

الجمهورية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة ابن خلدون تيارت

UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET

معهد علوم البيطرة

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

قسم الصحة الحيوانية

DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master complémentaire

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Vétérinaires

Présenté par : LALOUI Karima

Thème

**Cryoconservation de la semence équine par le milieu
Kenney modifié**

Soutenu publiquement le

Jury :

Président : SAIM Mohamed Saïd

Encadrant (e) : AYAD Mohamed Amine

Examinateur I : DERRAR Sofiane

Examinateur II : HAMDI Mohamed

Grade:

MCA

MCA

MCA

M AA

Année universitaire 2019/2020

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à ma mère pour tout l'aide qu'elle m'apporté durant mes années d'études.

Je le dédie aussi à mon cher frère Ismail Djilali.

Et aussi à la famille Adda surtout mon oncle M'hammed

Je le dédie enfin à mes chères amies surtout derdar amira, geulmame amel, idir fazia, mataallah Souad et Abassi Fátima Zohra. Pour toute l'aide et le support moral qu'il m'a apporté pour la réalisation de ce mémoire de fin d'étude.

Laloui Karima

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier DIEU le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force de mener à bien ce modeste travail

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements: A m'a chère maman qui m'a donnée les coudes de mains financière, morale, conseil et sentimentale pour finir ces études et ce travail.

*Ce mémoire a pu voir le jour grâce à **Dr. AYAD MOHAMED AMINE**, maître de conférences à Institut des sciences vétérinaires de Tiaret. Je le remercie pour son honneur d'encadrer mon travail, ses conseils, ces illustrations et sa gentillesse.*

*Je souhaite remercier tout particulièrement monsieur **Derrar Sofiane**, monsieur **saim Mohamed Saïd** et monsieur **hamdi Mohamed** pour avoir accepté de participer à ce jury et examinateur de thèse et Pour m'avoir donné envie de réaliser cette formation de master*

Je remercie tous les enseignants de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret qui ont donnés le maximum en de travail vigueur et enthousiasme dans la richesse animale du pays, ainsi que, A tout ceux qui m'aidée de loin et de près. Remerciement chaleureux.

Laloui Karima

Résumé

L'objectif de ce présent travail est d'étudier l'effet d'un dilueur de congélation (le Kenney modifié) sur la motilité et la longévité des spermatozoïdes avant et après décongélation, chez l'étalon arabe- barbe. , nous avons testés un milieu de lait, glycérol et du jaune d'œuf (Kenney supplémenté par des cryoconservateurs).l'analyse a été effectuée par un CASA (computer assisted semen analyse) ce qui nous a permis de voir l'ensemble des paramètres spermatiques individuelles et le pourcentage de chaque catégorie des spermatozoïdes (statiques et mobiles). Ainsi que la vitalité des spermatozoïdes testés par le test de l'ionise-nigrosine.

Un seul éjaculat de chacun des deux étalons arabe- barbe à été soumis à une cryoconservation avec u milieu de congélation (le Kenney modifié),

Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de Kenney avant la congélation, montre que les spermatozoïdes mobiles sont plus nombreux par rapport aux spermatozoïdes statiques. Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de Kenney supplémenté par les cryoconservateurs après décongélation montre que le pourcentage des spermatozoïdes immobiles à pris le dessus par rapport aux spermatozoïdes mobiles, nous remarquons aussi que le poucentage des spermatozoides vivants est plus important que celui des spermatozoides morts avec une valeurs de 90% & 10% repectivement dans un milieu Kenney supplémenté par des cryoprotecteurs.

Donc l'utilisation du milieu Kenney supplémenté par les substances Cryoprotective (glycérol et jaune d'œuf) a montré une bonne conservation du sperme équin avec une bonne vitalité et une mobilité acceptable, ce qui fait que le milieu a fait son rôle

Nutritif, protecteur, osmotique et antioxydant dans la totalité des processus de cryoconservation

Mots clés : semence- étalon- cryoconservation- Kenney modifie

Abstract

The objective of this present work is to study the effect of a freezing diluter (the modified Kenny) on sperm motility and longevity before and after thawing, in the Arabian stallion - beard. , we tested a medium of Milk, glycerol and egg yolk (Kenny supplemented with cryopreservatives). The analysis was carried out by a CASA (computer assisted semen analysis) which allowed us to see all the individual sperm parameters and the percentage of each category of sperm (static and motile). As well as the vitality of the sperm tested by the iosine-nigrosine test.

A single ejaculate from each of the two Arab-beard stallions was subjected to cryopreservation with freezing media (Kenny modifies), Evaluation of the sperm in Kenney's medium before freezing, shows that motile sperm are more numerous compared to static sperm. Evaluation of spermatozoa in Kenney's medium supplemented with cryopreservatives after thawing shows that the percentage of immobile spermatozoa has gained the upper hand compared to motile spermatozoa, We also notice that the percentage of living spermatozoa is greater than that of dead spermatozoa with a value of 90% & 10% respectively in a Kenney medium supplemented with cryoprotectants.

So the use of Kenney medium supplemented with Cryoprotective substances (glycerol and egg yolk) showed good preservation of equine sperm with good vitality and acceptable mobility, which means that the medium has done its role.

Nutritious, protective, osmotic and antioxidant in all cryopreservation processes

Key words: semen- standard- cryopreservation- Kenney modifies

Table des matières

Résumé

Introduction

Première partie : étude bibliographique

Chapitre I : Rappel sur l'appareil génital de l'étalon

I.1. La partie glandulaire (testicules).....	5
I.1. 1.Descente testiculaire	5
I.1.2.Topographie des testicules	5
I.1.3. Anatomie des testicules	6
I.1.3.1.Organisation externe des testicules	6
A. Les enveloppes testiculaires superficiels	6
B. Les enveloppes testiculaires profondes	7
I.1.3.2.Organisation interne des testiculaires	8
A. Les tubes séminifères	9
B. Le tissu interstitiel	11
C. vascularisation et innervation des testicules	12
I.2. la partie tubaire (excrétrice).....	12
I.2.1.Les voies spermatiques intra-testiculaires	12
I.2.2.Les voies spermatiques extra-testiculaires	13
I.2.2.1.L'épididyme	13
A. Le canal déférent	14
B. Les glandes vésiculaires	14
I.3.la partie uro-génitale	15
I.3.1.L'urètre d'étalon	15

A.L'urètre pelvien	15
B.L'urètre pénien	15
I.3.2. Glandes annexées à l'urètre	16
A. La prostate	16
B. Les glandes de Cowper	17
C. La verge ou pénis	17
I.4. Les mécanismes de l'érection.....	17

Chapitre II : production de la semence chez l'étalon

II.1. De la spermatogénèse à l'éjaculation.....	21
II.1.1.spermatogénèse et spermiogénèse et spermiation	21
II.1.1.1Spermatogénèse	21
II.1.1.2. Spermiogénèse	22
II.1.1.3.Spermiation.....	22
II.1.2. Structure de spermatozoïdes	24
II.1.3. Maturation de spermatozoïde et capacitation	26
II.1.3.1. Maturation	27
II.1.3.2. Capacitation	27
II.2. Caractéristiques de la semence d'étalon	27
II.2.1.Aspect externe	27
II.2.1.1. Volume	28
II.2.1.2. Couleur et consistance	28
II.2. 2. Composition chimique	29
II.2.3. Plasma séminal	29

Chapitre III : Collecte et conservation de la semence chez l'étalon

III.1.Collecte de la semence	32
------------------------------------	----

III.1.1.Méthodes de récolte de la semence	32
III.1.1.1.Récolte à l'aide du vagin artificiel	32
A. Description	32
B. Choix de type du vagin artificiel	33
C. Préparation du vagin artificiel	35
D. La collecte de sperme	35
III.1.1.2. La récolte par éjaculation chimique	36
III.2. contrôle de la semence	38
III.2.1. Examens macroscopiques	38
III.2.1.1. Volume	38
III.2.1.2. couleur et aspect	38
III.2.1.3. PH	39
III.2.2. Examen microscopique	39
III.2.2.1. Concentration	39
A. Evaluation par utilisation d'une cellule hématimétrique	39
B. Evaluation par utilisation du spectrophotomètre.....	40
III.2.2.2. La motilité	41
III.2.2.3. La morphologie	44
III.3. Conservation de la semence	46
III.3.1.Conservation à courte terme	46
III.3.1.1. Semence fraîche	46
III.3.1.2. Semence refroidie	47

III.3.1.3. Conservation à long terme (La Cryoconservation)	48
A. Définition	48
B. Principe	48
III.3.2. La cryoconservation dans l'espèce équine	49
III.3.3. Les agents cryoprotecteurs	49
III.3.4. Dilution du sperme	52
III.3.5. Les dilueurs	53
III.3.6. Les différentes étapes de la cryoconservation	55
III.3.6.1. Récolte et évaluation de la semence	55
III.3.6.2. séparation des différentes phases du sperme par centrifugation	55
III.3.6.3. La dilution	57
III.3.6.4. L'équilibration (réfrigération.....	57
III.3.6.5. Le conditionnement	57
III.3.6.6. la	59
III.3.6.7. la décongélation.....	60
III.3.6.8. Evaluation de la qualité de la semence congelée	60

Première partie : partie expérimentale

I. Matériel et méthodes	63
--------------------------------------	-----------

Lieu d'expérimentation.....	63
II .Effectif	64
III. Déroulement des récoltes	64
III.1. La Préparation du vagin artificiel.....	64
III.2. La préparation d'étalon	66
III.3. la récolte	67
IV. Sélection des éjaculats pour la congélation.....	69
V. Préparation du milieu de dilution	69
V.1. ingrédients	69
V.2.Préparation	71
VI. Préparation du milieu de cryocongélation	71
VI.1. Le Kenney modifié	71
VII. Evaluation des semences après la récolte	73
VII.1. examen macroscopique	74
VII.2. Détermination	75
VII.3. Examen microscopique	76
VIII. Traitement de la semence	76
VIII.1.Dilution primaire	76
VIII.2.Centrifugation de la semence	77

VIII.3.Dilution secondaire	78
VIII.4.Equilibration	78
VIII.5.Conditionnement de la semence	78
VIII.6.Congélation des paillettes	79
VIII.7.Evaluation des paillettes après décongélation	80
VIII.7.1.Décongélation	80
VIII.7.2.Evaluation	81
Résultats et discussion	81
Résultats	81
I. Evaluation de la semence après la récolte	81
II. Evaluation de la mobilité après décongélation	82
Discussion	85
Conclusion	89
Perspective et recommandation	91
Références bibliographiques	93

Liste des figures :

Figure 01 : dessin du tractus reproductif de l'étalon vue en coupe s'agit (MC .kinnon. A1993).....	4
Figure 02 : testicule et épiddidyme gauches du cheval. Conformation et moyen de fixité (BARONE.1956	6
Figure 03 : schéma d'une coupe transversal des testicules de cheval (enveloppe et pénis) D'après TIBARY et al. ; (2005).....	8
Figure 04 : organisation interne du testicule et de l'épididyme (Schatten ; 2007).....	9
Figure 05 : structure de pénis et du prépuce de l'étalon (P.L. Senger, Ph. D., 2003).....	19
Figure 06: Les différentes étapes de la spermatogenèse (Senger, 2012).....	23
Figure07 : Organisation interne de la tête du spermatozoïde (Dadoune, 2001).....	25
Figure08 : Organisation interne du spermatozoïde (Dadoune, 2001).....	26
Figure 09 : aspect du sperme d'étalon après centrifugation (Marie Allimant, 2010)	29
Figure 10 : vagin artificiel de type Missouri (Steven p.et al.2011).....	34
Figure 11 : vagin artificiel de type Colorado (John dascanio.2014).....	34
Figure12 : vagin artificiel de Type nishikawa (Steven p.et Al.2010).....	34
Figure 13 : A collecte de sperme éjaculé chimiquement à l'aide d'un pole et d'une tasse attachée ; B : préparation des comprimés d'imipramine pour une administration orale (John dascanio, 2014).....	37
Figure 14 : hématimètre : cellule de Thoma (http://slideplayer.fr/slide/3395368).....	40
Figure15 : photomètre Minitube avec cuvette remplie en sperme (John Dascanio. 2014).....	41
Figure 16 : microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante (Marie Allimant, 2010.).....	42
Figure 17 : Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et quelque anomalie pouvant être rencontrées (Steven P. et al, 2011).....	46

Figure 18 : Figure 18 : centrifugation de sperme dilué (A), puis aspiration de surnageant après centrifugation (B) (Steven P. et al. 2011).....	56
Figure 19 : Identification des paillettes (Clichés CERREC).....	58
Figure 20 : remplissage (B) et bouchage (C) des paillettes (John Dascanio. 2014).....	59
Figure 21 :(A) paillettes déposées sur une grille puis, (B) placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide, puis stockées dans une cuve d'azote liquide (C).....	60
Figure 22: Le laboratoire de la reproduction équine de l'institut des sciences vétérinaires	63
Figure 23 : les étapes de préparation du vagin artificiel de type Missouri.....	65
Figure 24 : vagin artificiel de type Colorado.....	65
Figure 25 : L'excitation de l'étalon en présence de la jument « boute-en-train » (A ANBER, B REZKI).....	67
Figure 26 : les étapes de la récolte de sperme chez le cheval «REZKI ».....	58
Figure 27 : les étapes de la récolte de sperme chez le cheval « ANBER ».....	69
Figure 28 : les ingrédients de milieu Kenney mesurés.....	70
Figure 29 : Les étapes de préparation du milieu Kenney.....	71
Figure 30: La préparation de plasma du jaune d'œuf.....	73
Figure 31 : Kenney modifié	73
Figure32 : les étapes de filtration de la semence.....	74
Figure33 : couleur et aspect de sperme après filtration.....	75
Figure 34: La détermination de la concentration à l'aide d'un photomètre Minitube... 	76
Figure35 : la dilution de sperme et le remplissage des tubes coniques à centrifuger.....	77
Figure36 : l'aspect du culot après l'aspiration de surnageant.....	77

Figure 37: le conditionnement des paillettes.....	79
Figure38 : les paillettes placées au dessus d'azote liquide en phase vapeur, prolongées en phase vapeur, puis stockées dans l'azote liquide.....	80
Figure39 : décongélation des paillettes.....	80
Figure 40: l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes sous le microscope optique...	81
Figure41 : spermatozoïdes morts et vivants après décongélation.....	85

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Caractéristiques séminales de 222 étalons de sang des Haras Nationaux...	28
Tableau02 : les modèles du vagin artificiel couramment utilisé et leurs caractéristiques Principales (Steven P.et al. 2011).....	34
Tableau 03 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après: Fontbonne, 1992).	43
Tableau 04 : - Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes Dans un échantillon (d'après: Fontbonne, 1992).....	45
Tableau 05 : composition de Kenney et l'INRA96 (pour 1L) (Marc Stéphanie, 2015) et le Burns and Renser.....	54
Tableau 06 : La composition du Kenney (pour 1l).....	70
Tableau 07 : les caractéristiques séminales individuelles obtenues pendant le protocole	81
Tableau 08: paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la première répétition..	82
Tableau 09: paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la première répétition..	82
Tableau 10: paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la deuxième répétition..	82
Tableau 11 : paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la deuxième répétition.	83
Tableau 12: paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la troisième répétition..	83
Tableau 13: paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la troisième répétition..	83
Tableau 14: paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la troisième répétition..	84
Tableau15 : variation des paramètres et des pourcentages des spermatozoïdes mobiles et immobiles après décongélation.....	84
Tableau16 : Vitalité des spermatozoïdes après décongélation	85

Introduction

Introduction

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.

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 J. 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 (**John 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 (**Deals, 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.

L'objectif de ce contexte est de regrouper des données sur la physiologie du mâle et les techniques de récolte et de conservation du sperme chez l'étalon d'intérêt vétérinaire. Nous avons décidé d'intégrer les méthodes de récolte dans ce travail car cette étape est indispensable à l'obtention d'un échantillon de semence prêt à être congelé. Le but était

Introduction

Également de dégager les protocoles utilisés et les avancées qui ont eu lieu dans le domaine de la cryoconservation de semence

Cette thèse comporte une partie bibliographique composée de trois chapitres divisée en 3 grandes titres : Rappel sur l'appareil génital de l'étalon, Production de la semence chez l'étalon et Collecte et conservation de la semence chez l'étalon et une partie expérimentale divisée en 3 parties : la première présente la méthodologie de travail, la deuxième la présentation et la discussion des résultats obtenus et la troisième la conclusion, ainsi que les perspectives.

Chapitre I

Rappel sur l'appareil
génital de l'étalon

L'appareil reproducteur male a pour rôle la production de sperme et son dépôt dans les voies génitales femelles où se réalise la fonction de fertilisation (**Baronne ,1978**).

Il se compose de trois parties : la partie glandulaire (les testicules), la partie tubulaire (les voies spermatiques), et la partie uro-génitale (urètre pelvien et pénien). (**Chirent Mylène, 2015**). Dont la fonction est :

_ **Une partie glandulaire** : à savoir les deux testicules dont le rôle est la formation des spermatozoïdes et l'élaboration des hormones sexuelles males.

_ **Une partie tubulaire** : à savoir les voies spermatiques qui acheminent les spermatozoïdes à l'intérieur des testicules puis à l'extérieur par l'épididyme et le conduit déférent jusqu' à l'urètre.

_ **Une partie uro-génitale** : commune aux voies urinaire et génitale, composée elle-même de deux parties : l'urètre pelvien, situé dans le bassin, où de nombreuses glandes **annexes** sécrétrices se terminent, assurent l'élaboration d'un liquide spermatique qui dilue et nourrit les spermatozoïdes afin de faciliter leur survie et leur transport, et l'**urètre pénien** qui aboutit au méat urinaire et auquel s'ajoutent des formations érectiles annexes volumineuses.

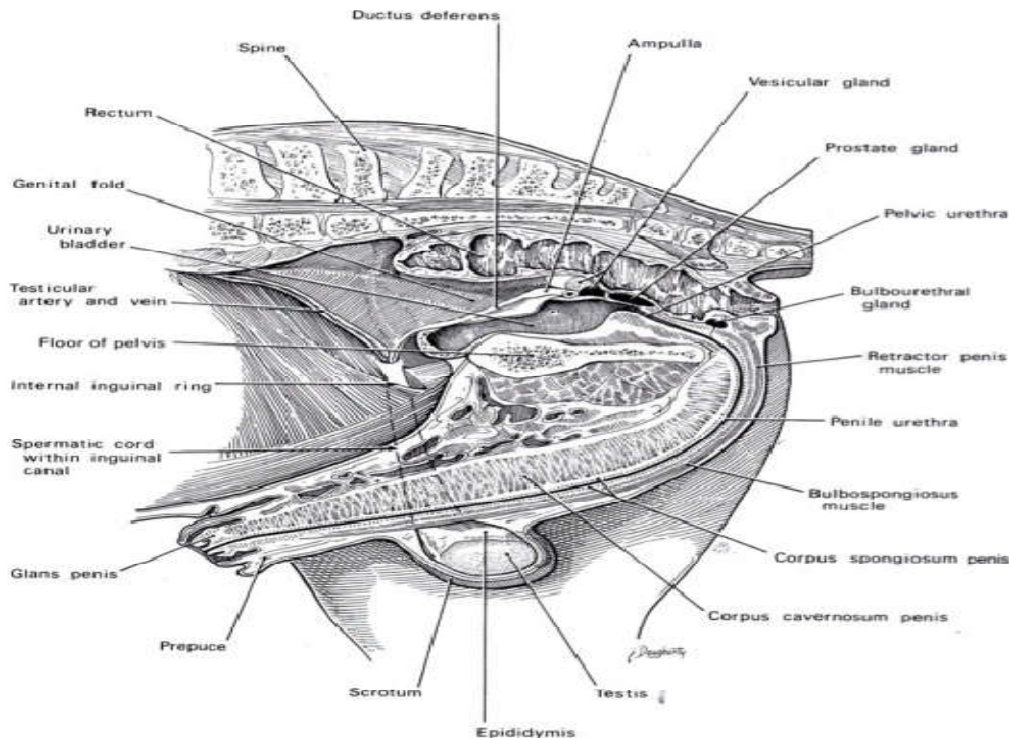


Figure 01 : dessin du tractus reproductif de l'étalon vue en coupe sagittale (MC .kinnon. A1993).

I .1.La partie glandulaire (testicules)

I.1 .1Descente testiculaire

Le testicule subit une migration, encore appelée descente testiculaire, au cours du développement de l'individu. Ce phénomène est commun à l'ensemble des mammifères et permet au testicule de se trouver à une température inférieure à la température corporelle, il s'agit là d'une obligation fonctionnelle, nécessaire à une spermatogénèse efficace (**ROGER ; 2009**).

La migration ou descente testiculaire est le phénomène par lequel la glande génitale mâle subit un déplacement qui la conduit de la région sous-lombaire à la région sous-inguinale dans un diverticule de la cavité péritonéale où elle vient faire saillie sous des enveloppes, apparentées à la paroi abdominale (**BARONE, 1956**).

I.1.2. Topographie des testicules

Les testicules sont des organes pairs de formes ovoïdes, suspendus en position horizontale par le scrotum en regard de la région pelvienne de l'étalon. Ils sont de la production des spermatozoïdes et la sécrétion de testostérone.

L'étalon est un mammifère exorchide permanent, c'est-à-dire que les testicules sont dans le scrotum tout au long de l'année de façon physiologique (**TIBARY et al, 2005**).

Les testicules sont des organes parenchymateux constitués de tissu conjonctif lâche, forment l'albuginée, et de nombreux lobules divisés eux même en tubes séminifères contournés et en tissu interstitiel. (**TIBARY et al, 2005**).

