

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET  
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES



**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de docteur veterinaire**

**THEME :**

**Etude Sur la dilution d'une Semence  
D'un Etalon Avec Le Miel**

**Présenté par :**

- Chelik abderrahmanne
- Tiar kamel amine

**Encadre par :**

- Dr : ayad mohamed amine

**Année universitaire : 2016 – 2017**

# Remerciement

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude

Et mes sincères

Remerciement a Mon tuteur de projet de fin d'étude

**Mr Ayad Mohamed Amine**

Qui a accepté d'encadrer mes travaux.

Ainsi que les membres de jury **Mr Derrar Sofiane**

Et **Mr Saim Mohamed Said** qui ont acceptés d'évaluer notre travail

Mes plus vifs remerciements s'adressent aussi à tout

Le cadre professoral et administratif

De L'institut vétérinaire de Tiaret

Mes remerciement a mes chères parents qui son eux tout cela n'aurai jamais

Etait possible, je n'oublierai jamais leur dévouement et leurres sacrifices.

J'espère pouvoir un jour les remercier à la hauteur de ce qu'ils m'ont apportés

Mes remerciements vont enfin à toute personne qui a

Contribuer de près ou de loin a l'élaboration de ce mémoire

# Dédicaces

Je tiens à la fin de ce travail à remercier Allah le te puissant de m'avoir donné la foi et ma voir d'en arriver là, et pour m'avoir donné la force dans les moments difficiles d'éditer ce mémoire.

je dédie ce mémoire à toute ma famille, mes très chers parents qui ont le droit de recevoir mes chaleureux remerciements pour le courage et le sacrifice qu'ils ont consentis pendant la durée de mes études en leurs souhaitant une longue vie pleine de joie et de la santé.

A mes chers frères : *Kadi et Mustapha* qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance de courage et de générosité

A mes meilleurs amis : *Abderrahmane, Nounou, Hako, Kassimou, Hamada, Djamel, Amine, Yassine.*

A mes enseignants de l'institut des sciences vétérinaires Tiaret qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.

A tous mes compagnons des cinq promotions.

# Dédicaces

Je tiens à la fin de ce travail à remercier Allah le te puissant de m'avoir donné la foi et ma voir d'en arriver là, et pour m'avoir donné la force dans les moments difficiles d'éditer ce mémoire.

Je dédie ce mémoire à toute ma famille, mes très chers parents qui ont le droit de recevoir mes chaleureux remerciements pour le courage et le sacrifice qu'ils ont consentis pendant la durée de mes études en leurs souhaitant une longue vie pleine de joie et de la santé.

A mes chers frères : *Hamidou* et *Youcef*, ma petite sœur : *Amina* qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance de courage et de générosité.

A mes meilleurs amis : *kamel, othman, Bilal, khaled, nounou, hako, kassimou, hamada, djamel, yassine.*

A mes enseignants de l'institut des sciences vétérinaires Tiaret qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis .

A tous mes compagnons des cinq promotions.

## Table des matières

INTRODUCTION.....	8
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
1. La technique d'insémination artificielle.....	11
1.1. Généralités.....	11
1.2. Les différents modes de conservation.....	12
1.2.1. Définitions.....	12
1.2.2. Inconvénients de la conservation.....	12
2. Préparation de la semence.....	13
2.1. Caractéristiques du sperme.....	13
2.2. Dilution du sperme.....	14
2.2.1. Méthodes de dilution.....	15
2.2.2. Les dilueurs.....	16
2.3. Conservation de la semence.....	20
2.3.1. Température.....	20
2.3.2. Vitesse de refroidissement.....	21
3. Evaluation de la qualité de la semence réfrigérée.....	22
3.1. Conséquences de la conservation.....	22
3.2. Méthodes d'évaluation de la semence.....	24
3.2.1. Test de réactivité des membranes.....	24
3.2.2. Test de réactivité des acrosomes.....	25
PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENT.....	26
1. Objectifs.....	27
2. Matériel et méthode.....	27

2.1. objectifs .....	29
2.2. Procédures générales .....	29
2.2.1. Les étalons.....	29
2.2.3. Récolte.....	30
2.2.4. Préparation des doses .....	31
2.2.5. L'évaluation des échantillons .....	34
3. Résultats .....	35
Les caractéristique des éjaculat des étalons choisies .....	35
DISCUSSION .....	39
CONCLUSION .....	41
BIBLIOGRAPHIE .....	42

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Caractéristiques séminales de 222 étalons de sang des Haras Nationaux .....	13
Tableau 2 : Composition du Kenney (pour 11) .....	16
Tableau 3 : Composition de l'INRA96 (IMV, L'Aigle, France) pour 11 .....	17
Tableau 4 : Composition du Tyrode modifié (pour 0,11) .....	18
Tableau 5 : Les caractéristiques des éjaculats des étalons choisis .....	35
Tableau 6 : L'effet des dilueurs .....	38

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : photo lieu d'étude centre équestre émir Abdelkader Tiaret.....	28
Figure 2 : photo de préparation des dilueur .....	29
Figure 3 : photo récolte du sperme .....	30
Figure 4: Photo le vagin Missouri utilisé dans l'expérimentation.....	31
Figure 5: Schéma du protocole expérimental .....	33
Figure 6 : photo de spermogramme .....	34
Figure 7 : Histogramme des volumes (ml) des étalons expérimentaux .....	35
Figure 8 : histogramme des concentrations des étalons expérimentaux .....	36
Figure 9: histogramme des motilités massales des étalons expérimentaux.....	36
Figure 10 : histogramme des motilités individuelles des étalons expérimentaux .....	37
Figure 11 : histogramme des volumes des concentrations et des motilités individuelles et des motilités massales.....	37
Figure 12 : effet des différentes concentrations de miel sur la motilité massale des spermatozoïdes après leurs conservations à 4°C.....	38

# introduction

---

## INTRODUCTION

Autrefois, la seule technique de reproduction utilisée dans l'espèce équine était la monte naturelle. Aujourd'hui, il faut tenir compte :

- du milieu professionnel qui entoure l'activité équine, pour qui le cheval est synonyme de métiers (éleveurs, cavaliers, techniciens...),
- des enjeux économiques que l'élevage implique (le prix des saillies pouvant dépasser les 15 000 € qui équivaut à 270 million de centime DA, 2 à 3 années d'entretien sont nécessaires avant que l'animal puisse démontrer ses capacités et trouver un acquéreur...),
- de la dispersion des juments et des étalons chez les éleveurs sur tout le territoire national, ainsi qu'à l'étranger.

La semence des étalons à haute valeur génétique, due à leur valeur sportive ou à leur appartenance à certaines races menacées, doit pouvoir être diffusée aux éleveurs pendant la période de monte, qui s'étend de février à juillet. De plus, certains étalons poursuivent leur carrière sportive pendant la saison de monte. Par conséquent, la reproduction équine se caractérise par des mouvements importants d'animaux ou de semences. Il a donc été nécessaire de moderniser les techniques de reproduction en utilisant tout d'abord l'insémination artificielle en semence fraîche, puis en se tournant vers des méthodes de conservation plus longues (réfrigération, congélation) de la semence, de façon à laisser entière liberté de mouvement aux reproducteurs. A l'heure actuelle, pour les haras Nationaux, le transport de la semence non congelée se fait surtout à 4°C dans des véhicules équipés de systèmes de refroidissement actif. Des transports ponctuels sont cependant effectués grâce à des boîtes contenant un système de refroidissement passif, permettant de maintenir une température basse, sans passer en dessous de 0°C, en théorie. Ces boîtes présentent cependant l'inconvénient d'être sensibles à la température extérieure.

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.

## introduction

---

L'objectif de ce travail est donc d'étudier **la qualité** du sperme conservé dans différentes doses de miel soumises à **différentes températures de stockage**.

L'étude bibliographique expose essentiellement les aspects techniques de l'insémination artificielle (IA), les modalités de préparation et de conservation de la semence, ainsi que les différents tests utilisés pour juger de la qualité des spermatozoïdes.

L'étude expérimentale est divisée en 3 parties : la première présente les différents protocoles mis en place, la deuxième les résultats obtenus et la troisième les réflexions que nous ont inspirées ces résultats.

# **PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. La technique d'insémination artificielle

#### 1.1. Généralités

La technique d'insémination artificielle (IA) présente de nombreux avantages par rapport à la monte naturelle :

- éviter le transport des animaux et diminuer le risque de contaminations inter élevages,
- éviter de blesser l'étalon ou la jument pendant la saillie,
- augmenter le nombre de juments par étalon et ainsi obtenir un progrès génétique plus important,
- diffuser le potentiel génétique d'un étalon sur le plan international.

