la classification consiste à répertorier les spermatozoïdes en fonction de la localisation de l'anomalie observée : têtes détachées sans queue, têtes anormales, acrosomes en bouton, gouttelettes cytoplasmiques proximales ou distales, pièces intermédiaires pliées ou irrégulières, queues coudées ou enroulées. Cela permet une observation plus explicite et plus représentative de l'ensemble des spermatozoïdes tout en évitant les hypothèses plus ou moins erronées sur l'origine de tel ou tel défaut. De plus, certaines anomalies morphologiques comme le détachement de tête peuvent être primaire, secondaire, ou tertiaire d'où des erreurs d'interprétation évitées. Aussi un choc osmotique peut provoquer une coudure ou un enroulement de la queue du spermatozoïde et donc être abusivement interprété comme étant une anomalie morphologique secondaire, quand bien même il s'agit d'une anomalie tertiaire (**Blanchard, 2003 ; Varner, 2008**).



**Figure20: représentation schématique des anomalies chromosomiques possibles  
(Blanchard, 2003)**

#### **IV-6.3 – Interprétation de la qualité de la semence :**

L'examen morphologique fournit des informations sur les caractéristiques individuelles des spermatozoïdes. Ce renseignement est important car la semence peut posséder une bonne mobilité avec des spermatozoïdes ayant des anomalies morphologiques. De plus, un étalon peut avoir de nombreux spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques sans que cela n'ait une incidence sur la fertilité. Un certain nombre de défauts morphologiques (gouttelettes cytoplasmiques ou queues anormales) semble n'avoir que peu d'effet sur la fertilité alors que d'autres (pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement anormaux, têtes détachées,

anomalies de forme de la tête, pièces intermédiaires pliées ou irrégulières, queues enroulées et cellules germinales prématurées) ont Un effet délétère sur la fertilité (**Love et al., 2000**).

La variation au niveau de la morphologie des spermatozoïdes au cours de la saison de monte pour un même étalon peut être importante, sans que cela n'affecte sa fertilité (**Love et al., 2000**).

Ainsi, l'observation morphologique des spermatozoïdes dans le cadre de la prédiction de la fertilité d'un étalon doit être interprétée avec prudence : certains étalons peuvent avoir un grand nombre de spermatozoïdes anormaux alors que leur exploitation comme reproducteur permet d'enregistrer des taux élevés de gestations. De plus, étudier la fertilité prévisible d'un étalon sur une saison de monte à partir d'un unique prélèvement est réducteur et conduit à de mauvaises interprétations. En général, un spermatozoïde à morphologie anormale n'exerce pas une influence directement négative sur un spermatozoïde normal.

Par conséquent, le nombre total de spermatozoïdes morphologiquement normaux dans un éjaculat donne une meilleure information sur la fertilité d'un étalon que le pourcentage ou le nombre absolu de spermatozoïdes morphologiquement anormaux. En général, le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux dans un échantillon de semence est similaire au pourcentage de spermatozoïdes progressivement mobiles (**Blanchard, 2003**).

### **Conclusion**

Les tests d'évaluation de la semence équine dits de routine, c'est-à-dire utilisés classiquement, sont les suivants :

- l'évaluation macroscopique de la semence (volume, couleur, pH)
- la détermination de la concentration en spermatozoïdes avec l'utilisation de la cellule hématimétrique, de la spectrophotométrie ou de compteurs de particules
- l'estimation de la mobilité des spermatozoïdes par évaluation visuelle de la semence après dilution
- la morphologie des spermatozoïdes grâce à diverses colorations de la semence

En se basant sur la bibliographie consultée, il s'avère que les techniques utilisées sur le terrain sont bien maîtrisées mais ne permettent qu'une évaluation restreinte des paramètres de la semence (concentration, morphologie, mobilité des spzs).

## **Références bibliographiques**

## **Références bibliographiques**

- ✓ *Baronne R., (2001). Chapitre II : Appareil génital mâle. In : Anatomie compare des - mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie II. Vigot , 83-250.*
- ✓ *Blanchard TL., (2003). Manual of equine reproduction. 2<sup>nd</sup> edition. Mosby*
- ✓ *Heymon Y., Vignon X., (2005). Reproduction des animaux d'élevage. Educagri*
- ✓ *Jasko DJ, Sawyer HR, Squires EL., (1991). Identification of degenerative germ cells in semen from a Quarter Horse stallion. Journal of Equine Veterinary Science; 11:283-286.*
- ✓ *Knobil E, Neill JD., (1999). Spermatozoa. In: Encyclopedia of Reproduction. Volume 4 (Pro-Z). ;586-596.*
- ✓ *Love CC, Varner DD, Thompson JA. (2000). Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. Journal of Reproduction and Fertility Supplement; 56:93-100.*
- ✓ *Pesch S, Bergmann M, Bostedt H., (2006). Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. Theriogenology; 66:307-13.*
- ✓ *Tibary A, Bakkowy, M. (2005). Reproduction equine. Tome II: l'étalon. Actes*
- ✓ *Thibault C., (2001). La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses*
- ✓ *Varner, DD (2008). Developments in stallion semen evaluation. Theriogenology; 70:448-62.*
- ✓ *Wessel MT, Althouse GC., (2006) Validation of an objective approach for simultaneous assessment of viability and motility of fresh and cooled equine spermatozoa. Animal Reproduction Science; 94:21-2.*