Les testicules dont la taille et le poids sont proportionnels au poids de l'animal ; taille de testicule en cm (**9_11cm de long ; 5_6 cm de large**), poids en g (**100_280g**) (**190g en moyenne**). (**D'après baronne 2001, bruyas2014**)

Le testicule gauche est en général situé un peu plus bas et un peu plus caudalement que le droit, l'albuginée est relativement épaisse et la pulpe brune jaunâtre ou grisâtre, Le mediastinum testis est peu développé, beaucoup plus rapproché du bord épидидymaire que le bord libre. Il est parcouru par une forte veine longitudinale. (**Baronne ; 2001**).

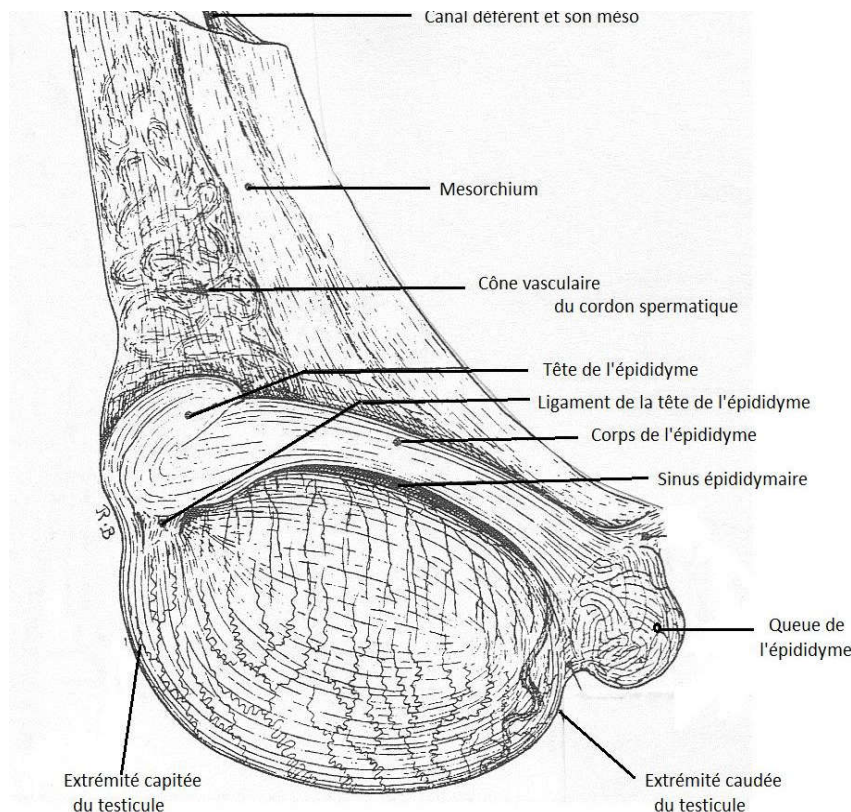


Figure 02 : testicule et épидидyme gauches du cheval. Conformation et moyen de fixité (BARONE.1956).

I.1.3. Anatomie des testicules

Un testicule d'étalon pourrait mesurée **80_140mm** de long sur **50_80mm** de large et peser environ **225g**. Cependant, l'âge et la saison affectant grandement le poids des testicules, leur taille et poids augmente proportionnellement a ceux de l'individu jusqu'à environ l'âge de **4à5** ans.

I.1.3.1. organisation externe des testicules

De la surface vers la profondeur, ces bourses sont constituées de cinq tuniques superposées, elles-mêmes pouvant être subdivisées en plusieurs plans. Il s'agit du scrotum, Du dartos, du fascia spermatique externe, du crémaster et de la fibro-séreuse, divisée en fascia spermatique interne et tunique vaginale (BARONE, 2001).

A. les enveloppes testiculaires superficielles

a. Scrotum

Il s'agit de l'enveloppe testiculaire la plus superficielle, simplement constituée par la peau et le dartos. La peau du scrotum présente des caractères particuliers : elle est mince, élastique

Et recouverte par un duvet fin. Contrairement aux autres enveloppes testiculaires, le scrotum constitue un sac commun aux deux testicules (**BARONE, 2001**).

Dartos Il s'agit d'une couche de tissu musculaire composée de fibres conjonctives et de fibres élastiques qui tapisse la face interne de la peau scrotale. Il s'agit d'un véritable muscle peaucier qui joue un rôle important dans la suspension des testicules (**BARONE, 2001**). Il a un rôle thermorégulateur grâce aux contractions musculaires qui provoquent des rides de scrotum en cas de froid (**Florence Batellier ; 2005**).

b. le fascia spermatique externe ou tunique celluleuse

Cette enveloppe constitue un premier plan de clivage entre les différentes structures des bourses testiculaires. Elle est constituée de deux couches d'aspect lamellaire séparées par du tissu conjonctif lâche. Il s'agit d'une zone de désolidarisation entre enveloppes superficielles (scrotum et dartos) et testicules, ce qui assure une protection mécanique par exemple contre les chocs (**ROGER, 2009**).

Dans cette couche que siège habituellement les infiltrations pathologiques en raison de la nature dissociable de ce tissu (**Delphine ; 2003**).

B. Les enveloppes testiculaires profondes

a. Crémaster

Il s'agit d'un muscle rouge vif issu du muscle oblique interne de l'abdomen. Il prend origine au niveau de l'anneau inguinal profond, traverse le canal inguinal et couvre les faces latérale et caudale du fascia spermatique interne. Sa contraction est à l'origine de l'ascension du testicule (**Vaissaire, 1977 ; Baronne ; 2003**), grâce à ses contractions importantes, il éloigne ou rapproche le testicule du corps (**florence Batellier, 2005**).

b. Fascia spermatique interne

Le fascia spermatique interne forme un sac piriforme débutant à l'anneau inguinal profond. Il est fortement solidarisé à la lame pariétale de la tunique vaginale ; ils constituent à eux deux la tunique fibro-séreuse (**BARONE, 1956 ; ROGER, 2009**)

c. Tunique vaginale

La tunique vaginale constitue la séreuse du testicule et de son cordon. Elle est constituée de deux lames, une lame pariétale et une lame viscérale, unies par le mésorchium et qui délimitent une cavité : la cavité vaginale, diverticule de la cavité péritonéale, avec laquelle elle communique au niveau de l'anneau vaginal (**BARONE, 2001**).

La cavité vaginale contient une faible quantité de liquide séreux qui facilite les mouvements du testicule au sein de ses enveloppes (**LITTLE et HOLYOAK, 1992**).

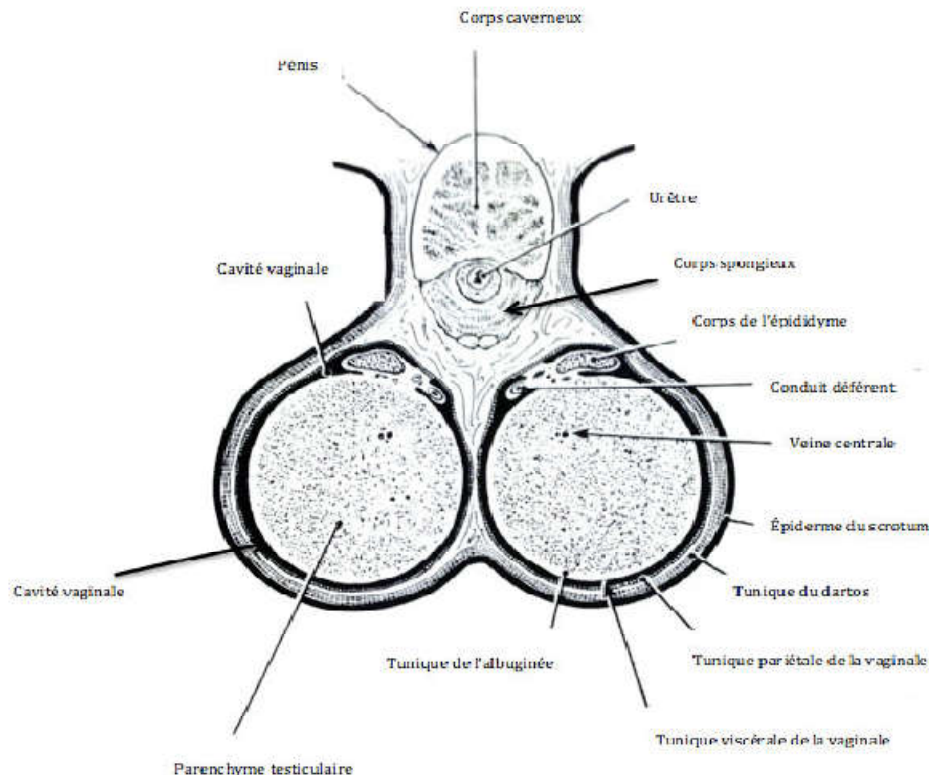


Figure 03 : schéma d'une coupe transversal des testicules de cheval (enveloppe et pénis) (D'après TIBARY et al. (2005)).

I.1.3.2. organisation interne des testicules

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

L'albuginée envoie des expansions à l'intérieur du testicule : elles forment des Cloisons qui délimitent des lobules testiculaires (**200 à 300**). Ces cloisons inter lobulaires se Rejoignent au centre du testicule, formant le mediastinum testis.

Chaque lobule est donc composé de plusieurs tubes séminifères entre lesquels se Trouve un tissu conjonctif lâche très vascularisé. C'est au sein de ce tissu interstitiel que l'on Trouve les cellules de Leydig (cellules endocrines sous forme d'îlots) (**Marie Allimant ,2010**).

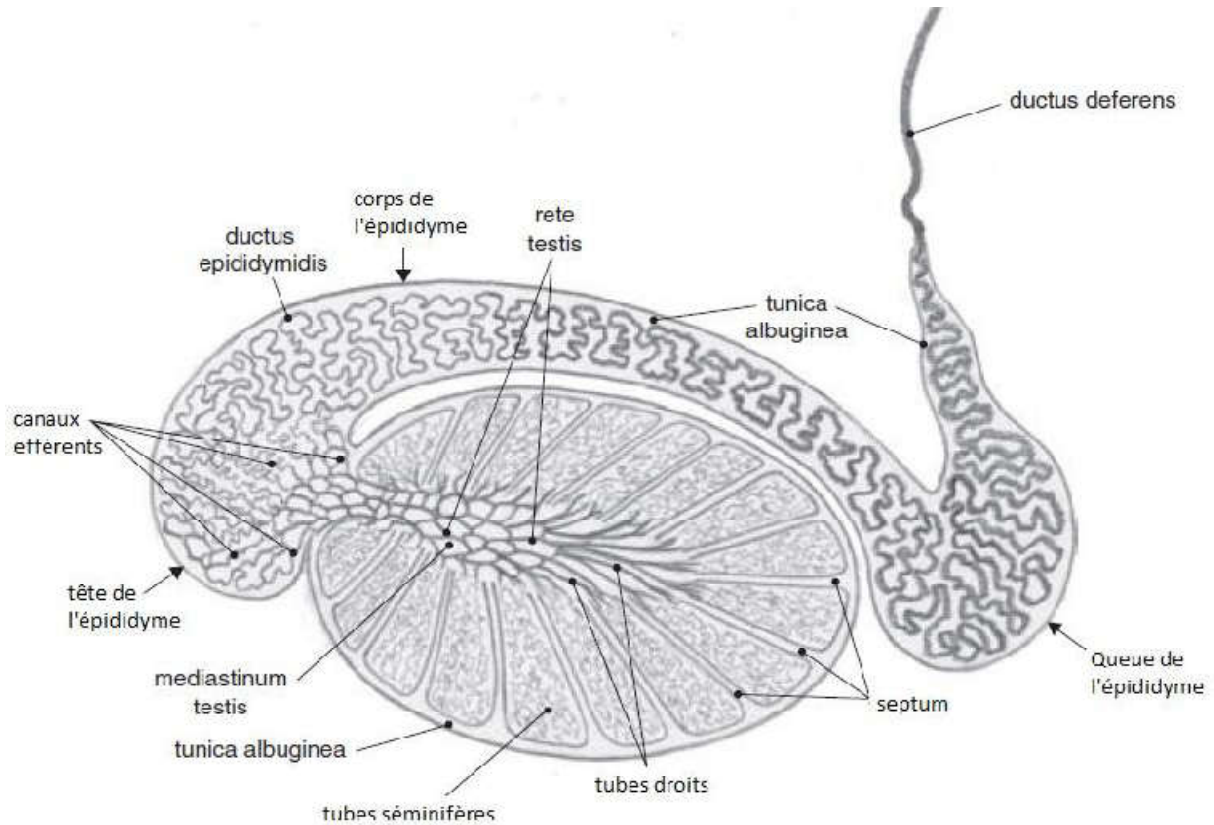


Figure 04 : organisation interne du testicule et de l'épididyme (Schatten ; 2007).

A. Les tubes séminifères

Chaque lobule du parenchyme testiculaire regroupe deux à quatre tubes séminifères contournés, siège de la spermatogénèse. Ces tubes sont fortement intriqués et échangent des anastomoses ; ils sont collectés par les tubes séminifères droits, situés au sommet de chaque lobule (**Baronne 1956**).

A la sortie d'un lobule, les tubes séminifères se jettent dans un tube droit dont la paroi ne comporte plus que des cellules cubiques, homologues des cellules de sertoli, et reposant sur une lame basale. Dans le corps de highmore, les tubes droits s'anastomosent et forment un réseau de canaux, le rete testis qui se dirige vers la tête de l'épididyme.

Chaque tube séminifère, fortement pelotonné sur lui-même, peut mesurer **jusqu'à 2 à 3 m** de long chez les grandes espèces et **120 à 300 Um** de diamètre (**florence batellier ; 2005**). Autour d'une lumière centrale pouvant contenir des spermatozoïdes, on observe sur la coupe

Transversale d'un tube un épithélium stratifié reposant sur une lame basale, cet épithélium assure la spermatogénèse, il comporte deux types de cellules :

A. les cellules de sertoli

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

Elles sécrètent les éléments de nutrition et synthétisent l'ensemble du liquide où baignent les spermatozoïdes. L'évolution des spermatogonies en spermatozoïdes a donc lieu entre les cellules de sertoli, qui possèdent divers rôles (**marie Allimant, 2010**).

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

a. Les cellules germinales aux différents stades de leur évolution

Sont les spermatogonies, les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes dérivant toutes des gonocytes.

➤ Les spermatogonies

Les spermatogonies sont issues des **cellules germinales** primordiales. Lors de la division cellulaire, lorsqu'une des spermatogonies s'engage dans la spermatogénèse, la Seconde peut servir, quant à elle, à maintenir le stock en cellules germinales. Celle-ci se divisera de nouveau plus tard en deux cellules-fille, et le même cycle reprendra.

Les spermatogonies passent par trois phases :

- la phase non différenciée est dite Ad, car la spermatogonie présente un **noyau** sombre (*dark* en anglais).
- ensuite, la spermatogonie rentre en phase **AP** car le noyau s'éclaircit et devient pâle ;
- enfin, après **mitose**, la spermatogonie rentre en phase B, avec de nouveaux changements au niveau nucléaire (agrégats périphériques de **chromatine**) et va se diviser pour donner des spermatozytes I qui vont poursuivre la spermatogénèse. (**sutura sciences**).

➤ **Les spermatozoïdes**

Le spermatozoïde est le résultat final de la spermatogénèse par plusieurs étapes de différenciation et de multiplication des cellules de la lignée germinale à partir des spermatogonies ou cellules initiales en aboutissant à la production des spermatozoïdes.

C'est une cellule hautement différenciée, à n chromosomes, de 50 à 80 μm de longueur comportant trois parties : la tête, le col, et le flagelle avec ses trois pièces : pièce intermédiaire, pièce principale, pièce terminale (**Florence Batellier ; 2005**).

Le flagelle, par ses mouvements, est à l'origine de la motilité des spermatozoïdes liée à leur pouvoir fécondant, car les mitochondries assurent les phosphorylations oxydatives du fructose Présent dans le liquide séminal fournissant l'énergie nécessaire aux mouvements de la queue, tandis que les structures de l'axonème ont des propriétés contractiles. Ainsi, les microtubules périphériques sont riches en ATP ase(**Mc Donald, 1980 ; Albert et jean, 2001**).

B. Le tissu interstitiel

Il est constitué de tissu conjonctif dans lequel se trouve des petits amas de cellules endocrines : les cellules Leydig, situés le long des capillaires sanguins. Ces cellules assurent la sécrétion d'hormones sexuelles males.

La production de testostérone par les cellules de Leydig est contrôlée par une gonadotrophine, l'hormone LH (lutealizing hormon). Une concentration basse en testostérone induit une augmentation de la sécrétion de LH par la glande pituitaire antérieure. Cette augmentation de LH entraîne la sécrétion de testostérone. La testostérone diffuse du tissu

interstitiel jusqu'aux tubes séminifères, où elle agit sur le bon déroulement de la spermatogenèse par le maintien du processus de méiose (reece1997).

C. vascularisation et innervation des testicules

Les testicules sont très fortement vascularisés. Chaque testicule est irrigué par l'artère testiculaire, très tortueuse, issue de l'aorte abdominale, qui se divise en branches terminale.

Irriguant le testicule mais aussi la tête et la queue de l'épididyme. Lorsqu'elle atteint le testicule, cette artère parcourt la surface de l'albuginée et pénètre ensuite le parenchyme.

Testiculaire où chaque lobule est alimenté par une branche artérielle (**Jégou et al. 2014; Baronne 2001**)

Les veines testiculaires partent directement vers la surface du parenchyme et se regroupent autour de l'artère testiculaire au niveau du cordon spermatique pour constituer le plexus pampiniforme qui permet le refroidissement du sang artériel et assure donc la thermorégulation du testicule. Dans certaines espèces, notamment les équidés, le plexus pampiniforme est relativement réduit (**Jégou et al. 2014; Baronne 2001**).

Les nerfs proviennent principalement du plexus mésentérique caudal et forment le plexus testiculaire. Ils se distribuent dans l'albuginée par des terminaisons sensibles libres. Il semblerait que les fibres nerveuses ne pénètrent pas dans les tubes séminifères (**Baronne 2001**).

I.2. la partie tubaire (excrétrice)

I.2.1.les voies spermatiques intra-testiculaires

Les voies de conduit spermatique testiculaires sont formées par les tubes droits prolongés par le rete testis d'où émergent une vingtaine de canaux efférents. Ces conduits quittent le testicule en traversant l'albuginée et convergent ensuite pour former la tête de l'épididyme (**marie Allimant, 2010**).

- **Les tubes droits :** courts et rectilignes, ils prolongent les tubes séminifères et sont bordés par un tissu épithélial simple formé de cellules cubiques qui sont équivalentes aux cellules de sertoli des tubes séminifères. Au niveau des tubes droits, on ne trouve par contre plus de cellules de la lignée germinale, à l'exception d'amas de spermatozoïdes en cours de migration.

- **Le rete testis** : est bordés d'un épithélium simple et cubique
- **Les canaux efférents** : ils cheminent dans le tissu conjonctif. Après la traversée de l'albuginée, ils prennent le nom de cônes efférents qui, par fusion, forment le canal épидидymaire unique. Ils ont un rôle de conduction et de progression des spermatozoïdes.

Le liquide du rete testis véhicule des spermatozoïdes immobiles. Il ne serait qu'une sécrétion tubulaire remaniée, probablement du fait d'échanges avec les veines testiculaires superficielles (**Thibault C. ; 2001**).

I.2.2 les voies spermatiques extra-testiculaires

I.2.2.1. L'épididyme

La différenciation des gamètes males s'effectue dans le testicule. Cependant à leur sortie les spermatozoïdes ne sont pas matures : ils ne sont ni mobiles, ni fécondants. La différenciation se poursuit en dehors de la gonade, dans le tube épидидymaire et constitue-la

Maturation des spermatozoïdes. Dans cet organe, les spermatozoïdes continuent à se transformer en subissant plusieurs modifications notamment biochimiques, qui les rendront aptes à reconnaître et à féconder un ovocyte (**Thibault C, 2001**).

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

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

L'épididyme possède plusieurs fonctions :

- La progression des gamètes par contraction des cellules musculaire.

- La réabsorption de liquides (eau, ions et protéines), essentiellement de la concentration en régions épидидymaire, ce qui entraîne une augmentation de la concentration en spermatozoïdes.
- La concentration des provenant du sang dans la lumière du tube (carnitine, inositol). La carnitine est captée par les spermatozoïdes et transformée en acétylcarnitine qui sera utilisée comme substrat énergétique pour la mobilité. L'inositol provient du testicule, de la synthèse épидидymaire et du sang. Son rôle est incertain.
- La sécrétion dans la lumière de petites molécules organiques et d'enzymes (glycérylphosphorylcholine, phosphatase, protéase, glycosidases) permettant de maintenir les gamètes en vie, de stabiliser leur membrane plasmique et de leur conférer leur mobilité et leur fertilité. La composition protéique du fluide épидидymaire est en constante évolution tout au long de l'organe, les protéines épидидymaire pouvant être très différentes de celles du sang et du testicule.

Ainsi, à la sortie de l'épididyme, les spermatozoïdes sont fertiles et mobiles. **(Thibault C. 2001).**

A. le canal déférent

Il est dans le prolongement de la queue de l'épididyme et accompagne le cône Vasculaire à travers le canal vaginal. Il chemine à la face médiale du mésorchium porté par le mesoductus déférents. Il est long de **60 à 70 cm**. Sa partie initiale est très flexueuse puis il devient rapidement rectiligne et remonte dans la région inguinale. Après avoir cheminé dans le cordon spermatique, le conduit déférent se porte, au-delà de l'anneau vaginal, sur le côté de la cavité Pelvienne puis

À la face dorsale de la vessie pour déboucher dans la portion initiale de la partie pelvienne de l'urètre **(Delphine ; 2003).**

B. Les glandes vésiculaires

Ce sont des glandes tubulo-alvéolaires. Les vésicules séminales (ou glandes Vésiculaires) et le conduit déférent se terminent par un conduit commun : le conduit éjaculateur qui débouche ensuite dans l'urètre. Les cellules épithéliales des vésicules séminales sécrètent des protéines (enzymes, inhibiteurs d'enzymes, protéines structurales) et un mucus gélatineux, Épais et blanc, composé entre autres de fructose et de prostaglandines. Les prostaglandines jouent un rôle dans les contractions des voies génitales femelles, et favorisent donc la

migration des spermatozoïdes dans ces voies femelles (**Baronne R. 2001 ; Thibault C. ; 2001**).