D'après l'annuaire de monte 2006 pour les étalons de selle français, 11 279 jument ont été mises à la reproduction grâce à l'IA (pour 19 452 saillies, soit 58% des saillies) dont :

- 2 212 (19,7%) en IA immédiate,
- 1 017 (9%) en IA réfrigérée sur place,
- 3 421 (30,3%) en IA réfrigérée transportée,
- 4 629 (41%) en IA congelée.

La diffusion de l'IA en France s'est heurtée à plusieurs problèmes. En effet, les étalons ne sont pas toujours disponibles, car la plupart continuent leur carrière sportive pendant la saison de monte. Les juments ne sont pas non plus toujours à proximité des étalons qui intéressent leurs propriétaires. Il a donc fallu trouver une solution pour différer l'utilisation de la semence de sa récolte. C'est ainsi que l'on a commencé à refroidir la semence d'étalon.

Cependant il existe un inconvénient majeur : les étalons possèdent une grande variabilité individuelle quant à l'aptitude de leur semence à être conservée. Deux solutions permettent de différer l'utilisation de la semence : la **réfrigération** et la **congélation**. Or, d'après les Haras Nationaux, seulement 40% des étalons de trait et 75% des étalons de sang

# Chapitre 01 : étude bibliographique

---

seraient utilisables en sperme réfrigéré (<12h) tandis que 85% des étalons de sang serai ent utilisables en sperme congelé [Vidament, 2005c].

La réfrigération évite certaines contraintes liées à la congélation (possession de cuve sà azote, préparation des paillettes, chocs de congélation/décongélation), mais ce terme regroupe une grande diversité de techniques mises au point pour obtenir une conservation optimale des spermatozoïdes.

## 1.2. Les différents modes de conservation

### 1.2.1. Définitions

- 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.

### 1.2.2. Inconvénients de la conservation

Certains étalons (dénommés « poor coolers ») subissent une baisse de leurs résultats de mobilité ou de fertilité suite à la conservation de leur semence, tandis que d'autres (dénommés « good coolers ») ne sont pas affectés [Brinsko et al., 2000a]. Ce phénomène est peut-être dû à des modifications des membranes regroupées sous le terme de « cold shock », mais sans relation avec les phénomènes ayant lieu au cours de la congélation : en temps normal, la bicouche phospholipidique que constitue la membrane cellulaire du spermatozoïde – comme celle de chaque cellule – est dite « fluide », c'est-à-dire que ses constituants (cholestérols, protéines) circulent librement au sein des phospholipides. Cependant, Parks et Lynch (1992) ont mesuré une température de transition de ces phospholipides à 20,7°C pour l'étalon, ce qui se traduit par une perte de fluidité et une désorganisation de la membrane aboutissant à la création de nouveaux pores. Ainsi, la perméabilité cellulaire est augmentée et le spermatozoïde ne peut plus maintenir son homéostasie d'où, à terme, la mort de la cellule. L'intensité de ce phénomène, commençant à 20°C est inversement corrélée à la température finale. Elle serait, de plus, dépendante de la vitesse de descente de température et de la

## Chapitre 01 : étude bibliographique

---

capacité des spermatozoïdes à y résister. En effet, le refroidissement n'a pas les mêmes conséquences sur les gamètes d'un étalon à un autre.

Les techniques de conservation de la semence sont donc à étudier avec attention afin de trouver l'optimum, compte-tenu des capacités de résistance des spermatozoïdes équins. C'est ce que nous proposons d'étudier dans cet essai.

### 2. Préparation de la semence

#### 2.1. Caractéristiques du sperme

**Tableau 1 : Caractéristiques séminales de 222 étalons de sang des Haras Nationaux**

<b>Volume (ml)</b> 40,5 +/- 20,0
<b>Concentration (10<sup>6</sup> spermatozoïdes/ml)</b> 155 +/- 71,0
<b>Nombre total (10<sup>9</sup> spermatozoïdes)</b> 5,6 +/- 3,0
<b>pH</b> 7,35 +/- 0,20
<b>% de spermatozoïdes vivants</b> 76,2 +/- 9,8

Le plasma séminal, produit en grande partie par les glandes annexes (et les cellules de l'épididyme pour une faible part), est nécessaire à la capacitation et à la nutrition des spermatozoïdes, mais **ses implications sont nombreuses et complexes**.

En effet, Calvet et al. (1994) expliquent que des spermatozoïdes prélevés dans l'épididyme sont capables de féconder des ovocytes sans passage dans l'utérus et sans qu'il soit nécessaire d'induire une réaction acrosomique (RA), alors que des spermatozoïdes éjaculés n'acquièrent cette capacité qu'après avoir traversé le tractus génital femelle. Dans

## Chapitre 01 : étude bibliographique

---

cette même étude, il est montré que la majorité des **protéines du plasma séminal** de cheval forment un **agrégat** autour du spermatozoïde.

Cet agrégat protéique empêcherait une capacitation trop précoce des spermatozoïdes, afin de préserver leurs moyens de défense jusqu'à l'ovocyte. De plus, le sperme constitue un élément étranger que l'utérus tente de rejeter par l'intermédiaire d'une **réaction inflammatoire** [Troedsson et al., 2001a]. On observe en effet un afflux de cellules polynucléaires neutrophiles en réponse à la présence des spermatozoïdes. Différentes études ont montré que les protéines du plasma séminal de mammifères limitent ce chimiotactisme, ainsi que la capacité d'adhésion des leucocytes vis-à-vis des spermatozoïdes [Troedsson et al., 2004 et 2001b].

Enfin, lors d'une insémination, ou a fortiori lors d'une saillie, une grande quantité des spermatozoïdes est déposée dans l'utérus. Or, sur cette impressionnante population (106 à 109 spermatozoïdes), peu (102 à 103) arrivent finalement au site de fécondation qu'est la jonction utéro-tubaire (JUT) [Ball, 2004]. Il est possible de constater une augmentation de la proportion de spermatozoïdes mobiles et normaux dans la zone de la JUT [Ball, 2004]. Celle-ci joue certainement un rôle important dans cette **sélection**, de même que dans la constitution d'un **réservoir de spermatozoïdes**, dans l'attente de l'arrivée de l'ovocyte. En effet, il se produirait une adhésion entre les cellules de l'oviducte et les gamètes. Ce phénomène empêcherait la fin de la capacitation des spermatozoïdes par le maintien d'un taux de calcium intracellulaire suffisamment bas, jusqu'au moment de la fécondation [Troedsson et al. 1998 ; Ball, 2004]. Le plasma séminal aurait une action néfaste sur cette adhésion. Mais ceci n'est pas gênant dans les conditions naturelles car, au fur et à mesure de l'ascension des gamètes, le plasma séminal est éliminé par l'utérus.

La survie des spermatozoïdes et le maintien de leur pouvoir fécondant dépendent de nombreux facteurs. La **dilution**, le **dilueur**, la quantité de **plasma séminal**, le **temps** et la **température** de conservation, la **stratégie d'insémination**, sont les principaux éléments à prendre en compte pour assurer une bonne fertilité lors de l'utilisation de la semence conservée.

### 2.2. Dilution du sperme

Les chercheurs s'intéressant à la conservation de la semence ont très vite remarqué la nécessité de **dilueur** la semence dès sa récolte, sans quoi sa durée de vie ne dépasse pas une

## Chapitre 01 : étude bibliographique

---

heure ou deux [Katila, 1997a] 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**.

Le plasma séminal est donc essentiel dans la physiologie de la reproduction, mais il devient gênant lorsqu'on essaie de modifier l'ordre des choses.

En effet, il a été montré que, lorsqu'il est en trop grande concentration dans la semence conservée, il est néfaste pour les spermatozoïdes sans que nous connaissions à l'heure actuelle les raisons de cette toxicité. Plusieurs techniques ont alors été mises au point pour diminuer la concentration du plasma séminal lors de la conservation.

### 2.2.1.Méthodes de dilution

La première utilise un **vagin ouvert** pour ne récolter que la fraction riche de l'éjaculat. En effet, les 3 premiers jets de l'éjaculat contiennent 75% des spermatozoïdes [Brinsko et al. 2000a], car la majorité des productions des glandes annexes ne vient qu'ensuite. Cette pratique, couramment réalisée en Finlande, permet d'éliminer la quasi-totalité du « gel »(fraction gélatineuse de l'éjaculat, riche en acide citrique et en potassium, produite par les vésicules séminales). Les inconvénients de cette technique (l'habileté et le nombre de personnes nécessaires, ainsi qu'une petite réduction de la quantité de spermatozoïdes récoltés)l'ont cantonnée à une utilisation plus limitée en France.

