

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة ابن خلدون تيارت

UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET

معهد علوم البيطرة

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

قسم الصحة الحيوانية

DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master complémentaire

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Vétérinaires

Présenté par : KOUACHI Younes

Thème

**Comparaison entre des milieux de cryconservation
de la semence équine**

Soutenu publiquement le

Jury :

Grade :

Président : AYAD Mohamed Amine

M.C.A

Encadrant : DERRAR Sofiane

M.C.A

Examineur I : SAIM Mohamed Saïd

M.C.A

Examineur II : HAMDY Mohamed

M.A.A

Année universitaire 2019/2020

Dédicaces

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A mes chères tantes pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral

A mon cher frère pour son appui et son encouragement,

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Remerciements

Je remercie tout d'abord « Allah » de m'avoir donné le courage d'entamer et finir ce mémoire dans de bonnes conditions

Je remercie vivement mon encadreur

Docteur DERRAR SOFIANE d'avoir encadré ce travail avec beaucoup de compétences.

pour ces conseils et surtout pour m'avoir consacré son temps afin de réaliser ce travail.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepter d'évaluer ce travail

Mes remerciements vont également

à mes enseignants : docteur Ayad Mohamed Amine et

docteur Saim Mohamed Said

Mes remerciements également à

docteur SMADI Mustapha Adnane

الهدف من هذا العمل هو مقارنة تأثير اثنين من مخففات التجميد (كيني المعدل وبيرن المعدل) على حركة وطول عمر الحيوانات المنوية قبل وبعد التجميد، في الفحل العربي - البربري، اختبرنا وسطاً من الحليب والجلسرين وصفار البيض

تم إجراء التحليل بواسطة تحليل السائل المنوي بمساعدة الكمبيوتر مما سمح لنا برؤية جميع المعلمات الفردية للحيوانات المنوية والنسبة المئوية لكل فئة من الحيوانات المنوية فضلاً عن حيوية الحيوانات المنوية التي تم اختبارها عن طريق اختبار الأيونات - نيجروزين.

تم حفظ الفذف الفردي للفحل العربي - البربري بالتبريد باستخدام مادتي تجميد.

يُظهر تقييم الحيوانات المنوية في وسط كيني وبيرن قبل التجميد أن الحيوانات المنوية المتحركة تفوق عدد الحيوانات المنوية الساكنة.

يُظهر تقييم الحيوانات المنوية في كيني المكمل بالمواد الحافظة بالتبريد والحروق المضاف إليها المواد الحافظة للبرودة بعد الذوبان أن النسبة المئوية للحيوانات المنوية غير المتحركة لها اليد العليا على الحيوانات المنوية المتحركة ولكن مع أهمية طفيفة في وسط بيرن.

نلاحظ أيضاً أن نسبة الحيوانات المنوية الحية أكبر من نسبة الحيوانات المنوية الميتة بقيمة 90% و 10% على التوالي في وسط كيني المضاف إليه مواد واقية من التجمد وأيضاً لوسط بيرن بقيمة 77% و 23%.

لذلك، فإن استخدام وسط كيني المضاف إليه مواد واقية من التجمد أظهر حفظاً جيداً مقارنة بوسط بيرن المكمل بمواد واقية من الجليد من أجل حفظ الحيوانات المنوية للخيل ذات الحيوية الجيدة والتنقل المقبول، مما يعني أن وسط كيني يلعب دوره الغذائي، الوقائي، ومضاد للأكسدة في جميع عمليات الحفظ بالتبريد.

Abstract

The objective of the present work is to compare the effect of two freezing extender (the modified Kenny and modified Burn) on the motility and longevity of sperm before and after cryoconservation, in the Arabian stallion - beard. , we tested an extender containing milk, glycerol and egg yolk (Kenny supplemented with cryopreservatives and Burn supplemented by cryopreservatives). The analysis was carried out by a CASA (computer assisted semen analysis) which allowed us to see the set of 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 ionise-nigrosine test.

A single ejaculate from the Arab-beard stallion was subjected to cryopreservation with two freezing media (modified Kenny and modified Burn).

Evaluation of the sperm in Kenney and Burn'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 and Burn supplemented with cryopreservatives after thawing shows that the percentage of immobile spermatozoa gained the upper hand compared to motile spermatozoa.

We also notice that the percentage of live spermatozoa is greater than that of dead spermatozoa with a value of 90% & 10% respectively in the Kenney medium and also for the Burn medium with a value of 77% & 23% respectively.

Therefore, the use of Kenney medium supplemented with Cryoprotective substances showed good preservation compared to Burn supplemented with Cryoprotective substances of equine sperm with good vitality and acceptable mobility, which means that the medium has played its nutritive, protective, osmotic and antioxidant role in all of the cryopreservation processes.

Key words: semen- standard- cryopreservation- modified Kenney, modified Burn

Résumé

L'objectif de ce présent travail est de comparer l'effet de deux dilueurs de congélation (le Kenny modifié et le Burn modifié) sur la motilité et la longévité des spermatozoïdes avant et après congélation, chez l'étalon arabe- barbe. , nous avons testés un milieu de lait, glycérol et du jaune d'œuf (Kenny supplémenté par des cryoconservateurs et Burn supplémenté par des cryoconservateurs).l'analyse a été effectuée par un CASA (computer assisted semen analysis) 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 l'étalon arabe- barbe à été soumis à une cryoconservation avec deux milieux de congélation (le Kenny modifié et Burn modifié),

L'évaluation des spermatozoïdes dans le milieu de Kenney et Burn avant la congélation, montre que les spermatozoïdes mobiles sont plus nombreux par rapport aux spermatozoïdes statiques. L'évaluation des spermatozoïdes dans le milieu Kenney supplémenté par les cryoconservateurs et Burn supplémenté par les cryoconservateurs après décongélation montre que le pourcentage des spermatozoïdes immobiles a pris le dessus par rapport aux spermatozoïdes mobiles mais avec une légère importance dans le milieu Burn.

Nous remarquons aussi que le pourcentage des spermatozoïdes vivants est plus important que celui des spermatozoïdes morts avec une valeur de 90% & 10% respectivement dans le milieu Kenney supplémenté par des cryoprotecteurs et aussi pour le milieu Burn avec une valeur de 77% & 23%.

Donc l'utilisation du milieu Kenney supplémenté par les substances Cryoprotectives a montré une bonne conservation par rapport au Burn supplémenté par les substances Cryoprotective du sperme équin avec une bonne vitalité et une mobilité acceptable, ce qui fait que le milieu Kenney a fait son rôle nutritif, protecteur, osmotique et antioxydant dans la totalité des processus de cryoconservation.

Mots clés : semence- étalon- cryoconservation- Kenney modifié, Burn modifié

Table des matières

Dédicaces	I
Remerciements.....	II
Résumé en arabe	III
Abstract.....	IV
Résumé en français	V
liste des illustrations.....	VI
Liste des tableaux.....	VII
Introduction.....	01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

I-ANATOMIE.....	3
La partie glandulaire (Testicules)	3
Topographie des testicules.....	5
Principe de la descente testiculaire	6
Les enveloppes des testicules ou bourses testiculaires	6
Les enveloppes superficielles	6
Scrotum.....	6
Dartos.....	6
Fascia spermatique externe	6
Muscle Crémaster	7
Fascia spermatique interne.....	7
Tunique vaginale.....	8

Table des matières

Caractères généraux, conformation et moyens de fixité.....	9
Structure du testicule.....	10
2-La partie tubaire (excrétrice)	11
L'épididyme.....	11
Le canal déférent.....	11
Les glandes vésiculaires.....	12
3-La partie uro-génitale.....	13
L'urètre d'étalon	13
Glandes annexées à l'urètre	13
La prostate.....	15
GLANDES BULBO-URETRALES ou DE COWPER.....	15
Formations érectiles annexées à l'urètre.....	16
CORPS CAVERNEUX DU PENIS	16
CORPS SPONGIEUX DE L'URETRE.....	17
Corps spongieux du gland.....	18
Les muscles du pénis	18
Vascularisation et innervation.....	21
Le fourreau ou prépuce	22
II-Physiologie de la reproduction chez l'étalon	23
La régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez l'étalon.....	23
L'axe hypothalamo-hypophysaire	23
L'hypophyse ou glande pituitaire	23
Les hormones testiculaires.....	24
La régulation de la fonction de reproduction.....	25

Table des matières

La puberté chez l'étalon.....	26
Spermatogénèse	27
Les cellules de Sertoli	30
Les cellules de Leydig	31
Spermatozoïde.....	32
La tête.....	33
Le flagelle	34
Maturation de spermatozoïde et capacitation	35
Capacitation	36
Caractéristiques de la semence d'étalon	37
Volume.....	37
Couleur et consistance	37
Composition chimique	38
Plasma séminal.....	39
 Chapitre II : Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon	
Collecte du sperme.....	40
Préparation du vagin artificiel.....	43
Évaluation de la semence équine	43
Examens macroscopiques	43
Volume.....	44
Couleur et aspect.....	44
PH	44

Table des matières

Examens microscopiques.....	45
Concentration.....	45
Evaluation par utilisation d'une cellule hématimétrique	45
Evaluation par utilisation du spectrophotomètre	46
La Motilité	47
La morphologie.....	51
Coloration	51
Evaluation et classification	52
Conservation de la semence.....	53
Conservation à court terme	54
Conservation à long terme	55
La décongélation.....	63
Evaluation de la qualité de la semence congelée	64

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel et méthode	66
Lieu de l'expérimentation	66
Effectif de l'expérimentation	66
Déroulement des récoltes	67
La Préparation du vagin artificiel	67
La préparation d'étalon.....	68
la récolte.....	70

Table des matières

sélection des éjaculats pour la congélation	71
Préparation du milieu de dilution	71
ingrédients.....	71
Préparation du milieu de Cryo-congélation	73
Le Kenney modifié	73
Préparation de plasma du jaune d'œuf.....	74
Evaluation des semences après la récolte	76
Eamen macroscopique	76
Volume	77
Couleur et aspect.....	77
Détermination de la concentration	77
Examen microscopique.....	78
Mobilité massale	78
Mobilité individuelle.....	79
Traitement de la semence.....	79
Dilution primaire.....	79
Centrifugation de la semence	80
Dilutuïn secondaire	81
Equilibration	81
Conditionnement de la semence	81
Congélation des paillettes	82
Evaluation des paillettes après décongélation	84
Décongélation	84

Table des matières

Evaluation	85
Résultats	86
Evaluation de la semence après la récolte	86
Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de Kenney avant la congélation	86
Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de Kenney supplémenté par les cryoconservateur après congélation	89
Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de BURN avant la congélation	91
Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de BURN supplémenté par les cryoconservateur après congélation	93
Discussion	96
Conclusion	98
Perspectives et recommandations	99
Références bibliographiques	100

Liste des illustrations

Figure 01 : Dessin du tractus reproductif de l'étalon vue en coupe sagittale (MC. Kinnon A.1993).....	4
Figure 02 : Le testicule et ses enveloppes, conformation externe (Barone, 2001)	7
Figure 03 : Conformation intérieure et structure du testicule de l'étalon (Picket B.W. 1993).....	8
Figure 04 : Testicule et épидидyme gauches du cheval. Conformation et moyen de fixité. (BARONE, 1956)	9
Figure 05 : Schéma de la conformation interne du testicule et de l'épididyme (BARONE 1956).....	5
Figure 06 : Schéma de l'aspect médial du canal déférent droit de l'étalon. (BARONE, 2001).....	12
Figure 07 : Schéma de l'aspect médial de l'urètre droit de l'étalon. (BARONE, 2001) ..	14
Figure 08 : Glandes génitales accessoires de l'étalon, vue dorsale (P.L. Senger, Ph. D., 2003).....	15
Figure 09 : Structure de pénis et du prépuce de l'étalon (P.L. Senger, Ph. D., 2003).....	17
Figure 10 : Coupe transversale du pénis du Cheval, au niveau de la partie moyenne du pénis. (BARONE, 2001)	19
Figure 11 : Coupe transversale du pénis du Cheval, en arrière de la couronne du gland (le gland isolé est vu par derrière) (BARONE, 2001)	20
Figure 12 : Vascularisation de la verge chez l'étalon. A. : artère, V. : veine (BARONE, 2001).....	21

Liste des illustrations

Figure 13 : Partie libre du pénis et prépuce du Cheval (CONSTANTINESCU, 2010) ...	22
Figure 14 : Schéma de la régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez l'étalon. A : activine ; E : oestrogènes ; I : inhibine ; T : testostérone (d'après AMANN, 2011).....	26
Figure 15 : Etapes de la spermatogénèse (d'après AMANN, 2011).....	29
Figure 16 : La spermatogenèse (Marie Allimant, 2010)	30
Figure 17 : Schéma illustrant l'organisation cellulaire des tubes séminifères (d'après AMANN, 2011)	32
Figure 18 : Structure d'un spermatozoïde (Marie Allimant, 2010).....	35
Figure 19 : Aspect du sperme d'étalon après centrifugation (Marie Allimant, 2010).....	38
Figure 20 : Mannequin de récolte pour étalons (Letenre Jessica 29 avril 2016).....	41
Figure 21 : Différents types de vagins artificiel (Letenre Jessica 29 avril 2016)	42
Figure 22 : Hématimètre : cellule de Thoma (https://slideplayer.fr/slide/3395368/)	46
Figure 23 : Photomètre Minitube avec cuvette remplie en sperme (John Dascanio. 2014)	47
Figure 24 : Microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante (Marie Allimant, 2010)	51
Figure 25 : Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et quelque anomalie pouvant être rencontrées (Steven P. et al, 2011)	53
Figure 26 : Centrifugation de sperme dilué (A), puis aspiration de surnageant après centrifugation (B) (Steven P. et al. 2011).....	60

Liste des illustrations

Figure 27 : Identification (A), remplissage (B) et bouchage (C) des paillettes (John Dascanio. 2014).....	62
Figure 28 : Paillettes déposées sur une grille (A) ensuite placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide (B) puis stockées dans une cuve d'azote liquide(D) (John Dascanio. 2014 ; Steven P. et al. 2011)	63
Figure 29 : Le laboratoire de la reproduction équine de l'institut des sciences vétérinaires.....	66
Figure 30 : Les étapes de préparation du vagin artificiel de type Missouri.....	68
Figure 31 : Vagin artificiel de type Colorado	68
Figure 32 : L'excitation de l'étalon en présence de la jument « boute-en-train » (A ANBER, B REZKI).	69
Figure 33 : les étapes de la récolte de sperme chez le cheval «REZKI ».....	70
Figure 34 : Les étapes de la récolte de sperme chez le cheval «ANBAR ».....	71
Figure 35 : Les ingrédients de milieu Kenney mesurés	72
Figure 36 : Les étapes de préparation du milieu Kenney	73
Figure 37 : La préparation de plasma du jaune d'œuf.....	75
Figure 38 : Kenney modifié	75
Figure 39 : Les étapes de filtration de la semence.....	76
Figure 40 : Couleur et aspect de sperme après filtration	77

Liste des illustrations

Figure 41 : La détermination de la concentration à l'aide d'un photomètre Minitube...	78
Figure 42 : La dilution de sperme et le remplissage des tubes coniques à centrifuger	79
Figure 43 : L'aspect du culot après l'aspiration de surnagent	80
Figure 44 : Le conditionnement des paillettes	82
Figure 45 : Les paillettes placées au dessus d'azote liquide en phase vapeur, prolongées en phase vapeur, puis stockées dans l'azote liquide	83
Figure 46 : Décongélation des paillettes	84
Figure 47 : L'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes sous le microscope optique après coloration par l'éosine	85
Figure 48 : Spermatozoïdes morts et vivants après décongélation	90
Figure 49 : Spermatozoïdes morts et vivants après décongélation	95

Liste des tableaux

Tableau 01 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992).....	49
Tableau 02 : Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992)	50
Tableau 03 : Composition de Kenney et de l'INRA96 (pour 11) (Marc Stéphanie., 2015)	59
Tableau 04 : La composition du Kenney (pour 11)	72
Tableau 05 : Les caractéristiques séminales individuelles obtenues pendant le protocole	86
Tableau 06 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la première répétition	86
Tableau 07 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la première répétition.....	87
Tableau 08 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la deuxième répétition.....	87
Tableau 09 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la deuxième répétition.....	88
Tableau 10 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la troisième répétition	88
Tableau 11 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la troisième répétition	88
Tableau 12 : Variation des paramètres et des pourcentages des spermatozoïdes mobiles et immobiles après décongélation.....	89
Tableau 13 : Variation des paramètres et des pourcentages des spermatozoïdes mobiles et immobiles après décongélation.....	89
Tableau 14 : Vitalité des spermatozoïdes après décongélation.....	90
Tableau 15 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la première répétition	91
Tableau 16 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la première répétition	91
Tableau 17 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la deuxième répétition.....	91
Tableau 18 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la deuxième répétition.....	92
Tableau 19 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la troisième répétition	92

Liste des tableaux

Tableau 20 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la troisième répétition	92
Tableau 21 : Variation des paramètres et des pourcentages des spermatozoïdes mobiles et immobiles après décongélation.....	93
Tableau 22 : Variation des paramètres et des pourcentages des spermatozoïdes mobiles et immobiles après décongélation	94
Tableau 23 : Vitalité des spermatozoïdes après décongélation.....	94

Introduction

Introduction

Dans l'élevage de chevaux moderne, la semence congelée est populaire en raison de ses avantages par rapport à la semence expédiée refroidie. Cependant, le sperme d'une grande partie de la population d'étalons ne peut pas être utilisé pour la congélation du sperme en raison de la qualité des spermatozoïdes post-décongélation et des taux de fertilité insatisfaisants (Alvarenga et al., 2004; Vidament et al., 2002; Samper et Morris, 1998).). De plus, de grandes variations de la qualité du sperme après le processus de congélation-décongélation et des taux de gestation variables après insémination se produisent entre les différents étalons et éjaculats (Oehninger et al., 2000; Samper et Morris, 1998). Par conséquent, l'agent cryoprotecteur doit être étudié pour chaque type de cellule.

Un grand nombre de rapports ont été publiés concernant la congélation de spermatozoïdes éjaculés avec plusieurs CPA (Hoffmann et al., 2011; Nur et al., 2010; Medeiros et al., 2002; Morrier et al., 2002; Molinia et al. , 1994). Cependant, des études antérieures ont fourni des résultats incohérents. Neves et coll. (1995) ont constaté que les taux de gestation étaient souhaitables avec du sperme congelé à l'aide d'EG. Tracey (1999) a évalué cinq cryoprotecteurs, Gly, EG, diéthylène glycol, propylène glycol et DMSO à quatre molarités (0,5, 1,0, 1,5 et 2,0 mol / l) sur plusieurs éjaculats provenant de sept étalons reproducteurs fertiles. Dans l'ensemble, l'utilisation de DMSO a fourni les valeurs de motilité et de viabilité post-décongélation les plus souhaitables et des résultats post-décongélation supérieurs pour les étalons qui avaient du sperme pour lequel l'utilisation de Gly a entraîné une faible capacité de congélation.

D'autres études ont utilisé des amides comme cryoprotecteurs pour les étalons, avec des améliorations plus significatives pour le sperme d'étalons dont le sperme ne pouvait pas être congelé efficacement avec Gly (Alvarenga et al., 2005). Certaines études ont révélé une amélioration significative de la fertilité de la semence d'étalon congelé avec du DMF par rapport à Gly (Medeiros, 2003; Moffet et al., 2003). En revanche, Mantovani et al. (2002) rapportent que l'utilisation d'EG réduisait le pourcentage de motilité massale et progressive des spermatozoïdes après décongélation par rapport à l'utilisation de 3% de Gly. Les spermatozoïdes congelés

Introduction

en utilisant Gly comme cryoprotecteur avaient des pourcentages plus élevés de spermatozoïdes mobiles et progressivement mobiles que les spermatozoïdes congelés avec du DMF (Moore et al., 2006). L'utilisation de MF et de DMF protège les spermatozoïdes des étalons contre les dommages causés par la cryogénie aussi efficacement que Gly (Squires et al., 2004). D'autres expériences n'ont montré aucune différence dans les taux de fertilité des juments inséminées avec du sperme congelé avec des dilueurs contenant du DMF ou du Gly. Par exemple, les inséminations quotidiennes des juments ont abouti à des taux de gestation de 46% et 50% pour le sperme traité avec des dilueurs de congélation contenant 2% de Gly ou 2% de DMF, respectivement (Vidament et al., 2002).

L'objectif de la présente étude est d'explorer les effets de deux milieux de congélation contenant le glycérol et le plasma du jaune d'œuf comme cryoprotecteurs, par l'évaluation des paramètres spermatiques de motilité massale, individuelle et vitalité du sperme d'étalon arabe barbe congelé-décongelé.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :
Anatomie et physiologie de
l'appareil reproducteur du
cheval

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

L'appareil génital du mâle est formé par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et du dépôt de celui-ci dans les voies génitales femelles. Il se compose de trois grandes parties : les testicules, les voies spermatiques et de l'urètre.