I.3. La partie uro-génitale

I.3.1. l'urètre d'étalon

L'urètre mâle est un long conduit impair ayant pour fonction l'excrétion de l'urine Et aussi celle du sperme. Il fait suite au col de la vessie ; près de son origine, il reçoit le débouché des voies spermatiques. Il longe le plancher pelvien, puis sort du bassin et se poursuit dans le pénis, à l'extrémité duquel il se termine par le méat urinaire ;(**BARONE 2001**).

Le conduit urétral est constitué d'une muqueuse doublée en certains endroits par un tissu érectile et enveloppée par une couche musculaire. Le tissu érectile de la paroi urétrale, dans sa portion pénienne (corps spongieux de l'urètre) présente des éléments vasculaires sont très développés et peuvent accumuler une grande quantité de sang. La couche musculaire est constituée de fibres musculaires striées circulaires, dont la contraction joue un rôle dans la miction et l'éjaculation (**ROGER, 2009**).

A. L'urètre pelvien

C'est la partie la plus proximale de l'urètre, elle est dite intra-pelvienne : d'une longueur seulement de 10 à 12 cm, elle est dépourvue de formations érectiles mais présente des glandes annexes importantes (**Baronne ; 2001**).

L'urètre pelvien est limité par deux rétrécissements : le premier, proximal, correspond au col de la vessie et le second, caudal, correspond à l'isthme de l'urètre. Ces deux rétrécissements

Délimitent une partie plus large appelée fosse prostatique, au niveau de laquelle se trouvent les orifices éjaculateurs, dans lesquels s'abouchent en commun les canaux déférents et les vésicules

Séminales. C'est également au niveau de la fosse prostatique que se trouvent les orifices des canaux excréteurs de la prostate (**Baronne, 2001 ; Roger, 2009**).

B. L'urètre pénien

Il représente la partie distale de l'urètre, dite extra-pelvienne ou pénienne, elle commence par un bulbe du pénis long de **8 à 10 cm** et assez peu renflé, sa largeur n'excédant pas **5 à 6 cm**, alors que le corps spongieux à un diamètre extérieur de **2,5 cm** et, au contraire

de la portion précédente, elle est entourée de tissu érectile mais dépourvue de glandes annexes (**Baronne, 2001**).

La portion pénienne comporte à son origine les orifices excréteurs des glandes bulbo-urétrales, encore appelées glandes de Cowper, et se situe au sein du corps spongieux (**Baronne, 2001 ; Roger, 2009**).

I.3.2. glandes annexées à l'urètre

A l'urètre sont annexées des glandes dont les sécrétions sont déversées au moment de l'éjaculation et diluent le sperme, lui donnant ainsi sa composition finale.

L'une de ces glandes est impaire et volumineuse : il s'agit de la prostate. Les autres, plus petites et paires, constituent les glandes bulbo-urétrales, (**BARONE ,2001**).

A.la prostate

La prostate est une glande impaire présente chez tous les mammifères mais dont la conformation peut varier d'une espèce à l'autre.

La prostate est un peu moins développée proportionnellement chez les équidés, elle est volumineuse, ferme et constituée de deux lobes réunis par un isthme. Elle se situe dorsalement à la terminaison de la vésicule séminale et à la partie terminale du canal déférent. Elle résulte en fait de l'agglomération de glandules multiples, unies par un stroma commun, mais débouchant par des conduits distincts (**10 à 20** de chaque côté, chez le Cheval), dans la partie initiale de l'urètre (**Baronne ; 2001**).

Le poids et la taille de la prostate sont positivement corrélés avec l'âge de l'animal (étalon 3-5 cm de large et 6-10 cm de long par lobe). Son développement est contrôlé par la sécrétion hormonale du testicule et indirectement par l'axe hypothalamo-hypophysaire. C'est pourquoi la Castration est à l'origine d'une atrophie importante de cet organe (**Johnston et al. 2001; Baronne2001**).

La prostate joue un rôle principal dans l'élaboration du sperme. En effet, les sécrétions prostatiques représentent les trois-quarts du volume spermatique et elles se déversent dans l'urètre via de multiples conduits, peu avant l'éjaculation, afin de diluer le sperme et de lui donner sa composition définitive. Le liquide sécrété par la prostate est opalescent, de pH légèrement acide

(Entre 6 et 7) et contient des protéines, du lactate, de l'acide citrique, du cholestérol et des enzymes ainsi qu'une faible concentration en sucres Réduits chez le chien par rapport aux autres espèces.

Il est également riche en éléments minéraux, principalement du zinc mais également du calcium, du magnésium et du potassium.

Les rôles de ces sécrétions sont multiples : dilution, transport, nutrition et protection des spermatozoïdes, effet tampon contre le pH vaginal, action bactériostatique, participation à la fin de la maturation des spermatozoïdes et propriétés immunosuppressives dirigées contre les éléments du tractus génital femelle (**Johnston et al. 2001; Baronne 2001**).

B.les glandes de cowper

Les glandes de cowper, appelées également glandes bulbo-urétrales, sont paires et situées de chaque côté de la face dorsale de la partie pelvienne de l'urètre, tout près du bulbe du pénis.

Elles sont en revanche un peu plus volumineuses chez l'étalon (**4-6 cm de long, 2-3 cm de large**).

Ces glandes sont de forme ovale voire cylindroïde chez l'étalon (**Baronne 2001**). De consistance ferme, elles présentent une surface irrégulière qui laisse percevoir une structure lobulaire. En effet, ce sont des glandes tubulo-alvéolaires, composées d'un réseau de tubules et de saccules entourés d'une mince couche de muscle strié. Les deux glandes sont reliées l'une à l'autre Par un tissu conjonctif et possèdent un seul conduit excréteur court. Les cellules épithéliales de ces glandes sécrètent des granules de mucus (**Baronne 2001; Noakes et al. 2009; Johnston et al. 2001; Dacheux et al. 2001**).

Le fluide émis est aqueux, visqueux et clair. Il est délivré avant le coït et aurait pour rôle une lubrification de l'urètre ainsi que sa protection contre les constituants délétères (ions, acides et bases) contenus dans les sécrétions prostatiques et celles des glandes vésiculaires. Il permet également de compléter la composition du sperme. (**Dyce et al. 1987; Dacheux et al. 2001; Noakes et al. 2009**).

C. la verge au pénis

Le pénis est l'organe copulateur du mâle. Il est composé de l'urètre, entouré de plusieurs formations érectiles : les corps caverneux, le corps spongieux de l'urètre et le corps spongieux

du gland, formations dont l'érection permet l'accouplement et le dépôt du sperme dans les voies génitales femelles. La longueur du pénis est variable en fonction de l'espèce de **l'animal (80 à 100 cm Chez l'étalon). (Baronne 2001; Noakes et al. 2009).**

Le pénis présente deux parties : l'une, proximale, qui occupe la région ventrale du périnée et la profondeur du scrotum : il s'agit de la partie fixe. L'autre, distale et mobile qui, Lors de l'érection, est portée dans les voies génitales de la femelle, c'est la partie libre, protégée au repos par un repli cutané, le prépuce.

Le corps du pénis présente de grandes variations interspécifiques. Il est épais chez les équidés Elle est subdivisée en deux branches appelées les piliers du pénis entre lesquels est logé le bulbe du pénis, plus ou moins volumineux et bilobé selon l'espèce. L'extrémité libre est formée par le gland

L'organe copulateur mâle des différentes espèces étudiées présente des similitudes dans la disposition générale ainsi que dans l'anatomie globale mais chaque espèce possède ses particularités anatomiques chez l'étalon, les corps caverneux sont également pourvus d'une albuginée très épaisse. Le pénis s'avance très loin, sous le ventre et le prépuce atteint le voisinage immédiat de l'ombilic. Le corps spongieux du gland est très peu développé. Ce dernier présente une forme très Asymétrique ; il est incurvé en crochet vers la gauche et l'ostium externe de l'urètre est porté par un processus urétral **(MARC Stéphanie, 2015).**

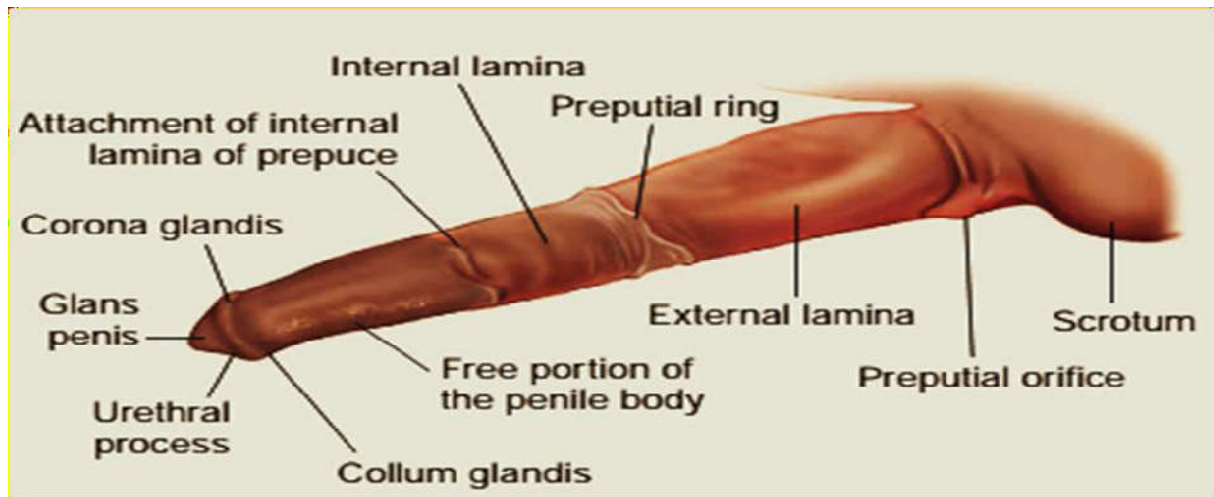


Figure 05 : *structure de pénis et du prépuce de l'étalon (P.L. Senger, Ph. D., 2003).*

I.4. 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 de la glande via le nerf érecteur (rameau du nerf honteux). Le nerf honteux assure l'innervation sensitive du périnée, du scrotum et du pénis (**Marie Allimant, 2010**).

Chapitre II

Production de la semence chez l'étalon

II. de la spermatogénèse à l'éjaculation

II.1. spermatogénèse, spermiogénèse et la spermiation

II.1.1. spermatogénèse

La spermatogénèse correspond au processus de multiplication et de différenciation des cellules

Souches germinales, dans les tubes séminifères, au sein du testicule, et qui résulte en la formation de cellules hautement spécialisées, les spermatozoïdes, constituant les gamètes mâles (**Brito 2007**).

La spermatogénèse est sous le contrôle hormonal de l'axe hypothalamo-hypophysaire ainsi que de la sécrétion de testostérone, qui subit des variations d'intensité selon le moment de la journée.

La durée de la spermatogénèse est variable en fonction des espèces (chez l'étalon la durée de la spermatogénèse (en jours) **57** jours, nombre total de spermatozoïdes par éjaculat (**15 milliards**)). La quantité de spermatozoïdes produits est proportionnelle à la taille de l'animal : **de 3 millions** jusqu'à 15 milliards de spermatozoïdes par éjaculat. Chez la plupart des mammifères, la production moyenne de spermatozoïdes est de 20 à 28 millions par jour et par gramme de testicule, à l'exception du taureau (**12 millions**) et de l'étalon (**15 à 20 millions**), (**Bruyas 2014**).

C'est durant la spermatogénèse que peut apparaître une partie des anomalies responsables de la mauvaise qualité du sperme, les anomalies dites primaires.

La **spermatogénèse** est divisée en plusieurs étapes au sein des tubes séminifères (**Figure 5**) :

- **La spermatocytogénèse** : étape de méiose permettant la maturation des spermatogonies en spermatides.
- **La spermiogénèse**: étape au cours de laquelle les spermatides évoluent en spermatozoïdes.
- **La spermiation** : libération des spermatozoïdes dans les tubes séminifères.

Chez l'adulte, les spermatogonies souches sont disposées à la périphérie des tubes séminifères, entre les cellules de Sertoli. Il existe un pool primordial de spermatogonies, dont certaines, les spermatogonies A, se divisent activement sans se différencier et permettent ainsi le renouvellement du stock de cellules souches ainsi qu'une production continue de spermatozoïdes.

Au cours de la **spermatocytogenèse**, parmi le pool de spermatogonies, certaines vont se différencier pour former les spermatogonies B qui subissent ensuite une division mitotique pour Passer au stade spermatocyte I. Le stade spermatocyte II sera atteint après la première division méiotique (réductionnelle) et la seconde division méiotique (équationnelle) les amènera au stade spermatide.

Cette méiose permet d'une part le passage à l'haploïdie, mais surtout, grâce à de nombreuses recombinaisons (séparation aléatoire des chromosomes homologues, crossing-over), elle réalise un brassage génétique intense et indispensable à la diversité génétique des individus (**Ponthier et al.2014; Dadoune et al. 2001; Johnston et al. 2001**).

II.1.1.2.spermiogénèse

Correspond à la différenciation des spermatides obtenues en spermatozoïdes. Les spermatozoïdes étant des cellules hautement spécialisées dans la motricité et la pénétration de l'ovocyte, la spermiogénèse comprend différentes étapes telles que la réorganisation et la condensation du noyau, la formation de l'acrosome et des structures de la queue.

La spermiogénèse peut se diviser en quatre étapes : la phase de Golgi (formation d'un pro-acrosome par l'appareil de Golgi), la phase de la « coiffe » (élongation de l'acrosome autour du noyau et début de l'organisation du flagelle), la phase de l'acrosome (allongement du cytoplasme et du noyau) et la phase de maturation (formation du flagelle et du corps résiduel, nombreuses modifications structurales) qui aboutit à un spermatozoïde différencié (**Baronne 2001**).

II.1.1.3.la spermiation

La **spermiation** correspond à la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Ils sont alors immatures et immobiles. Le corps résiduel est phagocyté par les cellules de Sertoli et seule une gouttelette reste accrochée proximale à la pièce intermédiaire. Cette gouttelette migre distalement au cours de la maturation épидидymaire puis finit par se décrocher du spermatozoïde. Parfois, des anomalies de migration de la gouttelette sont responsables de formes anormales de spermatozoïdes.

Les spermatozoïdes immatures rejoignent ensuite l'épididyme où ils y séjournent quelques jours. Dans la tête de l'épididyme, les spermatozoïdes ne sont ni mobiles, ni fertiles et la

Gouttelette cytoplasmique proximale est présente. La progression des spermatozoïdes dans l'épididyme ne dépend pas de leur mobilité propre, mais des mouvements de l'épithélium ciliaire et de l'activité musculaire lisse de la paroi de l'épididyme.

Dans le corps de l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité. L'apparition de la mobilité fait suite à l'absorption de carnitine au niveau de la tête de l'épididyme. À ce stade, La gouttelette cytoplasmique se trouve sur l'extrémité distale de la pièce intermédiaire et les spermatozoïdes peuvent se lier à l'ovocyte et sont capables de féconder un ovocyte.

Ces étapes au sein de l'épididyme font partie de la **maturation épидидymaire** qui est sous contrôle androgénique. Lors de la maturation épидидymaire, une condensation maximale du génome est obtenue suite au remplacement des histones par les protamines. Le noyau est mieux protégé et le cytoplasme est progressivement évacué, laissant uniquement place à des mitochondries qui entourent la gaine fibreuse (formant la pièce intermédiaire) qui se prolonge plasmique sont également observées. La grande majorité des spermatozoïdes sont ensuite stockés dans la queue de l'épididyme.

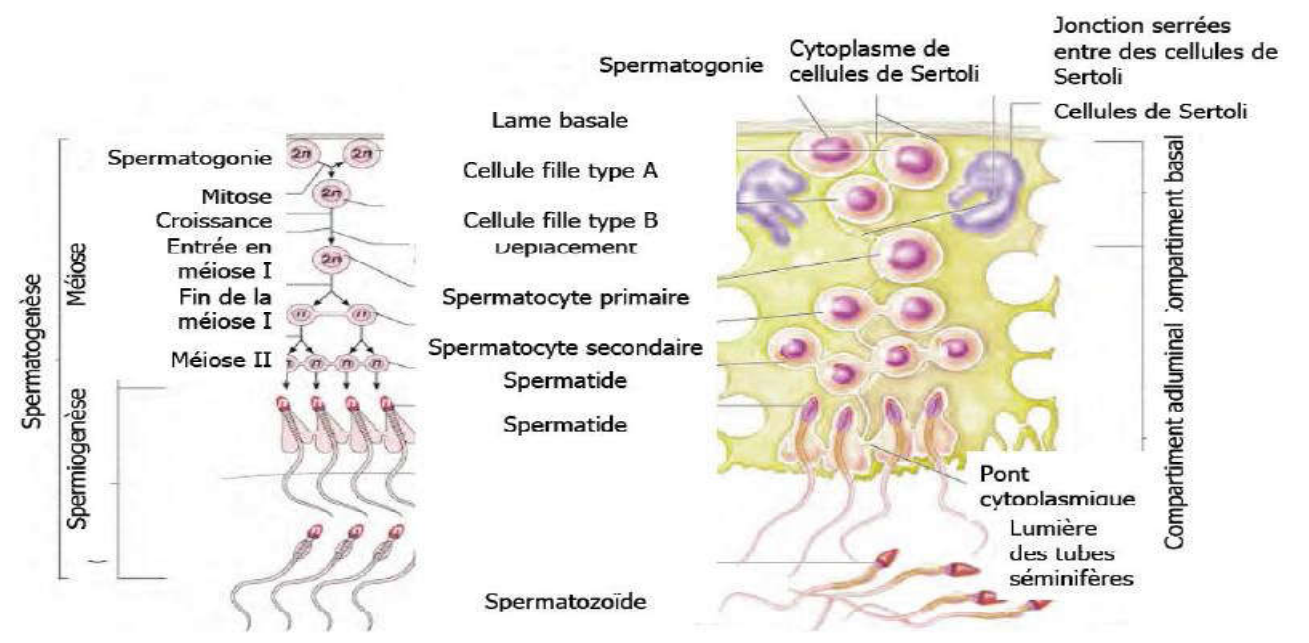


Figure 06: Les différentes étapes de la spermatogénèse (Senger, 2012).

II.1.2. structure de spermatozoïde

Le spermatozoïde transporte l'information génétique dans le tractus génital femelle et la délivre à l'intérieur de l'ovocyte. Afin d'accomplir cette mission, le spermatozoïde est hautement différencié. La taille et la forme du spermatozoïde varient entre espèces (**senger, 2005**).

Chez l'étalon, il mesure **60 Um** de long sur **2,7 Um** de large (**amann et Graham, 2011**). Morphologiquement, le spermatozoïde des mammifères est divisé en deux parties (**senger, 2005**) ; (i) la tête, comprend l'acrosome, le chapeau nucléaire et le noyau cellulaire et (ii) la queue ou flagelle, comprend la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale.

➤ La membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique constitue la barrière avec le milieu extérieur elle n'est pas homogène mais est divisée en de nombreux micro domaines (mosaïque) où des protéines spécifiques sont fixées (**Gadella, 2008**). De nature lipidique, elle peut être modifiée par le milieu avec lequel des échanges sont possibles (**Ricker et al, 2006; Gadella, 2007; 2008b**). Elle est sensible aux dommages causés par la congélation et des formes activées de l'oxygène (**FAO**) (**Brinsko et al, 2003 ; Neild et al, 2003 ; Neild et al, 2005**).

➤ La tête

La tête constitue la partie essentielle du spermatozoïde, car elle est presque entièrement composée du noyau et renferme donc la chromatine. Sa forme et ses dimensions sont variables selon l'espèce. Elle est à peu près ovalaire lorsqu'elle est vue de face et aplatie en vue de profil.

La tête est décrite comme comprenant trois parties : (i) l'acrosome, (ii) le noyau et (iii) le chapeau nucléaire (Figure08). La surface de la membrane de la tête est structurée en une mosaïque de territoires exposant des protéines nécessaires à la capacitation.

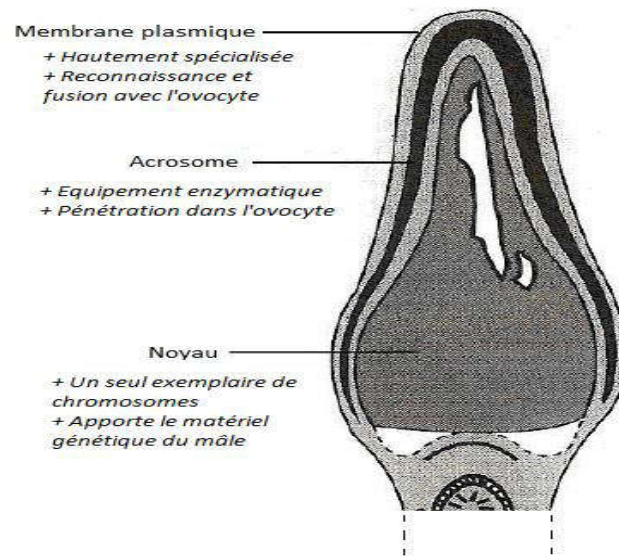


Figure07 : Organisation interne de la tête du spermatozoïde (Dadoune, 2001).

