



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Ibn Khaldoun–Tiaret**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département De Nutrition Et Technologie Agro-alimentaire**

Mémoire de fin d'études

**En vue de l'obtention du diplôme de Master académique**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie (D04)

Filière : Sciences Agronomiques

**Spécialité : Production Animale**

**Thème**

***Etude de la qualité de la semence équine congelée,  
après dégel, au CNIAAG, de Tiaret***

**Présenté par :**

**DJEBBOUR Nacera**  
**MAIZI Fatima**  
**BENSAID Hadjira**

**Devant le Jury :**

Président :	Mme MAKHLOUFI .C	MCA
Examineur 01 :	Mme OUABED A.	Pr
Examineur 02 :	Mme MELIANI S.	MCA
Encadreur :	Mr NIAR A.	Pr.
Co-encadreur :	Mme BELKHODJA .K	Directrice

**Année universitaire 2019-2020**

# Remerciements

*Nous remercions Dieu Le Tout Puissant, qui nous a donné la force, la volonté, et le courage De finaliser ce travail.*

*Nous exprimons toute notre gratitude et notre profond respect vis-à-vis de notre promoteur Pr. A.NIAR qui malgré ses lourdes tâches n'a cessé de*

*Nous encourager et de nous*

*Orienter par ses conseils, son aide, et surtout pour sa gentillesse.*

*Mme : KHADIDJA .B, notre Co-promotrice, qui nous aidé et facilité la tâche et surtout sa compréhension.*

*Nous remercions également tous les vétérinaires qui nous ont aidé dans cette enquête de recueil des informations.*

*Aussi nos cordiaux remerciements vont à la présidente et aux membres des jurys d'avoir accepté d'examiner ce travail :*

*Mme . MAKHLOUFI .C et Mme. OUABED .A et MELIANI. S*

*Nos vifs remerciements s'adresse à tous nos enseignants qui ont fait tout leur possible pour nous donner les connaissances nécessaires.*

*Et spécialement « M. ACHIR ET M. GUEMOUR»*

*Que tout ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail trouve ici l'expression de toute notre gratitude.*

## Dédicaces

*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 Amon père et ma mère et qu'ils trouvent  
ici.*

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

*Qu'Allah me les garde*

*Je dédie également à tous ceux qui m'aiment et spécialement à  
Mes adorables Sœurs «Sara . Souhila. Naima . Torkia . Bakhta »*

*A toute la famille djebbour sans exception.*

*A mon encadreur Pr. NIAR. A Qui mérite tous mon respect et tribut.*

*A mes collègues dans ce travail, mes amies et mes sœurs : FATIMA et  
HADJER*

*Pour Mes Amies « Hadjer, Hanane ,Donia ,Asma ch , torkia ,  
khadidja .fatima . hanaa .hadjira. nessrine »*

*Et bien sûr mes beaux petits « khalidou , ilyass »*

*Et mon 2<sup>ème</sup> Père « benali »*

*Enfin, je dédie ce travail à toute personne qui m'a aidé de le réaliser*

*De près ou de loin sans exception.*

*Djebbour nacera*

## Dédicaces

*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 Amon père : Aek et ma mère :Aicha, et qu'ils  
trouvent ici.*

*Toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études  
Qu'Allah me les garde*

*Je dédie également à tous ceux qui m'aiment et spécialement à  
Mes adorables Frères «belgacem ,aida ,lkhdem ,halima,chahinez ,saliha ,  
djawad, khalidou .»*

*A toute la famille Maizi et Sadjì sans exception.*

*A mon encadreur Pr. NIAR. A Qui mérite tous mon respect et tribut.*

*A mes collègues dans ce travail, NACERA et HADJER*

*Pour Mes Amies «asma ,soade ,hanane ,iman ,khadidja , zohra.»*

*Et bien sur mon mari : Ali*

*Enfin, je dédie ce travail à toute personne qui m'a aidé de le réaliser*

*De près ou de loin sans exception.*

*Maizi Fatima*

## Dédicaces

*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 Amon père : qui me manque tellement , mais... que je garde  
dans mon cœur a tout jamais. j'ai toujours rêvés de te partager ce  
moment..... « rabi yerahmou » et ma mère : khaira et qu'ils trouvent ici.*

*Toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études  
Qu'Allah me les garde*

*Je dédie également à tous ceux qui m'aiment et spécialement à  
Mes adorables Frères Spécialement «mohamed boussmaha » et mes  
sœurs « meriem, rachida..... »*

*Mes petits « younes , zakaria et tous les autres » A toute la famille  
Bensaid sans exception.*

*A mon encadreur Pr. NIAR. A er M Saleh. Qui mérite tous mon respect  
et tribut.*

*A mes collègues dans ce travail, et mes chéries « NACERA, FATIMA »  
et les autres collègues de promo de production animal . Pour Mes Amies  
«nabila, khadidja.»*

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

*Bensaid Hadjira*

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**IA** : Insémination Artificielle.

**SPZ** : spermatozoïdes.

**MIN** : Minute.

**ML** : Millilitre.

**PSA** : Agglutine de carahuéte.

**AQPS** : Autre Que Pur-Sang.

**VOL** : Volume.

**ANS** : Année.

**LDL** : Low Density Lipoprotein.

**DMSO** : Diméthyl Sulfoxyde, cryoprotecteur.

**PMS** : Progressive motile sperme.

**CASA** : computerized Assisted Sperm Analysis.

**INRA** : Institut National de la recherche agronomique.

**CNIAAG** : Centre National Insémination Artificielle Amélioration Génétique.

**IMV** : Intoxications Médicamenteuses Volontaires.

**INRA 96** : milieu de conservation de semence équine fraiche.

**G** : Gravité.

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Schéma de la conformation interne du testicule et de l'épididyme. (Barone, 2001).....	4
<b>Figure 02</b> : Coupe transversale du pénis du Cheval, au niveau de la partie moyenne du pénis.(Barone, 2001).....	6
<b>Figure 03</b> : Mannequin de récolte pour les étalons (d'après IMV technologies France).....	15
<b>Figure 04</b> : Différents compartiments et montage d'un vagin artificiel (d'après IMV technologies France).....	15
<b>Figure 05</b> : Différents types de vagin artificiel (d'après IMV technologies France)....	16
<b>Figure 06</b> : Annexe du CNIAAG, Jumenterie Chaou Chaoua de Tiaret.....	27
<b>Figure 07</b> : Présentation des étalons des deux races (Barbe et Pur-sag Arabe).....	28
<b>Figure 08</b> : Préparation de vagin artificiel de type « Missouri ».....	29
<b>Figure 09</b> : préparation d'étalon.....	30
<b>Figure 10</b> : La récolte de la semence.....	30
<b>Figure 11</b> : Observation microscopique de la semence de deux étalons.....	32

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Caractéristiques principales du sperme d'étalon (Dowsett et Pattie , 1987 cité par Nicholich, 1989).....	11
<b>Tableau 02</b> : Quelques caractéristiques du sperme de différentes races d'étalons de sport (Dowsett et Pattie , 1987 cité par Nicholich, 1989).....	12
<b>Tableau 03</b> : Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction de l'âge ( Dowsett et Pattie , 1987 cité par Nicholich, 1989).....	13
<b>Tableau 04</b> : Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction de la saison (Dowsett et Pattie , 1987 cité par Nicholich, 1989).....	13
<b>Tableau 05</b> : Composition des dilueurs de centrifugation et de congélation « allemands » utilisés pour la congélation du sperme équin (Blanchard TL. et al., 2005).....	24
<b>Tableau 06</b> : Composition des dilueurs de centrifugation et de congélation à base de lait écrémé utilisés pour la congélation de sperme équin (Blanchard TL. et al., 2005).....	24
<b>Tableau 07</b> : présentation des résultats d'évaluation de la qualité de la semence des deux étalons à la récolte.....	37
<b>Tableau 08</b> : Les valeurs de la motilité après décongélation (%).....	38



## 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 de deux étalons de race différente, l'un d'eux est de la race 'Barbe', et le second est de la race 'Pur-sang Arabe'. Après leur récolte au vagin artificiel, la semence des deux étalons a été filtrée, puis analysée afin de déterminer leurs caractéristiques (concentration en spermatozoïdes, mobilité). La semence a d'abord été diluée une première fois avec le premier milieu à base de lait ou avec des composants à base de lait et ne contenant pas un agent cryoprotecteur. Cette semence fraîche peut se conserver à une température allant de 5 à 20°C.

En vue d'une meilleure conservation et à long terme, la semence peut être congelée. On utilise souvent le milieu « INRA 96 + 2% de jaune d'œuf », afin d'améliorer la protection de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Cette semence peut être entreposée après sa congélation dans de l'azote liquide -196°C. 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 parfois 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.

**Mots clés :** Semence, congélation, décongélation, évaluation, INRA 96, fertilité, étalon.

## ملخص

من أجل معرفة آثار التجميد على خصوبة السائل المنوي للخيل المستخدم في التلقيح الاصطناعي ، قمنا بجمع السائل المنوي لفحلين من سلالتين مختلفتين ، أحدهما من السلالة "البربرية" ، والثاني من سلالة " العربي الاصيل". بعد جمع بذور الفحل في المهبل الاصطناعي، تم ترشيح السائل المنوي للفحل، ثم تحليله لتحديد خصائصه (تركيز الحيوانات المنوية ، الحركة). تم تخفيف السائل المنوي لأول مرة باستخدام المحلول الأول الذي يتركز على الحليب أو احد مكوناته ولا يحتوي على مادة واقية من التجمد. يمكن تخزين هذه البذور الطازجة في درجة حرارة تتراوح من 5 إلى 20 درجة مئوية.