Une autre approche consiste donc à **centrifuger** la semence, mais il a été montré qu'un retrait total du plasma séminal causait une baisse de la mobilité [Jasko et al, 1991] et qu'au moins 15% des spermatozoïdes étaient perdus au cours des manipulations. Brinsko et al (2000a) ont observé de plus que la centrifugation n'a été bénéfique que pour les étalons dits « poor coolers ». Les étalons dont la semence était peu affectée par la conservation (les« good coolers ») n'ont donc pas obtenu de meilleurs résultats après centrifugation de leur semence. En outre, des effets néfastes de la centrifugation sur la mobilité peuvent être mis en évidence, dépendant bien sûr de la vitesse de rotation et du temps de centrifugation, mais aussi de la présence ou non de dilueur avant centrifugation et du type de dilueur utilisé[Brinsko et al., 2000a].

Une autre méthode, plus usitée, consiste à **diluer de façon importante** l'éjaculat entier (5 à 20% selon Katila (1997a)). Certains étalons – à concentration faible en spermatozoïdes ou ne possédant pas assez de spermatozoïdes ayant une mobilité progressive (= PMS pour

## Chapitre 01 : étude bibliographique

---

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.

### 2.2.2. Les dilueurs

**Tableau 2 : Composition du Kenney (pour 1l)**

Glucose C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	49g
Lait en poudre	24g
Eau distillée stérile	q.s.p. 1 l
Streptomycine	1,5g
Pénicilline	1,5 millions UI

## Chapitre 01 : étude bibliographique

---

**Tableau 3 : Composition de l'INRA96 (IMV, L'Aigle, France) pour 1l**

CaCl <sub>2</sub>	0,14g
KCl	0,4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2g
NaCl	1,25g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	0,118g
NaHCO <sub>3</sub>	0,35g
HEPES	4,76g
Glucose C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	13,21g
Lactose C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> H <sub>2</sub> O	45,39g
Eau distillée stérile	q.s.p. 1 l
Pénicilline	50 000 UI
Gentamycine	50 mg
Phosphocaséinate	27g/l

## Chapitre 01 : étude bibliographique

---

**Tableau 4 : Composition du Tyrode modifié (pour 0,1l)**

NaCl	0,42g
NaHCO <sub>3</sub>	0,21g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,005g
Lactate de sodium 60%	0,310 l
CaCl <sub>2</sub>	0,029g
MgCl <sub>2</sub>	0,008g
HEPES	0,238g
Pyruvate de sodium	0,011g
BSA	0,6g
Eau distillée stérile q.s.p.	0,1 l
KCl	0,187g

KMT =

65% Kenney + 35% Tyrode modifié

## Chapitre 01 : étude bibliographique

---

Un dilieur est nécessaire pour assurer une protection aux spermatozoïdes, entre autres par un effet de volume. Il existe un grand nombre de dilieur à base de lait ou de solution saline, ayant tous pour objectif une meilleure survie des spermatozoïdes. Les principaux à l'heure actuelle sont (tableaux 2 à 4) :

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

Grâce à leurs composants, les dilieur assurent aussi un contrôle de la multiplication Bactériémie une protection des membranes vis-à-vis des radicaux libres et un apport en substrats nutritifs [Katila, 1997a]. Leur osmolarité et leur pH doivent être proches de ceux du +sperme, c'est-à-dire 300 mOsm/L avec un pH de 7,4 à 7,6. Pour la plupart des dilieur l'osmolarité se situe entre 280 et 450 mO sm/L avec un pH de 6,6 à 7,0 [Katila, 1997a]. Même si les mécanismes de protection des membranes restent encore obscurs, le fractionnement du lait par différentes méthodes (microfiltration, ultrafiltration, ...) a permis de les comprendre un peu plus. En effet, le principal inconvénient des substances telles que le lait, réside dans la complexité de leur composition. Ainsi, même si elles contiennent des éléments favorables à la conservation des spermatozoïdes, elles renferment aussi des composants toxiques, d'où l'intérêt d'en isoler les fractions les plus protectrices. Parmi celles-ci, le phosphocasinat natif (PPCN) et la  $\beta$ -lactoglobuline se sont révélés être les plus performants pour la conservation de la semence équine réfrigérée [Batellier et al., 1998 ; Batellier et al., 2001], d'où la création de l'INRA96. La formulation de ce dilieur a été établie non seulement sur la base des résultats de mobilité, mais aussi sur ceux de fertilité de la semence conservée.

### 2.3. Conservation de la semence

#### 2.3.1. Température

Il n'est pas possible de garder les spermatozoïdes à la température du corps car il s'ensuivrait une mortalité cellulaire importante à cause d'une activité métabolique intense [Varner et al., 1988]. La durée de stockage de la semence peut être augmentée en ajoutant un dilueur approprié et en abaissant la température. Cependant, il est très difficile de définir une température optimale à partir des études réalisées car de nombreuses variations de protocole sont observées concernant le dilueur utilisé, les conditions d'aérobiose et la durée de réfrigération. Néanmoins, que ce soit dans un dilueur à base de lait ou dans du Kenney, il semble que la température optimale soit autour de 4-5°C pendant 24 heures de conservation [Palmer, 1984 ; Varner et al., 1988 ; Varner et al., 1989 ; Zidane et al., 1991]. En effet, il a été montré que dans le Kenney, la mobilité des spermatozoïdes après 24 heures n'était pas meilleure lorsque la température était inférieure (0-2°C) [Varner et al., 1989].

Lorsque le temps de conservation est plus court [Province et al., 1985] ou que la conservation est réalisée en aérobiose [Batellier et al., 1998 ; Batellier et al., 2001], la température optimale serait plutôt aux alentours de 10-15°C. L'hypothèse qui est faite permettant d'expliquer ce phénomène est la suivante : l'intense métabolisme des spermatozoïdes à 15°C, faisant intervenir la respiration cellulaire et donc le cycle de Krebs, nécessiterait un apport en oxygène. Ce mode de conservation serait alors une alternative pour les « poor coolers ».

En pratique, en accord avec la littérature, la semence équine est le plus souvent conservée à 4°C, en anaérobiose, pendant 24 heures (aux USA), bien que la majorité des doses soient utilisées dans les 12 heures en France. Cependant, la semence peut parfois être conservée plus longtemps : certains auteurs ont ainsi obtenu un taux de gestation de 75% après conservation avec des dilueurs à base de lait pendant 40-48 heures, de 77% au bout de 70 heures et de 57% au bout de 80 heures [Heiskanen et al., 1994a et b]. Chacun de ces articles présente cependant l'inconvénient de ne porter que sur un faible nombre de cycles. Dans une autre étude considérant un nombre un peu plus conséquent de cycles (52), Batellier et al. (2001) obtiennent une fertilité de 48% au bout de 72H, dans de l'INRA 96.

### 2.3.2. Vitesse de refroidissement

Comme le montrent les étalons « poor coolers », la chute de température, bien que nécessaire à la conservation, n'est pas inoffensive. La première étude sur ce sujet [Douglas-Hamilton et al. 1984] a montré qu'en partant de 37°C, les vitesses de -1°C/min et -0,5°C/min altéraient la mobilité des spermatozoïdes. Ces constatations ont conduit les auteurs à créer l'Equitainer ND, boîte de transport de la semence, qui assure une vitesse de descente initiale de -0,3°C/min, sachant qu'elle ne peut ensuite que diminuer (cf. le paragraphe suivant). Des études plus récentes, menées avec un dilueur à base de lait [Kayser et al., 1992 ; Moran et al., 1992] ont montré que la descente idéale pour la mobilité des spermatozoïdes devait être rapide de 37°C à 20°C, puis lente (-0,05°C par minute) de 19-20°C jusqu'à 8°C, puis de nouveau rapide jusqu'à 4°C. Ceci est en accord avec les conclusions mentionnées précédemment sur la fluidité membranaire. Cependant, ces conditions sont difficiles à remplir sur le terrain.