- **L'acrosome** : est une vacuole spécialisée, composée d'une double membrane, située à l'avant du noyau et formée lors de la spermiogénèse pendant la phase de Golgi. L'acrosome couvre les deux tiers de la tête chez l'étalon.
Les enzymes hydrolytiques présentes dans l'acrosome sont responsables de la lyse de la zone pellucide ovocytaire essentielle à la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte lors de la fécondation. Le processus de congélation peut être à l'origine de réactions acrosomiales prématurées.
- **Le noyau** : occupe la plus grande partie de la tête du spermatozoïde et contient le matériel génétique mâle sous forme d'ADN hautement condensé. Il est haploïde et ne contient donc qu'un seul exemplaire de chromosomes (Ponthier et al. 2014; Brito 2007).
Chez le cheval, la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites au cours du processus de congélation peut entraîner la fragmentation de l'Adn du noyau. (Ponthier et al. 2014).
- **Le flagelle** : Le flagelle constitue l'élément moteur du spermatozoïde, il lui permet d'atteindre l'ovocyte dans les voies génitales femelles et de pénétrer ce dernier. Il comprend trois parties successives: (i) la pièce intermédiaire, (ii) la pièce principale et (iii) la pièce terminale (Figure09). La queue s'attache à la tête du spermatozoïde via une pièce spécifique, le col ou pièce connective, qui représente le segment initial du flagelle.

- **La pièce intermédiaire** : fait directement suite au col et constitue la partie la plus épaisse de la queue. Elle est formée de l'axonème entouré d'une couche de fibres denses et d'une gaine de mitochondries disposées en hélice et produisant l'ATP. Cette gaine mitochondriale est indispensable à la production d'énergie nécessaire au mouvement du flagelle. Chez le cheval, il a été observé que la congélation peut provoquer une diminution de l'activité mitochondriale, ce qui sera à l'origine d'une diminution de la mobilité du spermatozoïde.

L'axonème : est un filament qui parcourt toute la longueur de la queue et est constitué d'un assemblage de fibrilles longitudinales creuses ou microtubules : une paire de microtubules centrale entourée de neuf paires de microtubules. Les microtubules sont constitués de sous-unités de α - et β -tubulines associées à des protéines motrices dont la kinésine.

La pièce principale : de loin la plus longue, comporte simplement l'axonème et les fibres denses qui s'amincissent en allant vers la pièce terminale.

Dans la pièce terminale : la gaine et les fibres denses font défaut et seul le filament axial est présent (Baronne 2001; Brito 2007; Ponthier et al. 2014).

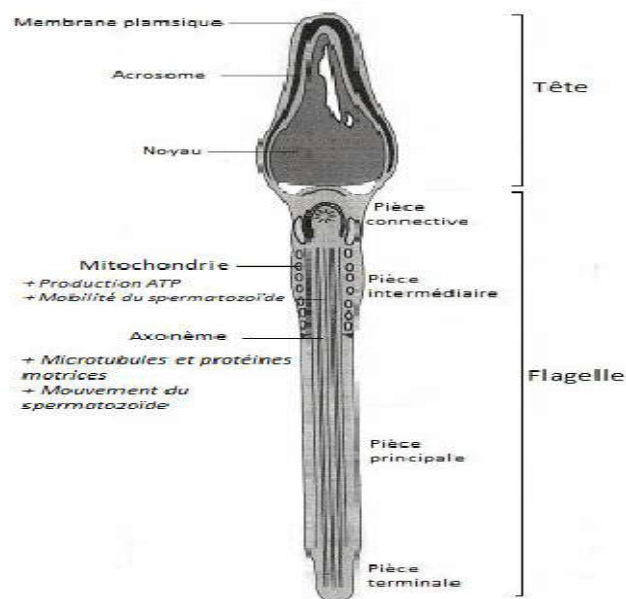


Figure 08 : Organisation interne du spermatozoïde (Dadoune, 2001).

I.1.3. Maturation de spermatozoïde et capacitation

I.1.3.1. Maturation

Le spermatozoïde équin séjourne au minimum 4,1 jours dans l'épididyme (Senger, 2005 ; Amann, 2011), où des modifications physiologiques et morphologiques vont avoir lieu.

Durant ce transit, Le liquide présent à l'entrée de l'épididyme va presque entièrement être réabsorbé et il sera ensuite remplacé par une sécrétion de la partie distale de l'épididyme (**Senger, 2005 ; Amann, 2011**). Dans la tête de l'épididyme, les spermatozoïdes ne sont ni mobiles, ni fertiles et une gouttelette cytoplasmique proximale est présente (**Senger, 2005 ; Amann, 2011**). Dans le corps de l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité. L'apparition de la mobilité fait suite à l'absorption de carnitine au niveau de la tête de l'épididyme (**Senger, 2005 ; Amann, 2011**). À ce stade, la gouttelette cytoplasmique se trouve sur l'extrémité distale de la pièce intermédiaire (**Braun et al, 1994**) et les spermatozoïdes peuvent se lier à l'ovocyte et sont capables de féconder un ovocyte (**Sostaric et al, 2008**).

Dans le plasma séminal, la membrane cytoplasmique de la tête va être recouverte par des protéines et des glucides du plasma séminal (**Lopez et al, 2007 ; Gadella, 2008 ; Gadella et al, 2008**). La dilution du milieu épидидymaire par le plasma séminal va aussi lever l'inhibition de la mobilité des spermatozoïdes (**Senger, 2005**).

Seuls les spermatozoïdes présents dans la partie distale de l'épididyme sont éjaculés. Les préliminaires sexuels provoquant une libération d'ocytocine, les contractions des muscles lisses vont amener les spermatozoïdes jusqu'à l'urètre pelvien où ils seront stockés avant l'éjaculation.

II.1.3.2.Capacitation

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

II.2. Caractéristiques de la semence d'étalon

II.2.1.Aspect externe

II.2.1.1.Volume

L'éjaculat de l'étalon est composé de deux fractions majeures : une fraction liquide (contenant la majorité des spermatozoïdes) et une fraction gélatineuse. Si le tube collecteur dispose d'un filtre, le volume de la fraction liquide peut être lu directement sur ce tube

collecteur. Par contre, le volume de la fraction gélatineuse doit être établi à partir de la portion retenue par le filtre. Certains étalons ont des éjaculats complètement dépourvus de gel (Marie Allimant, 2010).

II.2.1.2. Couleur et consistance

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

Pour les étalons de sang (moyenne sur 222 étalons des Haras Nationaux), les autres principales caractéristiques du sperme et de sa production sont regroupées dans le **tableau 01** (Haras nationaux, 2004).

Tableau 01 : Caractéristiques séminales de 222 étalons de sang des Haras Nationaux

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



Figure 09 : aspect du sperme d'étalon après centrifugation (Marie Allimant, 2010).

II.2.2. Composition chimique

La composition chimique du sperme est la suivante :

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

II.2.3. Plasma séminal

La semence est constituée de spermatozoïdes suspendus dans un fluide appelé plasma séminal. C'est un fluide complexe qui assure l'apport de substrats énergétiques aux spermatozoïdes qui en étaient largement dépourvus lors de leur stockage dans l'épididyme. De plus, il permet l'activation de la motilité progressive des gamètes qui y sont diluées, leur transfert dans le tractus génital femelle lors de l'éjaculation (**Dacheux et al. 2001**).

Les sécrétions des glandes annexes constituent la majeure partie de la fraction liquide de l'éjaculat, de **50 à 95%** du volume total du liquide séminal suivant les espèces. Certains éléments du liquide séminal proviennent de la filtration du plasma sanguin tandis que d'autres sont produits par les glandes sexuelles (**Dacheux et al. 2001**). Le plasma séminal joue également le rôle de substance tampon pour les spermatozoïdes.

Son pH est légèrement alcalin, entre **7,2 et 7,8**, et permet de neutraliser l'environnement acide du vagin (**Prins 1998**). Certaines études ont montré que les substances contenues dans le plasma séminal ne sont pas indispensables à la fécondation de l'ovocyte. En effet, aucune différence n'a été observée entre les taux de fécondation obtenus avec des spermatozoïdes prélevés directement dans la queue de l'épididyme ou avec des spermatozoïdes éjaculés. Cependant, *in vivo*, les différents composés contenus dans le plasma séminal possèdent bien une influence positive sur le pouvoir fécondant du spermatozoïde (**Dacheux et al. 2001**).

Le liquide séminal est composé à **90%** d'eau et il contient également différents composants chimiques (matière organique (**6%**), ions (calcium, phosphate...), lipides, glucides (fructose), albumines et globulines, bases aminées...etc.), (**Prins 1998**

Chapitre III
Collecte et
conservation de la
semence chez l'étalon

III. 1. Collecte de la semence

III.1.1. Méthodes de récolte de la semence

III.1.1.1. récolte à l'aide du vagin artificiel

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

Chez l'étalon, la récolte par vagin artificiel constitue la méthode de choix, tandis que la nécessité de la présence d'une jument en plein oestrus pour jouer le rôle du boute-en-train afin d'initier la suite d'événements menant à l'accouplement représente l'un des inconvénients de cette technique, dont la nécessité pour le collecteur d'être très proche de l'animal peut se révéler dangereuse pour ce dernier (Marc Stéphanie, 2015).

A. Description

Le vagin artificiel a une forme et des dimensions en rapport avec l'espèce pour laquelle il est conçu, en tenant compte de la conformation du pénis et de la taille de l'animal.

C'est un appareil simple et pratique, il est constitué de :

- **Un manchon extérieur** : c'est un cylindre en caoutchouc rigide, dont la longueur et le diamètre intérieur varient selon le type du vagin artificiel utilisé lors de la collecte chez l'étalon.

- **Un manchon intérieur** : c'est une capote amovible et gonflable, également en caoutchouc. La paroi qui le constitue est donc double et l'espace entre les deux manchons peut être rempli d'eau chaude en quantité suffisante à l'aide d'une valve extérieure de façon à ce que la température de la lumière du vagin artificiel soit comprise entre 45 et 48°C et la pression soit également équivalente à celle du vagin de la femelle.

- **Un cône en silicone** : qui prolonge le vagin artificiel, à l'extrémité duquel est fixé un tube de collecte en verre ou en plastique gradué pour recueillir le sperme, et l'autre extrémité servant à introduire le pénis est lubrifiée (Noakes et al. 2009)


Dans beaucoup de cas, le vagin artificiel est protégé d'un revêtement assurant, d'une part, la préservation de l'échantillon du choc thermique, et d'autre part, la protection du dispositif d'éventuels dommages (Shoenian, 2005).

B. Choix de type de vagin artificiel

Le choix du vagin artificiel et sa préparation conditionnent l'efficacité et la qualité de la semence récoltée. De nombreux modèles de vagins artificiels sont disponibles, et présentent des particularités qui sont à privilégier selon les besoins spécifiques de l'étalon, le mode de traitement de semence, et la préférence du manipulateur. **(Blanchard et al, 2003).**

Les modèles du vagin artificiel les plus couramment utilisés et leurs principales caractéristiques sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau02 : les modèles du vagin artificiel couramment utilisé et leurs caractéristiques Principales (Steven P.et al. 2011).

Vagin artificiel Missouri	Vagin artificiel Colorado	Vagin artificiel japonais (nishikawa)
<p>-C'est l'antivirus le plus largement utilisé surtout aux états- unis.</p> <p>- relativement peu couteux, légère et facile à assembler et à nettoyer.</p> <p>-Bonne rétention de chaleur (température qui dépasse 45 à48⁰c cette propriété peut être avantageuse pour les étalons qui préfèrent des températures plus élevées</p> <p>-Le chancre de contamination du sperme collecté par une fuite d'eau est très minime.</p> <p>-Deux longueurs sont disponibles (16 pouces et 22 pouces), les étalons avec un grand pénis peu préférer le liner plus long.</p>	<p>-il est plus lourd à utiliser que les autres vagins.</p> <p>- il offre une bonne rétention de la chaleur du fait qu'il y a deux doublures en caoutchouc entre la chambre d'eau et la lumière du vagin.</p> <p>- la contamination de sperme collecté est considérablement réduite.</p> <p>-La chemise d'eau de ce vagin artificiel est plus longue que le pénis, par conséquent, la température doit être soigneusement régulée pour éviter les dommages causés par la chaleur au sperme éjaculé.</p>	<p>- Le modèle japonais est Composé d'une petite Boîtier en aluminium Rigide et d'une seule doublure En caoutchouc, il est donc Légère et facile à assembler Et à nettoyer.</p> <p>- Il est plus disponible Dans la commerce aux États-Unis.</p> <p>-le contact du sperme avec Le liner en caoutchouc est Très minime.</p> <p>-l'eau peut facilement couler Ce qui réduit la pression du Vagin et augmente le risque De contamination de l'eau Dans l'éjaculat.</p> <p>-Des trous très ponctuels Peuvent se développer dans La gaine en caoutchouc Entraînent une fuite d'eau Dans la lumière du vagin</p>
		
<p><i>Figure 10 : vagin artificiel de type Missouri (Steven p.et al.2011).</i></p>	<p><i>Figure 11 : vagin artificiel de type Colorado (John dascanio.2014).</i></p>	<p><i>Figure12 : vagin artificiel de Type nishikawa (Steven p.et Al. 2010).</i></p>

C. Préparation du vagin artificiel

Immédiatement avant la tentative de collecte de sperme, la chemise d'eau est remplie d'eau à **45-55°C** pour fournir une température luminale de **44 à 48°C** ; au dessus de celui du corps semble aider au pénis stimulation et facilité l'éjaculation.

La pression de vagin artificiel doit être ajustée pour fournir un bon contact uniformément autour du pénis et une érection complète. La température et la pression d'eau dans le vagin artificiel doit être maintenu relativement constant pendant la collecte de sperme pour favorisé une performance constante de l'étalon et la récolte maximale de sperme. **(Steven p.et al .2011).**

La surface intérieure de l'AV doit être lubrifiée avec un lubrifiant stérile non pericide avant l'insertion du pénis. . Le récipient de récupération du sperme est placé à température corporelle pendant la durée du prélèvement et de l'acheminement de l'échantillon jusqu'au laboratoire, ceci afin d'éviter d'éventuels chocs thermiques. Il est également préférable de protéger la semence de la lumière.

Afin d'augmenter le nombre de spermatozoïdes récupérés et réellement utilisables à chaque prélèvement, un filtre à sperme est placé à l'entrée du récipient de récupération de l'éjaculat. Il permet de séparer la partie liquide de l'éjaculat, qui renferme les spermatozoïdes, de la partie épaisse et gélatineuse, le gel, qui correspond à la dernière fraction de l'éjaculat. Les filtres en nylon sont plus intéressants que les filtres en polyester car ils piègent moins les spermatozoïdes. Le filtre contenant le gel doit être retiré immédiatement du flacon pour éviter tout écoulement dans la partie spermatique **(Blanchard TL. Et al .2003)**

D. La collecte de sperme

Dans les centres de production de semence, le sperme des étalons est le plus souvent collecté au vagin artificiel. L'obtention d'une semence de qualité avec cette technique nécessite une bonne préparation des animaux préalablement à la collecte.

La nécessité de la présence d'une jument en plein oestrus pour jouer le rôle du boute-en-train, elle doit être bien préparée de manière à ce qu'elle tolère que l'étalon monte sans causer des dommages à elle, à l'étalon lui-même ou aux manipulateurs, et que les risques de transmission des maladies vénériennes sont minimales.

La zone de montage doit permettre une bonne assise, être libre de toute obstruction et être de niveau. Un étalon peut tomber et être blessé s'il tente de monter une jument sur une ponte. Les zones herbeuses, humides et glissantes doivent être évitées.

Une fois que l'étalon a été taquiné à la source, le pénis en érection est lavé à l'eau tiède et séché, ce qui lui stimule davantage avec une pression de la main sur le gland et le pénis, et en veillant particulièrement à retirer les débris et le smegma de la fosse glandulaire.

L'étalon doit s'approcher de la source de montage, avec l'entraîneur et le collecteur du même côté du cheval. Une fois qu'il est monté, le pénis est dévié dans le vagin artificiel qui est maintenue au niveau de la moitié de la hanche de la source de montage, selon un angle parallèle à l'abdomen de l'étalon.

Afin que le sperme soit peu exposé à la température élevée de la chemise d'eau, le gland du pénis devrait être aussi loin que possible dans le vagin artificiel, qui doit être tenue fortement contre la source de montage d'une main, tandis que l'autre main est placée à la base du pénis. Une fois que l'éjaculation commence, le vagin est retiré du pénis tout en abaissant lentement son extrémité distale, et le filtre est retiré rapidement tout en évitant la contamination de sperme collecté par du gel (**John Dascanio. 2014 ; Steven P. et al. 2011**).

III.1.1.2. La récolte par éjaculation chimique

Le sperme peut être prélevé sur des étalons présentant un handicap physique ou un problème éjaculatoire selon la procédure d'éjaculation chimique, connue sous le nom « **d'éjaculation ex copula induite par un médicament** ». Les étalons reproducteurs pour lesquels cette procédure est bénéfique incluent les chevaux avec des problèmes musculo-squelettiques graves, des défauts neurologiques, une paralysie de pénis et autres problèmes (**John Dascanio. 2014**).

L'éjaculation dans la copule dépend de l'érection, de l'insertion et de la poussée. Par conséquent tout déficit d'intérêt sexuel ou de capacité d'éveil ou d'aptitude physique peut affecter la capacité à éjaculer (**Angus O. et al, 2011**).

Elle est souvent réalisée par l'administration d'une paire de médicament dans un ordre séquentiel. Le chlorhydrate d'imipramine, un antidépresseur tricyclique, est utilisé pour tenter d'abaisser le seuil d'éjaculation. Comme l'éjaculation est médiée par un mécanisme adrénergique, la xylazine hydrochloride, un agoniste adrénergique a fait ses preuves dans divers protocoles généralement en association avec l'imipramine (**John Dascanio. 2014**).



Figure 13 : A collecte de sperme éjaculé chimiquement à l'aide d'un pôle et d'une tasse attachée ; **B** : préparation des comprimés d'imipramine pour une administration orale (John dascanio, 2014).

➤ **La Technique :**

Un certain nombre de protocoles spécifiques ont été testés expérimentalement et ont été utilisés en clinique pour induire l'éjaculation sans aucun effort ou exposition sexuelle (McGreevy PD, 1995) :

- L'étalon doit être maintenu dans un endroit calme (par exemple, l'étable régulier de l'étalon), les distractions doivent être éliminées (bruit, circulation, piétonne, etc.).
- L'étalon est administré par voie orale à l'imipramine broyée à une dose de **2,2 mg / kg**.
- Environ **1 à 2 heures** plus tard, le chlorhydrate de xylazine est administré à une dose de **0,3 à 0,4 mg / kg** par voie intraveineuse afin d'induire l'émission de sperme ; Le chlorhydrate de xylazine peut être remplacé par du chlorhydrate de détomidine à raison de **0,01 mg / kg** par voie intraveineuse.
- L'émission passive de sperme se produit généralement dans les **3 à 5 minutes** qui suivent l'administration de la xylazine au moment où l'étalon commence à être sous sédation ou lorsque la sédation s'estompe environ **12 à 15 minutes** après l'administration. Il est courant que les testicules du scrotum présentent un mouvement ascendant au moment de l'éjaculation (contraction du crémaster et de la tunique dartoïque). Cela peut être surveillé pour savoir quand il faut s'attendre à une éjaculation.

- Le sperme peut être capturé à l'aide d'une cupule tenue sur une longue perche ou d'un dispositif de prélèvement placé sur le prépuce et attaché au dos du cheval (**John Dascanio. 2014**).

III.2. contrôle de la semence :

III.2 .1. Examens macroscopiques :

III.2.1.1. volume :

La mesure du volume est utile pour calculer le nombre total de spermatozoïdes contenus dans l'éjaculat et se fait généralement à l'aide d'une éprouvette graduée juste après la récolte mais elle n'est pas indicatrice de la qualité de la semence. Celui-ci est très variable en fonction des individus, de leur âge, de leur taille et de la fréquence des récoltes ainsi que de la méthode de récolte. Le volume de la semence éjaculée dépend aussi les sécrétions des glandes annexes. (**Marc Stéphanie.2015**).

III.2.1.2. la couleur et aspect :

L'aspect de l'éjaculat représente un élément important dans l'évaluation de la semence. A l'état normal, la semence présente un aspect blanc laiteux, homogène mais trouble. Elle est également inodore. La présence d'une odeur anormale peut évoquer une contamination de l'éjaculat par de l'urine, du pus ou des bactéries (**Johnston et al. 2001**).

Certaines modifications de couleur peuvent orienter vers des affections spécifiques : la couleur jaune indique la présence d'urine ou la présence d'un exsudat inflammatoire ; la couleur verte met

En évidence la présence de pus ; la couleur rouge ou brune indique la présence de sang respectivement en nature ou digéré (**Johnston et al. 2001**).

Lorsque la couleur de la semence est anormale, la cause peut être établie par observation microscopique. En présence de leucocytes, d'érythrocytes ou d'urine, La semence est centrifugée à 300-1000 tours par minute pendant 5 minutes avec un dilueur Tris ou une solution saline associé à des antibiotiques. Le surnageant est ensuite enlevé et le culot est à nouveau suspendu dans un dilueur frais avec des antibiotiques. La semence peut ensuite être utilisée pour une insémination artificielle (**Simpson et al. 1998**).

III.2.1.3. pH

La mesure du pH se fait à l'aide d'un papier pH ou d'un pH-mètre. Le pH doit être mesuré dès que possible après la récolte pour éviter le biais dû aux produits issus du métabolisme des spermatozoïdes. Le pH normal du sperme d'étalon varie entre **7,2 et 7,7**. Il subit des variations physiologiques selon la saison, la fréquence des éjaculations et la concentration. Un Ph supérieur à **7,7** indique souvent une infection ou une inflammation de l'appareil génital interne, une contamination par de l'urine ou un autre produit alcalin tel que le savon ou une éjaculation incomplète.(**Tibary A, 2005. Blanchard TI, 2003.**).

III.2.2. examen microscopique

III.2.2.1. concentration

C'est un critère important pour le jugement de la qualité de la semence, dont l'objectif est de redéterminer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de semence pure.