لتخزين افضل و طويل الامد , يمكن تجميد السائل المنوي و غالبا ما يستخدم وسط ( INRA 96 + 2% ) صفار البيض لتحسين حماية غشاء البلازما في الحيوانات المنوية. كما يمكن تخزين هذه البذور في -196 درجة مئوية من النيتروجين السائل. في وقت استخدامه يتم إذابة هذا السائل المنوي في حمام مائي عند 37 درجة مئوية لمدة 30 ثانية. بعد الذوبان يجب أن تنتقل إلى التقييم المجهرى لتقدير النسبة المئوية للحيوانات المنوية (قابلية التنقل ، والبقاء). نرى أحيانا نتائج غير متسقة بين حركة الحيوانات المنوية والخصوبة. يساعد استخدام وسائط التخفيف الجيدة في الحفاظ على حيوية الحيوانات المنوية ، مما يسمح لها بالحفاظ على قدرتها على التخصيب لفترة أطول.

**الكلمات المفتاحية :** الخصوبة ، فحول, INRA 96 , السائل المنوي ، التجميد ، الذوبان ، التقييم .

## Abstract

In order to know the effects of freezing on the quality of equine semen used in artificial insemination, we collected the semen of two stallions of different breed, one of them is of the breed 'Barbe', and the second is of the 'Arabian Thoroughbred' breed. After their harvest in the artificial vagina, the semen of the two stallions was filtered, then analyzed in order to determine their characteristics (sperm concentration, mobility). The semen was first diluted for the 1st time with the first milk-based medium or with milk-based components and not containing a cryoprotectant. This fresh seed can be stored at a temperature ranging from 5 to 20C °.

For better and long-term storage, the semen can be frozen. "INRA 96 + 2% egg yolk" medium is often used in order to improve the protection of the sperm plasma membrane. This seed can be stored after freezing in -196C ° liquid nitrogen. At the time of its use, this semen is thawed in a water bath at 37 ° C. for 30 seconds. After thawing, we must proceed to its microscopic evaluation in order to estimate the percentage of sperm (mobility, viability). We sometimes see inconsistent results between sperm mobility and fertility. The use of good dilution media helps keep spermatozoa vitality, which allows them to keep their fertilizing power for longer.

**Key words :** Semen, freezing, thawing, evaluation, INRA 96, fertility, Stallions.

# Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Abstract	
Introduction.....	1
CHAPITRE I : Anatomie et physiologie sexuelle.....	3
1.1 Anatomie de l'appareil reproducteur de l'étalon.....	3
1.1.1 Les testicules, l'épididyme et cordon spermatique.....	3
1.1.2 Le scrotum.....	4
1.1.3 La descente des testicules.....	5
1.1.4 Les glandes annexes.....	5
1.1.5 Le pénis.....	6
1.1.6 Le prépuce.....	6
1.2 Physiologie sexuelle de l'étalon.....	7
1.2.1 La saison sexuelle de l'étalon.....	7
1.2.2 Evaluation de la libido et de l'aptitude au chevauchement.....	7
1.2.3 Le mécanisme de l'érection.....	7
CHAPITRE II : La semence équine fraîche.....	9
2.1 Le sperme.....	9
2.1.1 Définition.....	9
2.1.2 Morphologie.....	9
2.1.3 Composition chimique.....	10
2.1.4 Caractéristiques.....	10
2.2 La sélection des étalons.....	14
2.3 Collecte du sperme.....	14
2.4 Dilution et conservation du sperme.....	16
2.4.1 Conservation du sperme frais.....	16
2.5 Examen et appréciation du sperme.....	18
2.6 Différents modes de conservation.....	19
CHAPITRE III : La cryoconservation de la semence équine.....	20
3.1 La cryoconservation.....	20
3.1.1 Définition.....	20
3.1.2 Principe.....	20
3.2 La cryoconservation dans l'espèce équine.....	21
3.3 Les agents cryoprotecteurs.....	21

3.3.1 Les cryoprotecteurs non pénétrants.....	22
3.3.2 Les cryoprotecteurs pénétrants.....	22
3.4 Dilution du sperme.....	23
3.5 Les dilueurs.....	23
3.6 Congélation du sperme de cheval.....	25
3.7 Décongélation des paillettes.....	25
3.8 Evaluation de la qualité de la semence congelée.....	26

## PARTIE EXPERIMENTALE.....27

I.Objectif.....	27
1 Matériel et méthodes.....	27
1.1 Lieux de l'expérimentation.....	27
1.2 Effectif de l'expérimentation.....	27
2 Déroulement des récoltes.....	28
2.1 La Préparation du vagin artificiel.....	28
2.2 La préparation d'étalon.....	29
2.3 La récolte.....	30
2.3.1 Evaluation des semences après la récolte.....	31
2.3.1.1 Examen macroscopique.....	31
a. Volume.....	31
b. Couleur et aspect.....	31
2.3.1.2 Examen microscopique.....	31
a. Mobilité massale.....	31
b. Mobilité individuelle.....	31
2.3.1.3 Les différents colorants.....	32
2.3.1.4 Filtration de l'éjaculat.....	33
3 Dilution de la semence.....	33
a. Décente de la température à 22°C.....	33
b. Décente de la température de 22°C à 4°C.....	33
4 Centrifugation.....	34
5 Conditionnement de la semence.....	34
6 Préparation du milieu de Cryo-congélation.....	34
6.1 Le Kenney modifié.....	34
6.2 Préparation de plasma du jaune d'œuf.....	35
7 Congélation des paillettes.....	35
8 Evaluation des paillettes après décongélation.....	36
8.1 Décongélation.....	36
8.2 Evaluation.....	36
8.3 Méthodes d'évaluation de la semence.....	36
9 Résultats.....	37
9.1 Evaluation de la qualité de la semence après récolte.....	37
9.2 Evaluation de la qualité de la semence après la décongélation.....	38
Discussion.....	39
Conclusion	
Référence bibliographique	

## Introduction

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

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

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

Les étalons sont très inégaux dans l'aptitude de leur semence à résister à la conservation. Aujourd'hui encore, la qualité d'un éjaculat est estimée le plus fréquemment par la mesure de la mobilité des spermatozoïdes. Toutefois, la corrélation

qui existe entre ce critère et la fertilité reste insuffisante pour satisfaire à la fois les besoins de la recherche et les centres d'insémination (**chelik et Tiar, 2017**).

L'objectif de cette étude a été d'étudier l'effet de la congélation de la semence équine utilisée dans le cadre de l'insémination artificielle, sur la qualité des étalons.

Le présent mémoire est réparti en deux parties :

- Une synthèse bibliographique agencée en trois chapitres :
  - un premier qui aborde un rappel sur l'anatomie et la physiologie de l'appareil reproducteur chez les équidés ;
  - un deuxième qui traite des notions sur la semence équine ;
  - Un troisième consacré à la cryoconservation de la semence équine
- Une deuxième partie expérimentale dans laquelle nous présentons analytiquement les résultats de notre recherche.

# **CHAPITRE I : Anatomie et physiologie sexuelle**

## **1.1 Anatomie de l'appareil reproducteur de l'étalon :**

Les organes sexuels de l'étalon comprennent deux testicules et l'équivalent du tractus génital femelle, c'est-à-dire le canal qui relie les gonades au milieu extérieur. Cependant chez l'étalon ces canaux relient les gonades à l'urètre, voie commune au niveau du pénis, à l'émission des urines et à l'éjaculation du sperme. Les glandes annexes contribuent, par leurs sécrétions apportées aux spermatozoïdes pendant leur migration dans les canaux, à constituer cette sécrétion laiteuse blanchâtre appelée sperme (**Tibary et Bakkowy, 2005**).

### **1.1.1 Les testicules, l'épididyme et cordon spermatique :**

Les testicules ont une forme grossièrement ovale, aplatie ; ils présentent ainsi deux faces, deux bords et deux pôles. chez le cheval adulte, les testicules sont situés dans le scrotum dont le bord inférieur est libre, leur bord supérieur étant fixé à une membrane contenant l'épididyme.

Chaque testicule a une longueur d'environ 12 cm, une largeur de 5 cm, une hauteur de 7cm d'un bord à l'autre et un poids de 300 g. Ces caractéristiques varient en fonction des sujets, et de leur degré de maturité, tandis que le testicule gauche est souvent légèrement plus gros que le droit.

L'épididyme est fixé au bord supérieur du testicule et déborde légèrement sur sa face externe. Sa partie antérieure renflée constitue la tête, et sa partie postérieure également renflée mais à un moindre degré, la queue. La partie intermédiaire est le corps de l'épididyme. La tête est étroitement reliée aux canaux qui proviennent des testicules, et la queue est prolongée par le conduit principal ou canal déférent, élément du cordon spermatique qui amène les spermatozoïdes des testicules à l'urètre.

Le cordon spermatique s'étend de l'anneau inguinal au niveau de la paroi abdominale, au testicule dans le scrotum sous-jacent. Il est constitué par une artère, des veines, des vaisseaux lymphatiques, le canal déférent, un muscle et une fine membrane externe qui recouvre aussi l'épididyme et les testicules.

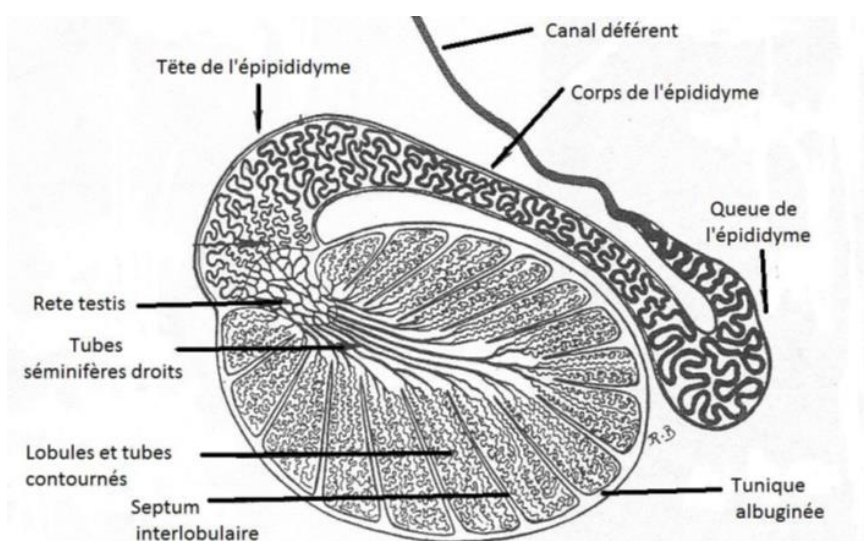
Sous cette membrane qui entoure le testicule se trouve une forte capsule dont l'incision laisse apparaître la glande de couleur gris-rosé et de consistance molle. Le testicule est divisé en compartiments par des cloisons de tissu conjonctif et l'élément musculaire.