Une des caractéristiques de l'organe qu'est le testicule est qu'il 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)

I-ANATOMIE

L'appareil reproducteur mâle a pour rôle la production de sperme et son dépôt dans les voies génitales femelles où se réalise la fécondation, il peut se décomposer en trois grandes parties qui possèdent des fonctions différentes : (Baronne R. 2001 ; Florence Batellier ; 2005)

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

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

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

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

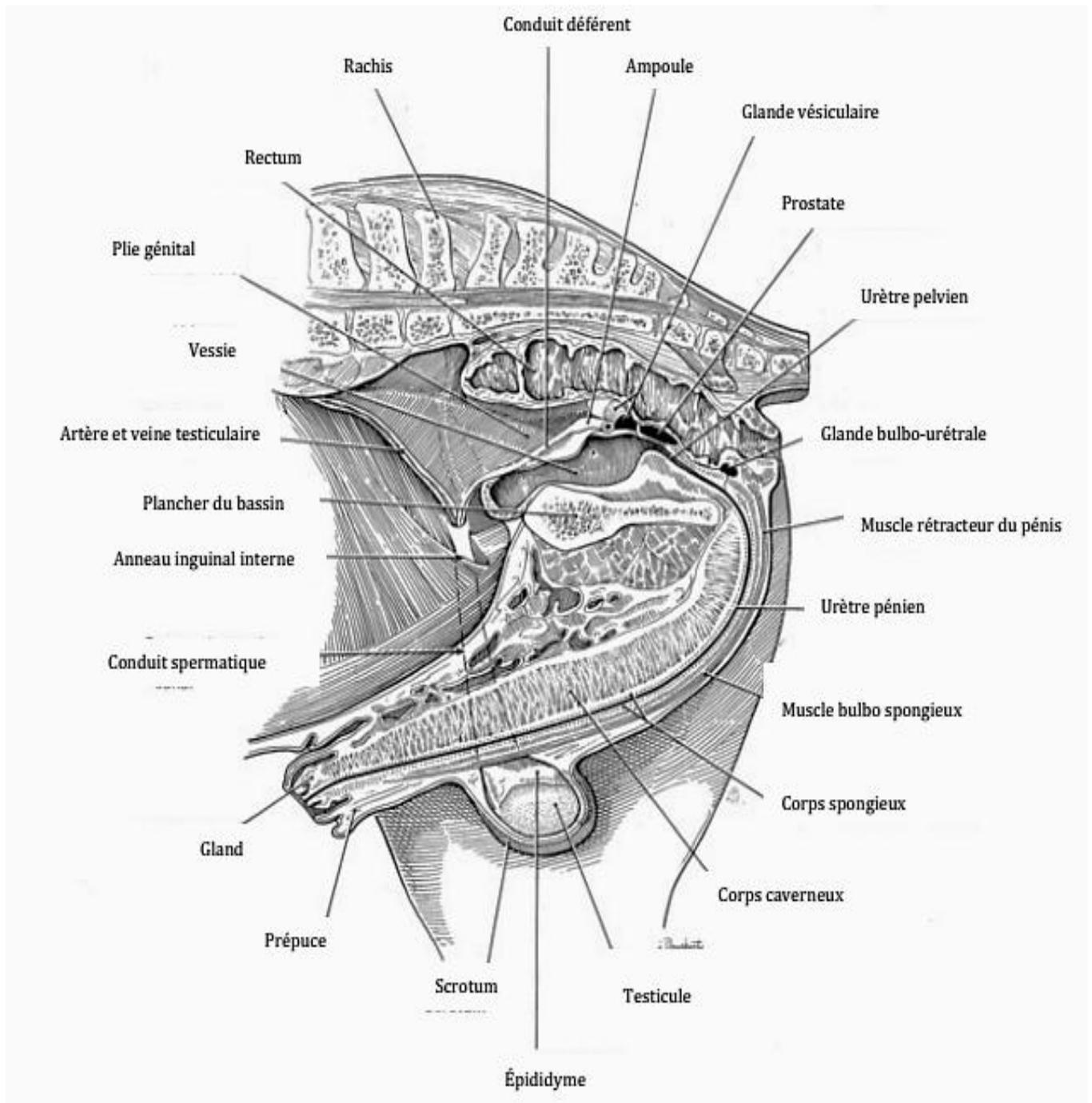


Figure 01 : Dessin du tractus reproductif de l'étalon vue en coupe sagittale (MC. Kinnon A.1993).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

1-La partie glandulaire (Testicules)

Topographie des testicules

Les testicules, glandes génitales du mâle, sont logés dans les bourses en région inguinale et ont une double fonction : une fonction gamétogène (production des spermatozoïdes) et une fonction endocrine (production des hormones sexuelles).

Les testicules sont des organes pairs dont la taille et le poids sont proportionnels au poids de l'animal, ils se différencient près des reins, mais ils subissent plus ou moins tôt par rapport à la naissance, une migration qui les amène à la périphérie du corps à fin que la température soit inférieure à celle du corps pour la production de spermatozoïdes féconds (Florence Batellier ; 2005).

Les testicules sont des organes parenchymateux constitués de tissu conjonctif lâche, formant l'albuginée, et de nombreux lobules divisés eux même en tubes séminifères contournés et en tissu interstitiel. Ils sont alors de forme ovoïde, suspendus en position horizontale par le scrotum en regard de la région pelvienne de l'étalon.

Ils sont responsables de la production des spermatozoïdes et de la sécrétion de testostérone (Tibary et al, 2005).

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 épидidymaire que le bord libre. Il est parcouru par une forte veine longitudinale (Barone 2001).

Les ongulés (comme les équidés) sont dits exorchides permanents, car la migration des testicules est irréversible et ils se situent près de l'aine chez le cheval (Florence Batellier ; 2005).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

Principe de la descente testiculaire

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).

Les enveloppes des testicules ou bourses testiculaires

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).

Les enveloppes superficielles

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).

Fascia spermatique externe

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).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

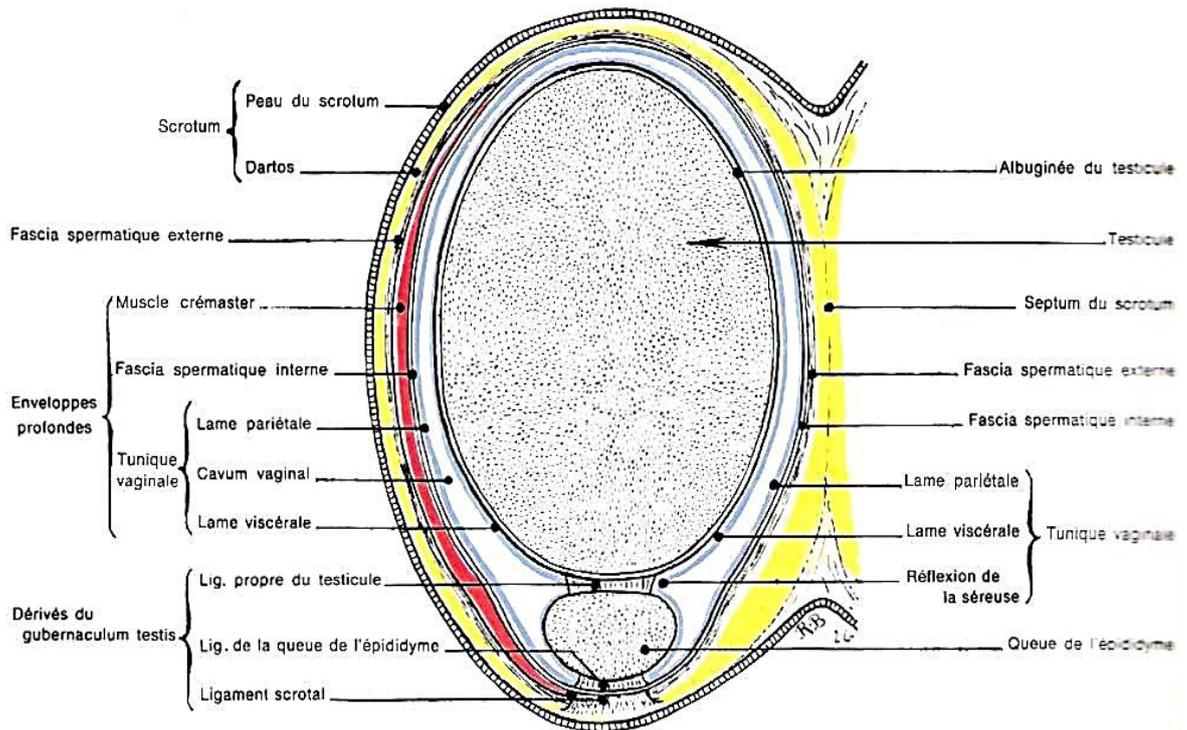


Figure 02 : Le testicule et ses enveloppes, conformation externe (Barone, 2001).

Muscle 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 (BARONE, 1956).

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).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

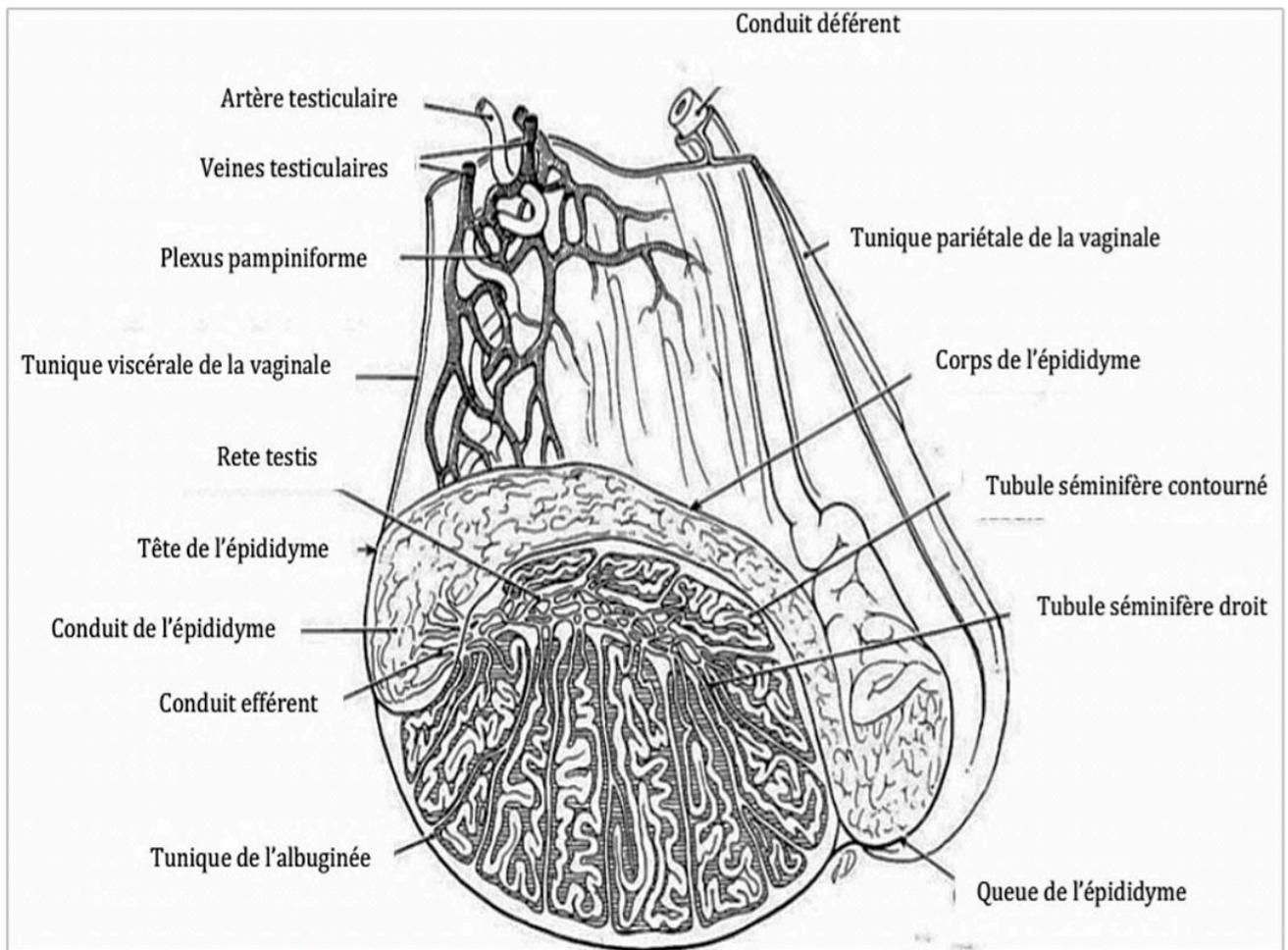


Figure 03 : Conformation intérieure et structure du testicule de l'étalon (Picket B.W. 1993).

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).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

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).

Les testicules, glandes génitales du mâle, sont logés dans les bourses en région inguinale et ont une double fonction : une fonction gamétogène (production des spermatozoïdes) et une fonction endocrine (production des hormones sexuelles).

Caractères généraux, conformation et moyens de fixité

Les testicules ne prennent leurs caractères définitifs qu'à l'époque de la puberté, qui a lieu entre 19 et 21 mois chez l'étalon (AMANN, 2011).

A la naissance, ces glandes sont de petite taille et ne s'accroissent que fort peu durant la première année de vie. Au moment où s'établit la sécrétion spermatique, elles subissent un développement rapide pour atteindre leur dimension et leurs caractères définitifs.

Chez un étalon de taille moyenne, chaque testicule mesure environ 9-11 centimètres de long, 6-7 cm de haut et 5-6 cm d'un côté à l'autre ; mais les variations raciales et individuelles sont importantes (BARONE, 1956).

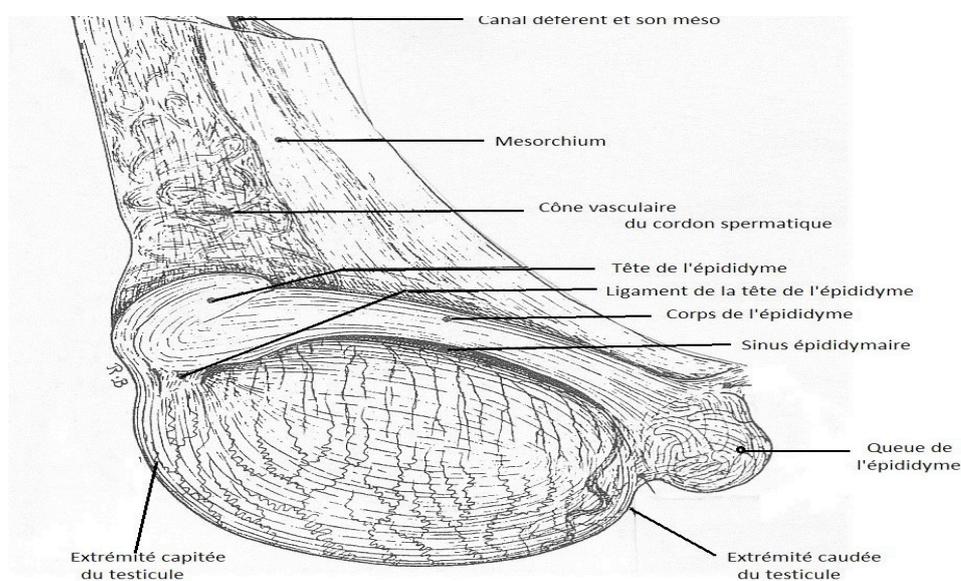


Figure 04 : Testicule et épидидyme gauches du cheval. Conformation et moyen de fixité (BARONE, 1956).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

Structure du testicule

La structure histologique de la glande testiculaire comprend :

- Un revêtement séreux,
- Une charpente fibreuse (tunique albuginée)
- Un parenchyme.

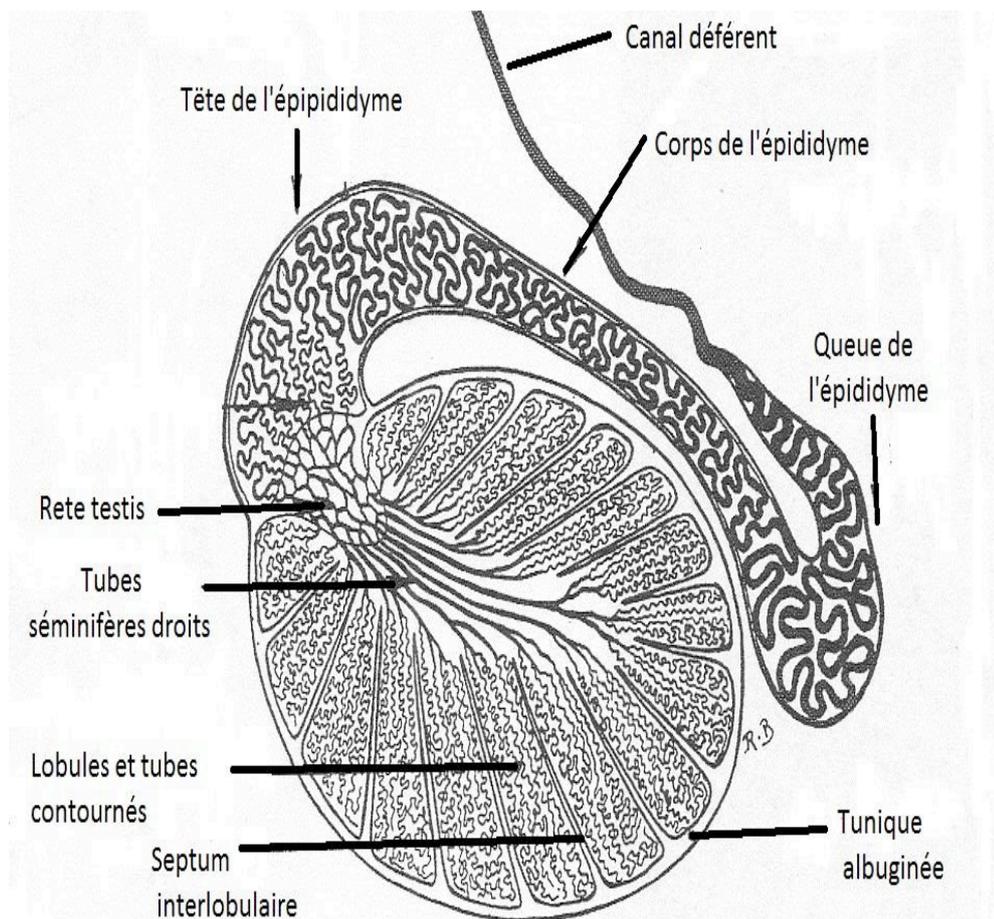


Figure 05 : Schéma de la conformation interne du testicule et de l'épididyme (BARONE 1956).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

2-La partie tubaire (excrétrice)

Les voies d'excrétion du sperme ou voies spermatiques s'étendent des testicules jusqu'au sinus uro-génital.

Les premiers segments de ces voies sont constitués par les tubes droits, le *rete testis* et les canalicules efférents, Puis ces voies spermatiques se poursuivent par un long conduit qui présente deux segments nettement différenciés : la partie proximale, l'épididyme, et la partie distale, le canal déférent.

Ce dernier va jusqu'à l'urètre, qui représente le sinus uro-génital. Dans sa partie terminale, le canal déférent présente des dépendances glandulaires, dont la principale est la glande vésiculaire ou glande séminale. BARONE (2001).

L'épididyme

L'épididyme est un organe allongé, qui suit le bord supérieur du testicule. Il reçoit de l'extrémité capitée de la glande testiculaire les canalicules efférents et se continue caudalement par le canal déférent. Il joue un rôle important dans le stockage des spermatozoïdes, qui subissent une maturation lors de sa traversée. La longueur de l'organe en place est de 12 à 13 centimètres mais en réalité, l'épididyme est formé par un tube très flexueux logé à l'intérieur d'une gaine contentive : une fois totalement déplié, ce tube atteint chez le cheval une longueur moyenne de 70 à 80 mètres (BARONE, 1956).

Le canal déférent

Le canal déférent fait suite au conduit épидидymaire et s'étend jusqu'à la portion pelvienne de l'urètre, au niveau de laquelle il s'abouche par le conduit éjaculateur, en même temps que la vésicule séminale correspondante. (BARONE, 2001 ; ROGER, 2009).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

L'organisation structurale du canal déférent permet l'acheminement du liquide élaboré par la glande génitale tout le long du conduit jusqu'au canal urogénital (BARONE, 1956).

Les glandes vésiculaires

Les glandes vésiculaires sont deux formations glandulaires allongées situées dorsalement à la vessie et annexées à la terminaison du canal déférent. Chacune de ces glandes débouche dans l'urètre par l'orifice éjaculateur, qu'elle constitue avec la terminaison du canal déférent correspondant.

Ces glandes produisent notamment du fructose, source énergétique pour les spermatozoïdes (BARONE, 2001).