En fait, les doses sont véhiculées dans des glacières électriques ou dans des réfrigérateurs embarqués dans les véhicules ou encore dans **des boîtes de transport** contenant un système de refroidissement passif – c'est-à-dire des packs remplis d'un liquide congelé – dont l'objectif est de maintenir la semence à des températures voisines de 4°C pendant un maximum de temps (environ 24h pour la plupart de ces dispositifs). Ceci implique une courbe de descente en température en forme d'exponentielle inversée car l'écart entre la température de la semence et celle du glass-pack diminue. Ainsi, la vitesse de descente varie au cours du **temps** mais aussi en fonction des **conditions environnementales** et du **volume** de semence stockée. L'Equitainer est la boîte la plus utilisée à l'heure actuelle grâce à ses performances mais elle présente l'inconvénient d'être coûteuse. Elle implique donc un investissement initial et un retour des boîtes après l'utilisation de leur contenu. Depuis quelques années, plusieurs sociétés ont mis au point et commercialisé des boîtes jetables moins coûteuses, mais est-ce au prix de leur efficacité ? Les études concernant ces systèmes de refroidissement passif sont diverses, chacune comparant une ou plusieurs de ces nouvelles boîtes à l'Equitainer en fonction des conditions de température extérieure [Nunes et al., 2007 ; Brinsko et al., 2000b ; Katila, 1997a]. Les résultats révèlent, pour la plupart, que les vitesses de descente sont rapides (jusqu'à 3,6°C/min) entre 37°C et 20°C, puis plus lentes jusqu'à 15°C (jusqu'à -0,3°C/min). La majorité des études montrent que l'Equitainer est la boîte dont la température intérieure est la plus indépendante de la température extérieure et ceci selon plusieurs paramètres :

## Chapitre 01 : étude bibliographique

---

la **température minimale** atteinte, le **temps** passé à ce minimum, et bien sûr la **courbe de descente** de température. L'influence de toutes ces variations sur la mobilité après conservation de la semence est controversée [Brinsko et al., 2000b ; Katila et al., 1997b].

Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à la fertilité des doses ainsi stockées alors qu'il est reconnu que la température et la durée de conservation sont des facteurs qui l'influencent.

### 3. Evaluation de la qualité de la semence réfrigérée

#### 3.1. 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 [Brinsko, 2006] 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 pour 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. Sinon, 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 d'un de ces facteurs. Par contre, toujours selon le 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 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. La méthode dite d'insémination en haut de corne, réalisée théoriquement au niveau de la jonction utéro tubaire (JUT), paraît attrayante car elle permet d'obtenir les mêmes résultats qu'une IA classique mais avec des doses jusqu'à dix fois moindres [Morris et al., 2000]. Il est cependant nécessaire de soulever quelques questions [Vidament, 2005b] :

- avec du **sperme frais**, les résultats sont très variables et dépendent beaucoup de fertilité de l'étalon et de l'intervalle entre l'insémination et l'ovulation (IA-OV). Cette technique s'appliquerait davantage à des étalons n'ayant pas une production de spermatozoïdes

## Chapitre 01 : étude bibliographique

---

suffisante, sachant que les contraintes sont importantes par rapport au faible avantage procuré (confection des paillettes, suivi échographique intense ...),

- avec du **sperme congelé**, les résultats sont équivalents à ceux obtenus avec une IA classique pour des doses de 50 millions de PMS et un intervalle IA-OV inférieur à 6H.

Si l'intervalle est plus long, il est nécessaire d'inséminer sous contrôle endoscopique afin de s'approcher au mieux de la JUT ou d'augmenter la quantité de spermatozoïdes

Ces résultats sont concordants avec les constatations de Ball (2004) (cf. § 2.2.2.) car en inséminant au niveau de la JUT, les spermatozoïdes ont certes moins de chemin parcourir, mais une plus grande proportion de plasma séminal y est déposée, ce qui pourrait avoir une incidence sur l'adhésion entre les spermatozoïdes et les cellules de l'oviducte.

Avant conservation, la dose de 200 millions de spermatozoïdes semble donc être efficace, mais le rythme des inséminations est aussi à prendre en compte. Vaut-il mieux inséminer cette dose en une fois ou en plusieurs fois ?

En ce qui concerne la semence réfrigérée à 5°C pendant 24H, Squires et al. (1998) ont montré qu'inséminer deux fois, à 24H d'intervalle, 1 milliard de spermatozoïdes, améliorerait la fertilité par rapport à la même dose (2 milliards de spermatozoïdes) inséminée en une seule fois. Ceci peut être expliqué de la façon suivante : la sélection opérée au niveau de l'oviducte aboutissant à l'adhésion des spermatozoïdes les plus performants ne minore pas la fertilité avec de la semence fraîche, car le nombre de spermatozoïdes n'est pas un facteur limitant. Cependant, avec de la semence réfrigérée pour laquelle nous avons vu que la mobilité peut diminuer jusqu'à 50%, ré-inséminer, une fois la sélection opérée, permettrait d'augmenter le nombre de spermatozoïdes stockés [Levillain, 2005 ; Vidament et al. 2005a].

De plus, Seime et al. (2003) ont montré que la fertilité de la semence réfrigérée est meilleure si on insémine entre 24H avant et 12H après l'ovulation, offrant une fenêtre plus étroite que son prédécesseur [Woods et al. 1990]. Ainsi, malgré une durée de vie théorique dans le tractus génital de la jument allant de 1 à 7 jours en fonction des étalons [Sieme et al., 2003], la fenêtre d'IA pour une fertilité optimale est beaucoup plus courte. Il est donc préférable de réaliser plusieurs IA à 24H ou 48H d'intervalle pour obtenir une bonne fertilité.

## 3.2. Méthodes d'évaluation de la semence

Une bonne fertilité 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, etc.), 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.

### 3.2.1. Test de réactivité des membranes

L'intégrité de la membrane plasmique peut-être affectée par les méthodes de conservation, or elle est essentielle au métabolisme des gamètes – comme de toute cellule. Le test HOS (HypoOsmotic Swelling test) est ainsi utilisé pour la tester chez l'homme depuis les années 1970-80, et a été adapté à l'étalon [Nie et al. 2000]. Son principe est de placer les spermatozoïdes dans une solution hypo-osmotique par rapport au plasma séminal. Dans ces conditions, si la membrane plasmique est intacte, le spermatozoïde se comporte comme un osmomètre : les pores de la membrane permettent le passage des liquides vers l'intérieur de la cellule qui se met alors à gonfler, pour équilibrer les pressions osmotiques. Ce gonflement est

## Chapitre 01 : étude bibliographique

---

visible au niveau du flagelle pour les spermatozoïdes car c'est la seule partie extensible. Au contraire, si la membrane plasmique est lésée, aucun gonflement ne sera visible.

### 3.2.2. Test de réactivité des acrosomes

L'intégrité fonctionnelle de la membrane plasmique ne fait pas tout : une série de changements complexes, incluant des modifications des lipides membranaires et la perméabilité au calcium, sont indispensables pour rendre le spermatozoïde capable de féconder un ovocyte. Ce processus – appelé capacitation – se concrétise par une mobilité accrue et une capacité à réaliser la réaction acrosmique (RA) [Meyers et al, 1995]. La RA commence par un accrochement à la zone pellucide (ZP) de l'ovocyte qui provoque un afflux massif de calcium à l'intérieur du spermatozoïde. Ceci induit la fusion, en de multiples points, de la membrane plasmique du spermatozoïde et de la membrane externe de l'acrosome. Il en résulte la formation de nombreuses vésicules qui se dispersent dans la ZP et y libèrent des enzymes qui en provoqueront l'hydrolyse [Gadella et al., 2001]. Il est possible de provoquer cette RA grâce à différentes molécules pour ensuite l'observer, par exemple par microscopie électronique (M.E.T.) [Varner et al. 2000]. La M.E.T. est la méthode de référence, mais elle est aussi chère et complexe. Elle peut être remplacée par un marquage fluorescent spécifique de la membrane externe de l'acrosome. Ainsi, les modifications de l'acrosome accompagnant la RA sont facilement visibles et par conséquent, on peut estimer le pourcentage de spermatozoïdes ayant réalisé la RA.

Les tests décrits ci-dessus sont donc des moyens efficaces pour juger l'état de la semence après conservation, mais aucun n'est pour l'instant corrélé directement à la fertilité des étalons.

## **PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE**

### ETUDE EXPERIMENTALE

#### 1. Objectifs

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier les caractéristiques et la fertilité de la semence conservée dans différent dilieur à base de miel à différentes températures (4 et 20°C) et a différentes concentration1, 2, 3, 4, 5.

Cette étude a été réalisée à la station de monte du centre équestre El émir Abdelkader Tiaret, de Février à Avril 2017.