Les compartiments ou lobules sont formés de tubes séminifères, de très fins canaux sinueux se terminant en cul de sac à une extrémité, et s'unissant de l'autre à des tubules pour former des tubes droits plus larges.

En résumé, les spermatozoïdes sont produits dans le testicule, stockés dans l'épididyme ou ils « mûrissent » et projetés au moment de l'éjaculation dans le canal déférent et l'urètre, avec le liquide séminal et la substance colloïdale produits par les glandes annexes (Tibary et Bakkowy, 2005).

La figure ci-dessous représente de manière schématique la structure du testicule et de l'épididyme de l'étalon.



**Figure 01 :** Schéma de la conformation interne du testicule et de l'épididyme (Barone, 2001).

### 1.1.2 Le scrotum

Le scrotum renferme les deux testicules. Il est constitué d'une peau fine et élastique qui contient des glandes sébacées et sudoripares. La couche moyenne est formée de tissus élastique et de fibres musculaires lisses, sous laquelle se trouve une couche de tissu conjonctif tapissée sur sa face profonde d'une extension de la tunique vaginale, fine membrane qui entoure également le testicule et lui permet de se mobiliser librement dans scrotum. Les testicules peuvent se rétracter par contraction du muscle du cordon spermatique et de la couche musculaire du scrotum. Ainsi par temps froid, lors des efforts ou en cas de danger, les testicules peuvent-ils être amenés à la partie basse du canal inguinal (Tibary et Bakkowy, 2005).

### **1.1.3 La descente des testicules**

C'est au cours de la période initiale de la vie fœtale que les testicules se développent au plafond de la cavité abdominale, au contact de chaque rein correspondant. Plus tard, ils vont effectuer une migration qui va leur faire franchir l'anneau inguinal ouvert dans la paroi abdominale, et de là, gagner le scrotum. Chaque testicule est précédé d'un repli de péritoine qu'il entraîne avec lui à travers l'anneau inguinal et qui va faire partie, avec le muscle déjà mentionné, du cordon spermatique.

Les facteurs mécaniques responsables de la migration des testicules sont mal connus. Les ligaments appendus aux testicules et à l'épididyme peuvent par rétraction progressive, contribuer à guider les testicules et l'épididyme dans leur descente à travers la paroi abdominale. L'élévation de la pression intra-abdominale peut aussi jouer un rôle. Les deux testicules sont en général présents dans le scrotum ou dans le canal inguinal à la naissance du poulain, mais il est probable qu'ils peuvent circuler librement dans le canal inguinal pendant des semaines voire des mois après le poulinage, chez certains sujets dont l'anneau inguinal reste perméable. Pour bon nombre de pur-sang l'un des testicules peut être plus petit, et demeurer dans le canal inguinal jusqu'à ce que le poulain atteigne 5 ans.

Dans d'autres cas, l'un des testicules – ou les deux - peut être définitivement retenu dans la cavité abdominale, affection appelée monorchidie - ou cryptorchidie -, le cheval étant qualifié de « monorchide » ou de « cryptorchide ». Le testicule resté dans la cavité abdominale est petit de consistance molle, flasque et incapable de produire des spermatozoïdes.

L'un des testicules peut ne descendre ou ne « tomber » dans le scrotum qu'à l'âge de 3 - 4 ou même 5 ans. Dans ce cas, le testicule « manquant » est habituellement perçu dans le canal inguinal (**Tibary et Bakkowy, 2005**).

### **1.1.4 Les glandes annexes**

Les glandes annexes comprennent les vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales. Elles apportent les sécrétions et les substances qui avec les spermatozoïdes formeront le sperme. Les vésicules séminales sont des sacs allongés, situés de part et d'autre de la face dorsale de la vessie. Leur longueur atteint environ 20 cm ; un canal amène leurs sécrétions dans le canal déférent.

La prostate est une glande lobulée, située au niveau du col vésical et à la partie initiale de l'urètre.

Elle est constituée de deux lobes latéraux reliés par un isthme. Deux glandes bulbo-urétrales, de part et d'autre de l'urètre, ont une forme ovale et mesurent à peu près 4 cm de long et 2,5 cm de large (Tibary et Bakkowy, 2005).

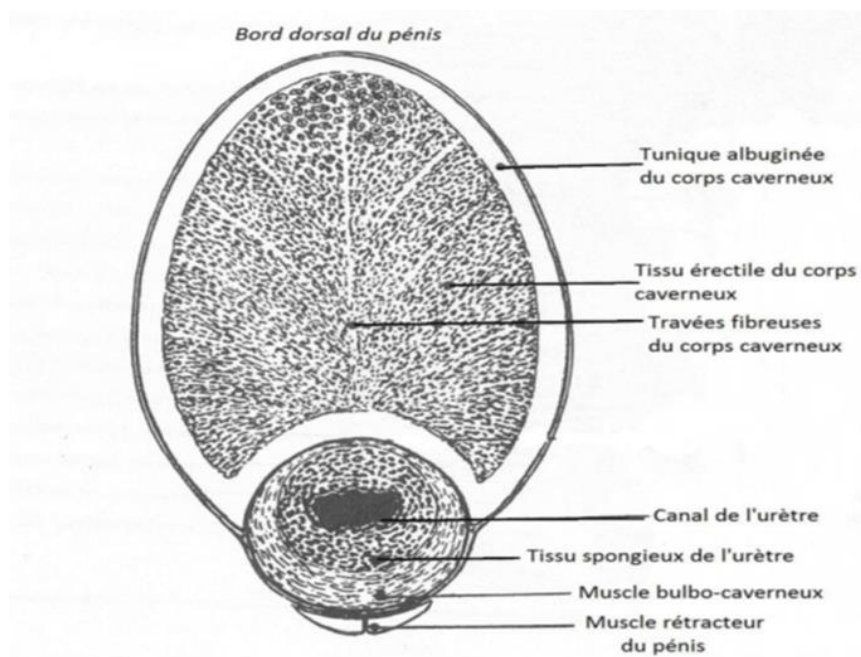
### 1.1.5 Le pénis

Le pénis, organe copulateur male, est constitué d'un tissu spongieux érectile. Sa forme est celle d'un cylindre aplati latéralement. L'orifice urétral et son sinus sont des zones importantes pour les prélèvements des micro-organismes responsables de maladies vénériennes, tels Klebsiella ou l'agent de la métrite contagieuse équine. Des traumatismes du pénis peuvent entraîner hémorragies, œdèmes douloureux et déformations (Tibary et Bakkowy, 2005).

### 1.1.6 Le prépuce

Le prépuce est une double invagination de la peau qui recouvre la portion libre du pénis au repos. Le smegma est une substance d'odeur forte et désagréable qui peut s'accumuler en très grande quantité. Les glandes qui le produisent ont une grande importance pratique : elles sont susceptibles d'abriter des agents responsables de maladies vénériennes (Tibary et Bakkowy, 2005).

La figure ci-après représente la structure interne du pénis chez le cheval.



**Figure 02 :** Coupe transversale du pénis du Cheval, au niveau de la partie moyenne du pénis (Barone, 2001).

## **1.2 Physiologie sexuelle de l'étalon**

### **1.2.1 La saison sexuelle de l'étalon**

L'étalon peut se reproduire physiologiquement toute l'année mais de part 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**).

### **1.2.2 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 œstrus : 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 réflexe du flehmen (retroussement de la lèvre supérieure en réaction initiale au flairage de la région génitale ou de l'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.

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 et al., 2003**).

### **1.2.3 Le mécanisme de l'érection**

L'érection est contrôlée par le système nerveux autonome. Le mécanisme de l'érection est ensuite purement vasculaire. Les cavités du tissu érectile se remplissent de sang et la longueur du pénis passe alors de 60 à 90 cm. On observe également une augmentation du diamètre de la partie renflée du gland (10 cm de diamètre). Le système orthosympathique, via le nerf hypogastrique, permet le remplissage des lacunes par le sang en agissant sur la vasomotricité du corps caverneux et a un rôle excito-sécrétoire sur les glandes annexes.

Le système parasympathique provoque l'érection du corps spongieux de l'urètre et du corps érectile du gland via le nerf érecteur (rameau du nerf honteux). Le nerf honteux assure l'innervation sensitive du périnée, du scrotum et du pénis ( **Blanchard, 2003. Heymon et Vignon, 2005**).

## CHAPITRE II : La semence équine fraîche

### 2.1 Le sperme

#### 2.1.1 Définition :

Le sperme d'étalon est composé par 93 % d'eau, 6 % de matière organique, 1 % de matière minérale. Son pH avoisine 7 à 7,8. Au point de vue éléments figurés, le spermatozoïde en est la base essentielle puisqu'il assure la fécondation. Il est véhiculé et nourri par le plasma séminal (**Jussiaux et Trillaud, 1977**).

#### 2.1.2 Morphologie

Comme tous les spermatozoïdes de mammifères, le spermatozoïde d'étalon comprend :

- La tête, formée :
  - du noyau (qui contient l'information génétique dans l'ADN fortement condensé)
  - de l'acrosome (contenant les enzymes nécessaires à la fécondation) avec une portion spécialisée de l'acrosome appelée segment équatorial.
- Le flagelle formé :
  - Du cou, point d'attachement du flagelle sur la tête, par un système de rotule.

C'est la pièce la plus vulnérable du spermatozoïde.

- De la pièce intermédiaire, de la pièce principale et de la pièce terminale.

Les mitochondries en hélice dans la pièce intermédiaire sont le siège principal de la production d'énergie, nécessaire au mouvement. C'est leur présence qui donne un aspect un peu plus épais à la pièce intermédiaire.

