

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة ابن خلدون تيارت
Université Ibn Khaldoun Tiaret
معهد علوم البيطرة
Institut des Sciences Vétérinaires
قسم الصحة الحيوانية
Département de Santé 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 :

Belakhdar hadj eddine mohamed

Seghier Djamel eddine Houssam

Boumegouas Ibrahim Anes

Thème:

***L'insémination artificielle chez la
jument***

Jury :

President: Saim Said
Encadreur: Ayad Mohamed Amine
Examineur I: Hallouz Hadj Feghoul
Examineur II: Derrar Sofiane

Grade :

MCA
MCA
MCB
MCA

Année universitaire 2019 / 2020

Remerciement :

Je remercie Allah de nous avoir donnés le courage, la patience et pardessus de tout la sante de mener à réaliser ce modeste travail.

Bien sûr nous tenons avant tout à remercier notre encadreur " Dr. Ayad Mohamed Amine", pour sa disponibilité, son encouragement et ces conseil.

Nos remerciements vont également vers tous ceux qui nous ont permis de mener à bien ce travail: les collègues de l'institut vétérinaire de TIARET et nos amis.

Enfin, nous exprimons toute notre reconnaissance envers nos proches, qui ont eu la tâche ardue de nous supporter pendant ces années parfois entrecoupées de moments difficiles !

Nos parents, pour leur soutien logistique et moral continu, on leur est infiniment redevable. Nos familles: pour leur aide inestimable : sans eux notre travail aurait été beaucoup plus difficile.

Dédicace :

Je tiens à remercier Allah pour m'avoir guidé ou je suis aujourd'hui, et m'avoir montré la voie quand j'étais perdu.

Je dédie ce modeste travail de fin d'étude :

A ma Mère qui a veillé mes nuits, qui m'a tant soutenue avec ses prières, qui m'a toujours

Encouragé et qui a tout fait pour m'avoir un jour réussir.

A ma grande mère, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie

Je tiens à remercier mon cher père (Allah yerhmeh)

A mon encadreur Dr. Ayad Mohamed amine.

A mes Frères : youcef et Mohamed kenouch djemel et anes mohamed et abdelfetah mousa

A Mes très chères soeurs

Ma famille «TAIBI et BELAKHDAR » pour leur aide.

A mes trinôme : djamel et anes mes frères

A mes amies : mehdi boumelik wahab mouade abdo

A mes petits anges maria et asma.

Dédicace

Je tiens à remercier Allah pour m'avoir guidé ou je suis aujourd'hui, et m'avoir montré la voie quand j'étais perdu.

Je dédie ce modeste travail de fin d'étude :

A ma chère mère, pour leur soutien et encouragement incessant jusqu'à maintenant et même dans les années qui viendront, je ne pourrai jamais repayer votre bien envers moi, un très très grand merci.

A ma grande mère, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.

A mon père, qui a sacrifié sa jeunesse pour me soutenir et m'encourager.

A ma fiancée depuis que je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler, tu me voulais toujours le meilleur.

A mon frère : Alaa eddine.

A ma petite sœur.

A mes amis : Boumelik, Wahab, mahdi

A mes compagnons : mohamed et anes mes frères

A mon encadreur Dr. Ayad Mohamed amine.

A tous les membres de la famille (Seghier et Belefeddal), petits et grands Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

Dedicace :

Je tiens à remercier Allah pour m'avoir guidé ou suis'je aujourd'hui, et m'avoir montré la voie quand j'étais perdu.

Je dédie ce modeste travail de fin d'étude comme lettre de reconnaissance

A ma mère, à cette femme qui a souffert sans me laisser souffrir , qui n'as jamais dit non à mes exigences et qui n'as épargné aucun effort pour me rendre heureux

A la mémoire de mon père qui nous à quitté voilà 3 ans . j'aurais tant aimé que tu sois présent . Que dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde .

*A mes frères pour leur appui et leur encouragement
A ma femme d'avoir toujours était la pour moi.*

Et un grand remerciement à mon encadreur : Dr. Ayad mohamed amine pour sa disponibilité et ces conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion . Et sans oublier mes camarade ,mes confrères et mes compagnons Mohamed et Djamel pour leur soutien.