Elle peut être déterminée directement par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique, ou à l'aide d'un spectrophotomètre dans la plupart des laboratoires de reproduction équine. Comme elle peut être déterminée indirectement par comparaison visuelle du sperme à des solutions standard, ou plus récemment par des instruments d'analyses assistée par ordinateur du sperme (**CASA**), ou par moyen de Nucleocounter SP-100TM basé sur la technologie de la fluorescence (**Meskini Zakaria. 2017 ; Angus O. et al, 2011**).

A. Evaluation par utilisation d'une cellule hématimétrique

C'est une méthode rapide, simple, ne nécessite pas beaucoup de matériel et c'est le moins chère pour déterminer la concentration en spermatozoïde de l'éjaculat et elle consiste en un comptage direct des spermatozoïdes observés individuellement.

Le sperme est tout d'abord dilué dans une solution hypertonique, comme du chlorure de sodium à 3%, destinée à tuer les spermatozoïdes afin d'en faciliter le dénombrement. Cette dilution est effectuée dans des mélangeurs de Potain utilisés habituellement pour le comptage des cellules sanguines. Si le sperme semble concentré en spermatozoïdes à l'examen microscopique au faible Grossissement, une dilution au centième voire au deux-centième est effectuée alors que si le sperme est peu concentré, une dilution au dixième voire au vingtième suffit. Une fois la dilution effectuée, une goutte de la préparation est déposée sur une cellule hématimétrique : cellule de Neubauer, de Malassez ou de Thoma. Ce sont des lames spéciales

Chapitre III : Collecte et conservation de la semence chez l'étalon

Composées d'un quadrillage très fin de compartiments d'un volume donné dans lesquels on compte simplement le nombre de spermatozoïdes présents. Le comptage est effectué à l'aide de l'objectif x400 du microscope. Les spermatozoïdes sont dénombrés en fonction de la technique relative à chaque type de cellule. Par convention,

Les spermatozoïdes situés sur le bas ou sur le côté droit du carré sont pris en compte et on ignore ceux situés en haut et à gauche. On peut également ne prendre en compte que les spermatozoïdes dont la tête se trouve dans le carré en question (**Johnston et al. 2001**).

Schéma d'une portion de la lamelle

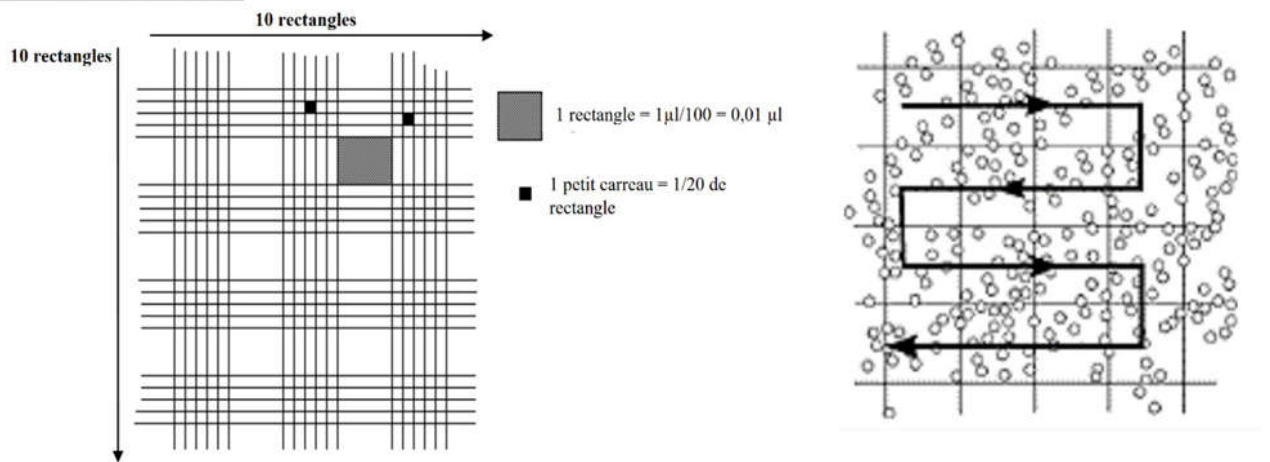


Figure 14 : hématimètre : cellule de Thoma

(<https://www.ozyme.fr/ressources>).

B. Evaluation par utilisation du spectrophotomètre

La numération peut également être réalisée grâce à des techniques plus modernes telles que la spectrophotométrie. L'acquisition d'un spectrophotomètre (**Figure 33**) est justifiée pour les praticiens spécialisés ou les grands haras dans l'espèce équine, surtout quand l'insémination

Artificielle est utilisée. Cette technique mesure la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et en détermine la concentration. L'estimation de la concentration en spermatozoïdes d'un éjaculat par mesure de la densité optique doit être considérée comme assez juste et utilisable en routine pour la préparation de doses d'insémination, mais pouvant être soumise à des biais de mesure (**MARC Stéphanie, 2015**).



Figure15 : photomètre Minitube avec cuvette remplie en sperme (John Dascanio. 2014).

III.2.2.2.la motilité

C'est le pourcentage des spermatozoïdes mobiles, qui doit être évaluée le plus rapidement possible ; dans les **10 à 15 min** après la récolte, qui peut être évaluée par observation au microscope ou de façon automatisée.

➤ **Méthode classique**

- **Dilution**

La mobilité des spermatozoïdes est d'abord évaluée au niveau de la semence « pure »(non diluée) afin de déterminer un éventuel effet délétère du dilueur de semence sur la semence : elle apporte une indication de la performance des spermatozoïdes dans leur milieu naturel. Elle peut cependant être difficile à évaluer lors de concentration spermatique élevée de par l'agglutination de spermatozoïdes sur la lame de verre. La mobilité des spermatozoïdes est ensuite évaluée après dilution de la semence dans un dilueur adapté [tableau 2]. La fiabilité et la répétabilité de cette évaluation sont ainsi généralement nettement améliorées. Il est préférable d'effectuer une dilution à une concentration définie (par exemple **20 millions** de spermatozoïdes par millilitre) à l'aide d'un dilueur de semence identique afin de limiter les biais d'observation (Tibary A.2005, Blanchard Tl.2003).

- **Evaluation visuelle**

L'estimation de la mobilité par observation au microscope est la méthode la plus simple, la plus rapide et la moins chère pour évaluer la qualité du sperme bien qu'elle soit subjective et ne constitue donc pas une méthode répétable par différentes personnes pour prédire le

Pouvoir fécondant de la semence observée (Johnston et al. 2001; Freshman 2002; Pe a Marnez 2004).

L'évaluation visuelle de la mobilité des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante et comporte une estimation de : (marie allimant ; 2010).



Figure 16 : microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante (Marie Allimant, 2010.)

-la mobilité massale

Dans un premier temps, le sperme est regardé au faible grossissement (x10) afin d'apprécier de façon subjective la mobilité massale, c'est-à-dire les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes. Une note variant de zéro à cinq est attribuée par l'observateur (Tableau 03). Cette observation simple mais peu précise est révélatrice à la fois de la vitesse de progression et de la concentration des spermatozoïdes (Fontbonne et al. 1992).

Tableau 03 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après: Fontbonne, 1992).

Note	Interprétation
0	Pas de mouvement
1	Spermatozoïdes en mouvement mais pas de mouvement d'ensemble
2	Ebauche de mouvements d'ensemble circulaires
3	Mouvements d'ensemble : cercles centrés sur eux-mêmes
4	Mouvements d'ensemble : vagues rondes en mouvement
5	Mouvements d'ensemble intensifiés

- **La mobilité individuelle** : le sperme est examiné au fort grossissement (**x400**) afin d'apprécier la mobilité individuelle. Le sperme doit être relativement peu concentré, afin que chaque spermatozoïde soit individualisable.

On distingue deux aspects :

- la **mobilité simple**: on considère tous les spermatozoïdes plus ou moins mobiles par opposition aux immobiles. Deux comptages sont réalisés par observation de quatre champs microscopiques à fort grossissement (**X 400**). Celle-ci s'exprime en pourcentage (**note de 0 à 100%**) et reflète partiellement la qualité du sperme (sperme de bonne qualité : plus **de 70%** de spermatozoïdes mobiles).
- la **mobilité progressive**: elle permet d'affiner le déplacement réel des spermatozoïdes. La vitesse de progression est appréciée subjectivement par l'opérateur dans le champ de vision du microscope. Les spermatozoïdes peuvent avoir des mouvements oscillants (ils vibrent et n'ont pas de direction définie) et des mouvements fléchants (ils se déplacent de façon rapide et en ligne droite). Sur une échelle de 1 à 5, on classe les spermatozoïdes en fonction de leur mouvement (Tableau 04) (**Fontbonne et al. 1992; Olivier Salson 2008**).

Tableau 04 : - Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après: Fontbonne, 1992).

Note	Interprétation
0	Pas de mouvement
1	Mouvements oscillants légers sans progression
2	Mouvements oscillants et progression faible et intermittente
3	Mouvements oscillants fléchant et progression lente régulière
4	Mouvements fléchant et progression régulière vers l'avant
5	Mouvements fléchant avec progression rapide vers l'avant

Evaluation de la mobilité au microscope est très subjective et présente d'importantes variations en fonction de l'opérateur (**30 à 60%**). Les biais sont nombreux (matériel sale, tube à essai non lavé avant son premier usage, mauvaise manipulation...) et peuvent engendrer une baisse de la mobilité. Les différents biais seront tout de même réduits si l'évaluation est toujours effectuée par la même personne expérimentée.

III.2.2.3. La morphologie

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

➤ Coloration

- **A l'aide des colorants cytologiques**

Les colorants cytologiques classiques à usage multiple, comme le Wright's, le Giemsa l'hématoxyline-éosine, sont utilisés pour mettre en évidence les cellules germinales ou somatiques sur les frottis de sperme. Ils permettent une coloration différentielle des différentes parties du spermatozoïde et une identification d'autres éléments cellulaires telles que les bactéries ou les leucocytes. (**Alliment ; 2010**).

- **A l'aide des colorants de fonds**

Les colorants les plus largement employés sont l'éosine-nigrosine ou l'encre d'inde grâce à 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.

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

➤ **Evaluation et classification**

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont traditionnellement classées en Anomalies primaires, résultant d'une perturbation au cours de la spermatogenèse et donc ayant une origine testiculaire. Des anomalies secondaires qui sont due à des altérations au Cours de leur passage dans les voies génitales excrétrices. Les anomalies tertiaires se produiraient in vitro, du fait d'une mauvaise récolte ou d'une mauvaise manipulation au laboratoire. Un minimum de **100** Spermatozoïdes doit être observé pour évaluer ces défauts de morphologie (**Varner DD. 2008, Blanchard TL. 2003**), et Selon (**Amann et Graham, 2011**), la proportion de spermatozoïdes anormaux doit être inférieure à **35 %**.

Actuellement, la classification consiste à répertorier les spermatozoïdes en fonction de la localisation de l'anomalie observée : têtes détachées sans queue, têtes anormales, acrosomes en bouton, gouttelettes cytoplasmiques proximales ou distales, pièces intermédiaires pliées ou irrégulières, queues coudées ou enroulées (Figure). Cela permet une observation plus explicite et plus représentative de l'ensemble des spermatozoïdes tout en évitant les hypothèses plus ou moins erronées sur l'origine de tel ou tel défaut. (**Tibary A. 2005. Varner DD. 2008, Blanchard TL. 2003**).

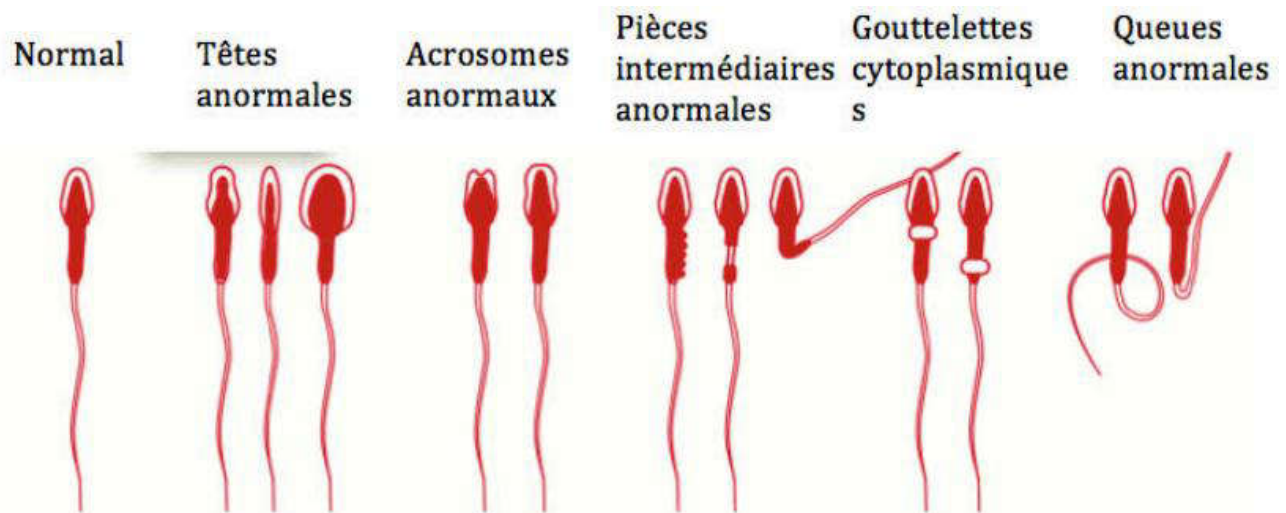


Figure 17 : Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et quelque anomalie pouvant être rencontrées (Steven P. et al, 2011).

III. Conservation de la semence

La majorité des registres de races équines aux Etats-Unis tolèrent les gestations obtenues par insémination artificielle. De nombreux registres permettent également l'insémination artificielle avec du sperme refroidi ou congelé. Le sperme refroidi est le plus utilisé.

La conservation particulièrement à l'état congelé, provoque des dommages aux spermatozoïdes qui concernent à la fois leurs structures (membranes, flagelles) et leur état fonctionnel. Ce qui influence leur motilité et leur viabilité. Malgré de nombreux travaux consacrés à ces problèmes, la fertilité de la semence congelée demeure généralement plus faible que celle de la semence conservée pendant quelques heures à température positive.

III.3.1. Conservation à court terme

III.3.1.1. Semence fraîche

Pour les étalons ayant de bonne fertilité, le sperme collecté est utilisé immédiatement ou jusqu'à **6 heures** après sa récolte et ce n'est pas nécessaire de le refroidir, et dans la plupart des cas il est dilué avec un agent de préchauffage à des rapports des **1 : 1 à 1 : 3 (sperme-dilueur)** en fonction de la concentration en sperme brut et de volume éjaculé, sitôt après sa dilution le sperme doit être retiré de l'incubateur et peut-être refroidi à température ambiante (**15-20 °C**) (Angus O. et al, 2011).

L'utilisation de cette semence conservée à la température ambiante semble présenter un intérêt particulier dans le cas des étalons dont la qualité du sperme est médiocre après le refroidissement, tandis que, certains auteurs disent que la conservation de la semence fraîche

Entre **15–20 °C** maintient le métabolisme des spermatozoïdes mais les rend plus sensibles aux éléments toxiques métabolisables (**G. Decuadro-Hansen., 2004**).

Le lait **UHT** ou les dilueurs à base de lait sont les plus utilisés pour la conservation de sperme d'étalon en vue de l'IA immédiate ou différée, alors que ces milieux de dilution doivent être ajoutés sitôt après la récolte de sperme (**G. Decuadro-Hansen., 2004**).

III.3.1.2. semence refroidie

Dans l'espèce équine, après la récolte, la semence peut être soit utilisée en tant que semence fraîche de façon extemporanée, soit réfrigérée, soit congelée pour un usage ultérieur. La réfrigération de la semence peut donc constituer soit un processus à part entière soit une des étapes du processus de cryoconservation qui correspond au refroidissement de la semence avant la congélation proprement dite, c'est-à-dire à l'étape d'équilibration.

La réfrigération de la semence peut être indiquée dans le cas d'une insémination à distance lorsque les animaux sont éloignés géographiquement, lorsque la semence est de qualité médiocre ou encore lorsqu'il faut différer une insémination initialement prévue avec de la semence fraîche. (**Marc Stéphanie, 2015**).

En pratique, en accord avec la littérature, la semence équine réfrigérée 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 : 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**). (**Batellier et al. 2001**) obtiennent une fertilité de **48%** au bout de **72H**, dans de l'**INRA 96**.

La conservation de la semence fraîche à **4°C** réduit le métabolisme des spermatozoïdes ce qui permet une économie de leur réserve énergétique et une bonne conservation de leur mobilité qui est restaurée après réchauffement (**G. Decuadro-Hansen., 2004**).

Dans l'espèce équine, les dilueurs de réfrigération adaptée à la réfrigération de la semence sont, en règle générale, à base de lait, comme par exemple le milieu **INRA96**. Avant Utilisation, il convient d'ajouter au dilueur du jaune d'œuf frais dans la proportion de **20 %** de jaune d'œuf pour **80 %** de dilueur.

III.3.1.3. conservation à long terme (la cryoconservation)

A. Définition

La cryoconservation correspond à l'utilisation de faibles températures pour préserver la structure intacte de cellules et de tissus vivants. Elle est utilisée dans la conservation des semences que ce soit dans l'espèce humaine ou dans les espèces animales.

Elle correspond à la préparation de cellules ou de tissus en vue de leur stockage à une température inférieure à -80°C . Cette procédure permet la conservation de ces cellules ou tissus pendant de nombreuses années et leur utilisation après réchauffement à la température ambiante. Les spermatozoïdes de mammifères furent les premières cellules à être congelées avec succès dans les années cinquante par Polge, Smith et Parkes et, depuis, la cryoconservation de la semence n'a cessé de se développer, notamment en ce qui concerne la reproduction dans les filières d'élevage (**Day et Stacey, 2007**).

La cryoconservation de la semence est réalisée dans le cadre de différents domaines : les technologies de reproduction assistée (**ART**), la conservation des espèces menacées ou encore dans un intérêt médical, lors d'une incapacité à reproduire ou d'un décès. Il s'agit d'une biotechnologie importante permettant d'éviter la propagation de certaines maladies sexuellement transmissibles, d'éliminer les barrières géographiques et de préserver le matériel génétique d'un animal pendant une période de temps théoriquement illimitée (**Neto et al. 2014; Day et Stacey 2007**)

B. Principe

La cryoconservation du sperme implique le stockage du sperme à des températures inférieures à zéro (c'est-à-dire congelées). Car n'est pas possible de garder les spermatozoïdes à des températures du corps vu de la mortalité cellulaire importante. (**Varner et al. 1988**).

Le cryogène normalement utilisé pour cette tâche est l'azote liquide (-196°C). Si le sperme résiste au processus de congélation et de décongélation, l'intégrité du sperme peut être maintenue presque indéfiniment dans l'azote liquide car l'activité métabolique du sperme est considérée comme négligeable à cette température. Si le sperme d'un étalon donné répond favorablement à la Cycle de gel-dégel, ils peuvent éventuellement conserver leur fonction pendant des siècles lorsqu'il est maintenu 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**

III.3.2.La cryoconservation dans l'espèce équine

L'insémination artificielle dans l'espèce équine a été limitée pendant de nombreuses années, particulièrement au Royaume-Uni où la reproduction des Pur-sang, qui constitue la majeure partie de l'industrie équine britannique, ne permettait pas son utilisation. Depuis une vingtaine d'années, elle a été bien plus utilisée en Europe, où 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. 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.

III.3.3. les agents cryoprotecteurs

L'ajout de l'agent cryoprotecteur, 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 Diminuent 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, le retrait semblerait

Plus néfaste que l'ajout du cryoprotecteur sachant que les dommages engendrés dépendent à la fois de la taille de la cellule et de la perméabilité de sa membrane aux agents cryoprotecteurs.

Les cryoprotecteurs non pénétrants

Les cryoprotecteurs non pénétrants 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.

Actuellement, en médecine vétérinaire, les milieux de congélation utilisent des composés d'origine animale comme le lait ou le jaune d'œuf pour des raisons économiques et de disponibilité.

L'étude de leur formulation vise à adapter leur contenu en protéines, glucides et lipides afin d'assurer aux spermatozoïdes une base nutritionnelle et de protéger les membranes des effets de la congélation.

- **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. 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).

Les cryoprotecteurs pénétrants

Tel que le glycérol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Gilmore et al, 2009) ou les amides (alvarenga et al, 2005) : ils sont les cryoprotecteurs idéal qui possèdent un faible poids moléculaire, une grande solubilité dans l'eau et une toxicité minimale.

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. De même, Ils remplacent une partie de l'eau intracellulaire et se lient à l'eau restante ce qui limite la formation de glace à l'intérieur de la cellule (mais également à l'extérieur).

- **Le glycérolé** : c'est le cryoprotecteur le plus utilisé pour la plus part des espèces animales

Il possède une action à la fois intra- et extracellulaire. Il pénètre à l'intérieur des spermatozoïdes et modifie la configuration des cristaux de glace qui s'y forment en les rendant plus arrondis, ce qui diminue le risque de perforation des membranes. Dans le milieu extracellulaire, le glycérol, dont la température de congélation est plus basse que celle de l'eau, se fixe aux molécules d'eau. Il diminue ainsi le seuil de congélation de l'eau extracellulaire et permet de limiter le gradient osmotique et de ralentir la vitesse de déshydratation des spermatozoïdes.

La concentration optimale en glycérol dans le milieu de congélation est variable selon l'espèce pour les spermatozoïdes d'étalon, plus sensibles aux variations osmotiques, la concentration 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**).

- **l'éthylène glycol et le diméthylsulfoxyde (DMSO)** : traversant plus facilement les membranes, possèdent tous deux un poids moléculaire plus faible que le glycérol, leur
- conférant ainsi une plus grande perméabilité cellulaire. Ils entrent donc plus rapidement dans la cellule que le glycérol et causent ainsi moins de variations osmotiques. Cependant, le DMSO s'est révélé moins efficace que le glycérol et n'est plus utilisé de nos jours (**Eilts2005b**).