La paire central et les 9 doublets de microtubules qui constituent l'axonème sont entourés par 9 fibres denses. Tous ces éléments s'étendent du cou jusqu'à la pièce terminale, en passant par la pièce intermédiaire et la pièce principale.

Les fibres denses se terminent à des endroits un peu déformés, ce qui entraîne une diminution progressive du diamètre du flagelle et lui donne un aspect effilé. Les microtubules constituent les éléments contractiles qui fléchissent le flagelle de manière hélicoïde, propulsant ainsi le spermatozoïde.

Les colonnes longitudinales de la gaine fibreuse de la pièce principale, ainsi que les fibres denses apportent la rigidité nécessaire au mouvement normal du flagelle. Ses particularités ont été décrites par Bielanski (1979) :

- La tête est asymétrique
- Le flagelle est implanté le plus souvent en position excentrée.
- L'acrosome est de petit volume.
- Présence de microtubules dans le cou (**Barrier Battut et al., 2014**).

### 2.1.3 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 aminé (**Heymon et Vignon, 2005**).

### 2.1.4 Caractéristiques

Des substances gélatineuses sont élaborées par les vésicules séminales. En premier lieu, ce gel est retenu par un filtre.

**Couleur** : Normalement, le sperme est blanc laiteux.

**Volume** : Le volume est important. Il est plus faible pour les étalons de sang (30-50 ml) que pour les races lourdes (120-150 ml) (**Fauquenot, 1987**).

**Concentration** : 100 à 200 millions de spz par ml en moyenne.

**Nombre total** : vers 10 milliards de spz en moyenne.

**Tableau 01:**Caractéristiques principales du sperme d'étalon (Dowsett et Pattie , 1987 cité par Nicholich, 1989).

Volume total (ml)	Concentration (10 <sup>6</sup> /ml)	Nombre total (10 <sup>9</sup> )	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
	200 (50-400)	10 (3-20)	75	Besse, 1993
52,5 ± 34,1	176 ± 125	7,8 ± 5,7	59 ± 14	Langlois 1977 cité par Nicholich, 1989



Ces caractéristiques varient avec la race (Tableau2), l'âge de l'étalon (Tableau1), la saison (Tableau 4), de la fréquence d'éjaculation, etc.

**Tableau 02 :** Quelques caractéristiques du sperme de différentes races d'étalons de sport (Dowsett et Pattie, 1987 cité par Nicholich, 1989).

Races	Nombre	Vol. sans gel (ml)	Vol. de gel (ml)	Vol. total (ml)	Concentration. (10 <sup>6</sup> /ml)	Nbre de spz (10 <sup>6</sup> )	Spz morts (%)
P.S.A.	73	36,2	1,0	37,2	286,8	12661	10,1
Quarterhorse	30	23,8	4,0	27,8	171,7	5372	23,8
Pur Sang	141	28,3	2,7	31,0	114,3	5027	21,6
Arabe ½ sang	73	33,2	5,5	38,7	116,1	4854	17,1
A.Q.P.S	111	30,2	3,1	33,3	97,2	4738	15,4
Palomino	44	23,8	1,1	24,9	138,5	4016	21,3
Appaloosa	18	23,3	2,0	25,3	90,4	3331	15,8
Shetland	8	44,4	13,1	57,5	101,3	1720	38,5
Poney	38	20,8	2,5	23,3	114,0	1122	24,7
Moyenne		29,3	3,9	33,2	136,7	4760	20,9

**Tableau 03 :** Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction de l'âge (Dowsett et Pattie ,1987 cité par Nicholich, 1989).

Age	Nombre	Vol. sans gel (ml)	Vol. de gel (ml)	Vol. total (ml)	Concentration. (10 <sup>6</sup> /ml)	Nbre de spz (10 <sup>6</sup> )	Spz morts (%)
1-2 ans	28	15,6	0,4	16	43,4	481	30,8
3-13 ans >13	427	30 ,2	4	34,2	147,8	5053	18,8
>13 ans	81	33,7	1,4	35,1	83,2	3252	22,8

**Tableau04 :** Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction de la saison (Dowsett et Pattie,1987 cité par Nicholich, 1989).

	Nombre	Vol. sans gel (ml)	Vol. de gel (ml)	Vol. total (ml)	Concentration (10 <sup>6</sup> /ml)	Nbre de spz (10 <sup>6</sup> )	Spz morts (%)
Printemps	232	26,2	4,4	30,6	110,2	3727	18,5
Eté	122	26,4	6,4	32,8	139,5	4369	18,7
Automne	80	21,5	1,3	22,8	192,3	5506	20,2
Hiver	102	23,1	1,9	25	125,2	3776	21,4
Moyenne		24,3	3,5	27,8	141,8	4345	19,7

## **2.2 La sélection des étalons**

Parmi les étalons jugés aptes à la reproduction, 95 % peuvent être exploités en IA de semence fraîche immédiate et 75 % en IA de semence fraîche différée (dans la journée) et, parmi ceux-ci, 80 % ont une semence dite " congelable " (source Haras Nationaux). Cette sélection est faite après examen des caractéristiques séminales quantitatives et qualitatives de l'étalon candidat au cours du spermogramme qui consiste en l'examen de 5 éjaculats collectés à 24 h d'intervalle. Des seuils ont été définis pour chaque caractéristique analysée et différent en fonction du type d'IA. Ainsi, les conditions d'utilisation d'un étalon en IA de semence fraîche immédiate sont identiques à celles de l'acceptation d'un étalon à la mise à la reproduction.

Pour les IA différées, les conditions sont plus strictes. Les paramètres qui seront déterminants pour la sélection de l'étalon sont : la concentration en spermatozoïdes des éjaculats et la mobilité des spermatozoïdes après des survies de 24 et 48h à +4 °C (**Clément et Vidament, 1998**). Les conditions d'acceptation d'un étalon à l'IA de semence congelée sont encore plus strictes : il doit satisfaire aux conditions de l'IA de semence différée et, de plus, sa semence subit un test de congélation. Il ne sera retenu que si, sur au moins 6 éjaculats congelés, plus de 3 sont sélectionnés après contrôle. Le contrôle consiste en l'examen de 3 paillettes par éjaculat dont le pourcentage de spermatozoïdes mobiles doit être supérieur à 35 %.

Actuellement, avec la technique utilisée dans les laboratoires de congélation des Haras Nationaux, au moins 69 % des éjaculats produits sont conservés (**Magistrini et Vidament, 1999**).

## **2.3 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**).

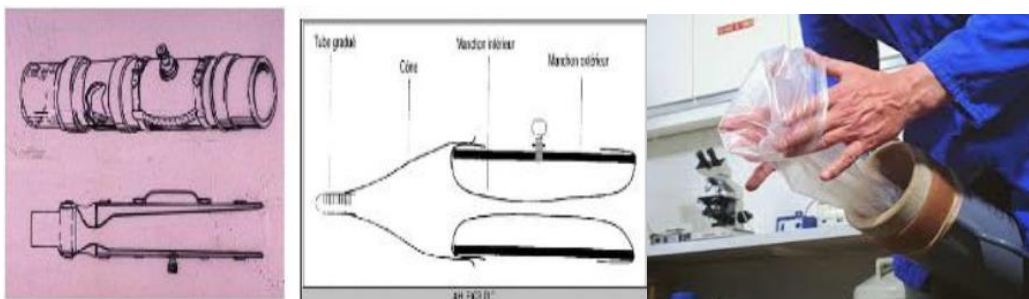
Le temps de réaction (entre le début des stimulations et la monte) est de 3,5 min (211 secondes) pour le 1er éjaculat et de 3,85 min (231 secondes) pour le 2eme, une heure plus tard en moyenne (**Nicolich, 1989**).



**Figure 03 :** Mannequin de récolte pour étalons (d'après IMV Technologies France).

Le prélèvement peut être effectué dans le vagin de la femelle (mais pas pour l'insémination artificielle), avec un condom en caoutchouc ou en plastique souple, ou mieux, avec un vagin artificiel. La température de l'eau du vagin artificiel au départ varie de 42°C à 50°C selon le temps estimé que l'étalon prendra pour éjaculer (**Valon et Chaffaux, 1983**). La capote est lubrifiée avec de la vaseline et la pression doit être proche de celle exercée par le vagin de la jument (**Chevalier, 1980**). L'opérateur qui prélève est de côté par rapport à l'étalon. Il dévie le pénis au moment du saut et présente le vagin artificiel (**Corde, 1985**).

Il faut en moyenne 30 minutes pour obtenir une éjaculation. La température de l'eau du vagin artificiel est comprise entre 42°C et 44°C au moment de la collecte (**Fauquenot, 1987**). La saillie elle-même dure 2 minutes environ. Le sperme doit être mis à l'abri de la lumière.



**Figure04 :** Différents compartiments et montage d'un vagin artificiel (D'après IMV Technologies France).



**Vagin artificiel de  
Nishikawa**

**Vagin artificiel de type  
Missouri**

**Vagin artificiel de type  
Colorado**

**Figure05 :** Les différents types de vagin artificiel (d'après IMV Technologies France).

## 2.4 Dilution et conservation du sperme

Le développement de l'insémination artificielle est lié à la mise au point de milieux permettant la survie des spermatozoïdes et le maintien de leur pouvoir fécondant. Ces dilueurs sont utilisés pour la conservation du sperme frais (12 à 24 heures), ou congelé (au-delà de 48 heures). Ils doivent présenter la même pression osmotique que celle du spermatozoïde et la maintenir pendant toute la durée du stockage, contenir des substances colloïdales pour protéger les spermatozoïdes, des composants favorisant le métabolisme des spermatozoïdes et leur longévité.

Le dilueur augmente le volume de l'éjaculat pour en faciliter le fractionnement et apporte un milieu de conservation meilleur que le plasma séminal.

Les constituants associés les plus couramment répandus assurent soit un rôle nutritif (jaune d'œuf – lait écrémé – glucose) soit un rôle isotonique (acide citrique et citrates – bicarbonate de soude – phosphate sodique – chlorure de potassium) soit un rôle sanitaire (antibiotique et sulfamide non spermicide), cette liste étant loin d'être exhaustive (Jussiaux et Trillaud, 1977).