A tous les membres de la famille (Boumegouas et Achour), petits et grands Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

Sommaire :

Remerciement :	2
Dédicace :	3
Sommaire :	6
Liste des figures :.....	9
Liste des tableaux :.....	10
I .Introduction :	11
II. Chapitre I : insémination artificiel.....	14
1. Historique :.....	15
2. Avantage :.....	15
3. Inconvénients :.....	16
3.1 Au niveau génétique :	16
3.2 Au niveau du coût :	16
4. types d'inséminations :.....	17
4.1 Définitions :	17
5. Insémination artificielle en semence fraîche :.....	17
5.1 Le choix de la technique :	18
5.2 Préparation de la semence :	18
6.1 .Dilution :.....	19
6.1.1. Introduction :.....	19
6.1.2. Les Dilueurs :	19
7. Insémination artificielle en semence réfrigéré :.....	19
7.1 Deux façons :.....	20
8. Insémination artificielle en semence congelée :	20
9. Insémination artificielle à petit volume :.....	20
9.1 Pourquoi utiliser une faible dose d'insémination :	21
9.2 Techniques d'insémination :.....	22
9.2.1 Insémination corne profonde guidée par voie rectale :.....	22
9.2.2 Avantages et inconvénients :	23
10. Insémination artificielle par endoscope :.....	24
10.1 Utiliser un endoscope :.....	24
10.2 Technique - Insémination hystéroscopique :	25

III. Chapitre II : la cryoconservation de la semence :	30
1. Introduction :	31
2. Traitement de semence pour la congélation :	31
3. Procédures standard pour la collecte de sperme :	32
4. Dilution du sperme après la collecte :	33
5. Comment concentrer le sperme :	34
5.1 Ajout du milieu de congélation :	37
5.2 Emballage :	39
5.3 Courbes de congélation :	39
6. Analyse du sperme après-décongélation :	40
7. Insémination à l'aide de sperme congelé :	41
8. Stratégies pour améliorer la qualité de la semence :	42
9. Congélation semence épидидymaire :	43
9.1 Techniques pour récupérer le sperme de l'épididyme :	44
9.2 Technique de rinçage et de flottation rétrograde :	44
9.3 Méthode de flottation :	45
9.4 Étapes de la cryoconservation du sperme épидидymaire :	45
IV. La partie expérimentale :	46
1. L'objectif du travail :	47
2. Lieu et période de l'étude :	47
3. Animaux de l'expérimentation :	47
3.1 Etalons :	47
3.2 Juments :	47
3.3 Matériel utilisé :	47
4. Préparation du vagin artificielle :	48
5. Méthode de récolte :	49
5.1 La préparation d'étalon :	49
5.2 La récolte :	50
5.3 Sélection des éjaculats pour l'insémination :	52
6. Manipulation de la semence et préparation des doses :	52
6.1 Evaluation des semences après la récolte :	52
6.2 Examen macroscopique :	53
6.2.1 Volume :	53
6.2.2 Couleur et aspect :	53

6.2.3 Détermination de la concentration :	53
6.3 Examen microscopique :.....	54
6.3.1 Mobilité massale :	54
6.3.2 Mobilité individuelle :	54
7. Protocole expérimentale :	54
8. Etapes d'insémination et de saillie :	54
8.1 Insémination artificiel :	54
8.1.1 Préparation de la jument :	55
8.1.2 Lavage de la jument :	55
8.1.3 La préparation des doses :	57
8.1.4 Insémination artificiel proprement dite :	58
9. Saillie naturel :	58
9.1 La Monte en main :	58
10. discussion.....	66
V. Conclusion.....	67
VI. Bibliographies	69

Liste de figures :