#### 2. Matériel et méthode

##### 2.1. Objectifs

- Evaluation de la semence des étalons nés et élevés en Algérie
- Etude de l'effet de la supplémentation des déférentes concentrations de miel au dilieur de la semence sur la concentration du sperme.
- Donné une durée maximal de conservation de la semence au miel a l'état frée (24 - 48) à 4 c°

##### Lieu d'étude

L'expérimentation c'est déroulé au niveau du centre équestre el émir Abdelkader de Tiaret au niveau de la partie d'élevage des étalons affilier à l'office national d'élevage équin (ONDEC). 15 étalons reproducteurs de différente race (Arabe, Barbe, Arabe barbe) sont élevés en vue de faire la reproduction des juments du HARAS et ceux des propriétaires.



**Figure 01 : photo lieu d'étude centre équestre émir Abdelkader Tiaret**

## Chapitre 02 :partie expérimentale

---

### 2.2. Procédures générales

Cinq concentrations de miel ont été testées dans cette étude, afin d'obtenir la concentration idéale pour conserver la semence des étalons le plus longtemps possible dans les deux températures étudiées:

Un lot témoin est laissé pour faire une comparaison entre les milieux supplémentés en miel dans les mêmes conditions



**Figure 02 : photo de préparation des dilueur**

#### 2.2.1. Les étalons

Quatre étalons, choisis parmi les étalons expérimentaux du centre équestre el émir Abdelkader et dénommés Nazih, kamarelile, **sarahni letoi**, charlockholmz ont été utilisés. Leur fertilité était connue grâce aux résultats des saillies naturelles obtenus en 2015 et 2016.

### 2.2.3. Récolte

Les étalons ont été utilisés pour les saillies avant d'être récoltés chose qui nous a facilité la vidange de ces derniers avant leurs récoltes.

Les étalons ont été récoltés sur une jument boute-en-train en chaleur entravé pour éviter tout risque de blessure pour l'étalon et celui qui fait la récolte.

Le vagin utilisé est un vagin artificiel type Missouri



**Figure 03 : photo de récolte du sperme**



**Figure 04 : le vagin Missouri utilisé dans l'expérience**

### 2.2.4. Préparation des doses

Le dilueur utilisé était le lait UHT. Pour éviter des problèmes d'altération de ce milieu dans les flacons de 200 ml après ouverture, le lait UHT était reconditionné par 10 ml. Une fois récoltée, la semence était immédiatement filtrée sur un filtre à semence pour en retirer les impuretés et le « gel ». Le volume de l'éjaculat était ensuite évalué. La concentration de l'éjaculat était mesurée au spectrophotomètre (SDM1 de minitube), préalablement étalonné. La mesure était effectuée deux fois de suite pour qu'on en fasse ensuite la moyenne. Le sperme était dilué afin d'obtenir des doses de 200 millions de spermatozoïdes dans un volume total de 10 ml. Deux gouttes de sperme dilué étaient observées au microscope (objectif 10), afin d'en évaluer la mobilité totale puis individuel.

Préparation des dilueur à base de miel :

1 ml de miel est additionné à 9 ml d'eau distillé pour obtenir une dilution 1/10<sup>ème</sup>

## Chapitre 02 :partie expérimentale

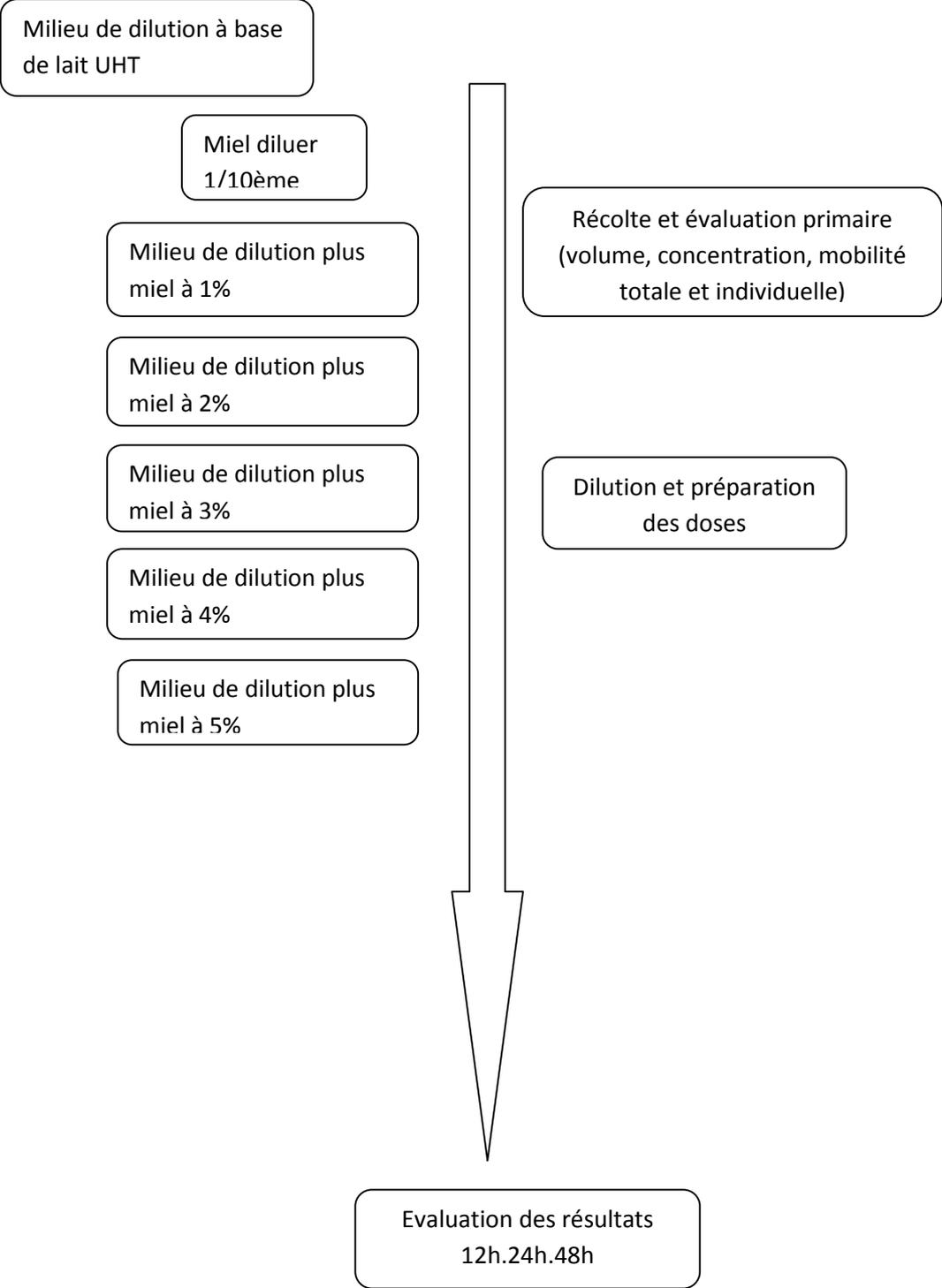
---

Une fois la dilution obtenu d'autres sont faite avec l'addition du lait UHT

- Une dilution 1% obtenu par 0.5ml du la solution du miel à  $1/10^{\text{ème}}$  avec 4.5ml de lait UHT.
- Une dilution 2% obtenu par 1ml du la solution du miel à  $1/10^{\text{ème}}$  avec 4ml de lait UHT.
- Une dilution 3% obtenu par 1.5ml du la solution du miel à  $1/10^{\text{ème}}$  avec 3.5ml de lait UHT.
- Une dilution 4% obtenu par 2ml du la solution du miel à  $1/10^{\text{ème}}$  avec 3ml de lait UHT.
- Une dilution 5% obtenu par 2.5ml du la solution du miel à  $1/10^{\text{ème}}$  avec 2.5ml de lait UHT.

La semence était divisée en une dilution de 1/1 (Volume pour volume) avec une comme témoin sans addition de miel

**Figure 05 : Schéma du protocole expérimental**





**Figure 06 : photo de spermogramme**

### **2.2.5. L'évaluation des échantillons :**

Après avoir fait la dilution les échantillons ont été conservé au réfrigérateur à 4°C et au laboratoire à 20°C au niveau du laboratoire de reproduction de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret.

Des évaluations de la motilité massale et individuelle ont été faite dans une chronologie comme suit à : 12h de conservation, 24h de conservation, et 48hde conservation.