### 2.4.1 Conservation du sperme frais :

Pratiquée couramment dans les grands Haras des Etats – Unis, la dilution de l'éjaculat frais permet l'insémination de 8 à 12 juments dans les 6 à 12 heures qui suivent la collecte.

La dilution est en effet obligatoire car en l'absence de dilueur, le plasma séminal seul n'assure pas la survie des spermatozoïdes soit à la température normale 36 °C, soit en

hypothermie 4 0C. A 36 0C le sperme non dilué perd sa motilité après 1 à 2 heures de conservation. A 4 0C, sa longévité est un peu accrue puisque à la température corporelle les spermatozoïdes sont très motiles et épuisent rapidement leurs réserves énergétiques qui sont par contre économisées par le ralentissement des mouvements que provoque le froid.

La semence fraîche est diluée et doit être conservée à faible température (4 à 5 0C). Le glucose et le jaune d'œuf à des teneurs variables dans le dilueur favorisent la survivance des spermatozoïdes.

La composition du dilueur influe de façon très nette sur le pourcentage de spermatozoïdes motiles et sur la durée de leur survie.

Nishikawa, mettant en comparaison trois dilueurs au taux de 1/3 à 4 0C, obtient respectivement :

- Au bout de 6 h = 95, 90,80 % de motilité.
- Au bout de 12h = 95, 82,63 % de motilité.
- Au bout de 24h = 95, 70,26 % de motilité.

Le premier du tableau étant baptisé C G H 27.

De 1961 à 1965 les pourcentages de motilité obtenus au Japon avec du sperme frais dilué au C G H 27 conservé de 2 heures à 8 heures à 4 0C, ont été comparables (67,3 %) à celui de la saillie naturelle.

### **Formules des deux dilueurs utilisés actuellement au JAPON :**

CGH 27

Jaune d'œuf = 7% V/V.

Gélatine = 0,1g.

Phosphate de sodium = 0,05 g.

Chlorure de potassium = 0,025 g.

Tartrate Sodico-potassique = 0,25 g.

Glycine = 0,7 g.

Glucose = 4,5 g.

Caséine = 0,5 g.

Drogue Tranquillisante = 0,01 g.

Eau Distillée = 100 ml.

## HF 20

Glucose = 5 %.

Lactose = 0,3 %.

Raffinose = 0,3 %.

Citrate sodique = 0,15 %.

Phosphate sodique = 0,05 %.

Tartrate Sodico – potassique = 0,05 %.

Jaune d'œuf = 2 à 0,5 %.

Pénicilline = 250 UI/ml.

Streptomycine = 250 mg/ml.

Cependant, les inséminations réalisées avec du sperme conservé dans les mêmes conditions au-delà de 24 heures ont été peu efficaces.

En définitive, les pertes de semence préparée et perdue par péremption sont loin d'être négligeables. La faible durée de conservation, qui n'excède pas la journée pour obtenir des résultats très fiables, limite son emploi à la fois sur le plan technique aussi bien qu'économique. Un des services qu'on peut faire rendre à la conservation « faible durée » serait dans les grandes stations de monte, où les grands étalons sont limités à un nombre réduit de sauts par jour éviter fatigue et ruine des jarrets. Au cas où le nombre de juments réceptives dépasserait cette potentialité, l'étalon serait collecté et sa semence diluée pour faire face à toutes les demandes (**Jussiaux et Trillaud, 1977**).

### 2.5 Examen et appréciation du sperme

Le choix de reproducteurs sains et féconds dépendant du contrôle qualitatif et quantitatif de la semence, cinq types de contrôles ont été préconisés pour évaluer la qualité du sperme puisqu'aucun critère isolé ne permet de le juger.

- Les examens macroscopiques sont basés sur l'appréciation du volume, de la viscosité, du PH et de l'aspect de l'éjaculat.
- Les examens microscopiques permettent l'évaluation de la mobilité massale et individuelle, la détermination de la concentration spermatique et du pourcentage de spermatozoïdes vivants, morts ou anormaux.
- Les examens biochimiques décèlent une dépréciation de la qualité du plasma séminal.

- Les tests de résistance font apparaître les variations de sensibilité aux chocs thermiques ou au degré de dilution, permettant l'élimination de certains étalons pour l'insémination artificielle.
- Les examens sanitaires détectent la présence d'un germe pathogène susceptible de nuire à la fécondité de l'étalon. ( **Jussiaux et Trillaud, 1977**).
- IA en frais : l'IA est réalisée sur place, immédiatement après la récolte de sperme.

## **2.6 Différents modes de conservation**

IA en frais : l'IA est réalisée sur place, immédiatement après la récolte de sperme,

IA congelée : la semence est congelée dans l'azote liquide (-196°C) et utilisée après avoir été conservée plus ou moins longtemps.

IA réfrigérée : concerne en fait toutes les IA différées mais non congelées. Il est alors nécessaire de préciser le temps pendant lequel les doses ont été conservées (12h, 24h, 48h...), sachant qu'en France, la majorité des doses sont utilisées dans les 12h (**Brinsko et al., 2000a**).



## CHAPITRE III : La cryoconservation de la semence équine

### 3.1 La cryoconservation

#### 3.1.1 Définition

La cryoconservation se définit comme l'utilisation de très basses températures pour conserver à long terme des cellules ou tissus, tout en maintenant intact leur structure et leurs fonctions (**Mazur, 1984**).

#### 3.1.2 Principe

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

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

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

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

Il devient, donc, indispensable de maîtriser les modifications biologiques, physiologiques et physiques s'exerçant sur les cellules et leur environnement au

moment de la cryoconservation afin d'apporter aux spermatozoïdes des composants pouvant leur permettre de résister à ces modifications délétères (**Mazur, 1968**).

### **3.2 La cryoconservation dans l'espèce équine**

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

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

Alors que, malgré une bonne qualité de sperme frais et les différents milieux et techniques de réfrigération et congélation testés, certains éjaculats équins d'un nombre important d'étalons possédant de bonnes performances sportives s'avèrent subfertiles, c'est-à-dire que leur semence ne supporte pas la congélation, avec une qualité du sperme après décongélation insuffisante pour des raisons encore inconnues. C'est pourquoi les méthodes de sélection des spermatozoïdes d'étalon représentent un outil de grande valeur dans les techniques de reproduction assistée de l'espèce équine (**Pillet et al., 2011, 2012**).

### **3.3 Les agents cryoprotecteurs :**

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

volume de la cellule spermatique (gonflement ou déshydratation) (Pillet et al., 2011, 2012).

### 3.3.1 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).

### 3.3.2 Les cryoprotecteurs pénétrants

Comme le glycérol, le diméthyl sulfoxyde (**DMSO**) (Gilmore et al., 2000) ou les amides (Alvarenga et al., 2005) : ils sont de bas poids moléculaire ; en entrant dans la cellule, ils limitent la formation de cristaux intracellulaires (mais également extracellulaire).

De même, ils entraînent des réarrangements lipidiques et protéiques de la membrane cellulaire ce qui induit une augmentation de la fluidité membranaire, une modulation du niveau de déshydratation cellulaire et une meilleure survie à la cryoconservation.

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

Pour les spermatozoïdes d'étalon, plus sensibles aux variations osmotiques, la concentration en glycérol ne devrait idéalement pas dépasser les 3,5 % du volume total.

Récemment, un milieu de congélation ne contenant que 2,5 % de glycérol a été développé et de très bons résultats de fertilité ont été observés (**Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Ponthier et al., 2014**).

### **3.4 Dilution du sperme**

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

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

La dilution permet d'obtenir une concentration en spermatozoïdes optimale pour la congélation. La concentration finale en spermatozoïdes dans l'échantillon dépend du choix du taux de dilution. Un nombre de spermatozoïdes d'au moins 200 millions par dose pour 2/3 de dilueur (**Barrier-Battut, 2013**).

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

### **3.5 Les dilueurs**

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

**Tableau 05 :** Composition des dilueurs de centrifugation et de congélation « allemands » utilisés pour la congélation du sperme équin (Blanchard et al., 2005).

<b>Milieu de centrifugation (dilueur Merk1)</b>	
D-Glucose	59,98 g
Citrate de dihydratetrisodique	3,70 g
EDTA (Ethylène diamine tetra-aceticacid)	3,70 g
Bicarbonate de soude	1,20 g
Pénicilline G potassique	1000000UI
Sulfate d'amikacine	1,00 g
Eau distillée déminéralisé qsp	1000 ml
Ajuster le pH à 6,9 avec du bicarbonate de soude	
Le dilueur peut être congelé à -20 °C sous de petits volumes jusqu'à utilisation	
<b>Milieu de congélation</b>	
Solution de D-lactose (11% poids/volume)	50.0 ml
Milieu de centrifugation (Merk <sub>1</sub> )	25.0 ml
Jaune d'œuf	20.0 ml
Glycérol	5.0 ml
Equex STM (Nova chemicalSales ,Scituate , MA )	0.8 ml

**Tableau 06 :** Composition des dilueurs de centrifugation et de congélation à base de lait écrémé utilisés pour la congélation de sperme équin ( Blanchard et al., 2005).