Figure 1 : Schéma de la technique d'insémination corne profonde guidée par voie rectale.....	22
Figure 2 : Vue hystérocopiquement de l'UTF et du cathéter d'insémination avant l'insémination	26
Figure 3 : Vue hystérocopiquement de l'UTJ et du cathéter d'insémination après insémination	26
Figure 4 : Étapes du processus de congélation du sperme	31
Figure 5 : vagin artificiel de type Colorado.....	32
Figure 6 : vagin artificiel de type Hanovre.....	32
Figure 7 : vagin artificiel de type Nishikawa.....	32
Figure 8 : Centrifugeuse	33
Figure 9 : Différences entre l'utilisation du coussin rouge et du liquide de coussin conventionnel pour centrifuger semence équine.....	35
Figure 10 : Étapes et conception schématique de l'utilisation du filtre à sperme pour éliminer le plasma séminal.....	36
Figure 11 : Représentation schématique de la morphologie, mobilité, concentration des spermatozoïdes.....	40
Figure 12 : Schéma du spermatozoïde normal et quelque anomalie pouvant être rencontrées.....	40
Figure 13 : Image du sperme avant et après centrifugation avec Equipure.....	42
Figure 14 : les étapes de préparation du vagin artificiel de type Missouri.....	48
Figure 15 : l'excitation de l'étalon en présence de la jument « boute-en-train ».....	49
Figure 16 : les étapes de la récolte de sperme.....	50
Figure 17 : le vagin artificiel acheminé au niveau de laboratoire.....	51
Figure 18 : un photomètre Minitube.....	52
Figure 19 : Lavage de la jument a la douchette par Savon anti septique.....	54
Figure 20 : Séchage par papier absorbent	56
Figure 21 : Jument bien nettoyée et sèche.....	56
Figure 22 : fiche de suivi de reproduction de jument	59
Figure 23 : fiche de suivi d'une jument inséminés par une saillie naturelle.....	60
Figure 24 : fiche de suivi d'une jument inséminés par une semence réfrigérer.....	61

Liste de tableau :

Tableau 1 : tableau récapitulatif des juments inséminée et suivies**62**

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des juments saillies et suivie**63**

I. Introduction

I. Introduction :

En un siècle, le cheval est progressivement passé d'animal de rente à animal de loisir.

Dans les deux cas, l'objectif de l'éleveur est presque toujours le même: obtenir un poulain par an et par jument. La durée de la gestation étant de 340 jours en moyenne, il ne dispose pour cela que de 25 jours après le poulinage pour que la jument soit à nouveau gestante. Cette nouvelle gestation peut être débutée en même temps que la jument allaite son poulain, puisque cette femelle est l'une des seules à ne pas connaître l'anoestrus de lactation.

Le cheval est traditionnellement considéré comme une espèce peu féconde: chaque année seules 55 à 65 % des juments mises à la reproduction donnent naissance à un poulain .

Pourtant, les conditions naturelles de reproduction du cheval ou « monte en liberté », sous la forme de troupeaux de 10 à 15 juments vivant en plein air avec un étalon, donnent d'excellents résultats, soit environ 85 % des juments qui poulinent par an. Cette méthode d'élevage n'est cependant pas accessible aux animaux de valeur en raison du risque d'accidents et du nombre insuffisant de juments servies par un même étalon. Elle n'est pas réalisable non plus pour les petits éleveurs ne disposant ni d'un étalon ni d'un nombre suffisant de juments pour constituer un troupeau.

La fécondité annuelle du cheval n'est donc pas seulement due à des particularités intrinsèques à l'espèce, mais également à notre gestion de sa reproduction.

En effet, les contraintes imposées sont nombreuses :

L'inadéquation de la saison officielle de monte, qui s'étend chaque année du 15 février au 15 juillet avec la saison naturelle des juments, dont la première ovulation de l'année se produit physiologiquement début mai.

Cette saison de monte est cependant justifiée par des raisons économiques, l'objectif des éleveurs étant le plus souvent d'obtenir un poulain par an et par jument, et que ces poulains naissent le plus tôt possible. En effet, la date du premier janvier est celle qui sépare les poulains qui s'affronteront plus tard par classes d'âge en courses ou en compétitions sportives.

Les poulains nés tôt ont significativement des meilleures performances que les poulains tardifs, et les poulains de boucherie précoces sont eux aussi avantagés par leur poids et leur

niveau de développement a la vente d'automne Ces performances sont imputables à la différence d'âge réelle entre les poulains, à laquelle s'ajoute un effet "milieu".

L'éloignement géographique des juments et des étalons.

Les premières passent l'hiver chez leur éleveur, qui ne possède le plus souvent pas d'étalon, et y restent souvent pour des raisons économiques le plus tard possible. Elles peuvent

être en boxe mais parfois aussi au pré, ce qui ne facilite pas la détection des chaleurs.

Elles ne sont souvent conduites au haras que lorsque les premières chaleurs ont été constatées, et donc la première ovulation est passée: le premier cycle est donc inutilisable.

Les techniques actuelles de reproduction, qui favorisent l'insémination artificielle : si celle-ci permet en effet de servir un plus grand nombre de juments par un même étalon, et de diffuser sa semence à un niveau national voire international, ses résultats en terme de fertilité par cycle sont moins bons que ceux de la monte en main.