## Chapitre 02 :partie expérimentale

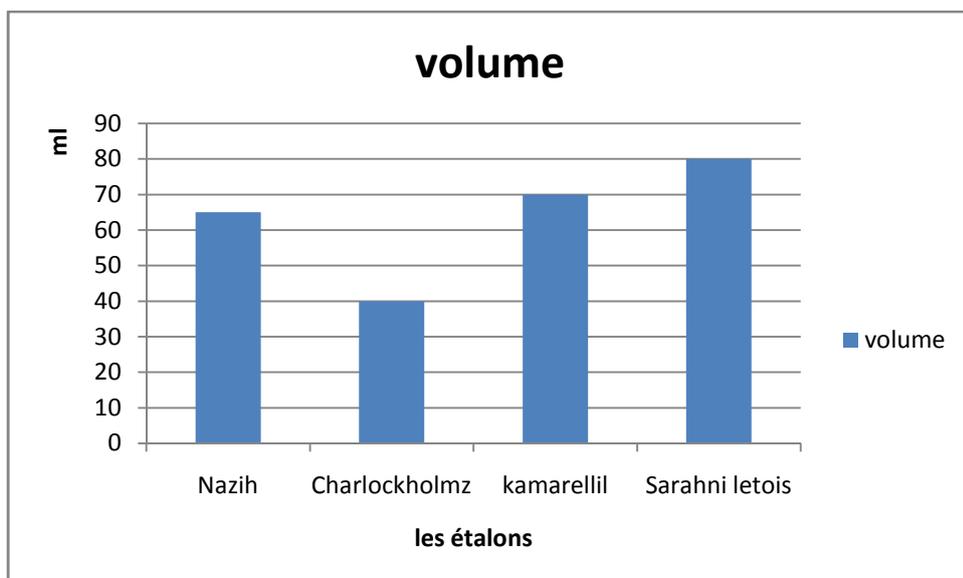
### Résultats

Les résultats de notre travail sont présentés dans les tableaux suivants :

**Tableau 05** : Les caractéristiques des éjaculats des étalons choisies

Étalons	Volume (ml)	Concentration (*10 <sup>6</sup> )	Motilité massale (%)	Motilité individuelle (%)
Nazih	65	165	90	80
Charlockholmz	40	55	30	10
kamarellil	70	127	95	90
Sarahni letois	80	98	60	55

Dans la présente étude nous avons remarqués que les concentrations des éjaculats des étalons expérimentaux varient de  $2 * 10^9$  à  $10 * 10^9$   
la motilité massale des éjaculats varie de 30 % à 95 %  
la motilité individuelle est comprise entre 10 % et 90 % .



**Figure 07** : Histogramme des volumes (ml) des étalons expérimentaux

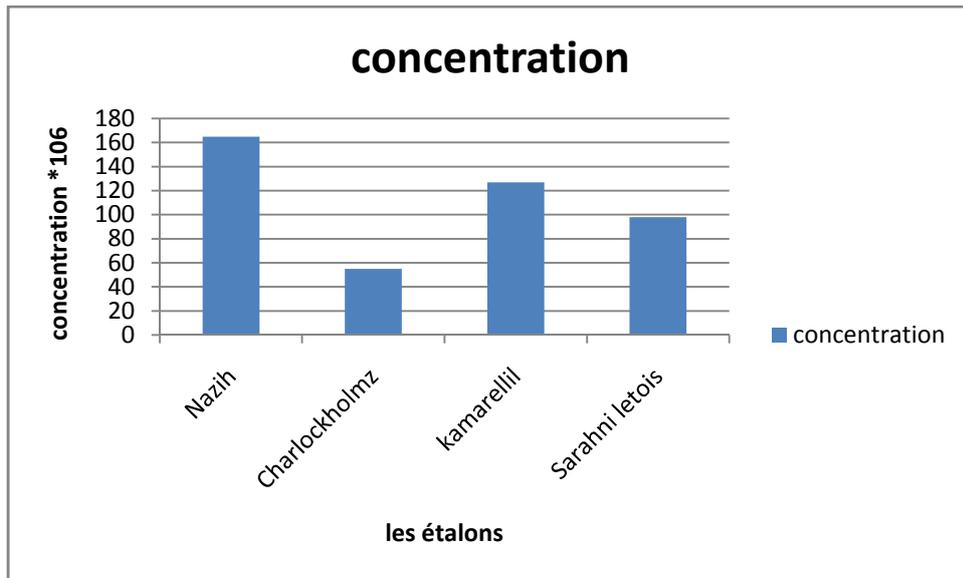


Figure 08 : histogramme des concentrations des étalons expérimentaux

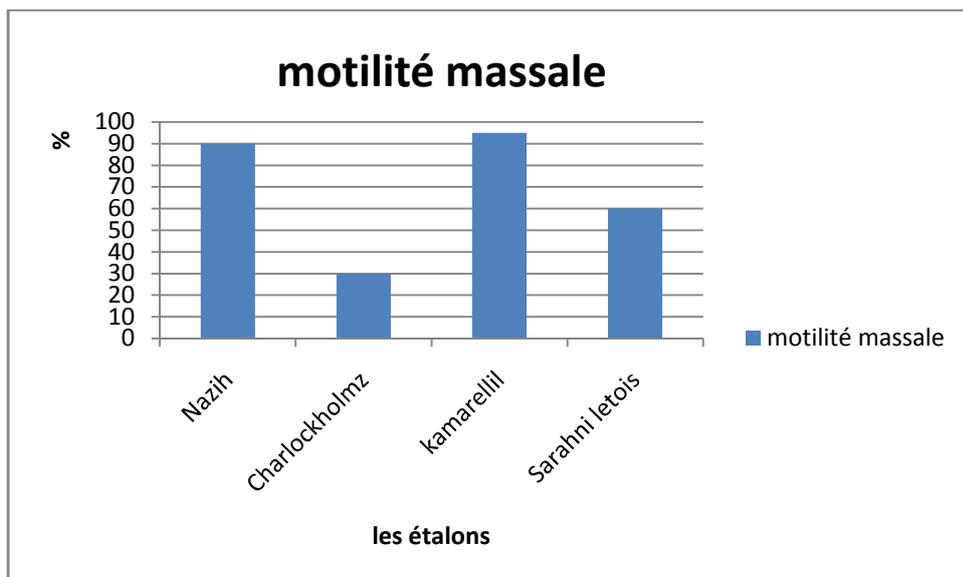
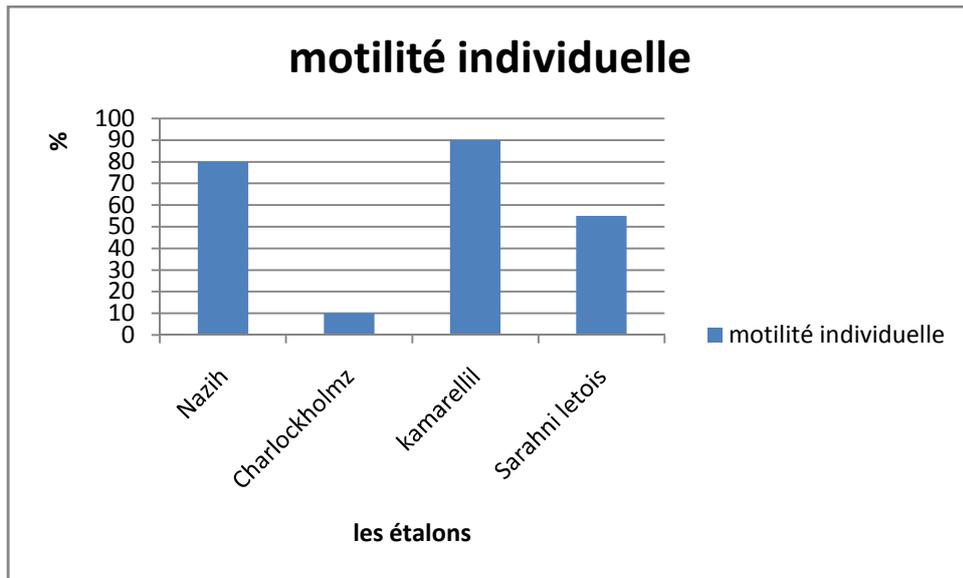
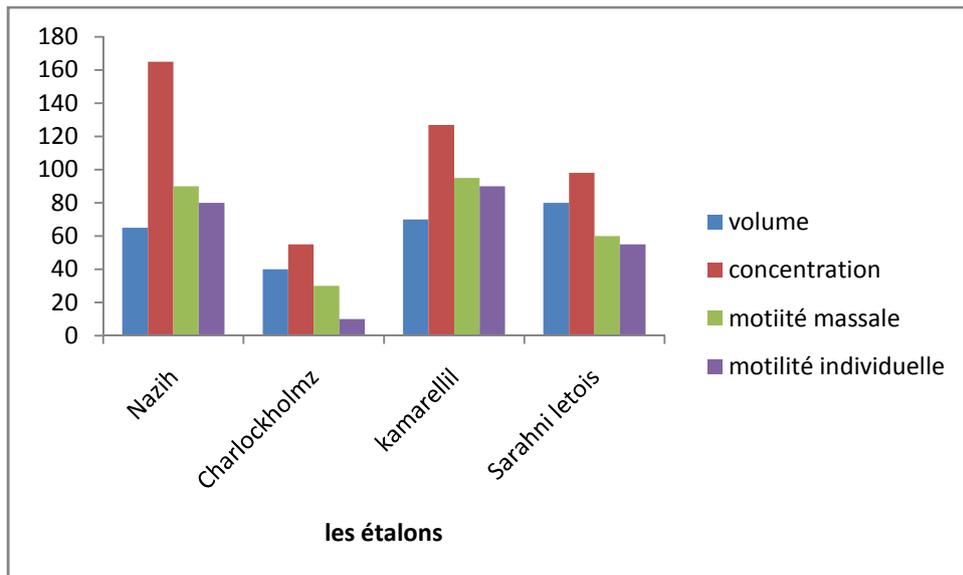