<b>Milieu de centrifugation modifié de kenney</b>	
Lait non gras en poudre ( par exemple Sanalac )	24.00 g
Glucose	26.5 g
Sucrose	40.0 g
Bicarbonate de soude ( 1mEq /ml )	6.0 g
Pénicilline G potassique	1000 000 UI
Sulfate d'amikacine	1.00 g
Eau distillée et déminéralisée	qsp 1000 ml
Le dilueur peut être congelé à – 20 °C sous de petits volumes jusqu'à utilisation	
<b>Milieu de congélation</b>	
Milieu de centrifugation modifié de kenney( ci-dessus)	92.5 ml
Jaune d'œuf	4.0 ml
Glycérol	3.5 ml
Une fois que le jaune d'œuf et le glycérol ont été ajoutés, ne pas congelé	

### 3.6 Congélation du sperme de cheval

Le protocole de congélation de la semence équine est le suivant :

- Collecte de la semence et première dilution Une fois collectée et filtrée sur gaze la concentration en spermatozoïdes de la semence est évaluée au photomètre. Une première dilution de la semence est réalisée dans le milieu INRA96® dans un bain-marie à +37°C de façon à avoir une concentration par pot de 50.10<sup>6</sup> spermatozoïdes/ml. La semence est ensuite refroidie dans un bain-marie à +22°C, pendant 10 minutes. Une première centrifugation est effectuée à 600g, pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant contenant le milieu et le plasma séminal est éliminé.
- Deuxième dilution et congélation de la semence Le culot de spermatozoïdes est resuspendu dans le milieu INRA-Freeze® afin d'obtenir une concentration finale de 100.10<sup>6</sup> spermatozoïdes/ml. Avant de mettre la semence en paillette de 0.5 ml (paillettes bovines IMV Technologies), elle est refroidie pendant 1 heure et 15 minutes à 4°C. La congélation des paillettes est réalisée à l'aide d'un congélateur programmable (Minidigitcool, IMV), selon une descente de température de -60°C par minute, de +4°C à -140°C. Une fois la température de -140°C atteinte, les paillettes sont plongées dans l'azote liquide à -196°C, où elles sont stockées (Pierre, 2013).

### 3.7 Décongélation des paillettes

Le sperme est décongelé 30 secondes dans un bain marie à 37 °C. Pour les analyses de motilité, 3 paillettes sont prélevées de manière aléatoire dans la cuve et décongelées (une par une à 3 minutes d'intervalle), pour chaque éjaculat et chaque étalon. Une fois décongelé, le contenu de chaque paillette est dilué dans 2mL d'INRA96® à la concentration de 25x10<sup>6</sup> spermatozoïdes par ml et incubé à 37°C pendant 10 minutes avant analyse (Pierre, 2013).

### **3.8 Evaluation de la qualité de la semence congelée**

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

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

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

# Partie expérimentale

## I. Objectif :

L'objectif de cette étude a été d'étudier l'effet de la congélation de la semence équine utilisée dans le cadre de l'insémination artificielle, sur la qualité des étalons.

### 1 Matériel et méthodes :

#### 1.1 Lieux de l'expérimentation :

Notre étude s'est déroulée au niveau de Centre National de l'Insémination Artificielle et de l'Amélioration Génétique (CNIAAG), et qui se situe au niveau de la jumenterie « Chaou Chaoua » de Tiaret.



**Figure 06 :** CNIAAG, Jumenterie Chaou Chaoua de Tiaret(Original).

#### 1.2 Effectif de l'expérimentation :

L'expérimentation a été réalisée durant la saison de monte 2020 (saison administrative du 1 Mars au 30 Juin), sur la semence de deux étalons appartenant à l'annexe du CNIAAG de Tiaret ; le premier appartient à la race « Arabe-Barbe », et le deuxième à la race « Barbe ».

1/ Ghaiouan : âgé de 17 ans, de race Pur- sang Arabe.

2/ Jeremy : âgé de 21 ans, de race Barbe.





**Pur-sang Arabe**

**Barbe**

**Figure 07 :** Présentation des étalons des deux races (Barbe et Pur-sang Arabe) (Original).

## **2 Déroulement des récoltes**

Les étalons étaient récoltés ou bien 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. Les deux étalons étaient récoltés au moins deux fois par semaine. Pour que la concentration en spermatozoïdes ne diminue pas, les collectes n'étaient pas réalisées deux jours consécutifs pour un même étalon. Ils étaient donc collectés un par un alternativement, mais seulement un seul éjaculat par étalon était utilisé pour la conservation (**Demni, 2019**).

### **2.1 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.



**Figure 08 :** Préparation de vagin artificiel de type Missouri (Original).

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

Le filtre à sperme placé à l'entrée du biberon de récupération du sperme était utilisé afin d'augmenter le nombre de spermatozoïdes récupérés dans chaque éjaculat en permettant de séparer la partie liquide de l'éjaculat, qui renferme les spermatozoïdes, de la partie épaisse et gélatineuse, le gel, qui correspond à la dernière fraction de l'éjaculat (**Demni, 2019**).

## 2.2 La préparation d'étalon

Avant d'accéder à la récolte du sperme, l'étalon qui est maintenue 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 œstrus, la monte demande un effort pour l'étalon, donc il lui faut une petite séance d'échauffement.

L'étalon à récolter est encore stimulé dans un second temps on le plaçant par l'opérateur en regard de la jument « boute-en-train » présentant un œstrus comportemental. qui est-elle même bien immobilisée par des entraves et placée à l'autre côté d'un fantôme de reproduction (**Demni, 2019**).



**Figure 09 :** préparation de l'étalon (Original).

### 2.3 La récolte

La récolte est faite dans une zone de monte spéciale. Nous travaillons toujours en équipe, de trois ou quatre soigneurs, jamais seul, avec celui qui tien l'étalon et le collecteur du même côté du cheval (côté gauche de la jument). Une fois qu'il est monté, la verge du cheval est alors détournée par l'opérateur qui l'insère dans le vagin artificiel et le sperme est recueilli dans le biberon de récupération du sperme. Cela dure quelques secondes, le vagin est ensuite retiré soigneusement du pénis, il est mis en position verticale et vidé de l'eau chaude pour essayer de récupérer la totalité de l'éjaculat et évité un contact prolongé de l'éjaculat avec la paroi interne du vagin chaude, puis il est directement acheminé vers le laboratoire qui se trouve juste à côté de la zone de collecte. L'étalon est ensuite remis au box (**Demni, 2019**).



**Figure 10 :** La récolte de la semence (Original).

### **2.3.1 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 a subi les tests suivants :

#### **2.3.1.1 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.

##### **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.

#### **2.3.1.2 Examen microscopique**

##### **a. Mobilité massale**

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

##### **b. Mobilité individuelle.**

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 fléchants 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 (Demni, 2019).



**Figure 11 :** Observation microscopique de la semence de deux étalons (Original).

### 2.3.1.3 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 ousomatiques 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.

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 glutar aldéhyde , 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 (Allimant, 2010).

#### **2.3.1.4 Filtration de l'éjaculat :**

Une fois récoltée, la semence était immédiatement filtrée dans un récipient gradué sur un papier filtre ou une double gaze stérile pour en retirer les impuretés et le « gel » qui contient le liquide séminal hautement toxique pour les SPZ en cryoconservation (Jasko, 1991).

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 37 °C (Meraimi, 2019).

### **3 Dilution de la semence**

Le diluant utilisé était le milieu « INRA 96® » (200 ml, IMV, L'Aigle, France). Pour éviter les problèmes d'altération de ce milieu dans les flacons de 200 ml après ouverture, l'INRA96 est reconditionné par 5, 10, 20 et 50 ml, et congelé à -18°C pendant au moins 24 heures, en vue d'une bonne standardisation. Chaque jour de récolte, un volume de « l'INRA96 » par dose à préparer sont décongelés à température ambiante, puis mis à 37°C dans un bain-marie pour la condition de l'isothermie. L'INRA 96 est rajouté à la semence pour une dilution de 1:3, c'est-à-dire, rajouter 3 volume du dilueur pour 1 volume de sperme.

#### **a. Décente de la température à 22°C :**

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

#### **b. Décente de la température de 22°C à 4°C :**

Les tubes de la semence diluée ont été mis dans des récipients en plastic remplis d'eau à 22°C. Ces récipients ont été placés dans un réfrigérateur réglé à 4°C pendant 30min Ainsi, le refroidissement de la semence se fait doucement par transmission à travers l'eau du récipient évitant le choc thermique des spermatozoïdes Mettre les tubes dans un bain marie a 37 °C (Meraimi, 2019).

## 4 Centrifugation :

Mettre 2 ml de coussin de centrifugation (MAXI-FREEZE, IMV, L'aigle, France) au fond de chaque tube de 10ml de centrifugation. Le coussin va jouer un rôle d'amortisseur mécanique pour éviter d'endommager les cellules spermatiques pendant la centrifugation à grande vitesse et de longue durée (au-delà de 600xg pdt plus de 10 min le coussin devient obligatoire **(Mancil et Varner, 2008)**).

La semence est alors centrifugée a 600xg pendant 10min cette vitesse ne fait perdre qu'environ 15% des spermatozoïdes **(Cochran et al., 1984 ; Heitland et al., 1996)**.

## 5 Conditionnement de la semence

- Après équilibrage, la semence diluée est conditionnée dans des paillettes mini tube contenant un volume de 0,5 mL.
- Les paillettes sont tout d'abord identifiées à l'aide d'un marqueur indélébile en mentionnant le nom d'étalon, la concentration en miel, et la date de la récolte.
- Après le refroidissement de la semence diluée, celles-là sont remplies par aspiration buccale à travers l'extrémité bouchonnée de la paillette. A l'aide des pointes de micropipette.
- Un petit volume de la semence est retiré de la paillette de manière à laisser un vide d'environ 1cm.
- Les paillettes sont obstruées par la poudre d'alcool polyvinyle et elles subies une légère agitation afin d'amener la bulle d'air au milieu de la paillette pour éviter tous éclatement par le processus de dilatation.

## 6 Préparation du milieu de Cryo-congélation

### 6.1 Le Kenney modifié

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

## **6.2 Préparation de plasma du jaune d'œuf**

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

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

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

Un volume de 15 mL du plasma de jaune d'œuf était aspiré à l'aide d'une seringue stérile et supplémenté à un volume de 80 mL du milieu du dilution (le Kenney), un volume de 5 mL de glycérol était en dernier lieu ajouté à ce mélange à cause de ces propriétés toxiques, rappelons que tous les constituants étaient mis préalablement à une température de 37°C (Demni, 2019).

## **7 Congélation des paillettes**

Les paillettes chargées en sperme ont été déposées sur une grille pré-refroidie (à 4°C) puis placées en premier lieu à 4 cm au-dessus de l'azote liquide en phase vapeur dans une boîte de polystyrène pendant 15 mn avant d'être plongées en phase liquide (Cristanelli et al., 1985). Les paillettes ont ensuite été stockées dans des fuseaux puis placées dans des canisters et maintenues immergées dans l'azote liquide jusqu'à décongélation (Demni, 2019).