L'étude des causes de l'infécondité permet de définir des points clés sur lesquels il est possible d'agir soit au niveau de l'élevage, avec ou sans l'intervention du vétérinaire, soit au niveau du haras.

L'objectif de ce travail est donc d'étudier la qualité du sperme et les déficient technique de l'insémination.

L'étude bibliographique expose essentiellement :

-Rappelle anatomique et physiologique de l'appareil génital de la jument.

- les aspects techniques de l'insémination artificielle (IA).

-les modalités de préparation et d'évaluation de la semence.

- et l'étude expérimentale expose essentiellement :

L'étude comparatif entre les juments qui insémine naturellement et les autre qui insémine artificiellement en l'institut vétérinaires IBN-KHALDON Tiaret.

II. chapitre I

1. Historique:

Au XIV^e siècle les Arabes ont utilisé l'insémination artificielle chez le cheval. Les premières tentatives en France ont eu lieu en 1887 avec Benoit et Repiqué. Ivanov Et l'école russe en 1912 sont à l'origine des premières applications pratiques (Nicolich, 1989). La reproduction du cheval a été étudiée dans les années 1950 par Nishi kawa au Japon qui a mis au point les premiers dilueurs pour la semence d'étalon (Nishi kawa, 1975). En France, l'INRA a mené des recherches sur l'insémination Artificielle des équidés à partir de 1978, dans le laboratoire d'Eric Palmer à la station de physiologie de la reproduction de Nouzilly (près de Tours). A partir de 1980, des Juments ont été inséminées en Bretagne (Fauquenot, 1987 ; Magistini, 1990). La congélation du sperme a été étudiée dès 1951-1953 par Skatin de l'Institut du cheval

À Moscou (Nicolich, 1989). En 2009, 70 % des juments sont inséminées en France. Les *haras nationaux* hébergent des étalons et ont parfois une jumenterie annexe pour assurer la reproduction des équidés soit par insémination, soit par saillie naturelle. Ils interviennent au niveau de 24 pôles hippiques répartis sur la France.

En Algérie l'insémination artificielle équine est pratiquée à moindre échelle dans les différents secteurs qui s'occupe du cheval mais des tentatives par les instituts vétérinaires et les centres de reproduction des équidés font l'objet de différentes études et pratiquent l'insémination artificielle la congélation des semences d'étalons élités.

Ce sont maintenant des prestataires de service pour les éleveurs, les organisations socioprofessionnelles et les collectivités territoriales. (meyer, 2009)

2. les avantages

L'insémination artificielle présente de nombreux avantages par rapport à la monte naturelle.

Elle permet :

- Un meilleur contrôle sanitaire des reproducteurs (pas de contact direct entre les étalons et les poulinières),
- Une accélération du progrès génétique (en multipliant la descendance d'un étalon de qualité),
- L'utilisation de reproducteurs très éloignés géographiquement,

- L'utilisation d'étalons exclus de la monte en main pour des raisons de caractère (étalons trop violents ou à la libido peu marquée), d'âge (trop âgés) ou de maladies (dorsalgie),
- Une diminution du risque d'accident lié au transport des reproducteurs,
- La possibilité pour l'étalon de poursuivre une carrière sportive en parallèle d'une carrière de reproducteur...
- augmenter le nombre de juments par étalon et ainsi obtenir un progrès génétique plus important, (ifce, avril 2014)

3. Les inconvénients :

3.1 Au niveau génétique

- Le risque consanguinité se pose si les étalons en IA font beaucoup plus de poulains que les autres étalons. il faut que les étalons fassent 10 fois plus de poulains qu'actuellement pour ressentir un faible effet sur la consanguinité.
- Les doutes sur la certification des origines sont levés par les deux mesures suivantes : identification de toutes les doses et contrôle de filiation obligatoire des poulains issus d'IA

3.2 Au niveau du coût

Le surcoût lié à la technique, de la récolte au conditionnement des doses (formation du personnel, investissement matériel, temps, frais de transport de la semence, ...)

- Pour son application, l'IA nécessite une technicité supérieure à la monte en main. D'où un coût financier plus élevé en personnel qualifié et en matériel.