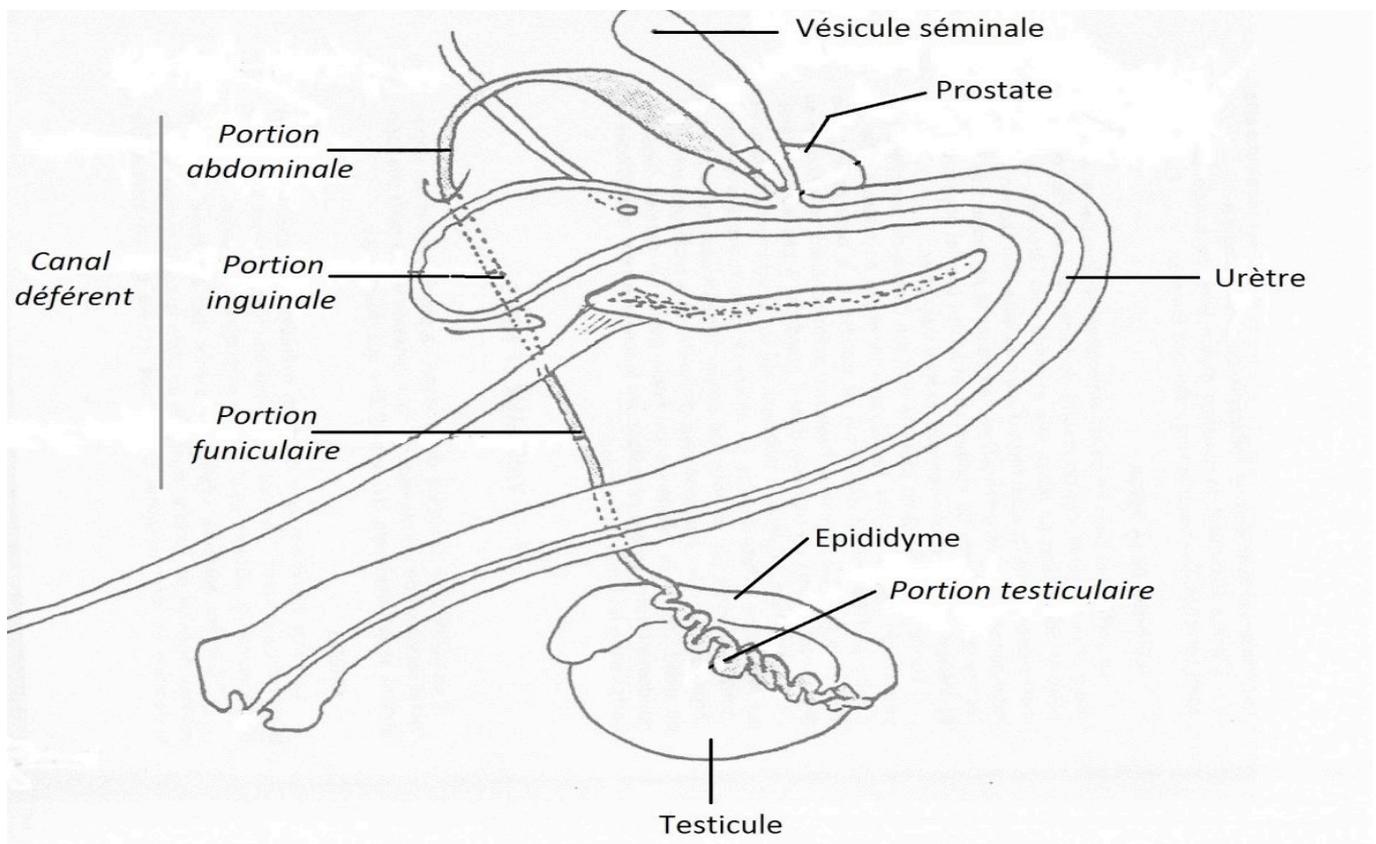


Figure 06 : Schéma de l'aspect médial du canal déférent droit de l'étalon. (BARONE, 2001).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

3-La partie uro-génitale

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).

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).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

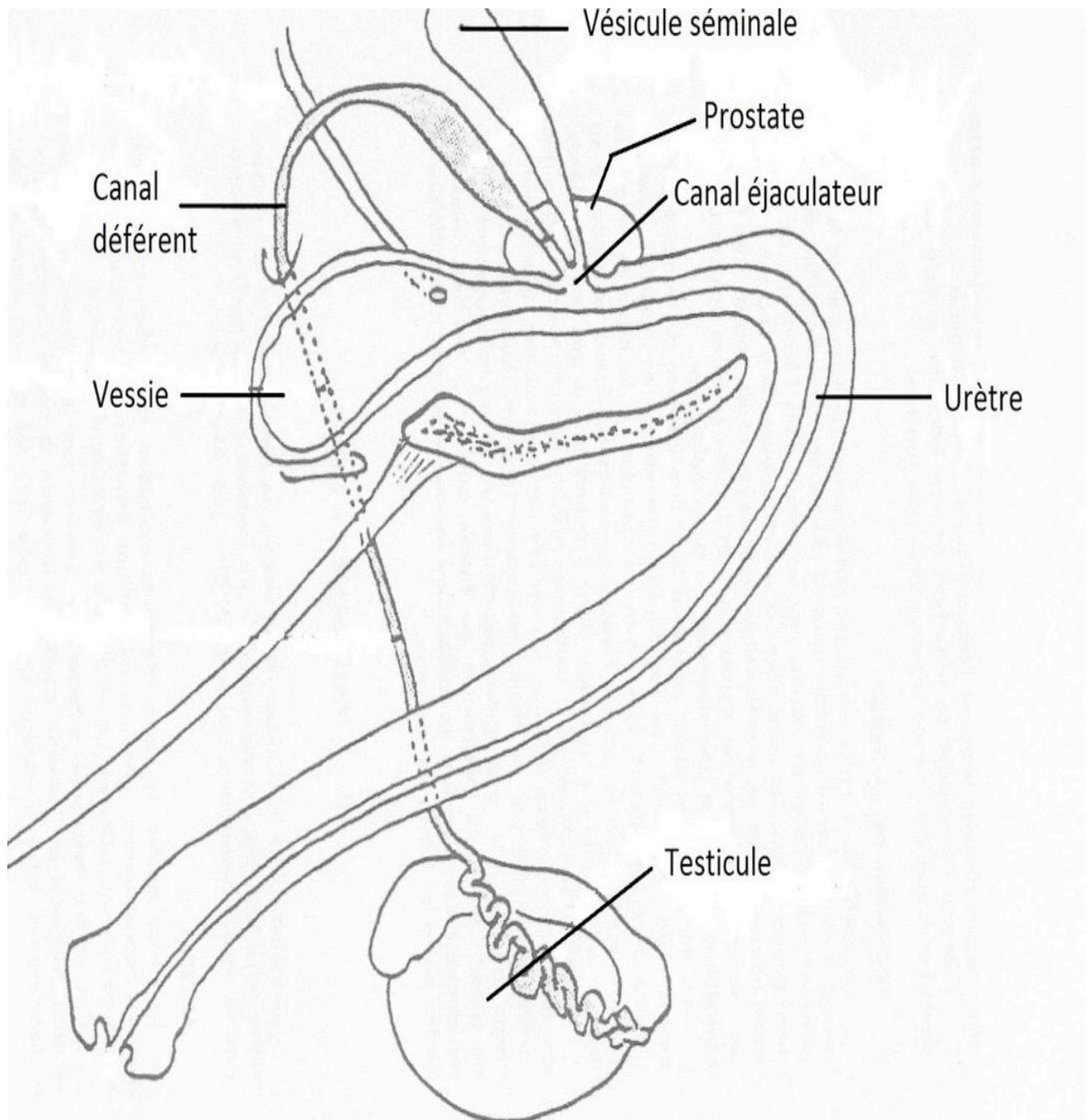


Figure 07 : Schéma de l'aspect médial de l'urètre droit de l'étalon. (BARONE, 2001).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

La prostate

La prostate est une glande impaire volumineuse située à cheval sur le col vésical. 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. De teinte grisâtre et d'aspect rugueux, la prostate est aplatie dorso-ventralement, étirée transversalement et élargie à ses extrémités. On peut lui distinguer une partie moyenne et deux lobes latéraux (BARONE, 2001).

GLANDES BULBO-URETRALES ou DE COWPER

Les glandes bulbo urétrales sont au nombre de deux, elles se situent crânialement et dorsalement à l'arcade ischiatique, de consistance ferme et de texture plus dense que la prostate. Leur taille est d'environ 4 à 5 cm de diamètre. Elles sont constituées de lobules responsables de la sécrétion dans l'urètre pelvien d'une partie minoritaire du plasma séminal, nécessaire à la formation du bouchon muqueux ans les voies génitales femelle (Chirent Mylène ; 2015).

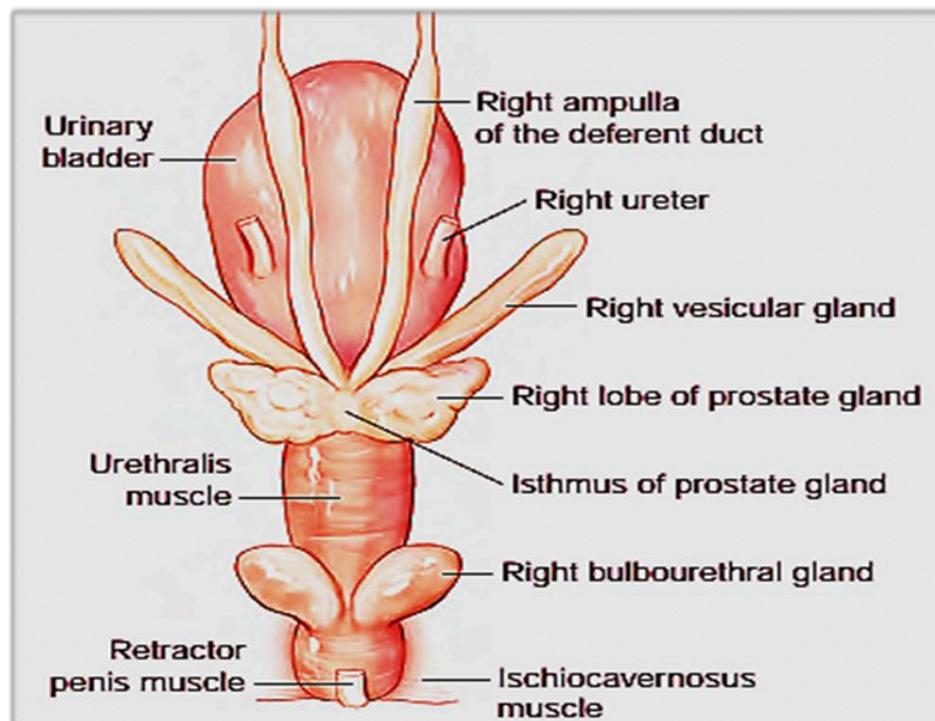


Figure 08 : Glandes génitales accessoires de l'étalon, vue dorsale (P.L. Senger, Ph. D., 2003).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

Formations érectiles annexées à l'urètre

Ces formations érectiles correspondent à des lacunes sanguines entourées par une enveloppe conjonctive. Lors d'un afflux sanguin au niveau de ces lacunes, l'augmentation de pression cavitaire déforme l'organe, le pénis, et le rigidifie (ROGER, 2009).

La portion pénienne de l'urètre est associée à quatre formations érectiles qui déterminent la conformation et le fonctionnement du pénis : les deux corps caverneux du pénis, le corps spongieux de l'urètre et le corps spongieux du gland ; (BARONE ;2001).

CORPS CAVERNEUX DU PENIS

Le corps caverneux est la formation érectile la plus développée ; elle forme avec son homologue la partie principale du pénis et supporte les autres constituants de l'organe. Il est formé à l'origine par deux parties latérales, qui restent distinctes chez de nombreux Mammifères, mais qui fusionnent précocement chez le cheval, chez lequel les traces de sa nature double ne sont perceptibles qu'au niveau de la racine du pénis (BARONE, 1956). Les corps caverneux sont donc généralement décrits ensemble, comme une formation unique, impaire et symétrique.

Le corps caverneux prend son origine sur le bord caudal de l'os ischium correspondant et son extrémité libre plonge dans le corps spongieux du gland, dont elle reste toujours parfaitement délimitée (BARONE, 2001).

L'érection est commandée par le système nerveux autonome mais son mécanisme repose essentiellement sur l'existence de ce réseau vasculaire.



Figure 09 : Structure de pénis et du prépuce de l'étalon (P.L. Senger, Ph. D., 2003).

CORPS SPONGIEUX DE L'URETRE

Ce tissu érectile peut être considéré comme une différenciation de la sous-muqueuse de l'urètre. Il existe sous une forme rudimentaire dans la portion pelvienne de l'urètre et prend toute son importance dans la portion.

Sa structure est tout à fait semblable à celle du corps caverneux (BARONE, 2001).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

Corps spongieux du gland

Cette formation érectile occupe l'extrémité libre du pénis, où elle entoure l'extrémité du corps caverneux. Elle est très développée chez les équidés et se prolonge à la face dorsale du corps caverneux sur une dizaine de centimètres au-dessus du gland, formant ainsi le processus dorsal du gland. Le tissu érectile du corps spongieux du gland est comparable à celui du corps spongieux de l'urètre ; ses cavernes sont seulement plus vastes et dilatables, sauf à la jonction des deux formations (BARONE, 2001).

Les muscles du pénis

Sont au nombre de trois. Le muscle bulbo-spongieux est un muscle impair, strié et appartient au corps spongieux de l'urètre. Le muscle ischio-caverneux est aussi un muscle strié mais pair et il couvre la racine du pénis correspondante. Il joue un rôle important lors de l'érection en comprimant les vaisseaux et la racine du pénis. Enfin, le muscle rétracteur du pénis est un muscle pair, formé de fibres musculaires lisses et de fibres élastiques. Ce muscle permet de ramener le pénis dans sa position de repos, après l'érection (BARONE, 2001).

La partie libre de la verge est entièrement revêtue par un **tégument** mince et généralement pigmenté.

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

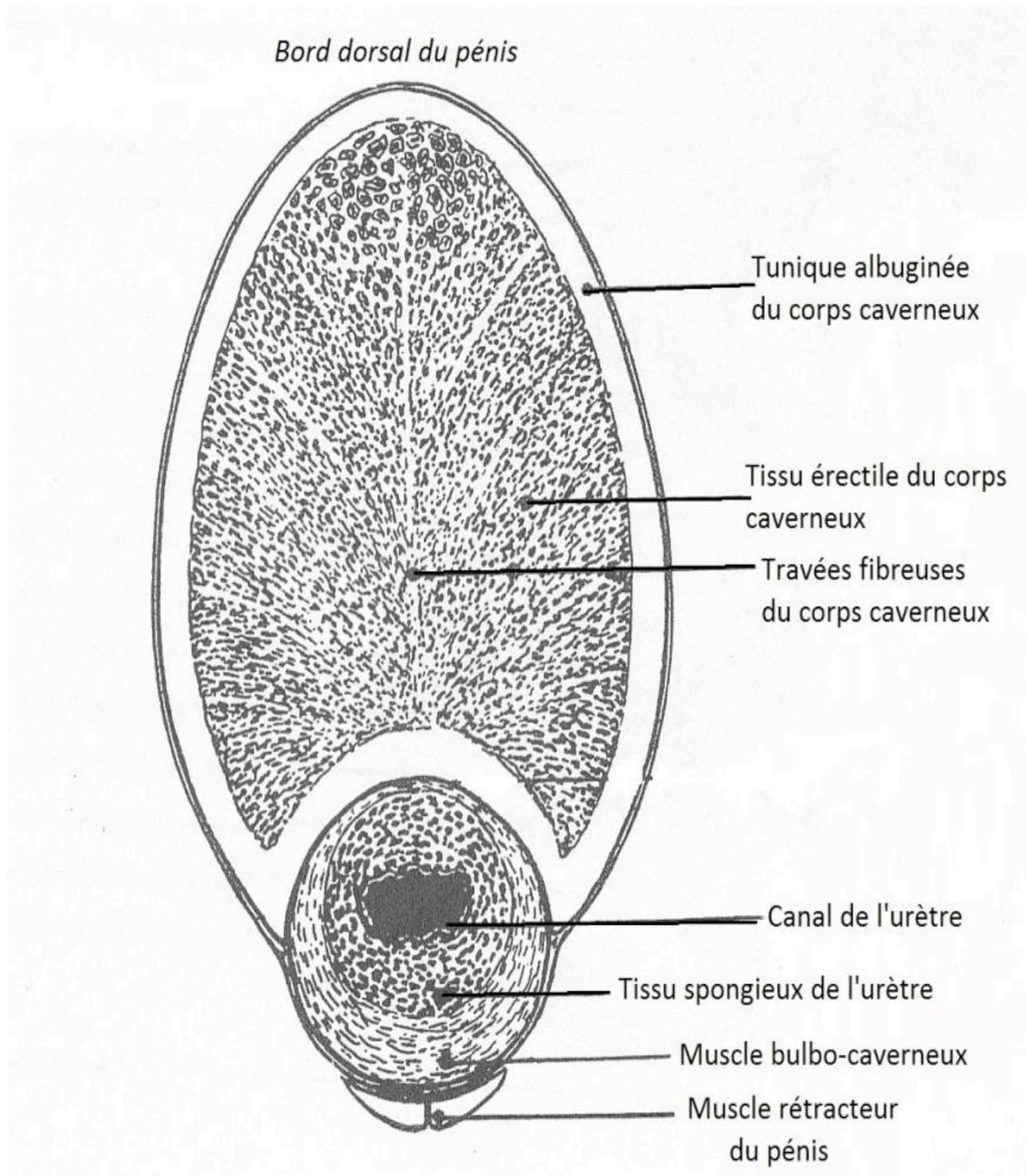


Figure 10 : Coupe transversale du pénis du Cheval, au niveau de la partie moyenne du pénis (BARONE, 2001).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

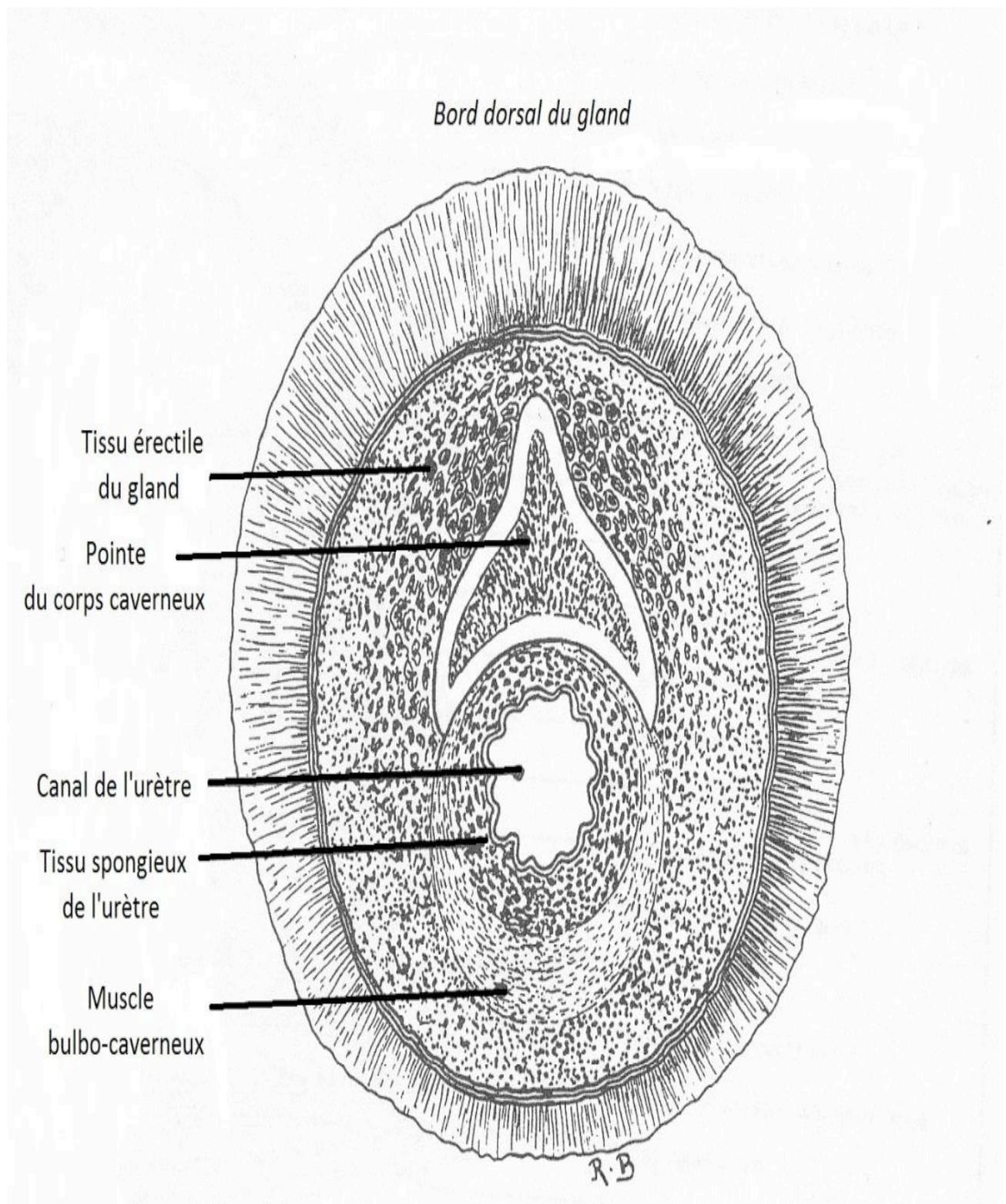


Figure 11 : Coupe transversale du pénis du Cheval, en arrière de la couronne du gland (le gland isolé est vu par derrière) (BARONE, 2001).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

Vascularisation et innervation

La constitution complexe du pénis, sa physiologie et ses importantes variations de volume, liées au mécanisme de l'érection, imposent aux vaisseaux et aux nerfs une topographie complexe ; BARONE (2001). Le pénis est vascularisé par plusieurs artères dont l'artère profonde du pénis et l'artère dorsale du pénis ; qui longe la face dorsale de l'organe. Ces artères font suite à l'artère honteuse interne après sa sortie de la cavité pelvienne et assurent l'irrigation des corps caverneux. Les terminaisons de l'artère honteuse externe, dont l'artère crâniale du pénis, assurent quant à elle, l'irrigation du gland.

Les veines du pénis sont volumineuses ; elles constituent un important plexus le long du bord dorsal de l'organe. Ce plexus dorsal s'étend jusqu'aux racines du pénis sous la forme de deux gros troncs flexueux, largement anastomosés entre eux. Ce plexus est drainé par deux systèmes, l'un antérieur, qui se jette dans la veine fémorale, et l'autre postérieur, qui aboutit à la veine honteuse BARONE (2001).