## 8 Evaluation des paillettes après décongélation

### 8.1 Décongélation

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

### 8.2 Evaluation

La motilité des spermatozoïdes a été examinée et enregistrée à l'aide d'un microscope optique juste à 0, 1/2, 1, et 2 heures après décongélation des paillettes, une goutte de sperme est déposée entre lame et lamelle préchauffées à 37°C, l'évaluation et le calcul de pourcentage de motilité ont été réalisés comme nous avons décrit précédemment, cela était fait pour chaque concentration (**Demni, 2019**).

### 8.3 Méthodes d'évaluation de la semence :

Une semence de bonne qualité est la concrétisation évidente d'une bonne conservation, mais il est intéressant d'essayer de prédire le pouvoir fécondant. Pour cela, il est possible de se baser sur les caractéristiques physiques de la semence en effectuant un spermogramme. Cependant, certains étalons ont une fertilité diminuée après conservation malgré un spermogramme satisfaisant voire excellent. **Jasko et al.** (1992a et b) et **Kenney et al.**(1971) ont montré qu'il était relativement facile d'évaluer qualitativement le sperme d'un étalon (sur différents critères tels que la mobilité, la concentration, les anormaux mais qu'il était très difficile de prédire quantitativement sa fertilité. En effet, chacun des paramètres qualitatifs est plus ou moins corrélé à la fertilité d'un étalon. D'après **Clément (1995)**, les caractéristiques séminales qui sont plus souvent corrélées avec la fertilité sont :

- la concentration.
- le nombre total de spermatozoïdes.
- le pourcentage de spermatozoïdes mobiles à 0h.
- le pourcentage de spermatozoïdes normaux. Ainsi, plusieurs tests ont été mis au point pour comprendre un peu plus précisément les discordances entre

spermogramme et fertilité et estimer l'intégrité de certaines fonctions indispensables à un spermatozoïde (**Beradal, 2013**).

## 9 Résultats

### 9.1 Evaluation de la qualité de la semence après récolte :

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

**Tableau 07** : Evaluation de la qualité de la semence des deux étalons après récolte.

	Volume totale	Volume Filtré	Concentration $10^6$	Ph	Mobilité	Nombre de saut	Temps de récolte
<b>Ghaiouan 03 mars 2020</b>	70ml	40ml	300ml	7	4/5	1	1min
<b>Jeremy 5 mars 2020</b>	65ml	40ml	180ml	7	4/5	1	5min

Le pH a été de 7, la mobilité a été de 4/5, et le volume filtré de 40 ml ; ce sont les mêmes valeurs qui ont été obtenues pour les deux étalons. En ce qui concerne le volume totale et la concentration, ils ont été plus élevés chez le jeune étalon « **Ghaiouan** », par rapport au plus vieux « **Jeremy** » (volume Total : entre 65 et 70 ml ; la concentration : entre 180 – 300 ml).

Le nombre de sauts a été d'une seule fois pour les deux étalons, et le temps de récolte a été de 05 min chez « **Jeremy** », l'étalon le plus âgé, et de 01 minute chez « **Ghaiouan** », le plus jeune.

## 9.2 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 08 :** présentation des valeurs de la motilité après décongélation (%).

	Valeurs de la motilité après décongélation (%)							
	0h		1/2h		1h		2h	
	Ghaiouan	Jeremy	Ghaiouan	Jeremy	Ghaiouan	Jeremy	Ghaiouan	Jeremy
Spermatozoïde	40%	20%	45%	25%	55%	32%	60%	40%

Les valeurs de la motilité après décongélation sont variées comme suit : de 0h à 2h chez l'étalon **Ghaiouan**, le pourcentage des spermatozoïdes s'est amélioré petit à petit (40%, 45%, 55%, 60%).

Chez l'étalon **Jeremy**, le pourcentage des spermatozoïdes s'est amélioré lui aussi, mais de façon moindre par rapport au jeune étalon «**Ghaiouan**» (20% ,25%, 32%, 40%).

Concernant les paramètres de mobilité des spermatozoïdes, les valeurs moyennes du pourcentage de spermatozoïdes rapides et de spermatozoïdes progressifs ont été plus élevées chez l'étalon «**Ghaiouan**» que chez l'étalon le plus âgé «**Jeremy**».

L'évaluation de l'intégrité de la membrane plasmique a montré que le pourcentage de spermatozoïdes HOS + a été significativement plus élevé chez le jeune étalon, comparé à l'étalon le plus âgé. Le facteur éjaculat s'est révélé significatif.

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants a été significativement plus élevé chez le jeune étalon, par rapport au plus âgé.

Pour l'évaluation de l'état de l'acrosome, le pourcentage de spermatozoïdes possédant un acrosome intacte a été lui aussi significativement plus élevé chez le jeune étalon, comparé à l'étalon le plus âgé ( **Najjar et al., 2009**).

## Discussion

Dans notre travail nous avons trouvé que le pH =7, que la mobilité a été de 4/5, et que le volume filtré a été de 40 ml : ce sont donc les mêmes valeurs obtenus chez les eux étalons. Tandis que pour le volume totale et la concentration, ces dernières ont été plus élevées chez le jeune étalon « **Ghaiouan** » par rapport à l'étalon « **Jeremy** », **le plus âgé** (volume Totale entre 180 et 300 ml pour Ghaiouan, contre seulement 65 et 70 ml pour Jeremy).

En ce qui concerne le nombre de sauts, nous avons enregistré un seul saut pour les deux étalons.

Le temps de récolte a été plus lent chez l'étalon le plus âgé (**Jeremy : 05minutes**), par contre il a été plus rapide chez l'étalon le plus jeune (**Ghaiouan : 01 minute**). Ce résultat varie considérablement selon la race et l'âge. Il est meilleur pour la race **Pur-sang Arabe** en comparaison avec la race **Barbe**.

La motilité des spermatozoïdes a été examinée et enregistrée à l'aide d'un microscope optique, à T= 0 , T= 1/2, T=1, et T= 2h après décongélation des paillettes.

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

Dans cette étude, nous avons utilisé le milieu « INRA 96 + 2% Jaune d'œuf », afin d'obtenir un meilleur résultat. Lors de l'évaluation microscopique après décongélation, nous avons distingué que le pourcentage de spermatozoïdes mobiles a été plus élevé, de même qu'une augmentation de la fertilité.

Plusieurs études comparatives montrent que l'INRA96 est un dilueur très performant :

- **Webb et al. (2006)** ont ainsi comparé la mobilité de l'**INRA 96**, avec le **Kenney** (dilueur de référence pour la réfrigération du sperme de cheval) et le **VMD-Z** (dilueur mis au point par le Haras du Z, mais dont la composition est inconnue). Il a montré que l'**INRA96** et le **VMD-Z** étaient équivalents, mais tous les deux supérieurs au **Kenney**, dans différentes situations (semence conservée 24, 48 ou 72 heures, dans des boîtes de transport, avec ou sans plasma séminal).

- **Pillet et al., (2008)** ont montré que la fertilité de la semence congelée dans l'**INRA96** (additionné de jaune d'œuf et de glycérol) était de 71%, tandis que celle dans l'**INRA82** (milieu de référence pour la congélation du sperme équin contenant aussi du jaune d'œuf et du glycérol), n'était que de 40%. Ainsi, l'**INRA96** est plus performant que les dilueurs de référence actuels, aussi bien pour la réfrigération que pour la congélation du sperme équin.

Résultats du test de réactivité des membranes (test HOS) : pour réaliser ce test, le laboratoire de l'**INRA** de Nouzilly a l'habitude de travailler avec une solution de sels de Hanks (additionnée de HEPES) hypo-osmotique. Le pouvoir osmotique de cette solution étant presque uniquement lié au NaCl, il suffit d'en retirer le sel pour obtenir une solution hypo-osmotique (par rapport au plasma séminal), à 50 mOsm/l, osmolarité de la solution que nous avons utilisée. La technique à utiliser pour réaliser ce test n'est pas standardisée, chacun faisant un peu à sa manière. Ainsi, **Nie et al. (2001)** après avoir comparé plusieurs solutions de différentes osmolarité, ont préconisé une incubation de 60 minutes dans une solution de sucrose à 100 mOsm/l. D'autre part, **Neild et al. (1999)** ont préféré une solution de lactose à 50 mOsm/l. Après 22 heures de conservation, ils ont obtenus 40% de spermatozoïdes réagissant au test de réactivité des membranes, mais sans différence significative entre lots. D'autre part, **Barrier-Battut**, avec un mode opératoire similaire, a obtenu 63% de spermatozoïdes ayant réagi à la récolte (moyenne sur 22 étalons fertiles). Ils ont donc constaté que la conservation de 22 heures fait chuter le taux de réaction à ce test de manière importante, sans qu'il soit possible de déceler une influence significative de la température de stockage sur ce paramètre. Cependant, nous pouvons remarquer une petite tendance non significative à l'augmentation du nombre de réactions avec la température (**Yoann, Jean, François le foll, 2008**).

Le jaune d'œuf est un agent protecteur non-perméable, il ne pénètre donc pas dans la cellule. Il protège les spermatozoïdes lors du refroidissement et durant la congélation. Le jaune d'œuf est ajouté aux diluants utilisés pour conserver les spermatozoïdes de

l'étalon ainsi que ceux de plusieurs mammifères. Le jaune d'œuf est composé d'eau, de lipides, de protéines, de glucides, de minéraux et de vitamines. Plusieurs données attestent que la fraction de lipoprotéines de faible densité (LDL) est le constituant du jaune d'œuf qui protège les spermatozoïdes durant la cryoconservation. Ainsi, des LDL isolés à partir du jaune d'œuf protègent aussi efficacement les spermatozoïdes que le jaune d'œuf entier lors du refroidissement et de la congélation.

La motilité, l'intégrité de l'acrosome et la viabilité sont protégées lorsque les spermatozoïdes sont dilués dans un diluant contenant des LDL (**Lusignan, 2011**).