Amides : de récentes études ont montré que l'ajout d'**amides** améliorerait la qualité de la semence après décongélation chez les étalons dont le sperme présentait une faible aptitude à la congélation. C'est l'exemple du Botu-Crio®, un dilueur pour étalon contenant du glycérol Et du méthylformamide comme cryoprotecteurs, capable de maintenir la viabilité et la fécondité des Spermatozoïdes équins qu'ils soient éjaculés ou prélevés au niveau de l'épididyme (**Neto et al. 2014; Melo et al. 2008**).

En effet, les amides présentent un poids moléculaire plus faible que le glycérol, probablement à l'origine d'un stress osmotique moins important et donc d'une résistance accrue du spermatozoïde au processus de cryoconservation. Les amides tels que le méthylformamide, le diméthylformamide ou le diméthylacétamide, protègent les spermatozoïdes d'étalons des dommages induits par la Cryoconservation et que cette

protection est d'autant plus remarquable chez les étalons dont la semence est fortement dénaturée par la congélation en présence de glycérol. De même, il semblerait que les propriétés spermicides que l'on retrouve avec le glycérol chez la jument soient moins marquées lors de l'utilisation d'amides, ce qui est à l'origine d'une amélioration de la fécondité (Alvarenga et al. 2005).

Ils présenteraient une protection similaire à celle du glycérol tout en causant moins de dommages cellulaires que le glycérol (Squires et al. 2004).

III.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, 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.

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 d'insémination artificielle doit être obtenue, avec un volume maximum de 1/3 de sperme pur pour 2/3 de dilueur (Isabelle Barrier-Battut, 2013).

➤ Méthodes de dilution

Plusieurs techniques 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 bien la centrifugation de la semence.

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 Des 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].

La méthode la 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 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.

III.3.5. Les dilueurs

Les dilueurs sont des milieux permettant de conserver, protéger et garder les propriétés fécondantes des spermatozoïdes. Permettent aussi d'ajuster la concentration en spermatozoïdes dans les paillettes. Il existe un grand nombre de dilueurs, à base de lait ou de solution saline, ayant tous pour objectif une meilleure survie des spermatozoïdes.

Composition

Il n'existe pas une composition de dilueur idéale. Mais les dilueurs contiennent obligatoirement des agents cryoprotecteurs pénétrants ou non pénétrants dont le rôle est d'augmenter la survie des spermatozoïdes. On retrouve également d'autres composés dans les dilueurs comme par exemple des antibiotiques, des substances nutritives telles que des sucres, des sels ou encore des détergents (Barbas et Mascarenhas 2009 ; Ponthier et al. 2014 ; et al. 2011).

Le dilueur doit posséder plusieurs propriétés afin d'améliorer la survie des spermatozoïdes. Il doit être isotonique à la semence afin d'éviter les chocs osmotiques, avoir Un pH compatible à la survie des spermatozoïdes, posséder un pouvoir tampon, une osmolarité appropriée (300mOsm /L avec un ph de 7,4 à 7,6), avoir une action stabilisatrice et protectrice des membranes, contenir des substances nutritives telles que des sucres et posséder un pouvoir antioxydant et antibactérien. Il doit également être facile à préparer, à conserver et à utiliser (Barbas et Mascarenhas 2009; Hanzen 2014).

Les fractions les plus protectrices isolées partir du lait, telle que, le **phosphocasinat natif (PPCN)** et la **β -lactoglobuline** se sont révélés être les plus performants pour la

Chapitre III : Collecte et conservation de la semence chez l'étalon

conservation de la semence équine réfrigérée (Batellier et al, 1998 ; Batellier et al, 2001), d'où la création de

L'INRA96. Dont la formulation de ce dilueur a été établie non seulement sur la base des résultats de mobilité, mais aussi sur ceux de fertilité de la semence conservée.

Les principaux dilueurs à l'heure actuelle sont :

- 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.

Tableau 05 : composition de Kenney et l'INRA96 (pour 1L) (Marc Stéphanie, 2015) et le Burns and Renser.

Dilueurs	Composition
Kenney	Glucose (49g), Lait en poudre (24g), Eau distillée stérile (q.s.p. 1 l), Streptomycine (1,5g), Pénicilline (1,5 millions UI)
L'INRA96 (IMV, L'Aigle, France)	CaCl (20,14g), KCl (0,4g), KH ₂ PO (40,06g), MgSO ₄ 7H ₂ O (0,2g), Na Cl (1,25g), Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O (0,118g), NaHCO ₃ (0,35g), HEPES (4,76g), Glucose (13,21g), Lactose (45,39g), Pénicilline (50 000 UI), Eau distillée stérile (q.s.p. 1 l), Gentamycine (50 mg) Puis, Phosphocasinat (27g/l)
Burns and Renser	Glucose (3g), sucre (9g), BSA (1,5g), streptomycine (0,15g), eau distillée stérile (100ml)

III.3.6. Les différentes étapes de la cryoconservation

III.3.6.1. Récolte et évaluation de la semence

Il existe de nombreuses techniques de récolte de la semence. Ces techniques ont déjà été décrites précédemment mais rappelons que la technique la plus utilisée dans l'espèce équine est celle du vagin artificiel, le sperme est filtré immédiatement après la récolte pour extraire la fraction gel du sperme, une sécrétion filamenteuse des glandes annexes. Après la récolte, le

sperme est analysé afin de déterminer ses caractéristiques (concentration en spermatozoïdes, mobilité...). (**Ponthier et al. 2014**).

Les Haras Nationaux recommandent pour que la semence soit considérée de bonne qualité afin d'être congelée un nombre total de spermatozoïdes progressifs par dose supérieur à 140 millions spermatozoïdes après décongélation, sachant qu'un éjaculat équin contient en moyenne 10 milliards de spermatozoïdes (**Ponthier et al. 2014**). Seuls les éjaculats avec plus de 60% de motilité totale ont été utilisés pour le refroidissement.

Le sperme est dilué une première fois avec le premier milieu à base de lait ou de composants de lait et ne contenant pas d'agent cryoprotecteur dont le volume de la fraction sans gel du sperme obtenue après éjaculation est mélangé avec un volume égal de dilueur. Différentes formulations commerciales existent et servent à conserver le sperme frais dans une gamme de température allant de **5 à 20°C**.

III.3.6.2. Séparation des différentes phases du sperme par centrifugation

La semence est composée d'une population hétérogène de spermatozoïdes viables et non viables suspendus dans les sécrétions des différentes glandes accessoires. La semence peut également contenir d'autres cellules (leucocytes, cellules épithéliales, érythrocytes, cellules germinales immatures) et des contaminants (urine, bactéries, virus). Les spermatozoïdes anormaux ou morts ainsi que les autres cellules ou contaminants ont un effet toxique sur les spermatozoïdes vivants et réduisent par conséquent la fertilité d'un éjaculat. (**Loomis 2006; Anzar et Graham 1994**). Chez le cheval, le sperme est relativement peu concentré, contrairement à ce qui est observé dans d'autres espèces comme le bovin (**Baracaldo, 2007**). C'est pourquoi des techniques de séparation du sperme sont utilisées.

La technique de séparation utilisée en routine est la centrifugation. Par ailleurs, elle permet de augmenter la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat, en enlevant le plasma Séminal entièrement (**Vidament et al, 2000 ; 2001**), car il ne semble pas bénéfique pour la congélation du Spermé équin (**Moore et al, 2005**), soit en gardant une petite fraction de celui-ci, de l'ordre de **5 %** du volume final après centrifugation (**Salazar et al, 2008 ; Ponthier et al, 2013**), pour la congélation.

La semence est diluée avec un dilueur primaire à 37°C, Les tubes sont centrifugés, idéalement à **600xg pendant 10 minutes** (**Barrier-Battut 2013 ; Neto et al. 2013**). Ensuite, le surnageant est enlevé, et les spermatozoïdes du culot sont alors remis en suspension dans une quantité appropriée de dilueur (**Barrier-Battut 2013**). L'ajout des milieux coussin à base

d'une solution d'iodixanol, au fond des tubes a permis d'augmenter jusqu'à plus de **90 %** le pourcentage de récupération des spermatozoïdes après centrifugation (**Waite et al, 2008 ; Hoogewijs et al, 2010**).

Ainsi, la centrifugation sur des milieux colloïdaux permet de séparer les spermatozoïdes anormaux, les débris cellulaires et d'ainsi améliorer la qualité du sperme après décongélation en ne sélectionnant que les spermatozoïdes normaux qui sont considérés comme mobiles et potentiellement fertiles (**Glander et al, 1990 ; Kobayashiet al, 1991 ; Loomis, 2006 ; Morrell, 2006 ; Edmond et al, 2008 ; Hoogewijs et al, 2010 ; Ponthier et al, 2013**). Cette méthode est très Utile chez les étalons dont la qualité du sperme frais est faible, mais elle nécessite du temps et entraîne de grandes pertes en spermatozoïdes et donc une diminution de la production de paillettes par éjaculats.

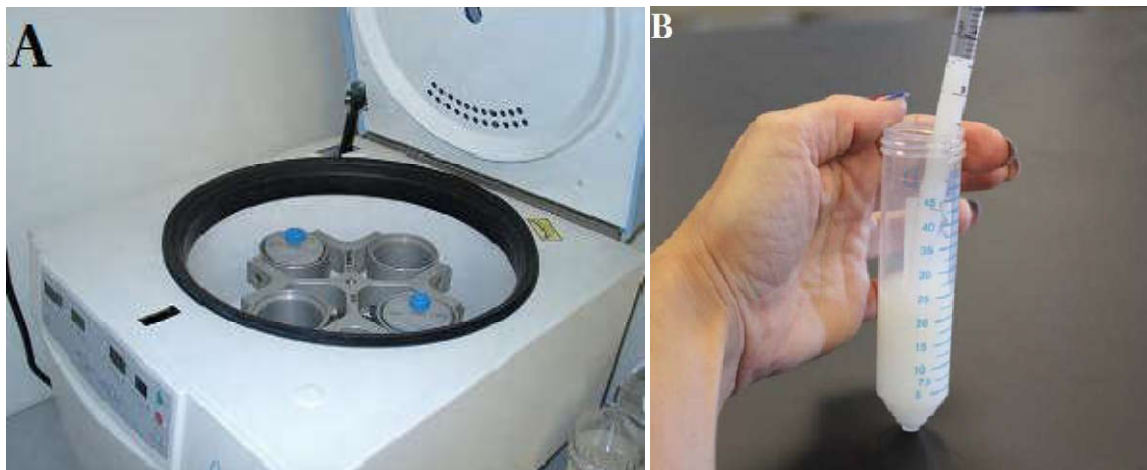


Figure 18 : Figure 18 : centrifugation de sperme dilué (A), puis aspiration de surnageant après centrifugation (B) (Steven P. et al. 2011).

III.6.3. La dilution

Une fois le culot riche en spermatozoïdes obtenu après l'étape de centrifugation, il est dilué avec le milieu de congélation. Ce milieu de congélation également appelé dilueur, Permet de conserver la semence en gardant les propriétés fécondantes des spermatozoïdes. Il permet également d'ajuster la concentration en spermatozoïdes dans les paillettes. (**Marc Stéphanie, 2015**).

La concentration finale après congélation dépend de la dilution avec le milieu de congélation et donc des options de commercialisation choisies lors de la production, mais aussi de la contrainte technique imposée par le milieu de congélation. En effet, si les dilueurs utilisés contiennent de Basses concentrations en agent cryoprotecteur, il faudra minimiser le rapport entre le volume du milieu de congélation et le volume du culot cellulaire afin que la

concentration en âge Cryoprotecteur ne soit pas trop basse dans la dilution finale. Il est conseillé d'inséminer avec des doses finales contenant au moins 400 **millions** spermatozoïdes (Ponthier et al. 2014).

III.3.6.4. L'équilibration (la réfrigération)

Elle correspond à une réfrigération préalable de la semence à +4°C avant la congélation proprement dite. Elle fait suite à l'étape de centrifugation et est réalisée directement après l'ajout du glycérol. Certains auteurs rapportent que cette étape permettrait aux cryoprotecteurs, notamment le glycérol, de pénétrer dans la cellule et serait à l'origine d'une meilleure survie des spermatozoïdes après décongélation en leur évitant un refroidissement trop brutal (Marc Stéphanie, 2015).

III.3.6.5. Le conditionnement

La semence est conditionnée juste avant d'être congelée. Le but du conditionnement est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable. Deux principaux conditionnements sont disponibles pour congeler la semence et se retrouvent dans les différentes espèces étudiées: les pastilles et les paillettes. Un troisième type de conditionnement est parfois rapporté, ce sont les ampoules qui sont à l'origine prévues pour une congélation lente mais peu souvent utilisée. (Marc Stéphanie, 2015).

La méthode la plus utilisée actuellement en France, dans de nombreuses banques de semence, est la congélation sous forme de **paillettes** ou « straws ». Les paillettes sont de fins tubes en chlorure de polyvinyle, obstrués à une de leurs extrémités par une pièce de coton. L'autre bout est libre et servira au remplissage de la paillette dont la contenance peut être de **0,25** millilitre, **0,5** millilitre ou **2,5** millilitres. Chez l'étalon, on trouve des « maxi-paillettes » de **4 à 5** millilitres. Les paillettes sont identifiées à l'aide du nom du mâle prélevé, de son numéro d'identification, du code de la race, de la date de récolte et de l'identification du centre d'insémination (Figure 42) (Loomis 2006; Hanzen 2014; Dumon 2007).



Figure 19 : Identification des paillettes (Clichés CERREC).

Une fois remplies, une légère agitation des paillettes permettra de ménager une place pour l'obturation et la bulle d'air nécessaire pour permettre la dilution du sperme lors de la congélation. Le bouchage peut s'effectuer manuellement ou être automatisé, comme c'est plus fréquemment le cas actuellement. Il est réalisé au moyen de poudre d'alcool polyvinylique qui, une fois humide, se transforme en gel ou par sertissage (**Loomis 2006; Hanzen 2014; Dumon 2007**).

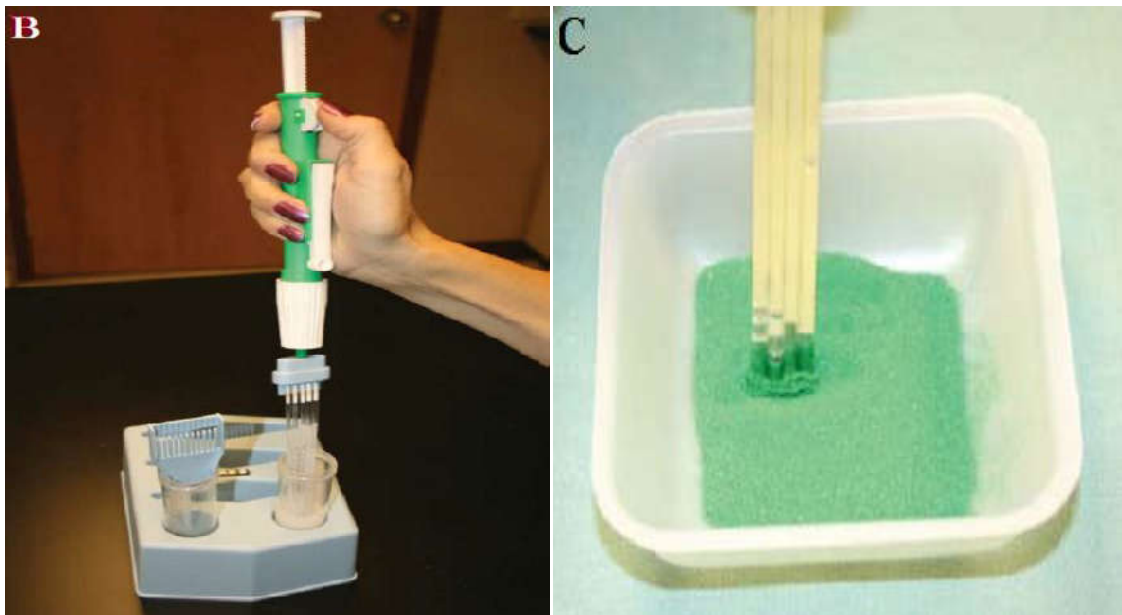


Figure 20 : remplissage (B) et bouchage (C) des paillettes (John Dascanio. 2014).

III.3.6.6. La congélation

Après d'équilibration, les paillettes peuvent être refroidies dans un congélateur programmable qui permet d'atteindre -140°C , avec une pente variable, selon le milieu de congélation utilisé, entre -20°C et -60°C par minute. Et elles sont ensuite immergées dans l'azote liquide à -196°C (Ponthier et al. 2014). Comme elles peuvent être congelées dans une boîte de polystyrène contenant de l'azote liquide : Les paillettes chargées sont placées dans une grille pré-refroidie (à 5°C) de telle sorte qu'elles se trouvent de **3 à 6 cm** au-dessus de l'azote liquide pendant **10 minutes** d'équilibrage, ou jusqu'à ce que la température atteigne -120°C , elles sont ensuite plongées dans l'azote liquide, placées dans des gobelets qui sont déjà fixés sur des cannes et finalement stockées dans un réservoir d'azote liquide à -196°C pendant des mois, voire des années. (John Dascanio. 2014).

Le choix de la vitesse de congélation est essentiel car il détermine la façon dont le spermatozoïde arrivera à rester en équilibre avec le milieu extracellulaire.

La vitesse de congélation optimale est une vitesse initialement lente afin de permettre une déshydratation suffisante de la cellule pour prévenir la formation de cristaux de glace intracellulaires, puis rapide pour éviter une déshydratation trop importante de la cellule.



Figure 21 :(A) paillettes déposées sur une grille puis, (B) placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide, puis stockées dans une cuve d'azote liquide (C).

III.3.6.7. La décongélation

La semence est décongelée juste avant son utilisation, lors d'une insémination artificielle le plus souvent. Quelle que soit l'espèce, la décongélation s'effectue de manière semblable à l'aide d'un Bain-marie. Les paillettes sont directement transférées de l'azote liquide dans le bain-marie (**Figure 47**) (**Ponthier et al. 2014**).

Dans la majorité des cas les paillettes de **0,5 ml** sont décongelées à **37°C** pendant **30 secondes**, alors que certains chercheurs ont suggéré que la décongélation de ces paillettes à **75°C** pendant **7 secondes** pouvait générer une mobilité accrue des spermatozoïdes après décongélation tandis que pour d'autres chercheurs une température de **46°C** pendant **20 minutes**, peut-être recommandée, Bien que cela puisse être le cas (**Steven P. et al. 2011**).

III.3.6.8. 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 (**Marc 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%** (**John Dascanio. 2014**).

❖ Nouveaux contrôles de qualité

Les contrôles de qualité actuels reposent sur le postulat qu'un spermatozoïde progressif est de bonne qualité et que, par conséquent, il pourra féconder l'ovocyte. Cependant, une fois arrivé à l'ovocyte, le spermatozoïde va devoir utiliser d'autres organites pour accomplir D'autres fonctions : se fixer sur l'ovocyte, traverser la zone pellucide, fusionner et libérer une information génétique non altérée. Diverses structures du spermatozoïde ont été étudiées : on peut citer l'intégrité de l'acrosome (**Oliveira et al, 2010**), l'intégrité de l'ADN (**Baumber et al, 2003**), la fonction mitochondriale (**Ortega Ferrusola et al, 2009b**), l'intégrité membranaire (**Oliveira et al, 2010**) et les indices morphométriques qui évaluent la forme géométrique du spermatozoïde (**Gravance et al, 1997**). Ces tests 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 (**Yoann., 2008**).

Etude expérimentale

Partie expérimentale

L'objectif de ce travail était d'étudier les caractéristiques et la fertilité de la semence conservée dans l'azote. Cette étude a été réalisée à la station expérimentale du Park Habitat mars 2020.

Matériel et méthodes

I. Lieu de l'expérimentation

Notre étude s'est déroulée au niveau du laboratoire de reproduction du parc équin de l'institut des sciences vétérinaires, à L'université Ibn Khaldoune de Tiaret.



Figure 22: Le laboratoire de la reproduction équine de l'institut des sciences vétérinaires.

II. Effectif de l'expérimentation

L'expérimentation a été réalisée durant la saison de monte **2020** (saison administrative du **01 février au 30 Juin**) sur la semence de deux étalons d'éleveurs privés de race arabe-barbe. **ANBAR** : un cheval âgé de **12 ans** avec une robe grise-pommelée, et **REZKI** : un étalon âgé de **7ans** avec une robe grise-foncée. Les deux étalons étaient maintenus dans des boxes individuels au niveau de l'institut et recevaient quotidiennement chacun d'eux, une ration composée de **6 kg** d'orge et **5 kg** de foin, avec de l'eau qui est distribuée à volonté. Leur fertilité était connue grâce aux résultats d'insémination en monte naturelle obtenus dans

Partie expérimentale

Les années précédentes et aussi grâce aux résultats d'insémination artificielle en semence fraîche obtenus en **2020**.

III. Déroulement des récoltes

Les étalons étaient récoltés ou bien utisés 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.

III.1. La Préparation du vagin artificiel

La récolte du sperme a été faite à l'aide d'un vagin artificiel de type **Missouri et Colorado**, immédiatement avant la récolte la chambre à eau du vagin artificiel est remplie avec de l'eau à **45-50°C**, et la pression à l'intérieur du vagin artificiel est ajustée d'une manière à ne pas gêner la pénétration ou la dilatation de la verge à l'intérieur du vagin artificiel, où elle doit être favorable à l'éjaculation, et ceci est en fonction des besoins de chaque étalon.

Avant le prélèvement, la surface interne du vagin artificiel est lubrifiée avec un lubrifiant stérile et non spermicide (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.