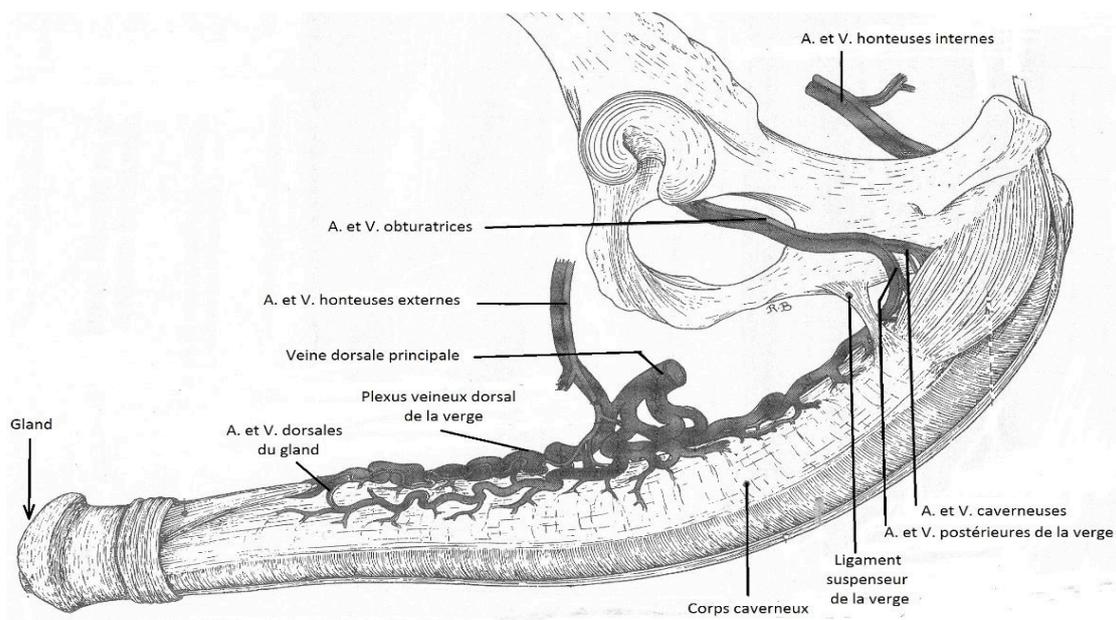


Figure 12 : Vascularisation de la verge chez l'étalon. A. : artère, V. : veine (BARONE, 2001).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

Le pénis est innervé par le nerf honteux et par le plexus pelvien ou hypogastrique. Sur la face dorsale du pénis, le nerf honteux se continue par le nerf dorsal du pénis. Ce nerf comporte, entre autres, des fibres sympathiques qui vont au corps caverneux et au corps spongieux du pénis de même qu'au tissu érectile du gland (BARONE, 1956).

Le fourreau ou prépuce

Le fourreau est constitué de deux lames tégumentaires, une externe et une interne, raccordées l'une à l'autre au niveau de l'anneau préputial. Entre ces deux lames, se trouve un plan conjonctivo-élastique très lâche. La lame externe se compose de la peau, peu différente de celle des régions voisines, notamment le scrotum. Sur sa face ventrale, on peut observer le raphé du fourreau.

La lame interne correspond à une peau modifiée, plus mince et pourvue de poils très fins et courts chez les équidés. Cette lame interne présente des glandes sébacées particulières, les glandes préputiales, qui sécrètent un produit appelé le smegma préputial (BARONE, 1956).

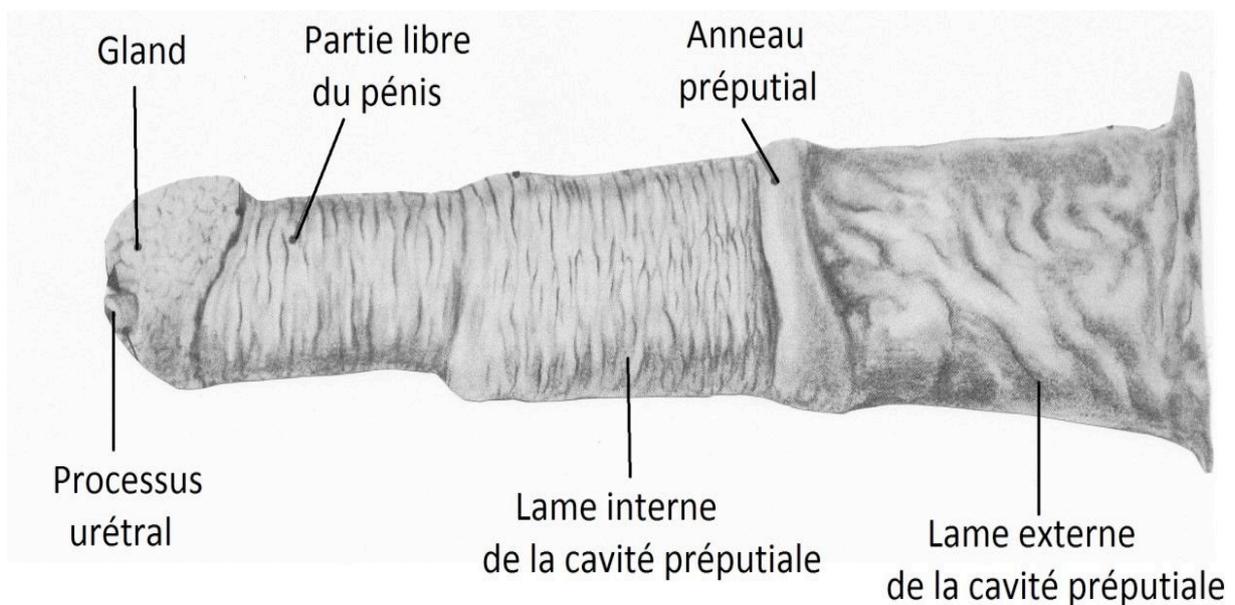


Figure 13 : Partie libre du pénis et prépuce du Cheval (CONSTANTINESCU, 2010).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

II-Physiologie de la reproduction chez l'étalon

Les rappels de physiologie de la reproduction chez l'étalon pour comprendre le rôle des différents éléments composant l'appareil génital et les mécanismes qui les relie.

Nous allons aborder la spermatogénèse et ses spécificités chez l'espèce équine, la régulation endocrinienne de la reproduction et enfin la puberté chez l'étalon.

La régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez l'étalon

La fonction des organes de l'appareil génital est contrôlée par le système neuroendocrinien. Ce système comprend notamment l'hypothalamus et l'hypophyse.

Les testicules ne sont pas des glandes neuroendocrines mais contiennent des cellules neuroendocrines dispersées. Ces cellules sécrètent des hormones en réponse à des signaux chimiques : les cellules de Leydig par exemple assurent la production puis la libération de testostérone en réponse à la sécrétion de LH (*luteinizing hormone*) par l'adénohypophyse.

L'axe hypothalamo-hypophysaire

Sous l'effet de certains stimuli neuronaux, l'hypothalamus synthétise et sécrète des hormones dites *releasing hormones*, c'est-à-dire qui vont entraîner à leur tour la sécrétion d'hormones par leurs organes/cellules cibles. La GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*) est l'hormone sécrétée par l'hypothalamus qui est impliquée dans le contrôle de l'activité de reproduction. Elle va agir sur l'adénohypophyse via des récepteurs spécifiques (AMANN, 2011).

L'hypophyse ou glande pituitaire

Localisée à la base du crâne, est en relation avec l'hypothalamus via des vaisseaux portes. Cette glande est formée de deux parties : le lobe antérieur correspond à l'adénohypophyse et le lobe postérieur correspond à la neurohypophyse. Sous l'action de la GnRH, l'adénohypophyse produit deux hormones impliquées

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

dans la fonction de reproduction : la Luteinizing Hormone (LH) et la Follicule-Stimulating Hormone (FSH). Ces hormones sont dites gonadotropes car elles ont

une action directe sur les ovaires et les testicules. Chez le mâle par exemple, elles vont stimuler la production d'hormones stéroïdiennes et de spermatozoïdes au niveau des testicules (AMANN, 2011).

La neurohypophyse synthétise différents neuropeptides dont l'ocytocine. L'ocytocine agit notamment sur les muscles lisses en stimulant leurs contractions. Chez le mâle, l'ocytocine stimule la contractilité des voies vectrices des spermatozoïdes : au moment de l'éjaculation, la libération d'ocytocine par la neurohypophyse stimule la contraction des muscles lisses au niveau de la queue de l'épididyme, permettant ainsi leur progression dans les voies génitales mâles (FILIPPI et al., 2002).

Les hormones testiculaires

Les principales hormones testiculaires sont les hormones stéroïdiennes sexuelles. Elles sont synthétisées et sécrétées chez l'étalon par les cellules de Leydig, localisées dans le tissu interstitiel. Elles se divisent en trois familles : les androgènes, les oestrogènes et les progestagènes. Des hormones glycoprotéiques sont également synthétisées au sein du testicule, par les cellules de Sertoli, situées au niveau de l'épithélium séminifère. Il s'agit notamment de l'inhibine et l'activine.

Les androgènes (testostérone, androstènedione, androstènediol, dihydrotestostérone, ...) ont de multiples rôles, aussi bien au niveau du parenchyme testiculaire qu'au niveau d'organes périphériques (AMANN, 1993).

Le testicule sécrète également des oestrogènes : l'oestrone, l'oestradiol et l'estriol. L'étalon produit une quantité d'oestrogènes plus importante par rapport aux autres espèces de mammifères. Les oestrogènes agissent par rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (ROSER, 2011).

L'inhibine et l'activine appartiennent toutes les deux à la superfamille des *Transforming Growth Factors- beta*. Ces deux protéines ont à la fois des fonctions endocrines, paracrines et autocrines (ROSER, 2011).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

L'inhibine est une hormone glycoprotéique sécrétée par les cellules de Sertoli, au niveau des testicules, chez le mâle. Elle agit sur l'adénohypophyse et inhibe la synthèse et la sécrétion de la FSH par un mécanisme de rétrocontrôle négatif (ROSER, 2011).

L'activine est également une hormone glycoprotéique sécrétée par les cellules de Sertoli. Le rôle de l'activine n'a pas encore été totalement élucidé chez l'étalon. Ces différentes hormones (androgènes, oestrogènes, inhibine et activine) interviennent dans le contrôle hormonal de la fonction de reproduction, de part leurs actions sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

La régulation de la fonction de reproduction

Des stimuli environnementaux tels que la photopériode régulent la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus ; le taux plasmatique de GnRH contrôle la synthèse et la sécrétion de LH et FSH par l'adénohypophyse et les hormones gonadotropes (LH et FSH) régulent la production des androgènes, estrogènes, protéines et autres facteurs locaux sécrétés par les testicules.

Finalement, les androgènes, oestrogènes et hormones glycoprotéiques (inhibine, activine) testiculaires exercent des rétrocontrôles négatifs sur l'hypothalamus et l'hypophyse (ROSER, 2011).

La figure 13 représente de manière schématique et synthétique les contrôles hormonaux impliqués dans la fonction de reproduction chez l'étalon.

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

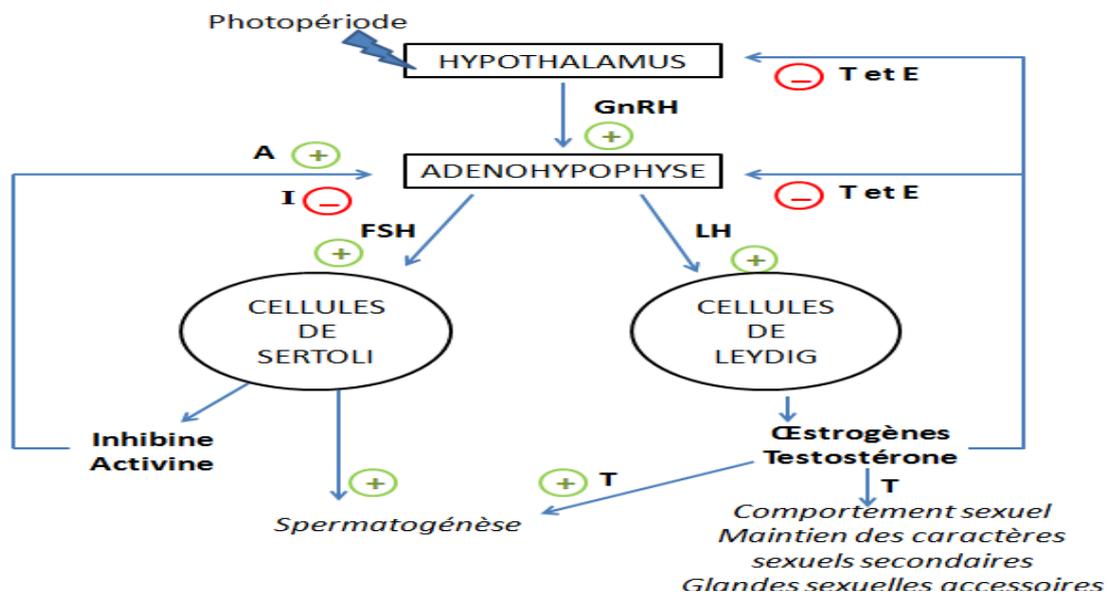


Figure 14 : Schéma de la régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez l'étalon. A : activine ; E : oestrogènes ; I : inhibine ; T : testostérone (d'après AMANN, 2011).

La puberté chez l'étalon

Chez l'étalon, la puberté se définit comme le moment à partir duquel l'individu est capable de prendre part avec succès dans l'acte de reproduction. Elle a lieu entre 19 et 21 mois dans l'espèce équine (AMANN, 2011).

Pour AMANN (2011), la puberté se définit comme le moment où le premier éjaculat de l'étalon contient 50 millions de spermatozoïdes dont plus de 10% est motile.

Dans une étude portant sur 15 jeunes étalons, la puberté s'est produite à environ 83 semaines mais 11 étalons sur 15 ont atteint la puberté à l'âge de 90 semaines.

A la naissance, les testicules de l'étalon contiennent des cellules indifférenciées, des gonocytes (cellules précurseurs des spermatogonies et des cellules de Sertoli) ainsi que très peu de cellules de Leydig fonctionnelles. La période qui suit, dite

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

période infantile, est caractérisée par une absence de sécrétion d'hormones gonadotropes par l'adénohypophyse, par une faible production d'hormones stéroïdiennes par les cellules de Leydig et par une diminution du nombre de

gonocytes. Il n'y a pas non plus de spermatogénèse. Cette période dure plus de 6 mois chez l'étalon ; puis se mettent en place des changements qui préparent l'individu pour la puberté : on parle de période prépubère. Le moment où ces changements interviennent est variable selon les individus et semblent être influencés par la race et la saison de naissance de l'individu (AMANN, 2011).

La période prépubère est caractérisée par des modifications au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Vers 9 mois d'âge, les concentrations plasmatiques en FSH et en LH augmentent. Vers 12 mois, les testicules augmentent de taille et se développent rapidement.

Quelques mois plus tard, ils commencent à produire des spermatozoïdes. La production de testostérone par les cellules de Leydig augmente également pendant cette période et peut être facilement mise en évidence grâce à une prise de sang à partir de 19 mois d'âge (AMANN, 2011).

Ces changements culminent au moment de la puberté, quand l'étalon produit des spermatozoïdes fertiles.

Suite à la puberté, une période de maturité sexuelle permet à l'étalon d'acquérir sa capacité reproductrice maximale via une augmentation de la taille des testicules, une augmentation de la production journalière de spermatozoïdes et un développement des réserves spermatiques (AMANN, 2011).

Spermatogénèse

La spermatogénèse est un phénomène physiologique permettant de produire les spermatozoïdes à partir de cellules souches appelées spermatogonies. La spermatogénèse se déroule dans les tubes séminifères eux-mêmes situés dans le parenchyme testiculaires (Johnson et Al.1997).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

La spermatogénèse débute entre 18 et 24 mois d'âge selon les étalons et la saison et se poursuit tout au long de la vie de l'animal. Le temps nécessaire à la transformation du stade de spermatogonie au stade de spermatozoïde est d'environ 57 jours (Tibary et al. 2005).

La durée de la spermatogénèse est d'environ 57 jours chez l'étalon (AMANN, 2011).

Ainsi, lors de dommages testiculaires (causés par une augmentation de la température ou l'administration d'hormones stéroïdiennes par exemple), un délai de 2 mois minimum est requis pour retrouver une spermatogénèse normale.

La production de spermatozoïdes quotidienne augmente significativement lors de la saison de reproduction de Mars à Aout et Avoisine les 19 millions de spermatozoïdes par jour par gramme de parenchyme testiculaire contre 15 millions en dehors de la période de reproduction (Mckinnon et al. 1993).

La spermatogénèse se déroule au sein des tubules séminifères des testicules. Trois grandes étapes sont nécessaires pour passer d'une spermatogonie à un spermatozoïde : la spermatocytogénèse, la méiose et la spermiogénèse (AMANN, 1993).

La spermatocytogénèse dure 19,4 jours chez l'étalon. Elle est caractérisée par une phase de multiplication (par mitoses) et de différenciation des spermatogonies, ce qui aboutit à la formation des spermatocytes. La phase de multiplication cellulaire assure également le renouvellement des spermatogonies, nécessaire au maintien d'un nombre suffisant de cellules souches (LITTLE et HOLYOAK, 1992).

La deuxième étape, qui fait intervenir le phénomène de méiose, dure également 19,4 jours chez l'étalon. Dans un premier temps, cette étape se caractérise par l'échange de matériel génétique entre les chromosomes homologues des spermatocytes primaires. Ensuite, les deux divisions successives de la méiose produisent les spermatides haploïdes (AMANN, 1993).

La spermiogénèse dure 18,6 jours chez l'étalon. Elle se caractérise par l'acquisition de fonctions : à la fin de cette étape, les spermatides sont complètement

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

différenciées. Elles sont alors nommées spermatozoïdes quand elles quittent l'épithélium spermatogène (AMANN, 1993).

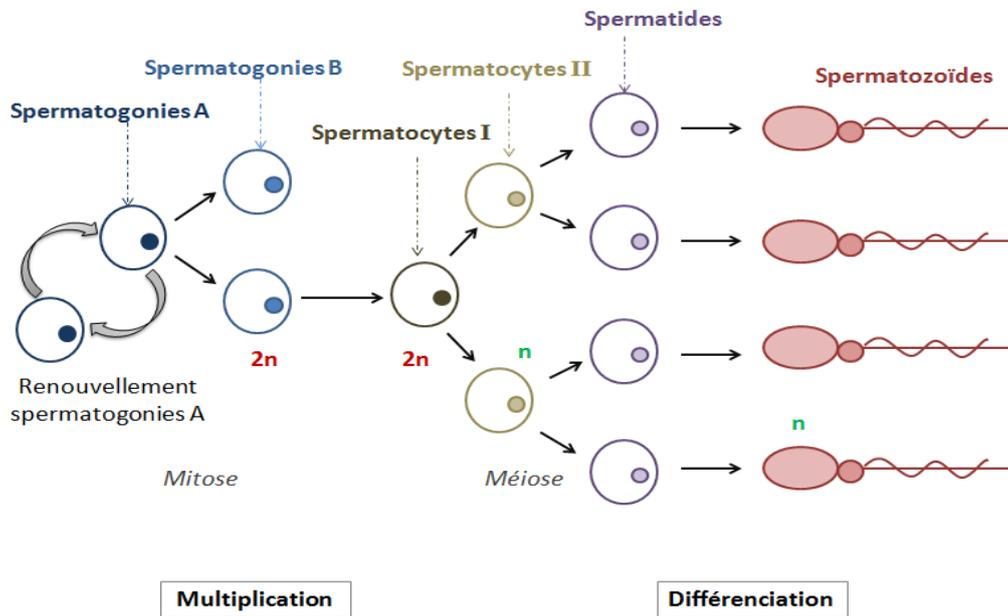


Figure 15 : Etapes de la spermatogénèse (d'après AMANN, 2011).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

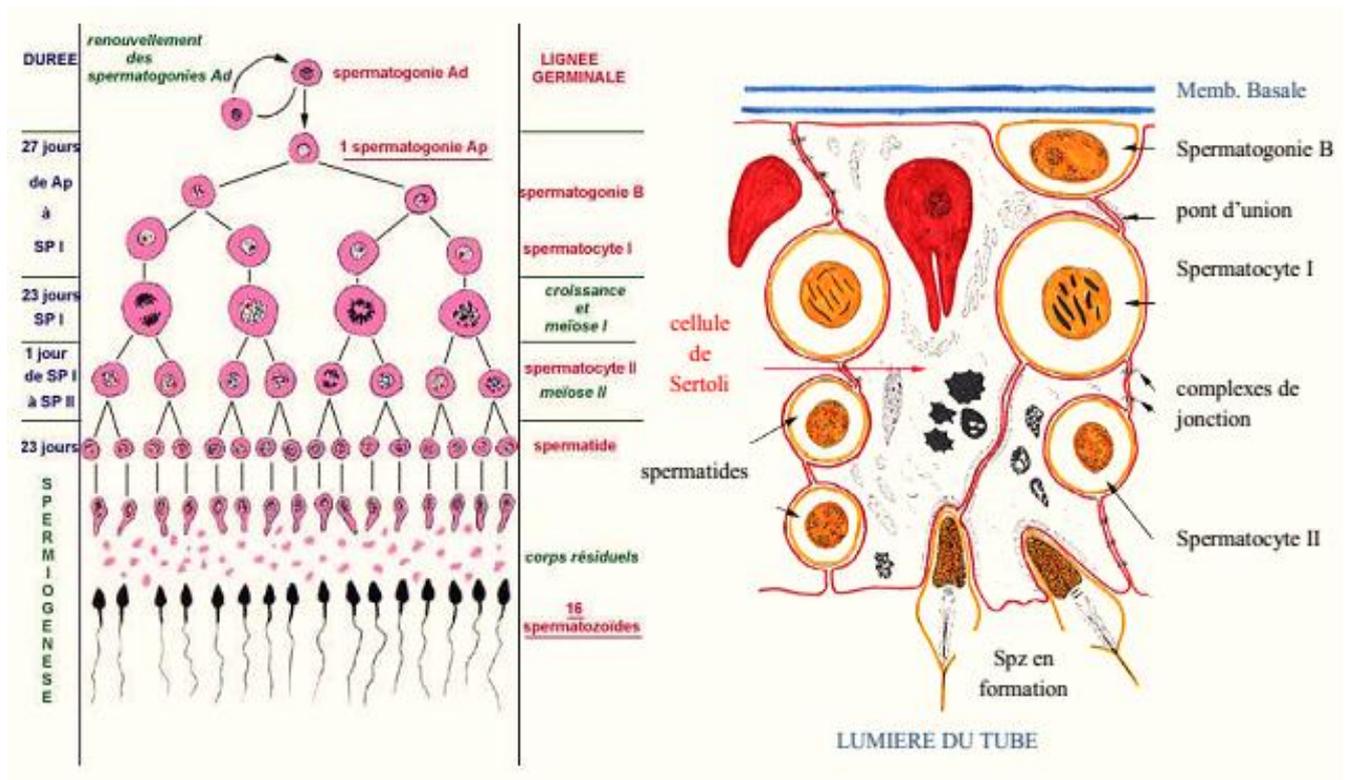


Figure 16 : La spermatogénèse (Marie Allimant, 2010).

Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli sont des cellules de soutien qui reposent sur la lame basale des tubules séminifères.. L'activité des cellules de Sertoli est sous la dépendance de la FSH (Follicle-Stimulating Hormone), hormone hypophysaire et la testostérone, sécrétée par les cellules de Leydig (AMANN, 2011).

Le nombre de cellules de Sertoli présentes dans un testicule conditionne le nombre de spermatozoïdes que peut produire ce testicule. Les cellules de Sertoli se multiplient seulement au cours de la vie foetale et de la première année de vie de l'individu et leur nombre est caractéristique de l'espèce (AMANN, 2011).

Chaque cellule de Sertoli est reliée aux cellules adjacentes via des jonctions intercellulaires particulières (des jonctions serrées notamment), ce qui délimitent deux compartiments au sein du tubule séminifère :

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

* le compartiment basal est le siège de la spermatocytogénèse ; il contient les spermatogonies et les spermatocytes primaires ;

* le compartiment adluminal contient les spermatocytes secondaires, les spermatides et les spermatozoïdes.

La barrière ainsi constituée, appelée barrière hémato-testiculaire, sépare les spermatides et les spermatozoïdes de la circulation générale sanguine et lymphatique, et donc des cellules de l'immunité. Ceci est essentiel, car les spermatides et spermatozoïdes, cellules haploïdes, présentent des caractéristiques antigéniques reconnues comme étrangères par le système immunitaire de l'étalon.

Lorsque cette barrière ne remplit pas son rôle, des anticorps antispermatisques peuvent se développer et être responsables d'une orchite auto-immune et donc d'une stérilité (LITTLE et HOLYOAK, 1992 ; AMANN, 1993).

Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont localisées dans le tissu interstitiel, en dehors des tubes séminifères, et à proximité des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Leur rôle principal est la synthèse et la sécrétion d'hormones stéroïdiennes.

Ces hormones vont participer à la régulation de l'activité de l'épithélium spermatogène, de l'axe hypothalamo-hypophysaire et des glandes sexuelles accessoires (AMANN, 1993).

Les hormones stéroïdiennes sécrétées par les cellules de Leydig sont : la testostérone, l'androstènedione, l'androstènediol, la dihydrotestostérone, la 3 alpha-androstanédiol et la 3 bêta-androstanédiol, l'oestrone, l'oestradiol et la progestérone ;(AMANN, 2011).

Les cellules de Leydig sécrètent de manière continue un taux basal d'hormones stéroïdiennes. Mais de manière périodique, la sécrétion de testostérone peut être stimulée : la concentration sanguine de testostérone est alors 2 à 4 fois plus élevée par rapport à la concentration basale. Notamment, la LH (luteinizing hormone), sécrétée par l'adénohypophyse, stimule la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig (AMANN, 2011).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

La figure ci-après illustre la relation spatiale entre les différents éléments constituant les tubes séminifères (cellules de la lignée germinale, cellules de Sertoli, cellules de Leydig, ...).

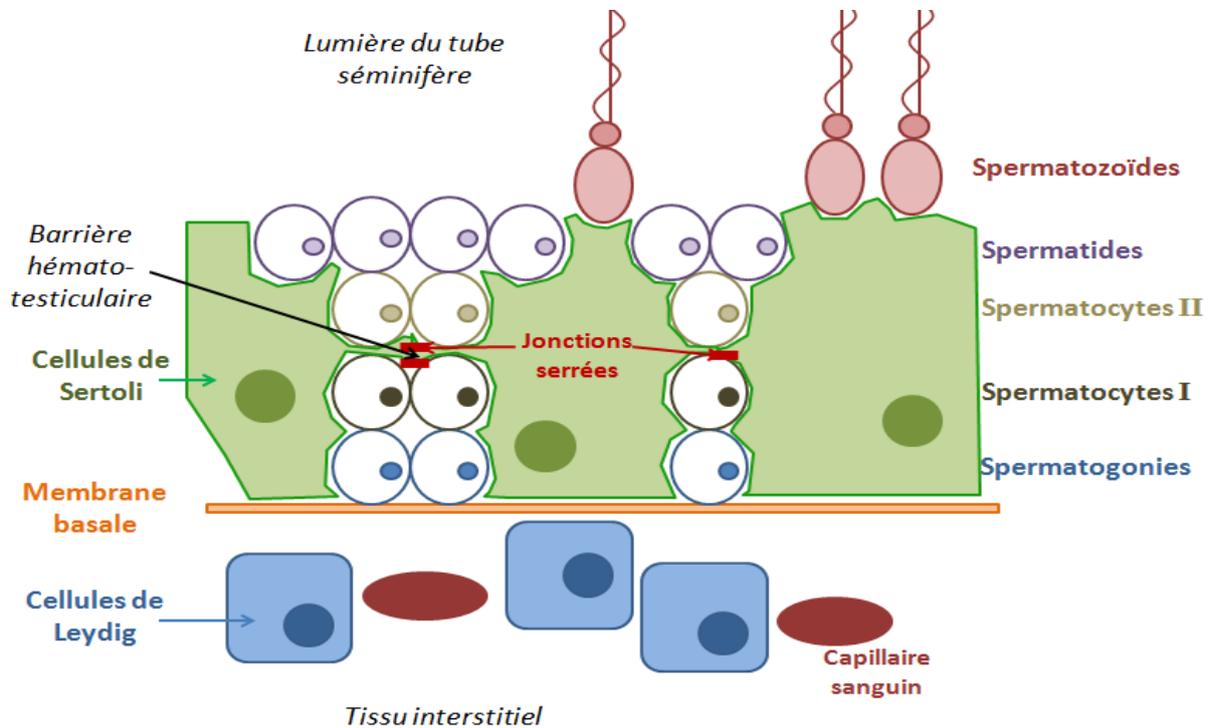


Figure 17 : Schéma illustrant l'organisation cellulaire des tubes séminifères (d'après AMANN, 2011).

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 μm de long sur 2,7 μm de large (Amann et Graham, 2011). Morphologiquement, le spermatozoïde des mammifères est divisé en deux parties : la tête, comprend l'acrosome, le chapeau nucléaire et le noyau cellulaire et la queue ou flagelle, comprend la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale.

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

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 (Senger, 2005 ; Lopez et al., 2007 ; Boerke et al., 2008 ; Gadella, 2008b). De nature lipidique, la membrane peut être modifiée par le milieu où se trouve le spermatozoïde avec lequel des échanges sont possibles, comme par exemple avec le cholestérol (Moore et al., 2005a ; Oliveira et al., 2010). Chez le cheval, le bovin et l'homme, la membrane est sensible aux dommages causés par la congélation (Barthelemy et al., 1990 ; Blottner et al., 2001 ; Bollwein et al., 2008). Les FAO semblent induire des lésions de la membrane lipidique lors du processus de congélation chez l'homme (Wang et al., 1997c), le bovin (Köss et al., 2007) et le cheval (Neild et al., 2005 ; Ortega Ferrusola et al., 2009a), même si des modèles de production *in vitro* de FAO n'ont pas augmenté la peroxydation des membranes du spermatozoïde équin (Baumber et al., 2000).

La tête

Le cytoplasme est très peu présent et l'essentiel de l'espace est occupé par le noyau et l'acrosome. Le noyau présente exclusivement de l'hétérochromatine, qui est particulièrement condensée grâce à des protéines particulières : les protamines. Il s'agit de protéines riches en arginine et cystéine capables d'établir entre elles des ponts disulfures. Sous cette forme la chromatine est également protégée contre les altérations possibles lors du stockage ou lors du transfert dans les voies génitales femelles. L'acrosome est une poche limitée par une membrane. A l'avant, la membrane est accolée contre la membrane plasmique et à l'arrière, la membrane épouse la forme du noyau. Son contenu est riche en enzymes protéolytiques (Knobil, E ; 1999).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

Le flagelle

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

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

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

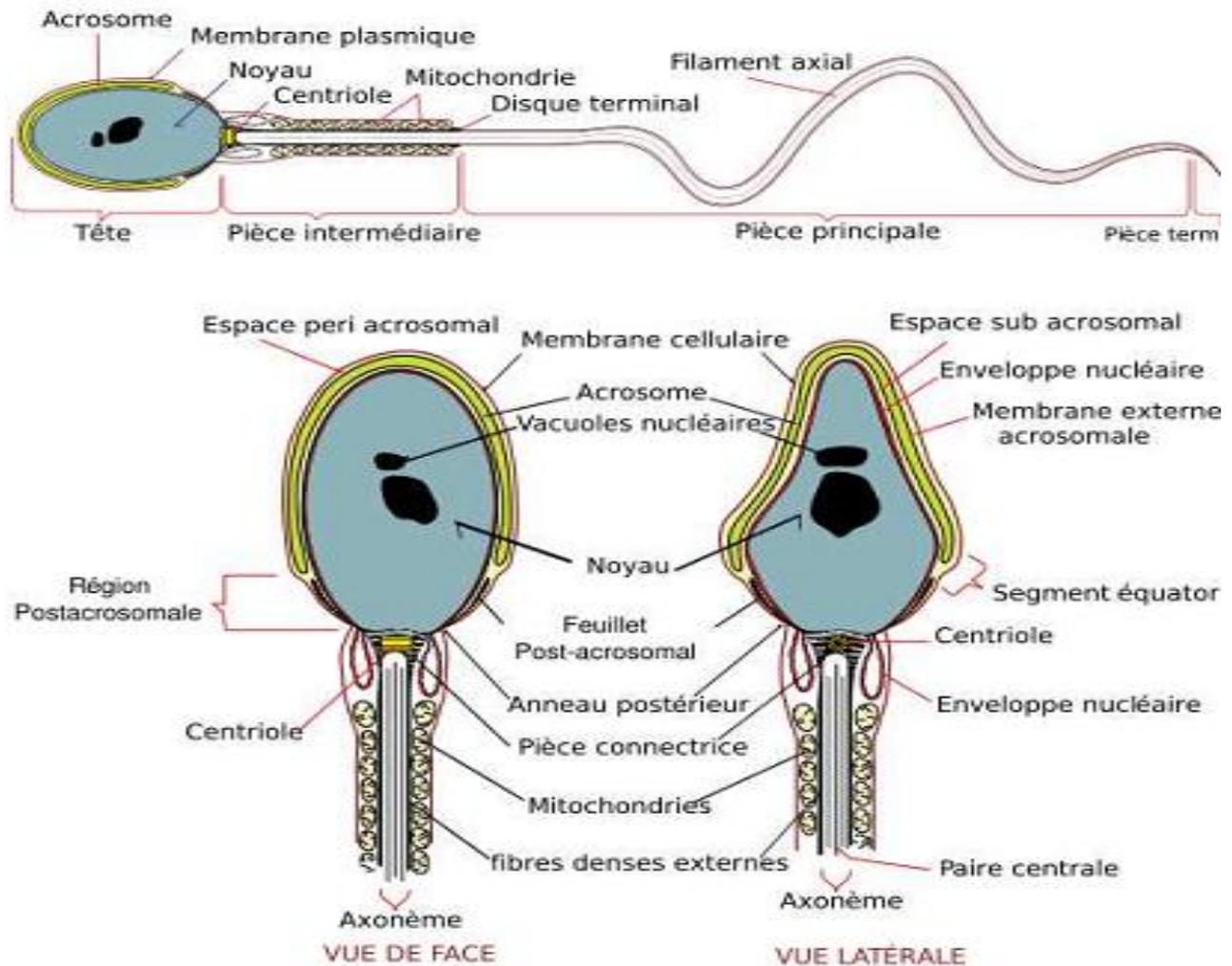


Figure 18 : Structure d'un spermatozoïde (Marie Allimant, 2010).

Maturation de spermatozoïde et capacitation

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

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

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.

Capacitation

Les spermatozoïdes subissent la capacitation dans les voies génitales femelles : ils achèvent leur maturation et acquièrent leur pouvoir fécondant. Des enzymes protéolytiques

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

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).

Caractéristiques de la semence d'étalon

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 (Tibary A ; 2005, Blanchard. TL ; 2003. Heymon Y ; 2005).

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).

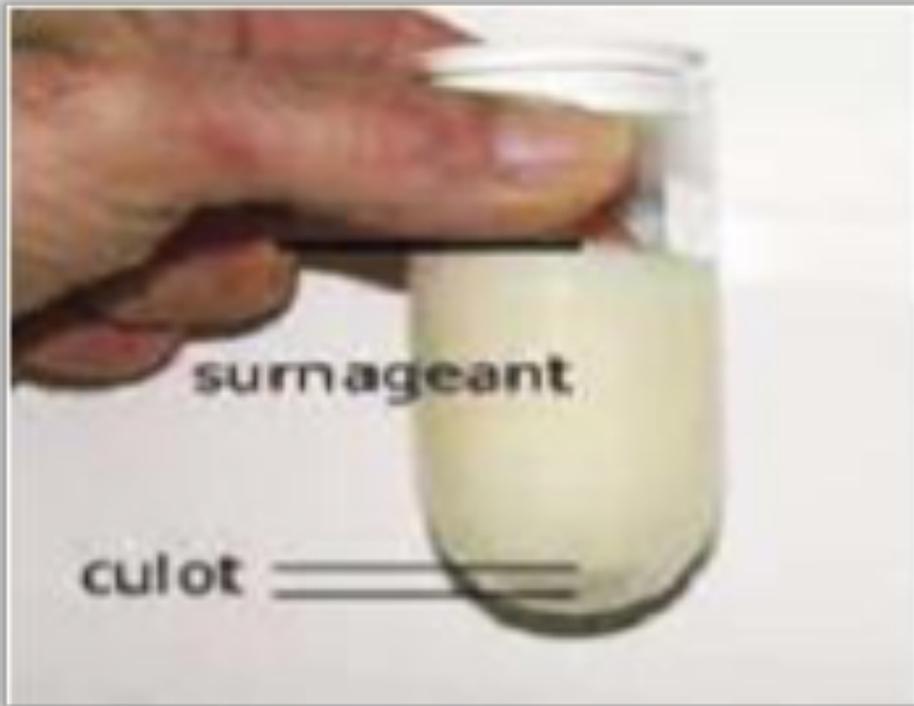


Figure 19 : Aspect du sperme d'étalon après centrifugation (Marie Allimant, 2010).

Composition chimique

La composition chimique du sperme est la suivante :

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

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur du cheval

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).

CHAPITRE II :

Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

I-Collecte du sperme

La collecte de sperme avec un vagin artificiel est généralement effectuée en permettant à l'étalon de monter une jument ou un fantôme de reproduction. La jument présentant un œstrus comportemental, est couramment utilisée comme une source de montage, 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 (John Dascanio. 2014 ; Steven P. et al. 2011).

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 pente. Les zones herbeuses, humides et glissantes doivent être évitées (John Dascanio. 2014 ; Steven P. et al. 2011).

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 (John Dascanio. 2014 ; Steven P. et al. 2011).

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 (John Dascanio. 2014 ; Steven P. et al. 2011).

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 tenu fermement 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).

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

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

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



Figure 20 : Mannequin de récolte pour étalons (Letenre Jessica 29 avril 2016).

Le prélèvement peut être effectué dans le vagin de la femelle (mais pas pour l'insémination artificielle), avec un condom en caoutchouc ou en plastique souple, ou mieux, avec un vagin artificiel. La température de l'eau du vagin artificiel au départ varie de 42°C à 50°C selon le temps estimé que l'étalon prendra pour éjaculer. (VALON ET CHAFFAUX, 1983).

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

La capote est lubrifiée avec de la vaseline et la pression doit être proche de celle exercée par le vagin de la jument (CHEVALIER, 1980). L'opérateur qui prélève est de côté par rapport à l'étalon. Il dévie le pénis au moment du saut et présente le vagin artificiel (CORDE,1985).

Il faut en moyenne 30 minutes pour obtenir une éjaculation. La température de l'eau du vagin artificiel est comprise entre 42°C et 44°C au moment de la collecte (FAUQUENOT, 1987).

La saillie elle-même dure 2 minutes environ. Le sperme doit être mis à l'abri de la lumière (FAUQUENOT, 1987).



Figure 21 : Différents types de vagins artificiel (Letenre Jessica 29 avril 2016).

Le choix du vagin artificiel et sa préparation conditionnent l'efficacité de la collecte 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'animal, le mode de traitement de la semence et la préférence du manipulateur (Blanchard et al. 2003).

Tous les modèles du vagin artificiel utilisés pour la collecte du sperme d'étalon sont fondamentalement similaires, en ce sens qu'ils sont dotés d'un jet d'eau qui permet de faire varier la température et la pression du manchon intérieur. Tandis que les caractéristiques spécifiques des différents types varient en longueur

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

totale, en diamètre, facilité de manipulation, poids et lieu d'éjaculation avec les étalons (Juan C. 2009).

II-Préparation du vagin artificiel

Just avant la collecte du sperme, la chemise d'eau est remplie d'eau à 45 - 50°C pour fournir une température luminale de 44 à 48°C, supérieure à celle du corps afin de stimuler le pénis et faciliter l'éjaculation. Et la pression doit être ajustée et adéquate pour assure un bon contact uniforme autour du pénis et une érection complète. La température et la pression de l'eau devraient être maintenues constantes pendant la collecte, afin de favoriser une récolte maximale de semence (Steven P. et al. 2011).

La surface interne de vagin artificiel doit être lubrifiée avec un lubrifiant stérile non- péricide, un filtre approprié est placé dans le tube de collecte, qui va piéger le gel, tout en permettant le passage de la fraction sans gel dans le réceptacle séminal afin de maximiser le nombre de spermatozoïdes disponibles, et le tube doit être maintenu à une température du corps pendant la collecte et au cours de son transport au laboratoire, afin d'éviter tout choc du froid sur le sperme qui devrait à son tour être protéger de la lumière (Steven P. et al. 2011).

Le filtre contenant le gel doit être retiré immédiatement après la collecte afin d'éviter toute infiltration de gel dans la portion sans gel de l'échantillon de sperme récolté (Steven P. et al. 2011).

III-Evaluation de la semence équine

III-1-Examens macroscopiques

Le spermogramme est une étude stricte du sperme qui revêt le volume, l'aspect, l'odeur, le pH, la mobilité des spermatozoïdes, le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur vitalité. Dans la section suivante il ne sera fait mention que des éléments les plus importants à savoir la mobilité et la numération (Marc Stéphanie. 2015).

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

III-1-1-Volume

Le volume de l'éjaculat est évalué par lecture directe sur le tube de collecte gradué juste après la récolte. Celui-ci est très variable en fonction des individus, de leur âge, de leur taille, la fréquence des récoltes et la méthode de récolte. Ainsi que la saison (plus faible en hiver qu'en été) et le temps de préparation de l'étalon (une stimulation sexuelle prolongée augmente le volume sans modifier le nombre de spermatozoïdes) (Marc Stéphanie. 2015).

La mesure du volume donne quelques indications, elle est importante pour calculer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat mais elle n'est pas indicatrice de la qualité de la semence (Marc Stéphanie. 2015).

III-1-2-Couleur et aspect

Normalement, 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).

III-1-3-PH

Le pH de la fraction sans gel du sperme peut être mesuré rapidement à l'aide d'un papier pH, mais il est préférable d'utiliser un pH-mètre précis. Le pH doit être mesuré dès que possible après la récolte pour éviter le biais dû aux produits issus du métabolisme des spermatozoïdes. Le pH normal du sperme d'étalon varie entre 7,2 et 7,7. Il subit des variations physiologiques selon la saison, la fréquence des éjaculations et la concentration. (Tibary A, 2005. Blanchard TL, 2003).

III-2-Examen microscopique

III-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 (Meskini Zakaria. 2017 ; Angus O. et al, 2011).

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).

III-2-2-Evaluation par utilisation d'une cellule hématimétrique

Il s'agit de la méthode la moins chère pour déterminer la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat et elle consiste en un comptage direct des spermatozoïdes observés individuellement (Johnston et al. 2001).

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 (Johnston et al. 2001).

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 (Johnston et al. 2001).

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

Une fois la dilution effectuée, une goutte de la préparation est déposée sur une cellule hématimétrique : cellule de Neubauer, de Malassez ou de Thoma (Johnston et al. 2001).

Ce sont des lames spéciales 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 (Johnston et al. 2001).

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).