Donc, la congélation fait un bon résultat, grâce au jaune d'œuf (ce dernier contient des valeurs nutritives). ce qui permet d'augmenter le nombre de spermatozoïdes.

Il y a un problème dans certain centre d'IA lors de la décongélation, car dans certains centre d'I.A, on laisse la cuve d'azote ouverte, sans la fermer pendant des minutes, et ce geste est frauduleux et non acceptable, et au-delà de 10 secondes, il faut impérativement fermer la cuve, sinon, on détruit la viabilité de tous les spermatozoïdes stockés.

Ces résultat est différent d'un étalon à l'autre, et diffère aussi avec la race et l'âge de l'étalon.

#### **Conséquences de la conservation :**

Une fois la conservation assurée, il est utile de s'intéresser au nombre de spermatozoïdes nécessaires pour obtenir une gestation. Dans ce domaine, les recommandations diffèrent d'un pays à l'autre. Pour du sperme frais, il est à peu près établi qu'une dose de 100 millions de spermatozoïdes, ayant une mobilité progressive (PMS : Progressive Motile Sperme) est un optimum ; si la fertilité de l'étalon est bonne, le temps de conservation inférieur à 12h et le suivi des juments correctement mené (**Brinsko, 2006**).

Cependant, il est possible d'obtenir une fertilité identique, mais avec des doses allant jusqu'à 500 millions de PMS. C'est-à-dire, que la quantité de spermatozoïdes inséminés peut compenser partiellement une défaillance de l'un de ces facteurs. Par contre, toujours selon ce même auteur, une dose de 50 millions de PMS réduit dans tous les cas la fertilité. Sachant maintenant que pour de la semence réfrigérée, et non pas congelée, il y a une perte de 50% environ de la mobilité des spermatozoïdes. Il est alors recommandé d'utiliser des doses d'au moins 200 millions de spermatozoïdes avant conservation (**Brinsko, 2006**). Ces recommandations sont de plus modifiées par le type d'insémination (**Beradal, 2013**).



## **Conclusion**

Les résultats obtenus au cours de cette étude permettent de montrer que la semence équine des étalons « Pur-sang Arabe » et « Barbe », conserve sa motilité et sa longévité pendant au moins 2 heures, lorsque le dilueur de cryoconservation est supplémenté par un jaune d'œuf.

En ce qui concerne nos résultats obtenus, ils sont très insuffisants par rapport à ceux que nous voulions obtenir au départ.

Premièrement, nous avons commencé notre partie expérimentale le 01 Mars 2020, et le 15 Mars, la pandémie du COVID-19 avait commencé, et toutes les structures pédagogiques de même que celles du CNIAAG ont fermé leurs portes, et nous n'avons réellement travaillé que 15 jours, environs. Nous avons commencé par suivre les directives du centre d'insémination, et nous avons obtenu le matériel nécessaire au niveau de la Faculté SNV, car le centre ne dispose pas de l'équipement et des outils nécessaires à l'étude. Mais, en vain !!!!!, le Virus Corona est venu tout perturber.



## Références Bibliographique

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

**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.

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

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

**Barrier Battut J ; Cuir F ; Ferry B ; Magistrini M ; Margat A et Provost E 2014.** Insémination artificielle équine. 5ème édition – Avril 2014. p 61, 63.

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

**Beradal M, 2013.** Évaluation de la qualité de la semence de l'étalon et l'insémination artificielle chez la jument. Université ibn Khaldoun de Tiaret. p58.

**Blanchard TL, et al.** Manual of equine reproduction. 2nd edition. Mosby 2003. Thèse de Doctorat de l'Université « CLAUDE-BERNARD » de LYON I (Médecine - Pharmacie), FRANCE.

**Blanchard T.L, D.D.Varner, J.Schumacher, CH.C.Love, S.P. Brinsko, S.L Rigby, 2005** Manuel de reproduction équine. 2ème édition. Maloine. p 251, 252.

**Bo G. Crabo, (2001) :** Physiological Aspects of Stallion Semen Cryopreservation.

**Brinsko Sp, Crockett Ec, Squires El. (2000a)** Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*. 54 (1) 129-36.

**Bustamante Filho IC, Pederlozzi CD, Sgaravatti AM, Gregory RM, Dutra Filho CS, Jobim MIM, Mattos RC. 2009.** Skim Milk-egg based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim Reprod*, 6:392-399.

**Chelik. A, Tiar. K, 2017.** Etude Sur la dilution d'une Semence d'un Etalon Avec Le Miel. Université Ibn Khaldoun De Tiaret .p1.thèse de doctorat.

**Chevalier F. C., 1980.** Contribution à l'étude de l'insémination artificielle du cheval. Thèse Méd. vét. n°12, ENV Alfort, Créteil, 91 p.

**Christian M, (2009) :** La reproduction et l'insémination artificielle du cheval. Note bibliographique.

**Corde R., (1985) :** Saillie - Insémination artificielle - Infertilité du mâle. In : Maisons-Alfort, France, Assoc. pour l'Etude de la Repro. Animale. La reproduction chez le cheval. Physiologie - pathologie : 67-73.

**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.

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

**Demni .F, 2019.** Mémoire de master : L'utilisation de miel d'euphorbe du sahara Algérien pour la cryoconservation du sperme d'étalons arabe-barbe dans larégion de Tiaret. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. p 53, 54, 55, 60,62,63.

**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.

**Fauquenot A., 1987.** L'insémination artificielle chez les équidés. BTIA, 44 (mai): 23-26.

**France Lusignan .M, 2011.** Étude du mécanisme de protection des spermatozoïdes de mammifères par le lait. Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D) en Biochimie Université de Montréal, p30.

**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.

**Hafez E. S. E., (1987) :** Reproduction in farm animals [Reproduction chez les animaux d'élevage]. 5e édition Lea and Febiger, Philadelphia, ed., 1 vol., 649 p.

**Heymon Y., Vignon X. (2005) :** Reproduction des animaux d'élevage. Educagri. Thèse de Doctorat l'Université de CLAUDE-BERNARD - LYON I, FRANCE (Médecine - Pharmacie).

<https://www.imv-technologies.france>. 23 Aout 2020, 10 :10 .

**Jerez R, González N, Olaciregui M, LuñoV, 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.

**Jussiaux. M et Trillaud .C 1977.** La reproduction chez le cheval. 1. L'étalon.A.lesot. Paris. P20, 42, 43,44.

**Katila T. (1997) :** Procedures for handling fresh stallion semen. Theriogenology. 48(7) 1217-27.

**Kolb .E, 1975 :** Physiologie des animaux domestiques. Paris, Vigot Frères. Ed., 1 vol., 974 p.

**Magistrini et Vidament (1999)** : L'insémination artificielle équine : des technologies à géométrie variable. CR 25e Journée de la recherche équine, Institut du Cheval, département DEFI, INA, Paris, 117-128.

**Mazur, p. (1968)** : Physical and chemical changes during freezing and thawing of cells, with special reference to blood cells. *Bibl. Haematol* 29 764-77.

**Mazur, P (1984)** : Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247 C125-42.

**Meraimi .O, 2019.** Double congélation de la semence équine ( Effet de la concentration en glycérol et de la dilution finale sur la qualité spermatique).Université Abd El Hamid Ibn Badis Mostaganem.p60,61,62.

**Najjar .A, Yvon. J.M ,Benaoun .B, Ezzaouia .M, pillet .E, Batellier .F , Ben M'rad .M , Magistrini. M, 2009.** Evaluation de la qualité des spermatozoïdes d'étalons pur sang Arabe congelés dans le milieu INRA96 supplémenté de jaune d'œuf et de glycérol. Institut National Agronomique de Tunisie.35<sup>ème</sup> journée d'étude .p209.

**Nicolich .C, 1989.** L'insémination artificielle équine. Thèse méd. Vét. Nantes n° 22, ENV Nantes, Nantes, 205 p.

**Pierre Milon.** (2013) : Étude de l'impact de trois conditions d'élevage du poisson zèbre et mise au point d'une méthode de congélation de sa semence dans l'optique de réaliser une analyse comparative entre le niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de poisson zèbre et d'étalon après congélation/décongélation Sciences agricoles. Dumas-00941937.

**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.

**Ponthier J. Desvals M. Franck T. De La Rebiere De Pouyade G. Spalart M. Palmer E. Serteyn D. Deleuse S. (2012)** : Myeloperoxidase in equine semen: concentration and localization during freezing processing . *J. Equine Vet. Sci.*, 2012, 32, 32-37.

**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.

**Ponsart C., Joly C., Le Guienne B., Beaujean N., Le bourhis D., Gérard O., Mermillod P. et Locatelli Y. (2014)** : Biotechnologies des gamètes et de l'embryon. In : SAINT-DIZIER M. et CHASTANT-MAILLARD S. La reproduction animale et humaine. Editions Quae. 752p.

**Rossdale. P, 1992 .**Le cheval : reproduction et élevage. traduit de l'édition anglaise par : Dr Elie seguy, Jean-christophe le maistre et caroline petit, paris .p 72,73,75,76.

**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.

**Stéphanie. M, 2015.** Thèse : Actualités En Cryoconservation Des Semences Des Principales Espèces D'intérêt Vétérinaire, Université CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie). Theriogenology. 54 (1) 129-36. Thèse Méd. vét. n°12, ENV Alfort, Créteil, p91.

**Tibary A, Bakkowy M. (2005) : Reproduction équine. Tome II: l'étalon. Actes** Thèse de Doctorat l'Université de CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie).

**Valon F., Chaffaux S., (1983) :** Le prélèvement du sperme chez le cheval. Rec. Med. Vet., 159 (11): 699-973.

**Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. (1988) :** Effects of cooling rate and storage temperature on equine Spermatozoal and motility parameters. Theriogenology. 29 (5) 1043-54.

**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.

**Yoann, J. et Le Foll, 2008 :** Etude sur la conservation de la semence équine dans une boîte de transport jetable exposée à différentes températures positives pendant 22 heures. Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort. Thèse .p60.