Figure 09 : histogramme des motilités massales des étalons expérimentaux



**Figure 10 : histogramme des motilités individuelles des étalons expérimentaux**

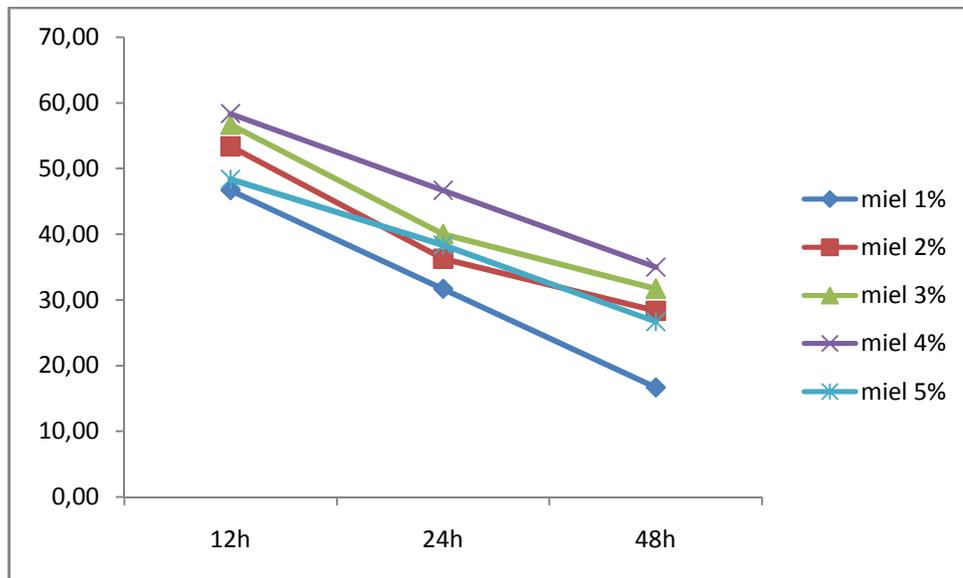


**Figure 11 : histogramme des volumes des concentrations et des motilités massales et motilités individuelles**

## Chapitre 02 : partie expérimentale

**Tableau 05 : présent L'effet des dilueurs**

concentration	Miel 1%			Miel 2%			Miel 3%			Miel 4%			Miel 5%		
	12h	24h	48h												
Nazih	60	40	15	70	50	35	70	50	40	75	60	50	65	50	35
charlock holmz	15	10	05	20	15	10	25	15	15	25	20	15	20	15	10
Kamar ellil	65	45	30	70	55	40	75	55	40	75	60	40	60	50	35
Sarahni letoi	30	20	05	35	25	15	30	35	10	35	30	15	35	20	10
Moyenne	46,67	31,67	16,67	53,33	36,25	28,33	56,67	40,00	31,67	58,33	46,67	35,00	48,33	38,33	26,67



**Figure 12 : effet des différentes concentrations de miel sur la motilité massale des spermatozoïdes après leurs conservations à 4°C.**

## Discussion

Dans la présente étude, nous avons utilisé le miel d'abeille dans le dilueur de sperme d'étalon comme substrat d'énergie et antioxydant bénéfique sur la membrane du sperme, ainsi pour évaluer son effet sur la conservation de la semence des chevaux. Le miel a été utilisé à différentes concentrations 1%, 2%, 3%, 4% et 5%. Les résultats de l'étude actuelle ont conclu que l'incorporation de différentes concentrations de miel au dilueur de sperme a augmenté la motilité de ce dernier. Il y avait une motilité importante de spermatozoïdes. Lorsque le diluant contenait du miel (2%, 3% et 4%) à 12, 24 et 48h après la conservation au frais à 4°C que la semence utilisée comme contrôle (0%). L'enrichissement du lait UHT avec le miel d'abeille a montré les records significatifs les plus élevés concernant la motilité du sperme, l'indice de viabilité.

Ces résultats concordent avec Olayemi et al. [10]; Jerez Et al. [25] et El-Sheshtawy et al. [13] qui a rapporté que la présence de miel dans les dilueurs de refroidissement et de congélation a augmenté la motilité des spermatozoïdes et la qualité améliorée du sperme chez la chèvre, le bélier et le sperme de taureau bovin, respectivement. Aussi, Fakhridin et Alsaadi a indiqué que la supplémentation de miel (10%) à la solution de cryoprotecteur de sperme humain se traduit par une amélioration de la qualité du sperme après la décongélation [11]. Récemment, Jerez-Ebensperger Et al. A conclu qu'il y avait des spermatozoïdes très mobiles (spermatozoïdes mobiles totaux, intégrité de l'acrosome et HOST) lorsque le diluant contenait du miel à 0 et 2 h après la décongélation et le fructose peuvent être remplacés par du miel au sperme diluer, sans effets néfastes sur la qualité du sperme après Cryoconservation [14]. D'un point de vue physique, le miel n'est pas congelé solidement à très basses températures. La viscosité du miel augmente et devient épais et condensé en diminuant les températures. Le miel a une transition vitreuse entre -42 Et -51 °C. Au-dessous

de cette température, le miel pénètre dans un verre Et devient une substance solide amorphe (non cristalline) et Empêcher la formation de cristaux de glace [26]. En outre, le miel a une unique propriétés chimiques où il contient un mélange de 25 sucres représentent environ 95%-97% de sa matière sèche (Principalement du fructose et du glucose). Avec les saccharides, un énorme nombre d'autres substances bioactives telles que les acides organiques, des enzymes, des antioxydants et des vitamines sont présents dans le miel avec des traces [27]. Une telle composition fournit divers éléments nutritionnels, effets biologiques et pharmacologiques dans les cellules vivantes, c'est-à-dire, antimicrobien (antiviral, antifongique et antibactérien), antioxydants, antitoxines, anti-inflammatoires, antimutagéniques [27,28]. Le fructose et le glucose agissent comme substrat cryoprotecteurs extracellulaires non pénétrant en raison de leur poids moléculaire élevé et maintenir l'équilibre osmotique [29]. En outre, les sucres fournissent La principale source d'énergie que les spermatozoïdes exigent de développer leur Processus métaboliques [30]. De nos jours, il existe des preuves des effets antioxydants du miel [5-8]. Les flavonoïdes possèdent des activités de balayage, inhibant ainsi les dommages causés par l'ADN induite par l'ADN [9]. Les études sur différentes espèces: bovins [13], ovins [14,15], chèvre [10], la carpe commune [12] et l'humain [11] ont déterminé la propriétés antioxydante du miel sur la cryoconservation des spermatozoïdes.

## **Conclusion**

En conclusion, cette étude indique que le miel d'abeille joue un rôle important dans la protection de la motilité des spermatozoïdes en post-décongélation, viabilité, l'intégrité membrane dans les spermatozoïdes cryoconservés grâce à sa valeur nutritive unique, son énergie, ses propriétés antibactériennes et Effets antioxydants.