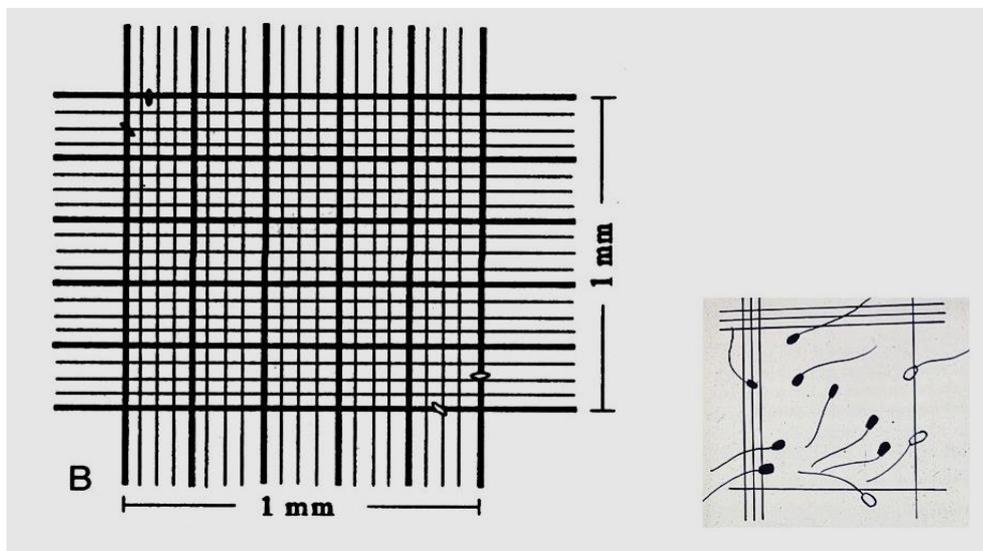


Figure 22 : Hématimètre : cellule de Thoma (<https://slideplayer.fr/slide/3395368/>).

III-2-3-Evaluation par utilisation du spectrophotomètre

L'acquisition d'un spectrophotomètre est justifiée pour les praticiens spécialisés ou les grands haras dans l'espèce équine, surtout quand l'insémination artificielle est utilisée (Allimant 2010).

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

Cette technique mesure la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et en détermine la concentration (Allimant 2010).

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 (Allimant 2010).



Figure 23 : Photomètre Minitube avec cuvette remplie en sperme (John Dascanio. 2014).

IV-La Motilité

La mobilité des spermatozoïdes, c'est-à-dire le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, doit être évaluée le plus rapidement possible, dans les 10 à 15 minutes après la récolte. Elle peut être évaluée par observation au microscope ou de façon automatisée (Tibary A. 2005, Blanchard TL. 2003).

A. 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 (Angus O. et al, 2011).

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

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 (Tibary A. 2005, Blanchard TL. 2003).

Un diluant à base de lait écrémé / glucose à une concentration de 25 à 50×10^6 / ml est préférable. Idéalement la motilité devrait être évaluée à 37°C pour éviter un ralentissement des spermatozoïdes dû à leur refroidissement. Ainsi en évitant toute source de contamination ou d'exposition excessive à la chaleur, au froid, au PH et à des conditions d'hyper ou d'hypo- osmolarité (Angus O. et al, 2011).

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'évaluation visuelle de la mobilité des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un

microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante à 37°C (figure), dont une goutte de phase spermatique déposée entre lame et lamelle et comporte une estimation de :

- 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

- La mobilité individuelle : Dans un second temps, 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.

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

Tableau 01 : 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

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 (Fontbonne et al. 1992 ; Olivier Salson 2008).

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

Tableau 02 : 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

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

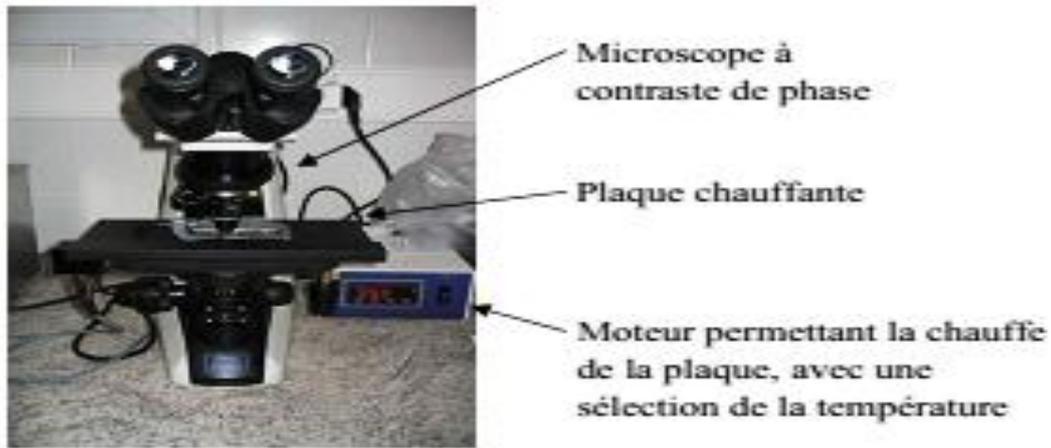


Figure 24 : Microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante (Marie Allimant, 2010).

V-4-La morphologie

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

A. Coloration:

A l'aide des colorants de fond :

En pratique, l'examen morphologique des spermatozoïdes, consiste en l'observation au microscope optique d'un étalement de semence coloré à l'éosine-nigrosine ou à l'encre de l'Inde (le plus souvent), des colorants de fond. Dont 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. Pour La visualisation des détails de la structure du spermatozoïde, une fixation des cellules est faite dans une solution tamponnée de formol ou dans un fixatif similaire tel que le glutaraldéhyde (Wessel MT. 2006).

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

L'éosine est un colorant entrant dans les spermatozoïdes lorsque leur membrane est lésée (Leeb et Rennhofer, 1954 ; Bjorndahl et al, 2003), la coloration à l'éosine-nigrosine permet donc une étude morphologique des spermatozoïdes ainsi qu'une détermination du taux de spermatozoïdes vivants et morts. Les spermatozoïdes vivants apparaissent blancs alors que ceux qui sont morts sont colorés en rouge ou rose suite à la perméabilité de leur membrane à l'éosine. La coloration à l'encre de chine est une préparation permettant d'avoir un meilleur contraste entre les spermatozoïdes (blanc) et la lame (fond noir), (Tibary A. 2005).

A l'aide des colorants cytologiques :

Les colorants cytologiques classiques, 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 (Tibary A. 2005).

B. 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

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

sur l'origine de tel ou tel défaut. (Tibary A. 2005. Varner DD. 2008, Blanchard TL. 2003

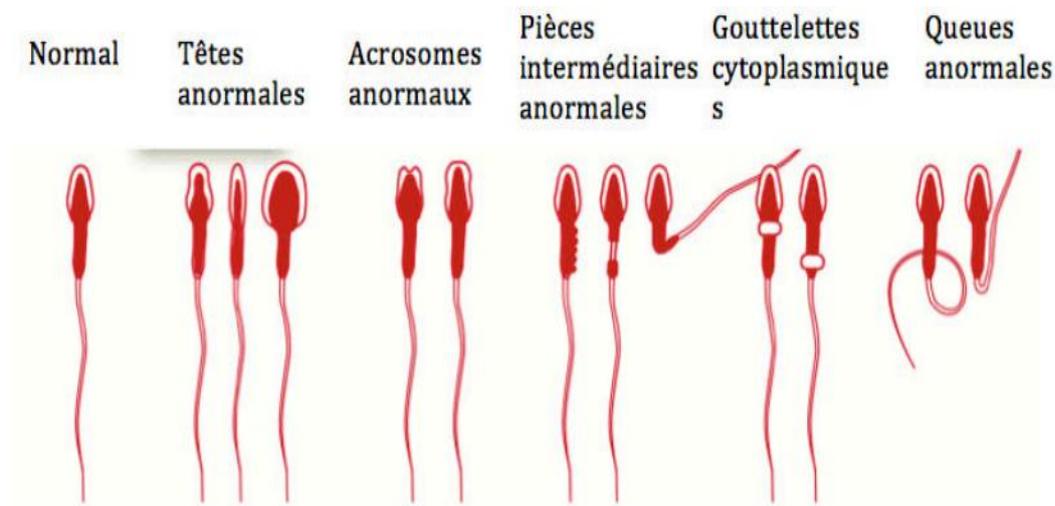


Figure 25 : Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et de quelques anomalies pouvant être rencontrées (Steven P. et al, 2011).

VI-Conservation de la semence

La semence d'étalon peut être utilisée directement à l'état frais après la récolte dans le but d'une insémination immédiate, ou être conservée sous forme réfrigérée ou congelée pour une insémination ultérieure. 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.

VI-1-Conservation à court terme

A. 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).

B. Semence refroidie

Dans l'espèce équine, la réfrigération de la semence à peut constituer soit un processus à part entier, 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 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).

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

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.

VI-2-Conservation à long terme (La Cryoconservation)

A. Définition

La cryoconservation 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).

Il s'agit d'une biotechnologie importante permettant la conservation des espèces menacées ou, incapable de se reproduire. D'éviter la propagation de certaines maladies sexuellement transmissibles, d'éliminer les barrières

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

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 il n'est pas possible de garder les spermatozoïdes à la température du corps vu de la mortalité cellulaire importante qui s'ensuit à cause d'une activité métabolique intense (Varner et al. 1988).

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

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

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

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

Il devient, donc, indispensable de maîtriser les modifications biologiques, physiologiques et physiques s'exerçant sur les cellules et leur environnement au moment de la cryoconservation afin d'apporter aux spermatozoïdes des composants pouvant leur permettre de résister à ces modifications délétères (Mazur, 1968).

C. Dilution du sperme

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

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

La dilution permet d'obtenir une concentration en spermatozoïdes optimale pour la congélation. La concentration finale en spermatozoïdes dans l'échantillon dépend du choix du taux de dilution. Un nombre de spermatozoïdes d'au moins 200 millions par dose 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).

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

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

- Les dilueurs :

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

• Composition :

En règle générale, les dilueurs contiennent 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 (c'est-à-dire 300 mOsm/L avec un pH de 7,4 à 7,6), pour la plupart des dilueurs, l'osmolarité se situe entre 280 et 450 mOsm/L avec un pH de 6,6 à 7,0 (Katila, 1997). Il doit aussi avoir une action stabilisatrice et protectrice des membranes, 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 phosphocaseinate natif (PPCN) et la β -lactoglobuline se sont révélés être les plus performants pour la conservation de la semence équine réfrigérée (Batellier et al, 1998 ; Batellier et al, 2001), d'où la création de l'INRA96. 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.

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

Les principaux dilueurs à l'heure actuelle sont (tableaux) :

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 03 : Composition de kenney et de l'INRA96 (pour 1l) (Marc Stéphanie., 2015).

Dilueur	Composition
Le 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), NaCl (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)

D. TECHNIQUE

Après la récolte, le sperme équin est filtré pour extraire la fraction gel du sperme, une sécrétion filamenteuse des glandes annexes. Le sperme est ensuite analysé pour déterminer ses caractéristiques (concentration en spermatozoïdes, mobilité). 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. Différentes formulations commerciales existent et servent à conserver le sperme frais dans une gamme de température allant de 5 à 20°C.

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

Chez le cheval, le sperme est relativement peu concentré, contrairement à ce qui est observé dans d'autres espèces comme le bovin (Baracaldo, 2007) : le plasma séminal doit donc être éliminé par centrifugation

Les tubes sont centrifugés à température ambiante (Vidament *et al.*, 2000) et le surnageant est enlevé. Certaines équipes (Salazar *et al.*, 2008 ; Ponthier *et al.*, 2013) proposent de conserver une petite fraction de plasma séminal, de l'ordre de 5 % du volume final, pour la congélation, mais d'autres recommandent de le retirer entièrement (Vidament *et al.*, 2000 ; 2001), car le plasma séminal ne semble pas bénéfique pour la congélation du sperme équin (Moore *et al.*, 2005b).

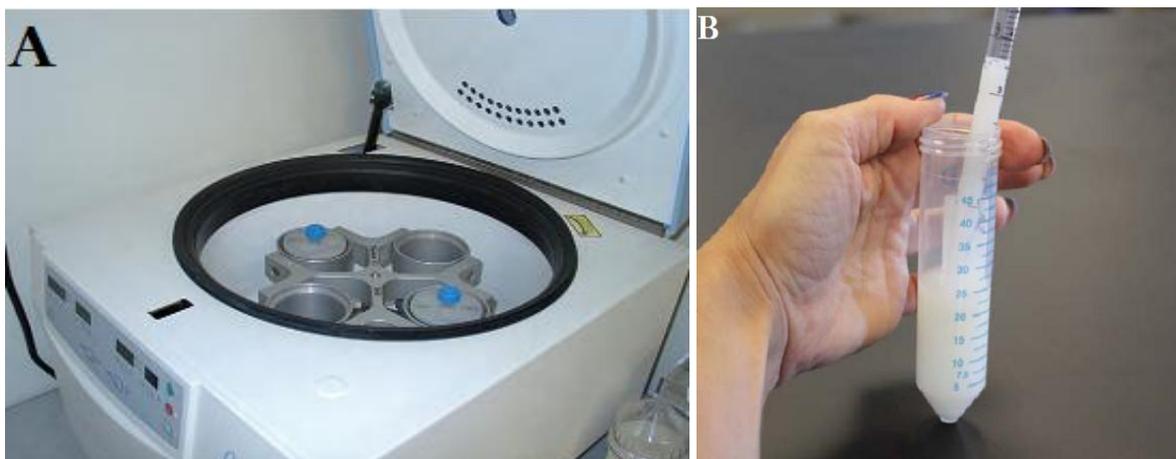


Figure 26 : Centrifugation de sperme dilué (A), puis aspiration de surnageant après centrifugation (B) (Steven P. et al. 2011).

De nouveaux protocoles utilisant des milieux coussin ont permis d'augmenter jusqu'à plus de 90 % le pourcentage de récupération des spermatozoïdes après centrifugation. L'ajout de ces milieux, qui sont composés d'une solution d'iodixanol, au fond des tubes permet d'augmenter l'accélération de la centrifugeuse (1000 g pendant 20 minutes au lieu de 600 g pendant 10 minutes, sans milieu coussin) et le temps de centrifugation sans provoquer de lésions du spermatozoïde (Waite *et al.*, 2008 ; Hoogewijs *et al.*, 2010). Le nombre de paillettes produites par éjaculat est donc plus grand car le nombre total de spermatozoïdes après centrifugation est plus élevé (90 % des spermatozoïdes récupérés au

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

lieu de 60 % avec le protocole de centrifugation n'utilisant pas les milieux coussins). Une alternative à la centrifugation est de séparer les fractions d'éjaculation lors de la récolte pour ne conserver que la fraction riche en spermatozoïdes (Sieme *et al.*, 2004 ; Kareskoski *et al.*, 2005), comme chez le chien (Linde-Forsberg, 1991 ; Thirumala *et al.*, 2003 ; Kutzler, 2005). Cependant, cette technique demande de l'expérience de la part des personnes effectuant la récolte.

Une étape intermédiaire peut être ajoutée au processus de congélation classique : la centrifugation sur des milieux colloïdaux. Cette méthode permet de séparer les spermatozoïdes anormaux, les débris cellulaires et les bactéries 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 ; Kobayashi *et 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 éjaculat.

Une fois que le culot riche en spermatozoïdes est obtenu, il est dilué avec le milieu de congélation. Chez le cheval, les milieux de congélation sont produits à base de lait ou de composants de lait, contrairement aux milieux utilisés chez l'humain, le bovin et le chien dont la base est un milieu tris-fructose (Esteves *et al.*, 2003 ; Thirumala *et al.*, 2003 ; Baracaldo, 2007). Du jaune d'œuf est aussi ajouté au milieu de congélation chez toutes les espèces. Récemment, le plasma de jaune d'œuf a été utilisé chez le cheval pour remplacer le jaune d'œuf (Pillet *et al.*, 2011). L'utilisation de milieux de congélation sans protéines d'origine animale doit encore être étudiée chez le cheval, mais les premiers essais réalisés avec du sperme réfrigéré sont décevants (Woelders *et al.*, 2007).

Le glycérol est l'agent cryoprotecteur le plus utilisé pour congeler du sperme. Alors que les spermatozoïdes humains (Agarwal, 2000), bovins (Baracaldo, 2007) et canins (Farstad, 1998) supportent des concentrations en glycérol entre 6 et 8 % du volume total, la concentration chez le cheval ne devrait idéalement pas dépasser les 3,5 % du volume total (Vidament, 2005 ; Vidament *et al.*, 2005). Récemment, un milieu de congélation ne contenant que 2,5 % de glycérol a été

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

développé et donne de très bons résultats de fertilité observée (Pillet *et al.*, 2008 ; 2011). Un autre milieu de congélation ne contenant que 1 % de glycérol est également disponible et donne de bons résultats de qualité de sperme (Alvarenga *et al.*, 2005). Cependant, ce milieu de congélation contient aussi des amides qui interviennent dans la cryopréservation, portant la concentration totale en agent cryoprotecteur total à 5 % (Alvarenga *et al.*, 2005). Le volume de milieu de congélation nécessaire pour atteindre la concentration finale désirée dans les paillettes est ajouté (Vidament, 2005).

Le premier palier de la descente en température consiste à équilibrer la température du sperme à 4°C pendant 75 minutes (Vidament *et al.*, 2000).

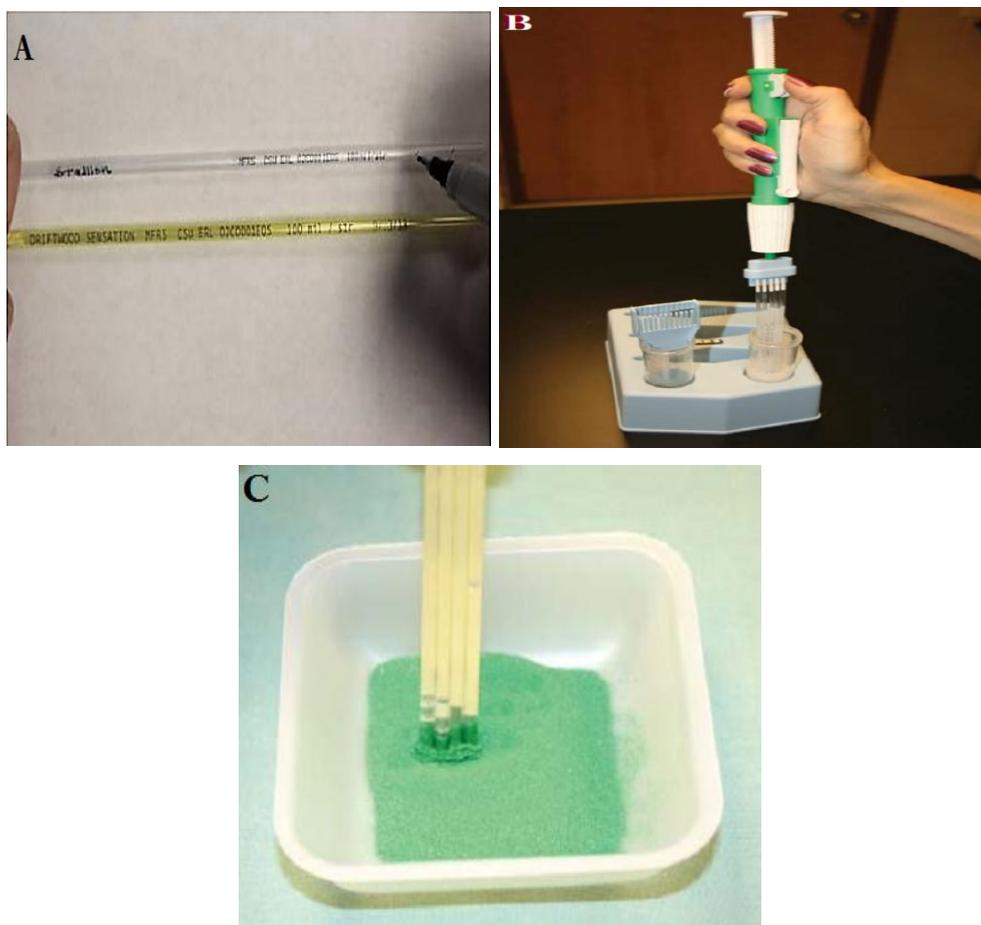


Figure 27 : Identification (A), remplissage (B) et bouchage (C) des paillettes (John Dascanio, 2014).

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

Le sperme est ensuite conditionné en paillettes de 0,5 ml (Vidament *et al.*, 2000). Les paillettes sont refroidies dans un congélateur électronique qui envoie des vapeurs d'azote pour atteindre -140°C , avec une pente variant, selon le milieu de congélation utilisé, entre -20°C et -60°C par minute (Alvarenga *et al.*, 2005 ; Pillet *et al.*, 2008). Les paillettes sont ensuite immergées et stockées dans l'azote liquide (-196°C). Pour les décongeler, les paillettes sont immergées pendant 30 secondes dans un bain-marie à 37°C (Vidament, 2005). Deux paillettes de chaque lot sont ensuite analysées avant la commercialisation.