Partie expérimentale

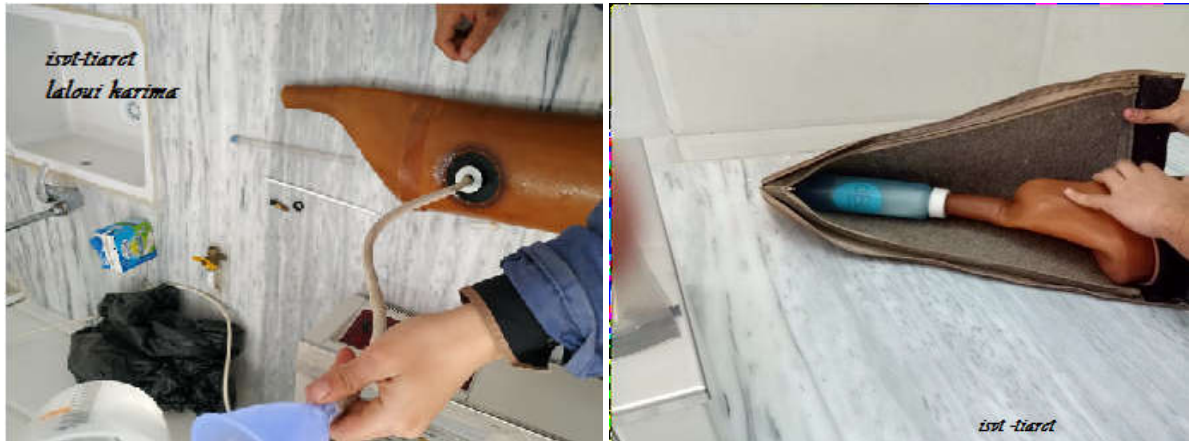


Figure 23 : les étapes de préparation du vagin artificiel de type Missouri.



Figure 24 : vagin artificiel de type Colorado.

III.2. La préparation d'étalon

Avant d'accéder à la récolte du sperme, l'étalon qui est maintenue dans son boxe 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 boxe 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 oestrus comportemental qui est-elle même bien immobilisée par des entraves et placée à l'autre côté d'un fantôme de reproduction.





Figure 25 :L'excitation de l'étalon en présence de la jument « boute-en-train » (A ANBER, B REZKI).

III.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.

Partie expérimentale



Figure 26 : les étapes de la récolte de sperme chez le cheval «REZKI ».



Figure 27 : les étapes de la récolte de sperme chez le cheval « ANBER »

IV. sélection des éjaculats pour la congélation

Dans notre expérimentation, seulement les éjaculats avec une concentration en spermatozoïdes qui est supérieur à 100×10^6 spermatozoïdes /ml et une mobilité individuelle égale ou supérieure à 75% ont été utilisées pour la cryoconservation.

V. préparation du milieu de dilution

Le Kenney aussi appelé Skim Milk Glucose extender (SKMG), décrit par (Yoann, 2008) était utilisé comme une source d'énergie, de protection contre les chocs thermiques, et d'optimisation de la survie des spermatozoïdes depuis la récolte jusqu'au moment d'insémination, ainsi comme une base de dilution de sperme après la récolte et l'évaluation initiale du volume sans gel et de la concentration en spermatozoïdes.

V.1.ingrédients

Tous les composants de milieu Kenny que nous avons utilisés sont disponibles dans tous les laboratoires de recherches et peuvent être facilement obtenus (**le glucose, lait en poudre entier, antibiotiques**). Ces composants sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

Partie expérimentale

Tableau 06 : La composition du Kenney (pour 1l)

Glucose $C_6H_{12}O_6$	49g
Lait en poudre	24g
Eau distillée stérile	q.s.p.1L
streptomycine	1,5g
Pénicilline	1,5 million UI

- q.s.p : quantité suffisante pour 1L

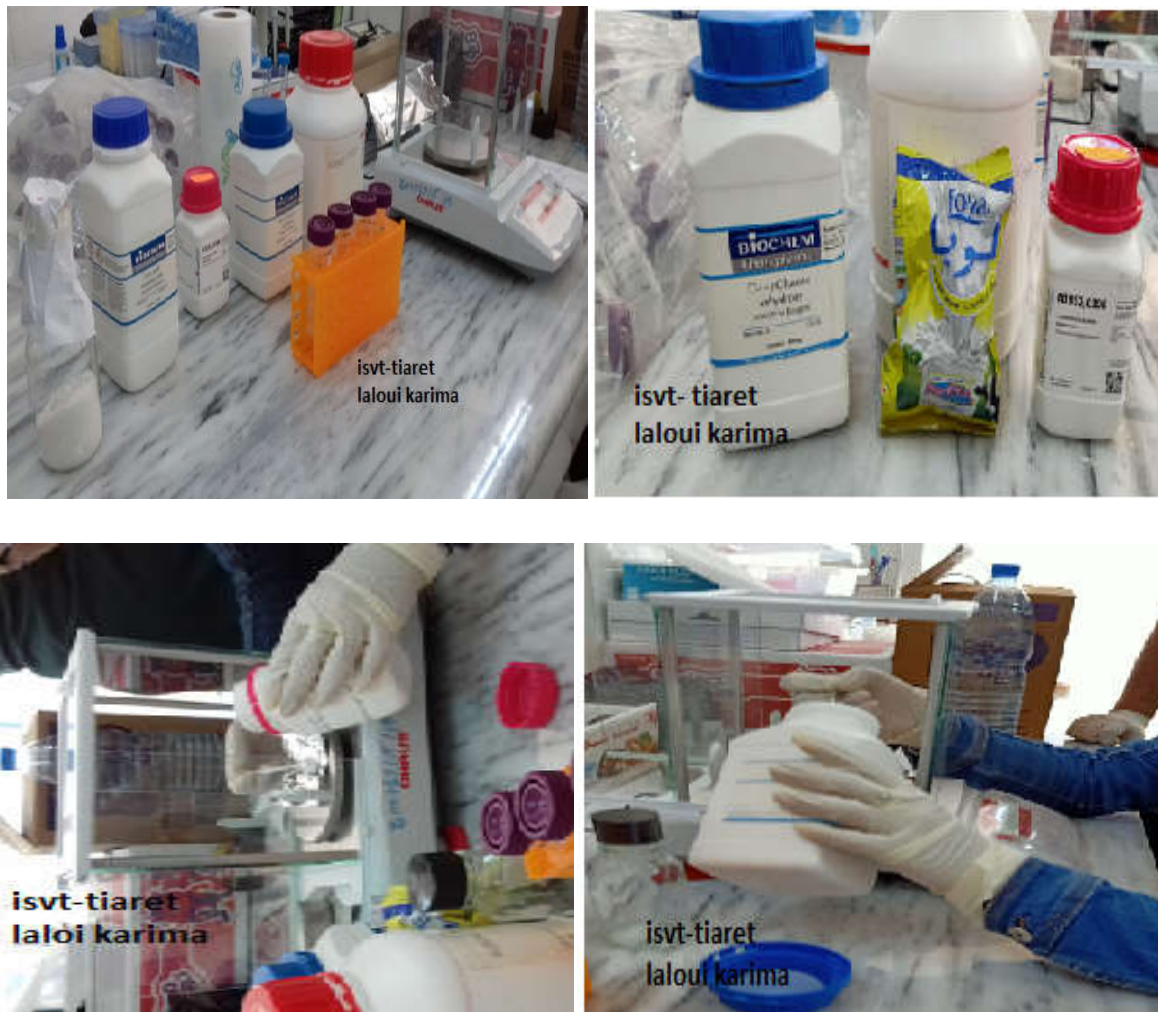


Figure 28 : les ingrédients de milieu Kenney mesurés.

V.2.Préparation

Dans notre expérimentation les quantités des ingrédients utilisées ont été mesurées dans une balance de précision (**ohaus explorer ®**) seulement pour la préparation d'un volume de **250 ml** de dilueur et ceci a été fait quelques heures avant la récolte du sperme.

tous les ingrédients ont été mélangés dans un récipient en verre stérile puis versés dans un flacon en verre encore stérile, fermé et placé par la suite dans un agitateur magnétique (**HEITO Paris HM 32**) pour qu'ils soient remuer pendant un certain temps jusqu'à mélange complet. Le diluant est ensuite mis dans une étuve réglée à **37°C** jusqu'au moment d'utilisation.



Figure 29 : Les étapes de préparation du milieu Kenney.

VI. Préparation du milieu de Cryo-congélation

VI.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 antioxydantes au dilueur de congélation (**John Dascanio, 2014**).

Partie expérimentale

□ 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 **7 ml** d'eau distillée stérile pour diminuer la viscosité du jaune d'œuf.

Le mélange ainsi obtenu était remplie dans un tube conique stérile de **45 ml** puis soumis à la centrifugation dans une centrifugeuse pendant **45 mn à 2000 x g (g : gravité)**, permettant d'avoir trois fraction le culot (membranes) la fraction moyenne (la partie à prélevée) et le surnageant (les lipides).

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 de 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**.





Figure 30:La préparation de plasma du jaune d'œuf.

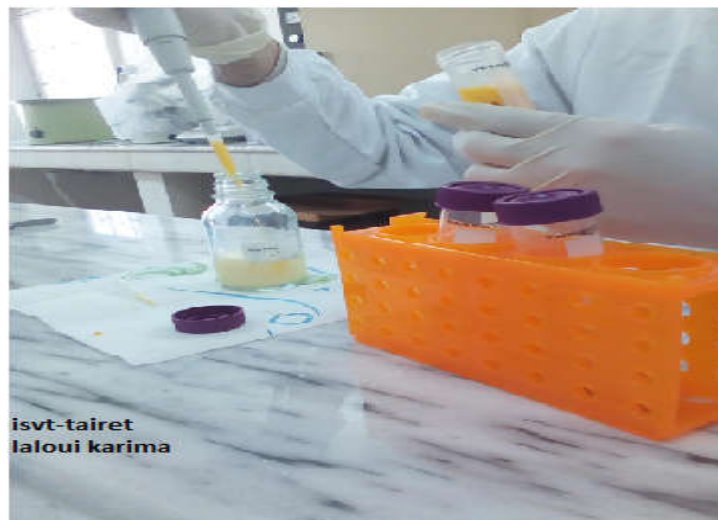


Figure 31 : Kenney modifié.

VII. 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.



Figure32 : les étapes de filtration de la semence.

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 :

VII.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 nue afin de détecter la présence éventuelle de sang, d'urine ou de pus dans l'éjaculat.



Figure33 : couleur et aspect de sperme après filtration.

VII.2. Détermination de la concentration

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





Figure 34:La détermination de la concentration à l'aide d'un photomètre Minitube.

VII.3. 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 chauffés à environ 37°C et placée par la suite sous le microscope optique (**OLYMPUS CX21**).

Dans un premier temps, le sperme est évalué au faible grossissement (**x10**) afin d'apprécier de façon subjective la mobilité massale, c'est-à-dire les mouvements de réunion et de dispersion de spermatozoïdes. Une note variant de zéro à cinq est attribuée par l'observateur (**Marc Stéphanies, 2015**).

b. Mobilité individuelle

Une dilution au **25 x 10⁶ SPZ/mL** est nécessaire pour l'estimation de la mobilité individuelle, cela a été fait par l'ajout d'une goutte de sperme dans un épendorphe rempli de **1.5 mL** de dilueur.

Le sperme est examiné au fort grossissement (**x40**). Le taux des spermatozoïdes mobiles est calculé en examinant **100 spermatozoïdes** dans quatre champs microscopiques, celle-ci s'exprime en pourcentage (**note de 0 à 100%**), (**Marc Stéphanies, 2015**).

VIII. Traitement de la semence

Après l'examen de la semence ; les étapes suivantes sont : la dilution, le Conditionnement dans les paillettes et la congélation de la semence.

VIII.1. Dilution primaire

Pour garder les spermatozoïdes viables et mobiles et en bon état, une dilution **1 : 1** (sperme / dilueur) a été faite dans le dilueur de Kenney que nous avons préparé préalablement et qui avait été Mis à l'étuve à **37°C**. Tout le matériel entrant au contact avec le sperme doit être à la même température.



Figure35 : la dilution de sperme et le remplissage des tubes coniques à centrifuger.

VIII.2. Centrifugation de la semence

Dans le but de séparer le plasma séminal des spermatozoïdes et de les concentrer, les échantillons de sperme qui ont subies une dilution primaire ont été remplies dans des tubes coniques de **45 mL** Et centrifugés pendant **10 mn** à **600 x g** (Cochran JD et al, 1984).



Figure36 : l'aspect du culot après l'aspiration de surnagent.

VIII.3. Dilution secondaire

Après centrifugation, au moins **95%** du surnageant a été éliminé, les culots ont été ensuite rassemblés dans un seul tube et remis en suspension avec de Kenney modifié (contenant **15%** de jaune d'œuf et **5%** de glycérol). Le volume de Kenney modifié ajouté était calculé dans l'ordre d'atteindre dans un premier temps une concentration finale en spermatozoïdes de **200 × 10⁶/ml** :

$$[\text{CT}] \text{ en SPZ} = [\text{C}] / 1\text{mL en SPZ} \times \text{V}$$

Volume de Kenney ajouté = [CT] en SPZ × 0,5 / 200 × 10⁶ – (volume des culots rassemblés)

[CT] : Concentration totale, [C] : Concentration, SPZ : spermatozoïde,

V : Volume de la fraction sans gel de l'éjaculat

VIII.4. Equilibration

Chaque aliquote a été par la suite refroidie lentement dans un réfrigérateur à **4°C** pendant **90 minutes**.

VIII.5 Conditionnement de la semence

Après équilibrage, la semence diluée est conditionnée dans des paillettes minitube 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.

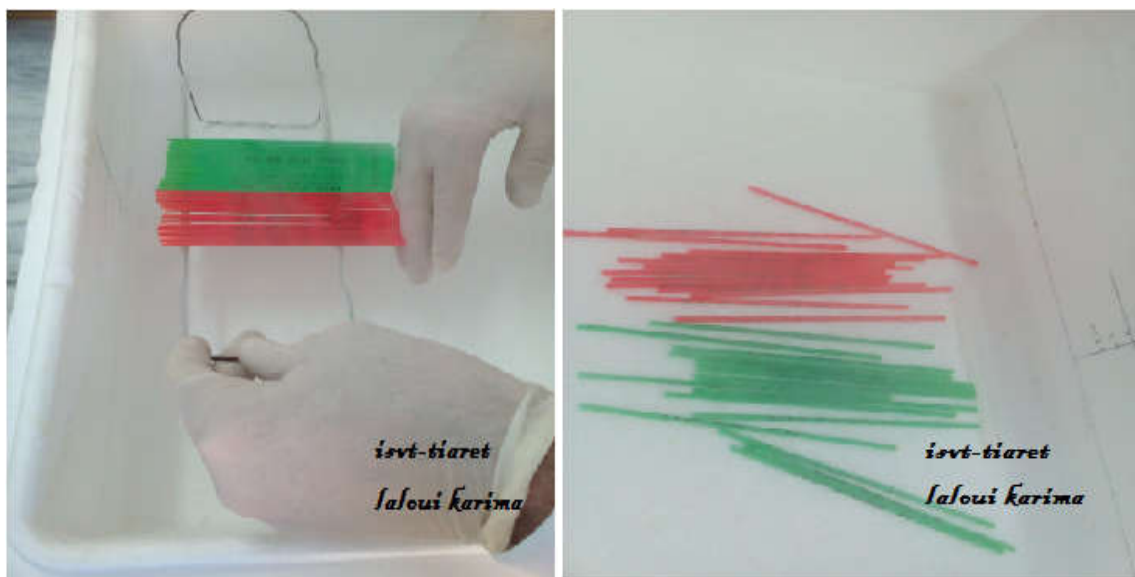
Après le refroidissement de la semence diluée, celles-là sont remplies par aspiration buccale à travers l'extrémité bouchonnée de la paillette. A l'aide des pointes de micropipette, un petit volume de la semence est retiré de la paillette de manière à laisser un vide d'environ **1cm**. Les paillettes 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.



Figure 37: le conditionnement des paillettes.

VIII.6. 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 MJ 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.



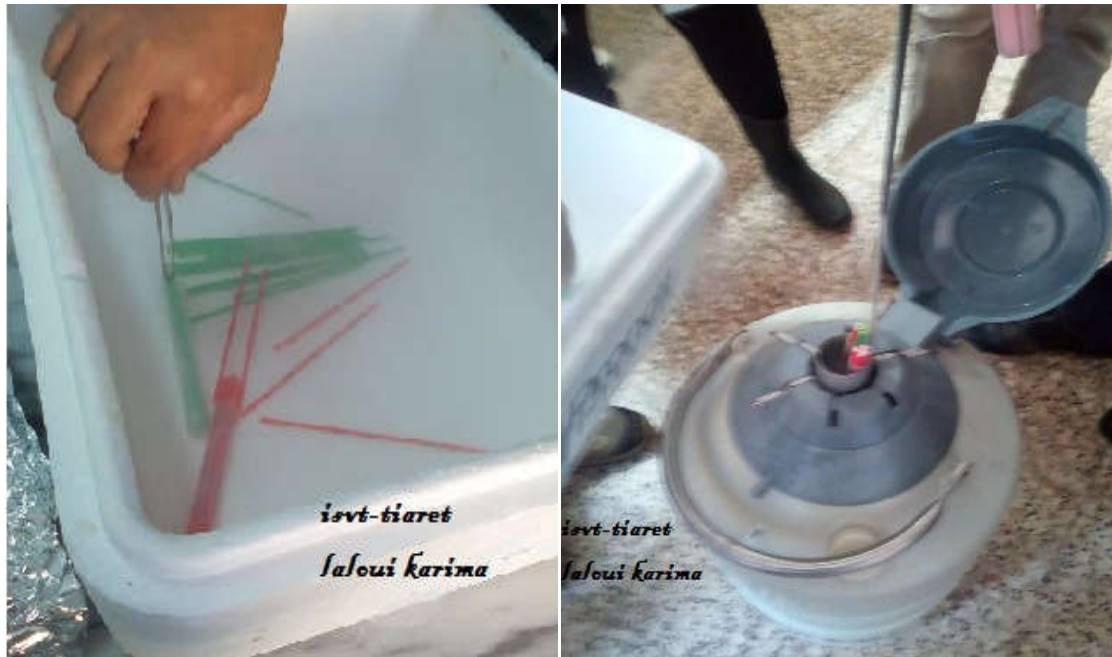


Figure38 : les paillettes placées au dessus d'azote liquide en phase vapeur, prolongées en phase vapeur, puis stockées dans l'azote liquide.

VIII.7. Evaluation des paillettes après décongélation

VIII.7.1. 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



Figure39 : décongélation des paillettes.

VIII.7.2. 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 l'avons décrit précédemment, cela était fait pour chaque concentration



Figure 40: l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes sous le microscope optique.

Résultats et discussion

Résultats

I. Evaluation de la semence après la récolte

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

Tableau 07 : les caractéristiques séminales individuelles obtenues pendant le protocole

	Paramètres	ANBER	REZKI
Examen macroscopique	Volume (ml)	58	85
	Couleur et aspect	Blanc laiteux homogène	Blanc laiteux homogène
/	Concentration (spz/ml)	123×10^6	133×10^6
Examen microscopique	Mobilité massale	3	3
	Mobilité individuelle	80%	75%

Partie expérimentale

II. Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de Kenney avant la congélation

Tableau 08: paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la première répétition

	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Moyenne	40	19.2	29.6	39	52	70	1.3	4
ecartype	38.73	26.46	31.47	27	29	18	1.16	3.89
max	201.3	138.3	138.8	100	100	100	8.2	21.7
min	10	00	00	00%	00%	00%	00	00

Tableau 09: paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la première répétition

Totale 1177	
LENT704	60,01%
MOYEN60	5,11%
PROGMOY 60	5,11%
PROGRAP 81	6,90%
RAPIDE 59	5,02%
STATIQUE 20	17,73%

Spermatozoïdes mobile : 82,27 ; spermatozoïdes immobiles : 17,73.

Tableau 10: paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la deuxième répétition

	VLC	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
MOYENNE	42.3	21.8	32.8	44%	58%	73%	1.4	4.6
ECARTYPE	38.55	27.40	32.62	27%	27%	19%	0.99	3.80
MAX	204.4	145	147	100%	100%	100%	7	20
MIN	10.1	00	0.8	0%	7%	7%	0	0

Partie expérimentale

Tableau 11 : paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la deuxième répétition

TOTALE 1068	
LENT 451	41.60%
MOYEN 41	3.78%
PROGMOY 49	4.52%
PROGRAP 53	4.88%
RAPIDE 47	4.33%
STATHIQUE 44	40.77%

Spermatozoïdes mobile : 59,23 ; spermatozoïdes immobiles : 40,77.

Tableau 12: paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la troisième répétition

	VLC	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
MOYENNE	46.9	23.8	36.1	0.4	0.6	0.7	1.5	4.7
ECARTYPE	29.09	29.10	35.25	0.28	0.27	0.13	1.12	4.18
MAX	173.1	159.8	159.8	1.0	1	1	7.3	20.0
MIN	10.1	0.0	3.3	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0

Tableau 13: paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la troisième répétition

TOTALE 1165	
LENT 487	5.55%
MOYEN 64	3.64%
PROGMOY 42	42.23%
PROGRAP75	6.50%
RAPIDE72	6.26%
STATIQUE 41	35.73%

Spermatozoïdes mobile : 64,27 ; spermatozoïdes immobiles : 35,73

Partie expérimentale

Les tableaux ci-dessus montre la variation des paramètres spermatiques pour l'étalon ANBAR et les pourcentages des spermatozoïdes mobiles et immobiles, suite à cette examen nous constatant que les spermatozoïdes mobiles sont plus nombreux par rapport aux spermatozoïdes statiques avec une moyenne allant de 59,23% à 82,27% et 17,73 à 40,77 respectivement on a noté aussi que le pourcentage le plus élevé dans les spermatozoïdes mobiles est celui des spermatozoïdes lents.

Les spermatozoïdes progressifs n'étaient pas très importants dans l'ensemble des spz mobiles.

III. Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de Kenney supplémenté par les cryoconservateurs après décongélation

**Tableau14 : variation des paramètres et des pourcentages des spermatozoïdes mobiles
et immobiles après décongélation**

	Moyenne	Écart-type
VCL	24,81	18,61
VAP	19,05	16,39
VSL	13,25	15,74
STR	49,4%	31,1%
LIN	62,6%	30,9%
WOB	74,3%	22,2%
ALH	1,08	0,64
BCF	2,00	2,70
Aire	15,77	11,98

**Tableau15 : variation des paramètres et des pourcentages des spermatozoïdes mobiles
et immobiles après décongélation**

lent	541	19,39%
moyen	23	0,82%
progressif moyen	41	1,46%
progressif rapide	3	0,10%
rapide	4	0,14%
statique	2167	77,67%

Les résultats des paramètres spermatiques et les pourcentages des spermatozoïdes mobiles et immobiles sont décrit dans les tableaux ci-dessus, on peut noter que le pourcentage des spermatozoïdes immobiles à pris le dessus par rapport aux spermatozoïdes mobiles avec une

Partie expérimentale

Moyenne qui a frôlé les 77,67% pour les statiques et une moyenne de 22,33% pour les spermatozoïdes mobiles, toute en notant que les valeurs des spermatozoïdes lents étaient les plus élevés dans la portion des spermatozoïdes mobiles.

Tableau16 : Vitalité des spermatozoïdes après décongélation :

	totale	pourcentage
vitality		(%)
Alive	90	90.00
Dead	10	10.00

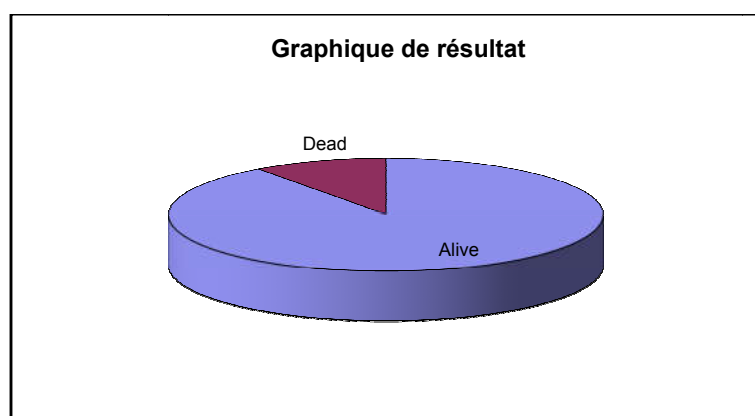


Figure41 : spermatozoïdes morts et vivants après décongélation

Le tableau et la figure ci-dessus montre le pourcentages des spermatozoides morts et vivants de l'éjaculat de l'étalon ANBAR conservés dans le milieu Kenney supplémenté par des cryoprotecteurs nous remarquons que le poucentage des spermatozoides vivants est plus important que celui des spermatozoides morts avec une valeurs de 90% & 10% repectivement.

Discussion

Dans le présent travail, nous avons testes un milieu de lait, glycérol et du jaune d'œuf (Kenny supplémenté par des cryoconservateurs).l'analyse a été effecteur par un CASA (computer assisted semen analyse) ce qui nous a permis de voir l'ensemble des paramètres spermatiques individuelles et le pourcentage de chaque catégorie des spermatozoïdes

Partie expérimentale

(Statiques et mobiles). Ainsi que la vitalité des spermatozoïdes testés par le test de l'iosine-nigrosine.

Nous avons pu observer que le pourcentage des spermatozoïdes mobiles à chuter après décongélation des paillettes mais la viabilité était très bonne de l'ordre de 90%.

Parmi les facteurs qui nuisent à la vitalité des spermatozoïdes on cite les radicaux libres et les phénomènes d'oxydation, le sperme d'étalon fertile présente rarement des leucocytes et un pourcentage élevé de spermatozoïdes anormaux (les principales sources de ROS), le processus de cryoconservation augmente la génération de ROS par les spermatozoïdes (**Ball et al.2011**).

La libération de ROS dans le milieu par des cellules endommagées est un danger potentiel pour les spermatozoïdes cryoconservés efficacement après décongélation, la teneur en antioxydants du milieu fourni par le dilueur de sperme contribue à éviter ou à diminuer le risque de peroxydation lipidique des membranes des spermatozoïdes.

Récemment, une approche protéomique a permis de mieux comprendre la composition du jaune d'œuf (**Mann et Mann, 2008**). Comprenant au moins 116 protéines, dont 86 auraient été présentes dans le jaune d'œuf pour la première fois, cet article décrit plusieurs protéines ayant une activité antioxydante probable. Le jaune d'œuf contient environ 33% de lipides et une importance capitale pour le développement de l'embryon. La présence de chélateurs métalliques tels que la phovistine du jaune, la céruloplasmine éliminent les ions métalliques libres qui pourraient catalyser la production de ROS. De plus, une protéine similaire à la superoxyde dismutase extracellulaire et une protéine à la glutathion peroxydase plasmatique peuvent contribuer à la capacité antioxydante du jaune (**Mann et Mann, 2008**).de même, le lait écrémé bovin présente une activité antioxydante pour protéger sa haute teneur en lipide (**taylor et Richardson, 1980**).

Cependant, nous devrions envisager deux étapes dans la préparation du lait écrémé (1) l'élimination des graisses entraîne également une perte de vitamines liposolubles (par exemple, les rétinoles et les tocophérols) ; (2) traitement à très haute température, lorsque le lait est chauffé pendant une courte période à une température supérieure à 135°C, inactivant par conséquent des enzymes telles que la catalase, la SOD et la PGx.

Partie expérimentale

Néanmoins, une activité de piègeur de radicaux libres a été de identifiée et liée à des minéraux comme le cuivre et le zinc ; qui sont nécessaires pour une activité appropriée des Enzymes piègeurs. En outre, ces minéraux ont leurs propres propriétés antioxydantes (**przbylska et al.2007**).de plus, la dénaturation des protéines expose des groupes sulfydryles (**Patrick et swaisgood, 1976, taylor et Richardson, 1980 ; jiminez-Guzman et al.2002**), améliorant la capacitation antioxydante des protéines et des peptides malgré sa structure fonctionnelle.

Conclusion

Conclusion

De la présente étude nous pouvons conclure que l'utilisation du milieu Kenney supplémenté par les substances Cryoprotective (glycérol et jaune d'œuf) a montré une bonne conservation du sperme équin avec une bonne vitalité et une mobilité acceptable, ce qui fait que le milieu a fait son rôle

Nutritif, protecteur, osmotique et antioxydant dans la totalité des processus de cryoconservation.

Perspectives et recommandations

Perspectives et recommandation

Les résultats que nous avons obtenus dans notre étude ouvrent des perspectives intéressantes, elles nous ont laissé penser à :

- ❖ Augmenter l'effectif de travail (le nombre des étalons et des éjaculats utilisés pour chacun d'entre eux).
- ❖ Essayer d'inséminer des juments avec ces semences congelées pour savoir l'effet in vivo et calculé la fertilité.
- ❖ Nous espérant ainsi améliorer la clarté du milieu de cryoconservation pour une visualisation plus claire des spermatozoïdes permettant une évaluation optimale de la qualité du sperme congelé, le lait en poudre entier pourrait être remplacé par du lait écrémé ou semi écrémé.
- ❖ Une comparaison de notre milieu de congélation avec autres milieux de congélation commercialisés pour mieux juger son effet sur les paramètres de sperme d'étalon.
- ❖ Tester d'autres types des dilueurs de congélation pour la semence de l'étalon

Références bibliographique

Références bibliographiques

Allimant M. 2010. Actualités sur les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence de l'étalon. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, 138p.

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

Amann R.P., Graham J.K. 2011. Spermatozoal function. In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. (Eds), *Equine reproduction*. 2nd edition. Wiley-Blackwell: Oxford, 1053-1085.

Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner. 2011. *Equine Reproduction*, Second Edition. Blackwell Publishing Ltd.

ANZAR M. et GRAHAM E.F. (1994) Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. *Theriogenology*. Vol. 43, n° 2, p 439-449.

Baracaldo M.I. Steps for freezing bovine semen : from semen collection to the liquid nitrogen tank. [En ligne]. 2007. Adresse URL : http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia/2007/baracaldo_et_at_2007.pdf, consulté le 02/04/2014.

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

Barone R, Tagand R. 1956. Anatomie des équidés domestiques. Tome second. Splanchnologie et angiologie. Fascicule III. Appareil uro-génital. Péritoine, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, pp. 633-1010.

Barone, R., 1978. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Editions Vigot frères – Tome3. LYON, 851p.

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

Baronne 2003. Radiographic bone density around immediately loaded oral implants.

Barrier-Battut I. 2013. Collecte et traitement de la semence d'étalon. *Equ'idée*. Article 2-7

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.

Références bibliographiques

Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. 2001. Advances in cooled semen technology. Anim Repro Sci. 68:181–90.

Batellier F. et al. 2001 Advances in cooled semen technology. Anim Reprod Sci. 68 (3-4) 181-90.

Baumber J., Ball B.A., Linfor J.J., Meyers S.A. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. J. Androl., 24, 621-628.

Blanchard TL, et al. 2003. Manual of equine reproduction. 2nd edition. Mosby

Braun J., Sakai M., Hochi S., Oguri N. 1994. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. Theriogenology, 41, 809-818.

BRINSKO S.P., CROCKETT E.C. et SQUIRES E.L. (2000) Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. Theriogenology. Vol. 54, n° 1, p 129-136.

Brinsko S.P., Blanchard T.L., Rigby S.L., Love C.C., Varner D.D. 2003. Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. Theriogenology, 59, 735-742.

BRITO(L.F.C.,(2007),(“Evaluation(of(Stallion(Sperm(Morphology.”(Clinical’ Techniques' in'Equine' Practice (6((4), (249–64).

BRUYAS(J.F.,(DAELS(P.,(2013,(“CASTRATION(<< HORMONALE >>(DE(L’ETALONIn((Proceeding(AVEF(du(11(au(13(Decembre(2013,(Deauville,(France,(AVEF,(147–56).

Chirent Mylène. 2015. Les alternatives à la castration chirurgicale chez l’étalon ; Thèse Présentée à l’université Claude Bernard – Lyon.

Cochran JD, Amann RP, Froman DP, Pickett BW. 1984. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. Theriogenology; 22: 25-38.

Dacheux J-L. et Dacheux F. 2001. L’épididyme et les glandes annexes. In : La reproduction chez les mammifères et l’homme. Nouvelle Edition entièrement refondue. INRA Editions. Ellipses

Références bibliographiques

Dadoue J-P., Demoulin A. 2001. « Structure et fonction du testicule » dans « La reproduction chez mammifères et l'homme » de C. THIBAUT, Levasseur édition marketing, p 256 à 288 .

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.

Day John G. ET Stacey Glyn N. 2007. Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Second Edition. Humana Press Inc. 365p.

DYCE K.M., SACK W.O. ET WENSING C.J.G. (1987) Textbook of Veterinary anatomy. W.B. Saunders Company.

Delphine, Marie, Ghislaine Fehrenbach. 2003. L'éventration post-castration chez le cheval ; Thèse Présentée à la faculté de médecine de Créteil.

Dumon Christian. 2007. insémination artificielle dans l'espèce canine : Actualités. Bull. Acad. Vét. France. Tome 160 - N°2.

Edmond A.J., Teague S.R., Brinsko S.P., Comerford K.L., Waite J.A., Mancill S.S., Love C.C., Varner D.D. 2008. Effect of density-gradient centrifugation on quality and recovery rate of equine spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 107, 318-318.

EILTS B.E. (2005) Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. Theriogenology, 64, 685-691.

EILTS B.E. (2005) Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. Theriogenology, 64, 692-697.

Florence Batellier (chap. 14 et 16), Elisabeth Blesbois (chap. 13 et 15), (Jean-Pierre Brillard (chap. 14, 15 et 17- poules reproductrices), Marina Gorovoum (chap. 14 et 16), (François Hérault (chap.17, palmipèdes gras), Yvan Heyman (chap.6), Guy Perrier (chapt.10), Marie-Claude Rogier-Saderne (chap. 17, palmipèdes gras), Fabrice Savary (chap. 17, faisans) et Xavier Vignon (chap.6). 2005. Reproduction des animaux d'élevage (2ème édition).

FONTBONNE Alain et DUMON Christian (1992) Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In : Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. P.M.C.A.C. Editions.

Références bibliographiques

- FRESHMAN J.L. (20 Partie expérimentale 02)** Semen collection and evaluation. Clin. Tech. Small. Anim. Pract. Vol. 17, n° 3, p 104-107
- Gadella B.M. 2008.** Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. Anim. Reprod. Sci., 107, 229-236.
- Gadella B.M. 2008.** Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. Anim. Reprod. Sci., 107, 229-236.
- Gadella, B.M., Tsai, P.S., Boerke, A., Brewis, I.A. 2008.** Sperm head membrane reorganisation during capacitation. Int J Dev. Biol 52, 473-480.
- G. Decuadro-Hansen. 2004.** La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal Chilled and frozen semen : the animal experience.
- 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.
- Glander H.J., Schaller J., Ladusch M. 1990.** Eine einfache Methode Zur Separierung von frischen und kryokonservierten Humanspermien mittels einer Dextran Visotrast Dichtegradientenzentrifugation. Zentralbl. Gynakol, 112, 91-97.
- GRAHAM K.J.** Principles of cryopreservation. In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. (Eds), Equine reproduction. 2nd edition. Wiley-Blackwell: Oxford, 2011, 2959-2963.
- Gravance C.G., Champion Z., Liu I.K., Casey P.J. 1997.** Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. Anim. Reprod. Sci., 47, 149-155.
- 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.
- Heiskanen ML, Huhtinen M, Pirhonen A, Maenpaa PH. 1994a.** Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for 70 or 80 hours. Theriogenology. 42(6) 1043-51.
- Heymon Y., Vignon X. 2005.** Reproduction des animaux d'élevage. Educagri.
- Hoogewijs M., Rijsselaere T., De Vliegher S., Vanhaesebrouck E., De Schauwer C., Govaere J., Thys M., Hoflack G., Van Soom A., De Kruif A. 2010.** Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. Theriogenology, 74, 118-126.
- HANZEN Christian (2014)** Biotechnologies: L'insémination artificielle chez les ruminants.

Références bibliographiques

Isabelle Barrier-Battut. 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.

Jasko DJ, Sawyer HR, Squires EL. Identification of degenerative germ cells in semen from a QuarterHorse stallion. *Journal of Equine Veterinary Science* **1991**; 11:283-286.

Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. A comparison of two computer-automated semen analysis instruments for the evaluation of sperm motion characteristics in the stallion. *Journal of Andrology* 1990;11:453-9.

JÉGOU B., ROLLAND A. et ALBERT O. (2014) Le testicule. In : SAINT-DIZIER M. et CHASTANT-MAILLARD S. La reproduction animale et humaine. Editions Quae. p 752.

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

Johnston S.D., Root Kustritz M.V. ET Olson P.N.S. (2001). *Canine and Feline Theriogenology.* Saunders Company. 592p.

JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N.S. (2001) Semen Collection, Evaluation, and Preservation. In: Johnston S.D. (Eds.). *Canine and feline theriogenology.* W.B. Saunders compagny, Philadelphia, 287- 306.

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

Kenney RM. *Manual for clinical fertility evaluation of the stallion.* Hastings, NE: Society of Theriogenology; 1983.

Kobayashi T., Kaneko S., Hara I., Park Y.J., Sato h., Ohno T., Nozawa S. 1991. Concentrating human sperm before cryopreservation. *Andrologia,* 23, 25-28.

Loomis P.R. 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 22, 663-676.

Lopez M.L., Olea N., Retamal C.A. 2007. Post-testicular changes in the density and distribution of intramembrane particles of stallion sperm surface domains. *Anim. Reprod. Sci.,* 100, 204-210

Marc Stéphanie. 2015. Thèse : Actualités En Cryoconservation Des Semences Des Principales Espèces D'intérêt Vétérinaire, Université CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie).

Références bibliographiques

Mc. Donald Me. 1980. « Veterinary endocrinologie and reproduction ». Lea ET Febiger edition 3rd 560p. **Albert et Jean. 2001.** « Biologie du développement » .5ème édition de l'abrégé.

McGreevy PD, Cripps PJ, French NP, Green LE, Nicol CJ. 1995. Management factors associated with stereotypic and redirected behaviors in the Thoroughbred horse. *Equine Vet J*; 27:86–91

MELO C.M., PAPA F.O., FIORATTI E.G., VILLAVERDE A.I.S.B., AVANZI B.R., MONTEIRO G., DELL'AQUA J.A., PASQUINI D.F. ET ALVARENGA M.A. (2008)
Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm.
Anim. Reprod. Sci. Vol. 107, n° 3-4, p. 331.

Mj Taylor, Richardson, 1980,Antioxidant activity of skim milk : effect of heat and resultant sulfhydryl groups *journal of dairy science* 03(11), 1783-1795

Meskini Zakaria. 2016-2017. Mémoire de master ; l'insémination artificielle chez les caprins de la race arbia dans la région de Tiaret ; Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.

Moore A.I., Squires E.L., Graham J.K. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Therio–genology*, 63, 2372-2381.

Morrell J.M. 2006. Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod. Domest. Anim.*, 41, 63-67.

Neild D.M., Brouwers J.F., Colenbrander B., Aguero A., Gadella B.M.2005. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 72,230-238.

Neto C.R., Monteiro G.A., Sancler-Silva Y.F.R., Papa P., Guasti P.N., Resende H.L., Papa F.O., Dellaqua JR. J.A. et Alvarenga M.A. 2014. Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. *Journal of Equine Veterinary Science.* Vol. 1, n° 34, pp. 58-60.

Noakes D.E., Parkinson timothy j. ET England G.C. 2009. Veterinary reproduction and obstetrics. Ninth edition. Saunders Elsevier. 961p.

OLIVIER S. (2008) Récolte et conservation du sperme chez les félins : étude bibliographique. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Créteil. 201p

Références bibliographiques

Oliveira C.H., Vasconcelos A.B., Souza F.A., Martinsfilho O.A., Silva M.X., Varago F.C., Lagares M.A. 2010. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 118, 194-200.

Salazar J.L., Hayden S.S., Waite J.A., Comerford K.L., Edmond A.J., Teague S.R., Love C.C., Varner D.D. 2008. Effect of cryopreservation protocol on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*107, 347-348.

Ortega Ferrusola C., Garcia B.M., Gallardo Bolanos J.M., Gonzalez Fernandez L., Rodriguez Martinez H., Tapia J.A., Pena F.J. 2009. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 114, 393-403.

PILLET E., DUCHAMP G., BATELLIER F., BEAUMAL V., ANTON M., DESHERCES S., SCHMITT E. et MAGISTRINI M. (2011) Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*. Vol. 75, n° 1, p. 105-114.

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., 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.

Prins G. 1998. Semen, In: *Encyclopedia of reproduction*. Volume 4. Knobil E., Neill J.D. Academic Press.

Reece W.O. 1997. Male Reproduction. In: *Physiology of Domestic Animals*. 2nde edition. Williams and Wilkins. 370p.

Ricker J.V., Linfor J.J., Delfino W.J., Kysar P., Scholtz E.L., Tablin F., Crowe J.H., Ball B.A., Meyers S.A. 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol. Reprod*74, 359-365.

Roger T. 2009. L'appareil génital mâle des Mammifères domestiques. Documents de cours de l'Unité d'anatomie, Vetagro-sup, Campus vétérinaire de Lyon, 54pp.

Salazar J.L., Hayden S.S., Waite J.A., Comerford K.L., Edmond A.J., Teague S.R., Love C.C., Varner D.D. 2008. Effect of cryopreservation protocol on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*107, 347-348.

Senger P.L. 2005, Pathways to pregnancy and parturition. *Current Conceptions*: Pullman, 373 p

Références bibliographiques

Shoenian S, 2005. «Reproduction in the ram». Prolongation de coopérative du Maryland. Université de Maryland.

SIMPSON G., ENGLAND G.C. et HARVEY, M. (1998) Manual of small animal reproduction and neonatology. British Small Animal Veterinary Association. Gloucester (United Kingdom). 246p.

Sostaric E., Aalberts M., Gadella B.M., Stout T.A.E. 2008.The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. Anim. Reprod. Sci., 107, 237-248

Steven P. Brinsko, Terry L. Blanchard, Dickson D. Varner, James Schumacher, Charles C. Love, Katrin Hinrichs, David L. Hartman. 2011. Manual of equine reproduction – 3rd edition, 325p (p161-162).

SQUIRES E.L, KEITH S.L et GRAHAM J.K (2004) Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. Theriogenology. Vol. 62, n° 6, pp. 1056-1065.

Thibault C. 2001. La reproduction chez les mammifères et l’homme. Ellipses.

Tibary, A., Bakkourym. 2005. Equine Reproduction. Tome2. L’étalon. Vol. 2. Actes Éditions. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Maroc, 554p.

Vaissaire J-P. 1977. Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires. Maloine S.A. éditeur. 457p. P81-155.

Varner DD. 2008. Developments in stallion semen evaluation. Theriogenology; 70:448-62.

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.

Vidament M., Ecot P., Noue P., Bourgeois C., Magistrini M., Palmer E. 2000. Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. Theriogenology, 54, 907-919.

Vidament M., Yvon J.M., Couty I., Arnaud G., Nguerkamfeugang J., Noue P., Cottron S., Le Tellier A., Noel F., Palmer E., Magistrini M. 2001. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. Anim. Reprod. Sci. 68, 201-218.

Références bibliographiques

Waite J.A., Love C.C., Brinsko S.P., Teague S.R., Salazar J.L., JR., Mancill S.S. 2008. Varner D.D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology*, 70,704-714.

Yoann, Jean, François. 2008. Mémoire de doctorat sous le thème : Etude sur la conservation de la semence équine dans une boîte de transport jetable exposée à différentes températures positives pendant 22 heures. La faculté de médecine de Créteil.