## BIBLIOGRAPHIE

- VIDAMENT M. (2005c) French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* **89** : 115-136.
- 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.
- PARKS JE, LYNCH DV. (1992) Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. **29** : 255-266
- TROEDSSON MH, LOSET K, ALGHAMDI AM, DAHMS B, CRABO BG. (2001a) Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim. Reprod. Sci.* **68** (3-4) 273-8.
- TROEDSSON MH, ROZEBOOM KJ, ROCHA-CHAVEZ G, CRABO BG. (2001b) *The chemotactic properties of porcine seminal components toward neutrophils in vitro*. *J. Anim. Sci.* **79** : 996-1002.
- TROEDSSON MH, ALGHAMDI AS, FOSTER DN. (2004) Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen into inflamed uteri. *Reproduction*. **127** : 593-600.
- BALL B.A. (2004) Hysteroscopy and low-dose insemination techniques in the horse. *Recent Adv. in Equ. Reprod.* (IVIS A0216.1204)
- TROEDSSON MH, LIU IK, CRABO BG. (1998) Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology*. **50** (5) 807-18.
- KATILA T. (1997a) Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*. **48** (7) 1217-27.
- RIGBY SL, BRINSKO SP, COCHRAN M, BLANCHARD TL, LOVE CC, VARNER DD. (2001) Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Anim. Reprod. Sci.* **68** (3-4) 171-80.
- BATELLIER F, DUCHAMP G, VIDAMENT M, ARNAUD G, PALMER E, MAGISTRINI M. (1998) Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 degrees C under aerobic conditions. *Theriogenology*. **50** (2) 229-36.
- BATELLIER F. ET AL. (2001) Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci.* **68** (3-4) 181-90.
- VARNER DD, BLANCHARD TL, LOVE CL, GARCIA MC, KENNEY RM. (1988) Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*. **29** (5) 1043-54.

PALMER E. (1984) Factors affecting stallion semen survival and fertility. *Proceeding of 10<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Urbana-Champaign II, Vol.3 : 377

VARNER DD, BLANCHARD TL, MEYERS PJ, MEYERS SA. (1989) Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20 degrees C. *Theriogenology*. **32** (4) 515-25.

ZIDANE N, VAILLANCOURT D, GUAY P, BIGRAS-POULIN M. (1991) Fertility of fresh equine semen preserved for up to 48 hours. *J. of Repro. and Fert.* **44** (Suppl) : 644

PROVINCE CA, SUIRES EL, PICKETT BW, AMANN RP. (1985) Cooling rate, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*. **23** (6) 925-932.

HEISKANEN ML, HUHTINEN M, PIRHONEN A, MAENPAA PH. (1994b) Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. *Acta. Vet. Scand.* **35** (3) 257-62.

DOUGLAS-HAMILTON DH, OSOL R, OSOL G, DRISCOLL D, NOBLE H. (1984) A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology*. **22** (3) 291-304

KAYSER JP, AMANN RP, SHIDELER RK, SQUIRES EL, JASKO DJ, PICKETT BW. (1992) Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. **38** (4) 601-14.

MORAN DM, JASKO DJ, SQUIRES EL, AMANN RP. (1992) Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*. **38** (6) 999-1012.

NUNES, D.B. ET AL. (2007) Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple design cooling system. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.022

BRNSKO SP, ROWAN KR, VARNER DD, BLANCHARD TL. (2000b) Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. *Theriogenology*. **53** (8) 1641-55.

KATILA T, COMBES GB, VARNER DD, BLANCHARD TL. (1997b) Comparaison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology*. **48** (7) 1085-92.

BRNSKO SP. (2006) Insemination doses : how low can we go? *Theriogenology*. **66** (3) 543-50. Review.

VIDAMENT M. (2005b). Savoir bien acheter et bien utiliser le sperme congelé équin : quelques informations sur l'utilisation des petites doses et de l'IA profonde. *Texte complet et fiche technique mis en ligne sur le site des Haras Nationaux à l'adresse :*  
<http://www.haras-nationaux.fr/portail/index.php?id=3508&MP=2766-2640>

SQUIRES EL, BRUBAKER JK, MCCUE PM, PUCKETT BW. (1998) Effect of number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*. **49** : 743-749.

LEVILLAIN N. (2005) *Essai d'optimisation de la conservation de la semence équine par réfrigération : étude comparative de deux protocoles de réfrigération à 15°C et 5°C*. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, n°82, 53 pages.

VIDAMENT M. ET AL. (2005a) Fertilité du sperme d'étalon conservé de 24 à 72 h dans l'INRA96® : stratégie d'insémination et température de conservation. *31<sup>ème</sup> Journée de la recherche équine*, Paris : 93-103

SIEME H, SCHÄFER T, STOUT TAE, KLUG E, WABERSKI D. (2003) The effect of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*. **60** : 1153-1164.

WOODS J, BERGFELT DR, GINTHER OJ. (1990) Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. *Equ. Vet J.* **22** (6) 410-5.

JASKO DJ, LITTLE TV, LEIN DH, FOOTE RH. (1992a) Comparaison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **200** (7) 979-85.

JASKO DJ. (1992b) Evaluation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am. Eq. Pract.* **8** (1) 129-48. Review.

KENNEY RM, KINGSTON RS, RAJAMANNON AH, RAMBERG CF JR. (1971) Stallion semen characteristics for predicting fertility. *Proceedings of the 17<sup>th</sup> Ann. Con. Am. Assoc. Equine Practitioners* – Chicago, 53-67.

CLEMENT F. (1995) *Etude d'une population d'étalons infertiles : apport au diagnostic et à l'étiologie de l'infertilité*. Thèse Ing. Agro., ENSAR. Montpellier, France

NIE GJ, WENZEL JGW. (2001) Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*. **55** : 1005-1018.

MEYERS SA, OVERSTREET JW, LIU IKM, DROBNIS EZ. (1995) Capacitation in vitro of stallion spermatozoa : comparaison of Progesterone-Induced Acrosome Reaction in fertile and subfertile males. *J. Androl.* **16** (1) 47-54.

GADELLA BM, RATHI R, BROUWERS JFHM, STOUT TAE, COLENBRANDER B. (2001) Capacitation and the acrosome reaction in equine sperme. *Anim. Reprod. Sc.* **68** : 249-265.

VARNER DD, BLANCHARD TL, BRINSKO SP, LOVE CC, TAYLOR TS, JOHNSON L. (2000) Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. *Anim. Reprod. Sci.* **60-61** : 493-509.

[25] Jerez R, Gil L, Gonz'alez N, Luño V, Olaciregui M, Martínez F, et al. Rosemary honey as natural energetic source on refrigeration ram semen. *Reprod Dom Anim* 2013; 48: 1.

[10] Olayemi FO, Adenigi DA, Oyeyemi MO. Evaluation of sperm motility and viability in honey included egg yolk based extenders. *Glob Vet* 2011; 7(1): 19-21

[13] El-Sheshtawy RI, El-Nattat WS, Sabra HA, Ali AH. Effect of honey solution on semen preservability of local breeds of cattle bulls. *Wld Appl Sci J* 2014; 32(10): 2076-2078.

[11] Fakhridin MB, Alsaadi RA. Honey supplementation to semen freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. *J Fam Reprod Health* 2014; 8(1): 27-31.

[14] Jerez-Ebensperger RA, Luño V, Olaciregui M, Gonz'aleza N, Blas I de, Gila L. Effect of pasteurized egg yolk and rosemary honey supplementation on quality of cryopreserved ram semen. *Small Rum Res* 2015; 130: 153-156.

[26] Kantor Z, Pitsi G, Thoen J. Glass transition temperature of honey as a function of water content as determined by differential scanning calorimetry. *Agric Food Chem* 1999; 47: 2327-2330.

[27] Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for nutrition and health: a review. *J Am Coll Nutr* 2008; 27: 677-689.

[28] Manyi-Loh CE, Clarke AM, Ndip RN. An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *Afr J Microbiol Res* 2011; 5: 844-852.

[29] Meryman HT. Cryoprotective agents. *Cryobiology* 1971; 8: 173-183.

[30] Gil L, Mascar'ó F, Mur P, Gale I, Silvia A, Gonz'alez N, et al. Freezing ram semen: the effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on post-thaw sperm motility. *Reprod Domest Anim* 2010; 45: 91

[5] Orsolich N, Basic I. Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. In: Singh VK, Govil JN, Arunachalam C, editors. *Recent progress in medicinal plants*. USA: Studium Press LLC; 2007, p. 55-113.

[8] Aljady AM, Kamaruddin MY, Jamal AM, Mohd Yassin MY. Biochemical study on the efficacy of Malaysian honey in infected wounds: an animal model. *Med J Islam Acad Sci* 2000; 13(3):125-132.

[9] Chen CH, Weng M, Wu CH, Lin J. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evid Based Complement Altern Med* 2004; 1(2): 175-185.

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

[12] Ogretmen F, Inanan BE. Evaluation of cryoprotective effect of Turkish pine honey on common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Cryo Lett* 2014; 35(5): 427-437.