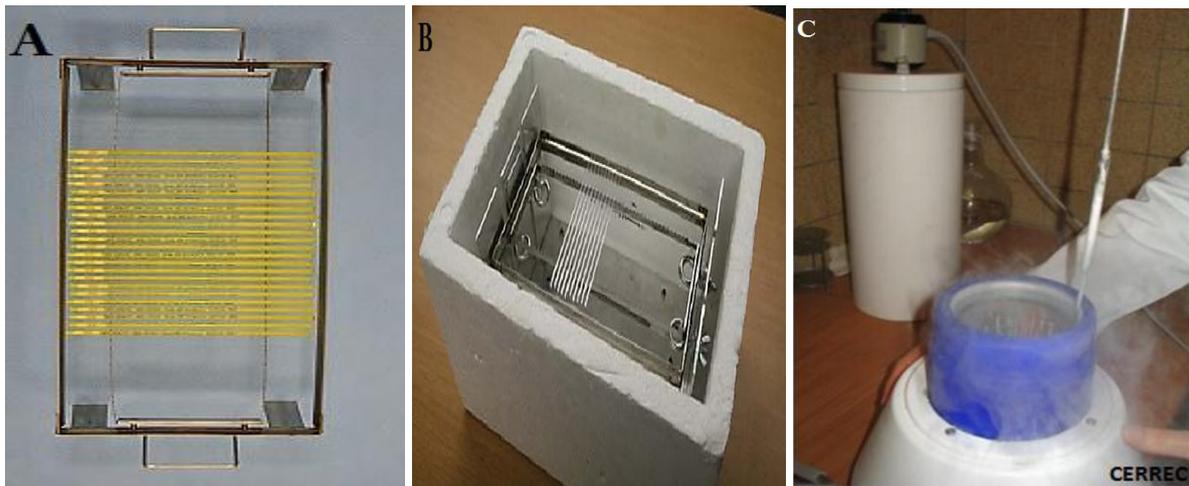


Figure 28 : Paillettes déposées sur une grille (A) ensuite placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide (B) puis stockées dans une cuve d'azote liquide (D) (John Dascanio. 2014 ; Steven P. *et al.* 2011).

VII-La décongélation

La semence est décongelée juste avant son utilisation, lors d'une insémination artificielle le plus souvent dont les paillettes sont directement transférées de l'azote liquide dans un bain-marie, et la méthode de décongélation recommandée est dictée en particulier selon le diamètre de la paillette à décongelée.

Dans la plupart 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

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

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).

VII-1-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

Chapitre II : Récolte et conservation de la semence chez l'étalon

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).

PARTIE
EXPERIMENTALE

PARTIE EXPERIMENTALE

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 méthode

1-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.

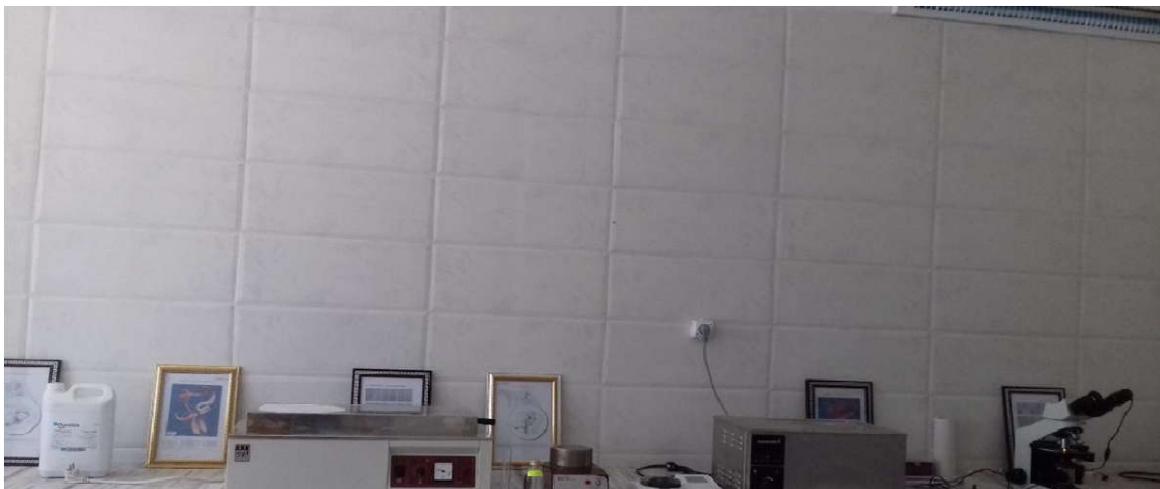


Figure 29 : Le laboratoire de la reproduction équine de l'institut des sciences vétérinaires.

2-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.

PARTIE EXPERIMENTALE

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

3-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.

3.1-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.



Figure 30 : Les étapes de préparation du vagin artificiel de type Missouri.



Figure 31 : Vagin artificiel de type Colorado.

2.2-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.

PARTIE EXPERIMENTALE

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 œstrus comportemental qui est-elle même bien immobilisée par des entraves et placée à l'autre côté d'un fantôme de reproduction.



Figure 32 :L'excitation de l'étalon en présence de la jument « boute-en-train » (A ANBER, B REZKI).

3.3-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.



Figure 33 : Les étapes de la récolte de sperme chez le cheval «REZKI ».



Figure 34 : Les étapes de la récolte de sperme chez le cheval «ANBAR ».

4-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.

5-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.

5.1-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,

PARTIE EXPERIMENTALE

lait en poudre entier, antibiotiques). Ces composants sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 04 : La composition du Kenney (pour 1l)

Glucose $C_6 H_{12} O_6$	49g
<i>Lait en poudre</i>	24g
<i>Eau distillée stérile</i>	<i>q .s .p.1L</i>
<i>streptomycine</i>	1,5g
<i>Pénicilline</i>	1,5 million UI



Figure 35 : Les ingrédients de milieu Kenney mesurés.

5-1-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 36 : Les étapes de préparation du milieu Kenney.

6-Préparation du milieu de Cryo-congélation

6-1-Le Kenney modifié

Tous d'abord, le milieu de dilution (SKMG) que nous avons préparé a été modifié en lui ajoutant 5% de glycérol avec 15% de plasma du jaune d'œuf.

Le glycérol est pour améliorer l'aptitude à la fécondation des spermatozoïdes fragilisés ou endommagés pendant le processus de congélation, alors que le jaune d'œuf était ajouté dans le but d'améliorer la protection de la membrane plasmique des spermatozoïdes et ceci en

fournissant un pouvoir tampon et des propriétés antioxydantes au dilueur de congélation (John Dascanio, 2014)

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 diverses 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 rempli 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.

PARTIE EXPERIMENTALE

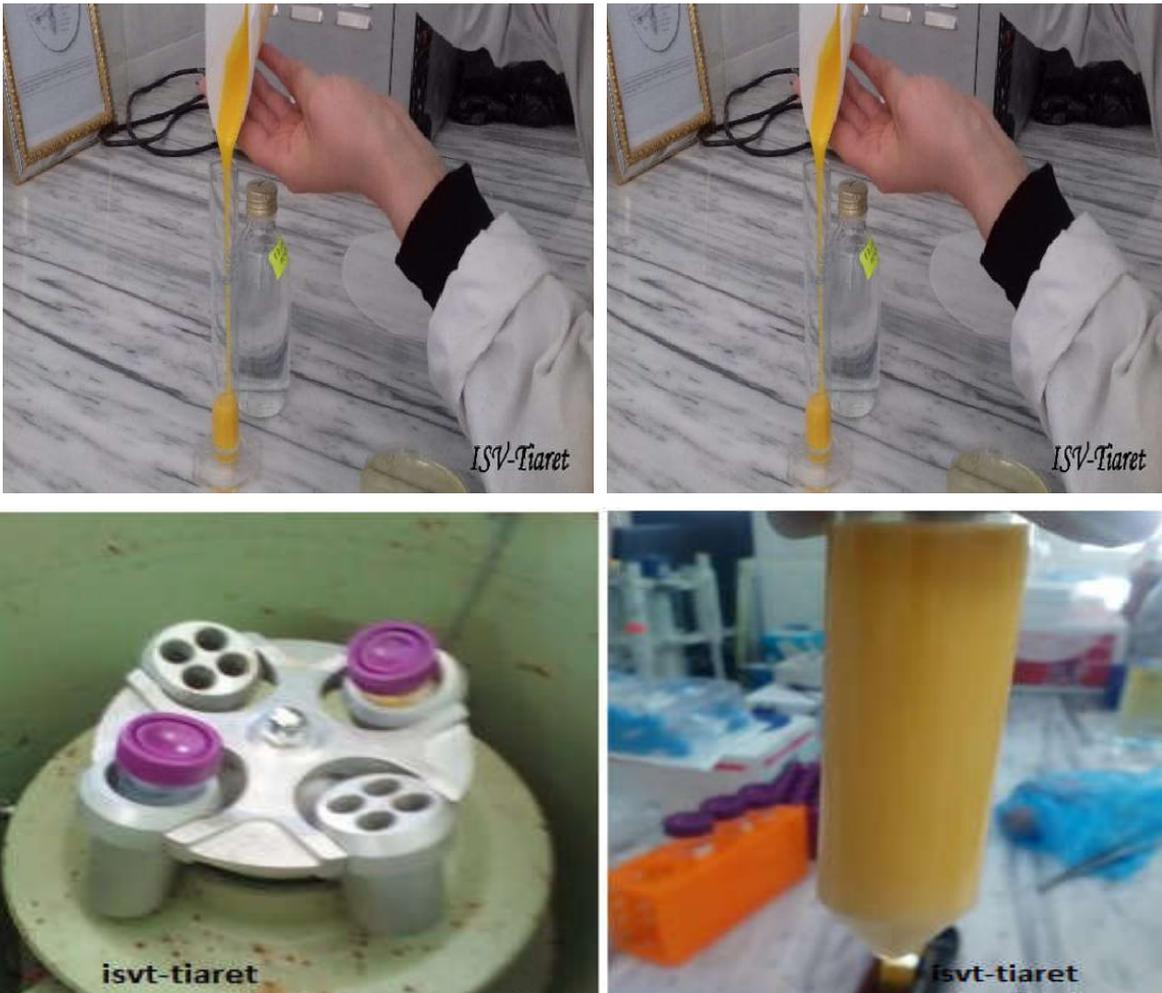


Figure 37 :La préparation de plasma du jaune d'œuf.



Figure 38 : Kenney modifié.

7-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.



Figure 39 : 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 :

7-1-Examen macroscopique

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

PARTIE EXPERIMENTALE

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.

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.



Figure 40 : Couleur et aspect de sperme après filtration.

7-2-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 41 : La détermination de la concentration à l'aide d'un photomètre Minitube.

7-2-Examen microscopique

a-Mobilité massale

Immédiatement après évaluation macroscopique, le volume de la semence exempte de gel était analysé par le dépôt d'une goutte de sperme entre lame et lamelle propres, secs et chauffés à environ 37°C et placés 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 25×10^6 SPZ/mL est nécessaire pour l'estimation de la mobilité individuelle, cela à 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).

7-3-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.

8-1-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.



Figure 42 : La dilution de sperme et le remplissage des tubes coniques à centrifuger.

8-1-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).



Figure 43 : L'aspect du culot après l'aspiration de surnagent.

8-3-Dilutuin 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 $200 \times 10^6/\text{ml}$:

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

$$\text{Volume de Kenney ajouté} = [\text{CT}] \text{ en SPZ} \times 0,5 / 200 \times 10^6 - (\text{volume des culots rassemblés})$$

[CT] : Concentration totale

[C] : Concentration

SPZ : spermatozoïde

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

8-4-Equilibration

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

8-5-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 44 : Le conditionnement des paillettes.

8-6-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.



Figure 45 : Les paillettes placées au dessus d'azote liquide en phase vapeur, prolongées en phase vapeur, puis stockées dans l'azote liquide.

8-7-Evaluation des paillettes après décongélation

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.



Figure 46 : Décongélation des paillettes.

PARTIE EXPERIMENTALE

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.

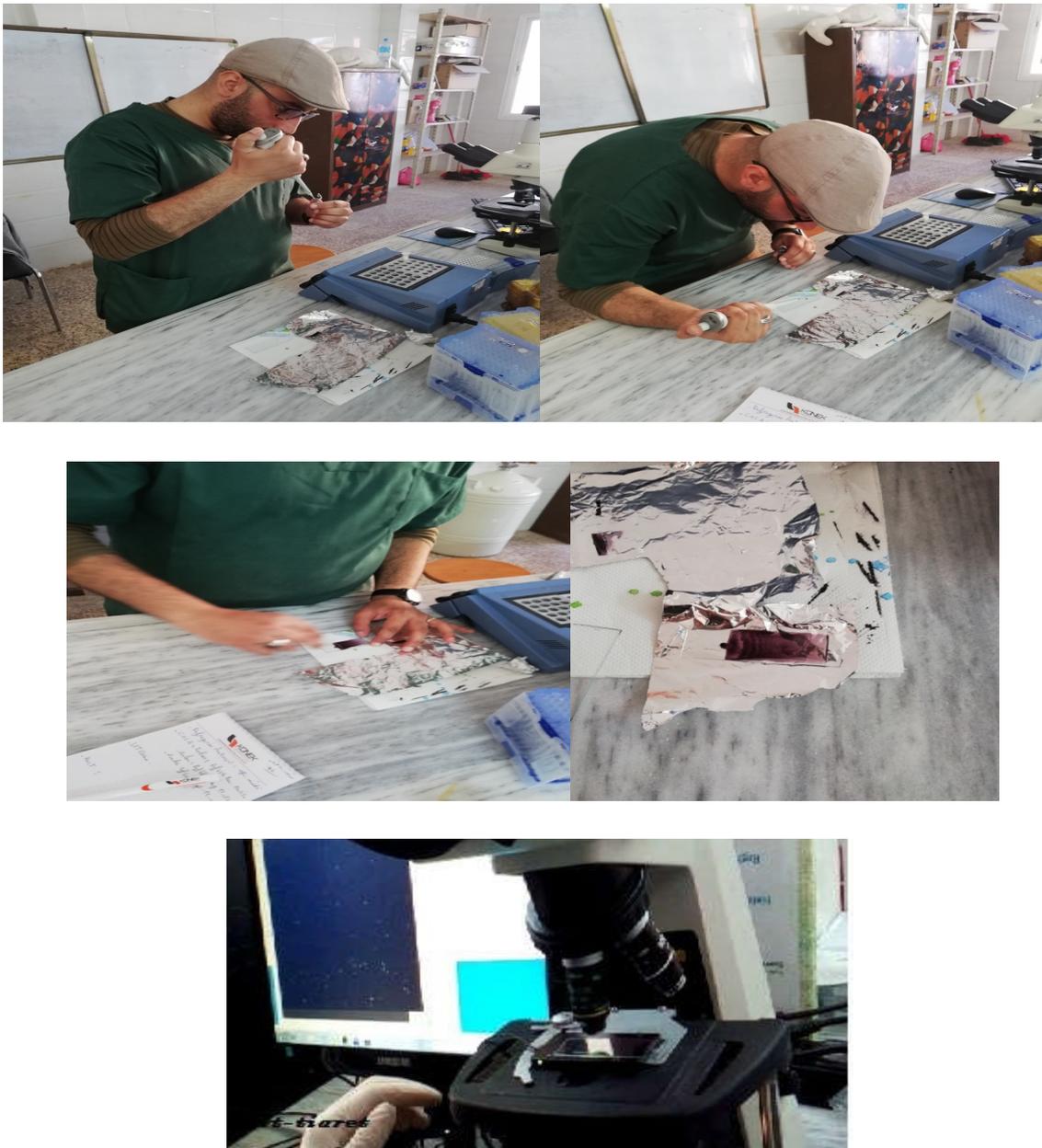


Figure 47 : L'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes sous le microscope optique après coloration par l'éosine.

PARTIE EXPERIMENTALE

Résultats

1-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 05 : 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%

2-Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de Kenney avant la congélation

Tableau 06 : 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

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 07 : 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 08: 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 EXPERIMENTALE

Tableau 09 : 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 10 : 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 11 : 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 EXPERIMENTALE

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.

3-Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de Kenney supplémenté par les cryoconservateur après congélation

Tableau 12 : 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

Tableau 13 : 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%

PARTIE EXPERIMENTALE

Les résultats des paramètres spermatiques et les pourcentages des spermatozoïdes mobiles et immobiles sont décrits 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 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.

Tableau 14 : Vitalité des spermatozoïdes après décongélation.

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

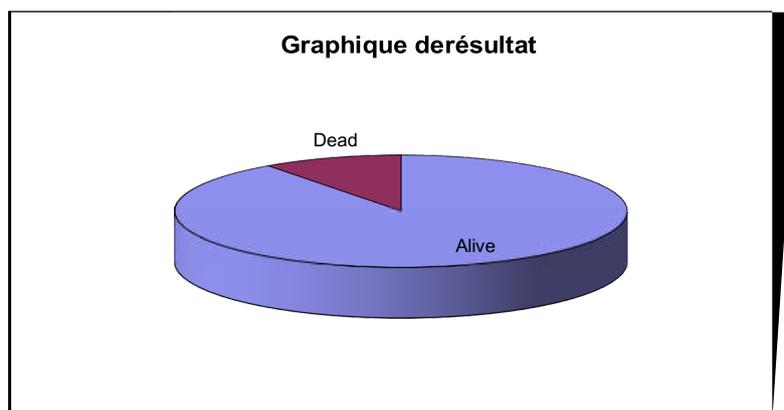


Figure 48 : Spermatozoïdes morts et vivants après décongélation.

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.

PARTIE EXPERIMENTALE

4-Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de BURN avant la congélation

Tableau 15 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la première répétition.

	Aire	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
MOYENNE	16,6	47,7	35,7	42,3	67%	75%	84%	1,1	6,3
ECARTYPE	9,0	29,8	26,8	28,7	31%	28%	19%	0,8	4,2
MAX	66,3	166,8	99,5	130,4	100%	100%	100%	7,4	20,0
MIN	4,0	10,1	0,0	4,1	0%	0%	24%	0,0	0,0

Tableau 16 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la première répétition.

TOTAL		
STATIQUE	229	50%
RAPIDE	3	1%
PROG RAPIDE	13	3%
PROG MOYEN	82	18%
MOYEN	15	3%
LENT	112	25%

Spermatozoïdes mobile : 50% ; spermatozoïdes immobiles : 50%

Tableau 17 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la deuxième répétition.

	Aire	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
MOYENNE	16,2	47,3	34,1	40,6	64%	74%	81%	1,2	6,6
ECARTYPE	9,24	30,94	27,66	29,16	31%	27%	20%	0,81	4,08
MAX	71,2	142,0	120,2	125,9	100%	100%	100%	6,2	22,0
MIN	4,0	10,0	0,0	0,0	0%	0%	0%	0,0	0,0

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 18 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la deuxième répétition.

TOTAL		
STATIQUE	496	48%
RAPIDE	18	2%
PROG RAPIDE	43	4%
PROG MOYEN	165	16%
MOYEN	19	2%
LENT	283	28%

Spermatozoïdes mobile : 52% ; spermatozoïdes immobiles : 48%

Tableau 19 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la troisième répétition.

	Aire	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
MOYENNE	16,5	52,6	39,5	46,5	66%	76%	82%	1,2	6,7
ECARTYP	9,39	33,76	29,48	32,47	32%	27%	21%	0,76	4,21
MAX	66,8	180,4	109,0	140,6	100%	100%	100%	5,4	19,0
MIN	4,1	10,1	0,0	1,6	0%	0%	13%	0,0	0,0

Tableau 20 : Paramètres et pourcentage des spermatozoïdes de la troisième répétition.

TOTAL		
STATIQUE	212	48%
RAPIDE	9	2%
PROG RAPIDE	25	6%
PROG MOYEN	84	19%
MOYEN	5	1%
LENT	100	23%

Spermatozoïdes mobile : 52% ; spermatozoïdes immobiles : 48%

PARTIE EXPERIMENTALE

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.

5-Evaluation des spermatozoïdes dans le milieu de BURN supplémenté par les cryoconservateur après congélation

Tableau 21 : Variation des paramètres et des pourcentages des spermatozoïdes mobiles et immobiles après décongélation.

	Moyenne	Écart-type
VCL	24,32	23,92
VAP	19,09	24,40
VSL	14,50	25,28
STR	47,4%	36,0%
LIN	59,9%	35,2%
WOB	70,4%	26,4%
ALH	0,95	0,59
BCF	0,79	1,65
Aire	18,93	11,62

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 22 : Variation des paramètres et des pourcentages des spermatozoïdes mobiles et immobiles après décongélation.

STATIQUE	1399	91,91%
RAPIDE	0	0%
PROG RAPIDE	4	0,26%
PROG MOYEN	7	0,45%
MOYEN	3	0,19%
LENT	109	7,16%

Les résultats des paramètres spermatisques et les pourcentages des spermatozoïdes mobiles et immobiles sont décrits 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 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.

Tableau 23 : Vitalité des spermatozoïdes après décongélation.

	Total	Pourcentage (%)
<u>VITALITY</u>		
Alive	77	77,00
Dead	23	23,00

PARTIE EXPERIMENTALE

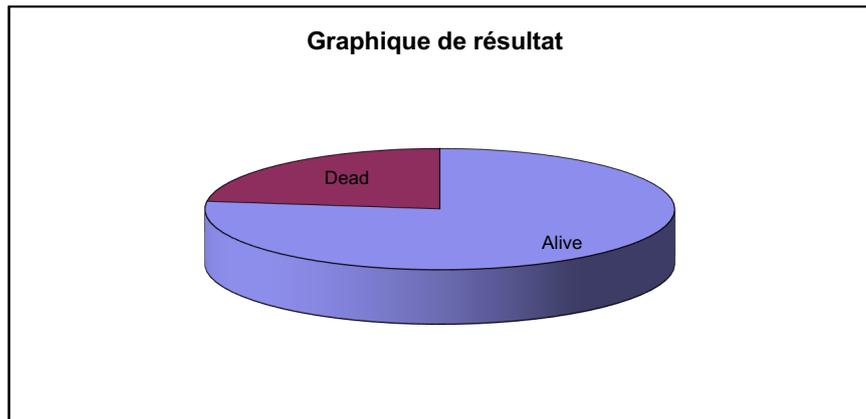


Figure 49 : Spermatozoïdes morts et vivants après décongélation.

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 BURN supplémenté par des cryoprotecteurs nous remarquons que le poucentage des spermatozoides vivants est plus important que celui des spermatozoides morts avec une valeurs de 77% & 23% repectivement.

Discussion

La cryoconservation du sperme d'étalon est connue pour réduire différents paramètres de la capacité fécondante du sperme, tels que la motilité totale, la mobilité progressive, la perméabilité de la membrane plasmique, la morphologie et même l'activité mitochondriale (Parks et Graham, 1992; Brum et al., 2008). Dans les résultats de cette étude on a observé un effet néfaste de la cryoconservation de la semence équine par les procédures de congélation, sur les paramètres de motilité progressive, de vitalité, par rapport à la semence d'étalon fraîche. Salazar et coll. (2011), ont observé une réduction des paramètres de motilité totale, de motilité progressive et des vitesses curvilinéaire et linéaire, dans le sperme cryoconservé avec des taux de refroidissement rapides et lents. Dans cette étude, il n'y avait aucun effet de la cryoconservation sur la morphologie normale du sperme d'étalon, tandis que Blottner et al. (2001) ont signalé plusieurs altérations de la morphologie du sperme équin cryoconservé, et Vlasiu et al. (2008) décrivent des changements dans les dimensions de la tête du sperme cryopréservé.

Les valeurs des paramètres de qualité du sperme frais trouvées dans ce travail sont comparables à celles rapportées dans la littérature, principalement en relation avec la motilité et la vitalité normale. Les résultats sont présentés pour la motilité progressive: 41,5% \pm 5,4% (Kankofer et al., 2005); 68,3% \pm 3,7% (Pérez et al., 2008) et 73% \pm 6,3% (Cocchia et al., 2011). Résultats de vitalité de 81% \pm 5,2% (Cocchia et al., 2011); 55,1% \pm 14,4% (Henry et al., 2002) et 86,6% \pm 4,3% (Sieme et al., 2003). Et des valeurs morphologiques normales : 43,4% \pm 19,9% (Neild et al., 2000), ainsi que des résultats sont présentés pour: 56,1% \pm 14,2% (Neild et al., 2000) et 56,2% \pm 8,6% (Perez et al., 2008). Etre clair la variabilité entre les différents rapports, qui pourrait être attribuée à des facteurs tels que la race, l'environnement et la méthode d'évaluation.

Pour le sperme d'étalon cryoconservé, des valeurs de motilité progressive de 56,1% \pm 20,9% ont été trouvées (Hoffmann et al., 2011); 23% (Squires et al., 2004) et 55,3% \pm 14,3% (Henry et al., 2002). Des résultats de vitalité de 32,6% \pm 6,52% (Hoffmann et al., 2011); 44,1% (Medeiros et al., 2002) et 12% \pm 9,9% (Henry et al., 2002); et une valeur HOS de 52,8% (Mantovani et al., 2002). Ces résultats étaient inférieurs dans certains cas, et dans d'autres cas similaires à ceux obtenus dans cette étude, étant important de considérer les différences dans les

PARTIE EXPERIMENTALE

protocoles de cryoconservation, l'origine des animaux, ainsi que dans la qualité du sperme cryoconservé.

Entre les traitements de cryoconservation de semence équine, une différence a été trouvée pour les paramètres évalués comme indicateurs de la fertilité : motilité massale, motilité progressive et vitalité. On peut donc considérer que la congélation par le milieu Kenney a donné de meilleurs résultats par rapport au milieu Burn de point de vue paramètres de fertilité dans le sperme équin après cryoconservation.

Comme mentionné précédemment, dans différentes enquêtes, il y a eu une baisse évidente de la qualité après décongélation du sperme d'étalon cryopréservé par rapport au sperme frais, étant des procédures de congélation lente (Padilla et Foote, 1991) et une congélation rapide dans la vapeur d'azote (Clulow et al., 2008).

CONCLUSION

Conclusion

Nous avons conclu dans le présent travail que l'utilisation du milieu de dilution Kenney à base de lait et glucose a donné de bons résultats dans la cryocongélation de la semence équine avec un pourcentage des spermatozoïdes vivants de 90% par rapport au milieu Burn qui présente un taux de vitalité de 77%, ainsi que pour la motilité anté et post congélation.

On a remarqué aussi la présence d'une réduction des paramètres (motilité massale, motilité progressive et vitalité) en post décongélation pour les deux milieux.

On peut donc considérer que la congélation par le milieu Kenney a donné de meilleurs résultats par rapport au milieu Burn de point de vue paramètres de fertilité dans le sperme équin après cryoconservation ce qui justifie la priorité d'utilisation du milieu Kenney au milieu Burn dans la cryoconservation de la semence équine.

Perspectives et recommandations

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 des deux milieux pour savoir l'effet in vivo et calculé la fertilité pour chaque milieu

Nous espérons ainsi d'améliorer la clarté de chaque milieu de cryoconservation pour une visualisation plus claire des spermatozoïdes qui permette une évaluation optimale de la qualité du sperme congelé.

Une comparaison entre d'autres milieux de congélation commercialisés pour mieux juger l'effet de chaque milieu sur les paramètres de sperme d'étalon.

Tester d'autres types de dilueurs de congélation pour la semence de l'étalon.

Références bibliographiques

1. **Aboagla EM, Terada T. 2003.** Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod*, 69:1245-1250.
2. **Akerejola OO, Ayivor MD, Adams EW. 1978.** Equine squamous cell carcinoma in Northern Nigeria. *Vet Rec*, 7, pp. 336-337.
3. **Al-Waili, NS 2004.** Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J. Med. Food*. 7: 210- 222.
4. **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.
5. **Allison N, Robert B, Moeller J. 1999.** Bilateral testicular leiomyosarcoma in a stallion. *J Vet Diagn Invest*, 11, pp. 179-182.
6. **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.
7. **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.
8. **Amann RP. 1993.** Physiology and Endocrinology. In: Mckinnon AO, VOSS JL (eds), *Equine Reproduction*, 1ed., Lea & Febiger eds, Philadelphia, pp. 1137-1154.
9. **Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner. 2011.** *Equine Reproduction*, Second Edition. Blackwell Publishing Ltd.
10. **Banday, M. N.; Lone, F. A.; Rasool, F.; Rather, H. A. and Rather, M. A, 2017.** Article: Does natural honey act as an alternative to antibiotics in the semen extender for cryopreservation of crossbred ram semen?
11. **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.
12. **Barbas J. P. et Mascarenhas R. D. 2009.** Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. Vol. 10, n° 1, p 49 - 62.
13. **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.
14. **Baronne R. 2001.** Chapitre II : Appareil génital mâle. In : Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie II. Vigot 83-250.
15. **Barrier-Battut I. 2013.** Collecte et traitement de la semence d'étalon. *Equ'idée*. Article 2-7.
16. **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.
17. **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.
18. **Batellier F. et al. 2001** Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci*. 68 (3-4) 181-90.
19. **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.

Références bibliographiques

20. **Bjorndahl L., Soderlund I., Kvist U. 2003.** Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum. Reprod*18, 813-816.
21. **Blanchard TL, et al. 2003.** Manual of equine reproduction. 2nd edition. Mosby
- Bo G. Crabo, DVM, PhD. 2001.** Physiological Aspects of Stallion Semen Cryopreservation.
22. **Blottner, S., C. Warnke, A. Tuchscherer, V. Heinen and H. Torner. 2001.** Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Sciences* 65(1-2): 75-88.
23. **Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. 2008.** Honey for nutrition and health: a review. *J Am Coll Nutr*; 27: 677-689.
24. **Braun J., Sakai M., Hochi S., Oguri N. 1994.** Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology*, 41, 809-818.
25. **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.
26. **Brum, A., K. Sabeur and B. Ball. 2008.** Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology* 69(9): 1041-1055.
27. **Bustamante Filho IC, Pederlozzi CD, Sgaravatti AM, Gregory RM, Dutra Filho CS, Jobim MIM, Mattos RC. 2009.** Skim Milk-egg based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim Reprod*, 6:392-399.
28. **Catry, B; Van Duijkeren, E; Pomba, MC; Greko, C; Moreno, MA; Pyorala, S and Torneke, K 2010.** Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals, epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol. Infect.*, 138: 626- 644.
29. **Chen CH, Weng M, Wu CH, Lin J. 2004.** Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evid Based Complement Altern Med*. 1(2): 175-185.
30. **Chirent Mylène. 2015.** Les alternatives à la castration chirurgicale chez l'étalon ; Thèse Présentée à l'université Claude Bernard – Lyon.
31. **Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G, Maxwell WMC. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. Anim Reprod Sci 2008; 108:298–308.**
32. **Cocchia, N., M. Pasolinia, R. Mancinib, O. Petrazzuoloc, I. Cristofarod and I. Rosapane. 2011.** Effect of SOD (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 75(1): 1201-1210.
33. **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.
34. **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

35. **Dadoune 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.
36. **Daels P.F. 2003.** New technics of artificial insemination in the mare. In: Belgian Equine Practitioners Society (Ed.), Proceedings de la 20^e journée d'étude de la Belgian Equine Practitioners Society, Bruxelles.
37. **Day John G. et Stacey Glyn N. 2007.** Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Second Edition. Humana Press Inc. 365p.
38. **Delphine, Marie, Ghislaine Fehrenbach. 2003.** L'éventration post-castration chez le cheval ; Thèse Présentée à la faculté de médecine de Créteil.
39. **Drion P-V, Beckers J.F, Ectors F, 1993.** « Physiologie de la reproduction ». Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire Dumont P., 1997. « Point Vétérinaire ». Vol 28. N°185, Août –Septembre.
40. **Dumon Christian. 2007.** insémination artificielle dans l'espèce canine : Actualités. Bull. Acad. Vét. France. Tome 160 - N°2.
41. **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.
42. **El-Nattat, WS; El-Sheshtawy, RI; El-Batawy, KA; Shahba, MI and El-Seadawy, IE 2016.** Preservability of buffalo bull semen in tris-citrate extender enriched with bee's honey. J. Innov. Pharm. Biol. Sci., 3: 180-185.
43. **El-Sheshtawy RI, El-Nattat WS, Sabra HA, Ali AH. 2014.** Effect of honey solution on semen preservability of local breeds of cattle bulls. Wld Appl Sci J. 32(10): 2076-2078.
44. **Fakhrildin MB, Alsaadi RA. 2014.** Honey supplementation to semen freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. J FAM Reprod Health; 8(1): 27-31.
45. **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 (2^{ème} édition).
46. **G. Decuadro-Hansen. 2004.** La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal Chilled and frozen semen : the animal experience.
47. **Gadella B.M. 2008.** Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. Anim. Reprod. Sci., 107, 229-236.
48. **Gadella, B. M., R. Rathi, J. F. Brouwers, T. A. A. Stout et B. Colenbrander. 2001.** Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. Anim Reprod Sci. 68 : 249-265.
49. **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.
50. **George G. 1996.** « Cours d'histologie ». Cours du PCEM.
51. **Gil L, Mascar óo F, Mur P, Gale I, Silvia A, Gonz ´alez N, et al. 2010.** Freezing ram semen: the effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on post-thaw sperm motility. Reprod Domest Anim. 45: 91.
52. **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:

Références bibliographiques

- convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. Hum. Reprod. 15, 335-343.
53. **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.
54. **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.
55. **Hanzen C. 2006.** « Propédeutique de l'appareil reproducteur mâle et examen du sperme des ruminants, équidés et porc ». Cours de reproduction, université de Liège, Belgique.
56. **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.
57. **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.
58. **Henry, M., Snoeck, P. and Cottorello, A. 2002.** Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. Theriogenology 58(2): 245-248.
59. **Henry, M., Snoeck, P. and Cottorello, A. 2002.** Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. Theriogenology 58(2): 245-248.
60. **Heymon Y., Vignon X. 2005.** Reproduction des animaux d'élevage. Educagri.
61. **Hoffmann, N., H. Oldenhof, C. Morandini, K. Rohn and H. Sieme. 2011.** Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. Animal Reproduction Science 125(1-4): 112- 118.
62. **Hoogewijs M., Rijsselaere T., De Vlieghe 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.
63. <https://slideplayer.fr/slide/3395368/> , consulté le 29/05/2019.
64. **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.
65. **Jerez R, Gil L, González N, Luño V, Olaciregui M, Martínez F, et al. 2013.** Rosemary honey as natural energetic source on refrigeration ram semen. Reprod Dom Anim. 48: 1.
66. **Jerez R, González N, Olaciregui M, Luño V, de Blas I, Gil L. 2016.** Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. Small Rumin Res, 134:34-38.
67. **Jerez-Ebensperger R, Gil L, Gonzales N, De Blas I. 2015b.** The combined effect of use of honey, garlic (*Allium Sativum* L.) and skimmed milk as an extender for chilling sheep semen. Cryo Lett; 36(4): 243-251.
68. **Jerez-Ebensperger RA, Luño V, Olaciregui M. 2015.** González N, Blas I de, Gila L. Effect of pasteurized egg yolk and rosemary honey supplementation on quality of cryopreserved ram semen. Small Rumin Res; 130: 153-156.

Références bibliographiques

69. **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).
70. **Johnson L., Blanchardt. L., Varnerd. D., Scrutchfiled W. L. 1997.** “Factors Affecting Spermatogenesis in the Stallion.” *Theriogenology* 48(7), 1199–1216.
71. **Johnston S.D., Root Kustritz M.V. ET Olson P.N.S. (2001).** Canine and Feline Theriogenology. Saunders Company. 592p.
72. **Juan C. Samper, 2009.** Equine breeding management and artificial insemination. Second edition, 299p (p34).
73. **Kankofer, M., G. Kolm, J. Aurich and C. Aurich. 2005.** Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology* 63(5): 1354-1365.
74. **Kantor Z, Pitsi G, Thoen J. 1999.** Glass transition temperature of honey as a function of water content as determined by differential scanning calorimetry. *Agric Food Chem.* 47: 2327-2330.
75. **Katila T.1997.** Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology.* 48(7) 1217-27. **Knobil E, Neill JD. 1999.** Spermatozoa In: *Encyclopedia of Reproduction.* Volume 4 (Pro- Z); 586-596.
76. **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.
77. **Leeb H., Rennhofer G. 1954.** Ueber die Beurteilung der Vitalität menschlicher Spermien mit der Eosin-Nigrosin-Färbung nach Blom. *Wien. Med. Wochenschr*, 104, 877-878.
78. **Loomis P.R. 2006.** Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 22, 663-676.
79. **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.
80. **Mantovani, R., A. Rota, M. Falomo, I. Bailoni, and I. Vincenti. 2002.** Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reproduction, Nutrition and Development* 42(3): 217-226.
81. **Manyi-Loh CE, Clarke AM, Ndip RN. 2011.** An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *Afr J Microbiol Res.* 5: 844-852.
82. **Marc Stéphanie. 2015.** Thèse : Actualités En Cryoconservation Des Semences Des Principales Espèces D'intérêt Vétérinaire, Université CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie).
83. **Marie Allimant. 2010.** Thèse: Actualités sur les méthodes d'évaluation de la Qualité de la semence de l'étalon. Université Claude-Bernard - Lyon I.
84. **Mazur, P. 1968.** Physical and chemical changes during freezing and thawing of cells, with special reference to blood cells. *Bibl Haematol* 29 764-77.
85. **Mc. Donald Me. 1980.** « Veterinary endocrinologie and reproduction ». Lea ET Febiger edition 3rd 560p. **Albert et Jean. 2001.** « Biologie du développement » .5^{ème} édition de l'abrégé.
86. **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.

Références bibliographiques

87. **Mckinnon A.O., Squires E.L., Vaala W., Varner D.D. 1993.** Equine Reproduction Second Edition. London, Wiley-Blackwell. (3288p).
88. **Medeiros, A., G. Gomes, M. Carmo, F. Papa and M. Alvarenga. 2002.** Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58(2): 273-276.
89. **Meryman HT. 1971.** Cryoprotective agents. *Cryobiology*. 8:173-183.
90. **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.
91. **Mohamed Mahmoud Moustafa kaniel, Ahmed Reda Mohamed, 2017.** Elkhawagah Effect of honey supplementation on Egyptian buffalo semen.
92. **Moore A.J., Squires E.L., Graham J.K. 2005.** Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Therio-genology*, 63, 2372-2381.
93. **Morrell J.M. 2006.** Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod. Domest. Anim.*, 41, 63-67.
94. **Neild D.M., Brouwers J.F., Colenbrander B., Agüero 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.
95. **Neild DM, Chaves MG, Flores M, Miragaya MH, Gonzalez E, Aquero A: The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. Andrologia. 2000, 32: 351-315.**
96. **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.
97. **Noakes D.E., Parkinson timothy j. ET England G.C. 2009.** Veterinary reproduction and obstetrics. Ninth edition. Saunders Elsevier. 961p.
98. **Ogretmen F, Inanan BE. 2014.** Evaluation of cryoprotective effect of Turkish pine honey on common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Cryo Lett.* 35(5): 427-437.
99. **Olayemi FO, Adenigi DA, Oyeyemi MO. 2011.** Evaluation of sperm motility and viability in honey included egg yolk based extenders. *Glob Vet*; 7 (1): 19-21.
100. **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.
101. **Orsolich N, Basic I. Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. In: Singh VK, Govil JN, Arunachalam C, editors. 2007.** Recent progress in medicinal plants. USA: Studium Press LLC, p. 55-113.
102. **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.
103. **P.L. Senger, Ph. D. 2003.** Pathways to pregnancy and parturition; second edition; Chapter 3, p51 (367P).
104. **Padilla AW, Foote RH. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. J Anim Sci. 1991;69: 3308-3313.**

Références bibliographiques

105. **Parks, J. and J. Graham. 1992.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38(2): 209-222.
106. **Pérez, J., F. Mello, G. Juliani, M. Lagares, L. Lago and M. Henry. 2008.** Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Animal Reproduction Science* 5(3-4): 103-109.
107. **Pickett B.W. 1993.** Factors affecting sperm production and output. In : MCKINNON A.O., VOSS Chapitre 2 : physiologie de la reproduction de l'étalon : J.L. Equine Reproduction. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993, 689-699.
108. **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.
109. **Ponsart C., Joly C., Le Guienne B., Beaujean N., Le bourhis D., Gérard O., Mermillod P. et Locatelli Y. 2014.** Biotechnologies des gamètes et de l'embryon. In : SAINT-DIZIER M. et CHASTANT-MAILLARD S. La reproduction animale et humaine. Editions Quae. 752p.
110. **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.
111. **Prins G. 1998.** Semen, In: Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Knobil E., Neill J.D. Academic Press.
112. **Reece W.O. 1997.** Male Reproduction. In: Physiology of Domestic Animals. 2nde édition. Williams and Wilkins. 370p.
113. **Rezzi Léa. 2016.** Prise en charge des tumeurs de l'appareil génital chez les équidés ; Thèse présentée à l'université Claude Bernard – Lyon.
114. **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.
115. **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.
116. **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.
117. **Salazar, J. L. Jr, Teague, S. R., Love, C. C., Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., & Varner, D. D. (2011).** Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology*, 76, 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.016>.
118. **Salisbury GW, Van Demark NL, Lodge JR. 1978.** Extenders and extension of unfrozen semen. In: Salisbury GW (Ed.). *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. San Francisco, CA: W.H. Freeman. pp. 442-493.
119. **Senger P.L. 2005,** Pathways to pregnancy and parturition. *Current Conceptions: Pullman*, 373 p.
120. **Shoenian S, 2005.** «Reproduction in the ram». Prolongation de coopérative du Maryland. Université de Maryland.
121. **Sieme, H., G. Martinsson, H. Rauterberg, K. Walter, C. Aurich, R. Petzoldt and E. Klug. 2003.** Application of techniques for sperm selection in fresh

Références bibliographiques

- and frozen-thawed stallion semen. *Reproduction of Domestic Animals* 38(2): 134-140.
122. **Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016.** Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem*, 196:309-323. Warriach HM.
123. **Snedecor GW, Cochran WG. 1989.** *Statistical methods*. 8th ed. Ames, IA, USA: Iowa State Univ.
124. **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.
125. **Squires, E., S. Keith and L. Graham. 2004.** Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62(6): 1056-1065.
126. **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).
127. **Thibault C, 1975.** « La fécondation ». 1 vol. Masson 1995. 20.
Thibault C, Beaumont A, Levasseur M-C. 1998. « La reproduction des vertébrés ». Edition MASSON, Paris.
128. **Thibault C. 2001.** *La reproduction chez les mammifères et l’homme*. Ellipses.
129. **Tibary, A., Bakkourym. 2005.** *Equine Reproduction. Tome2. L’étalon. Vol.2.* Actes Éditions. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Maroc, 554p.
130. **Vaissaire J-P. 1977.** *Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires*. Maloine S.A. éditeur. 457p.p81-155.
131. **Varner D.D.** Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology*, 70,704-714.
132. **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.
133. **Varner DD. 2008.** Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*; 70:448-62.
134. **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.
135. **Vidament M., Yvon J.M., Couty I., Arnaud G., Nguekamfeugang 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.
136. **Vlasiu, T., I. Groza, I. Morar and R. Catana. 2008.** The effect of different freezing procedures on sperm head morphometry in stallions. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* 65(2): 146-151.
137. **Waite J.A., Love C.C., Brinsko S.P., Teague S.R., Salazar J.L., JR., Mancill S.S. 2008.**

Références bibliographiques

138. **Wessel MT, Althouse GC. 2006.** Validation of an objective approach for simultaneous assessment of viability and motility of fresh and cooled equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*; 94:21-2.
139. **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.
140. **Zoheir, KMA; Harisa, GI; Abo-Salem, OM and Ahmad, SF. 2015.** Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 28: 973-981.