3.3 Au niveau technique

La manipulation de la semence en dehors des voies génitales des reproducteurs augmente le risque d'atteinte de la fertilité :

- Il existe une grande variabilité individuelle entre étalons sur l'aptitude de la semence à être conservée. les différentes techniques ne sont pas applicables à tous les étalons : 40% des étalons de trait et 75% des étalons de sang seraient utilisables en sperme réfrigéré ; les 2/3 des étalons de sang sont congelables.
- La fertilité par chaleur en IAC est inférieure à celle de la monte en main ou de l'IAF.
- L'IAC demande un suivi ovarien intensif à cause de la limitation du nombre de dose.

- Un risque de mauvaise application des techniques est possible avec des répercussions soit sur le pouvoir fécondant de la semence, soit sur l'hygiène des doses et de leur mise en place

4. types d'inséminations :

4.1 Définitions :

1. **IA en frais** : l'IA est réalisée sur place, immédiatement après la récolte de sperme,
2. **IA réfrigérée** : concerne en fait toutes les IA différées mais non congelées. Il est alors nécessaire de préciser le temps pendant lequel les doses ont été conservées (12h, 24h, 48h...), sachant qu'en France, la majorité des doses sont utilisées dans les 12h. (ifce, avril 2014)
3. **IA congelée** : la semence est congelée dans l'azote liquide (-196°C) et utilisée après avoir été conservée plus ou moins longtemps, (ifce, avril 2014)

5. Insémination artificielle en semence fraîche: (equine, 1999)

(immédiate et différée)

Lorsque l'IA est faite immédiatement après la collecte, la semence est utilisée pure (IA dans les 5 minutes qui suivent la collecte) ou après dilution à la température de 37 °C dans du lait semi-écrémé UHT (IA dans les 30 minutes qui suivent la collecte). Cette technique permet d'obtenir, avec des doses d'IA de 200.10^6 spermatozoïdes totaux. Lorsque l'IA est différée, la semence est systématiquement réfrigérée et conservée à 4 °C dans du lait demi-écrémé UHT supplémenté d'antibiotiques lorsque la durée de conservation est inférieure à 12 h et dans le milieu INRA96 ou le milieu de Kenney quand la conservation dure de 12 à 24 h. La dose d'IA est également de 200.10^6 spermatozoïdes totaux. Que l'on pratique l'IA immédiate ou différée (dans la journée), les juments sont suivies à la barre (détection des chaleurs) et inséminées toutes les 48 heures jusqu'à l'ovulation constatée par échographie ou jusqu'au refus, c'est-à-dire jusqu'à la fin des chaleurs détectée par l'étalon. Lorsque la conservation n'excède pas 12 heures L'IA différée de plus de 12 h est utilisée de façon ponctuelle sur le terrain et peu de résultats fiables sont disponibles. A l'étranger les milieux de dilution de la semence sont à base de lait et le milieu le plus utilisé est celui de Kenney (Kenney et al 1975) avec certaines variantes qui portent sur la quantité d'antibiotiques et sur des additifs (jaune d'œuf, sucres, substances tampons, activateurs de la mobilité, etc). La température de

conservation la plus utilisée est 4 °C et les juments sont inséminées avec des doses contenant de **250 à 500.10⁶** spermatozoïdes dits progressifs, c'est-à-dire dont la trajectoire est rectiligne. Une telle dose correspond à environ **700.10⁶** spermatozoïdes totaux.

5.1 Le choix de la technique :

Différentes techniques d'insémination artificielle en semence fraîche sont utilisées. Toutes ne sont pas égales en efficacité et la gestion des juments varie. C'est pourquoi il est indispensable de prendre en compte le plus de paramètres possibles afin de faire le bon choix de la technique employée en fonction de la poulinière. (I. Barrier, P.Doligez 2017).

5.2 Préparation de la semence :

Le nombre de spermatozoïdes par dose ne doit pas descendre en dessous de **200.10⁶** spermatozoïdes totaux. En cas de quantité de semence insuffisante, les juments prioritaires (proches de l'ovulation) seront servies dans un premier temps. Il est possible de récolter l'étalon une 2^{ème} fois dans la journée pour les juments non servies.

- La technique d'IA immédiate doit être préférée pour tous les étalons utilisés sur place.
- La technique « sperme pur partagé » est utilisée lors de collectes avec 1 ou 2 juments à servir. Les juments doivent être inséminées dans les 5 minutes qui suivent la récolte.
- La technique 2/3 (lait) - 1/3 (semence) ne permet pas la conservation de la semence. Si une jument retardataire se présente, il faut récolter l'étalon à nouveau. La technique de dilution à 20.10⁶ spermatozoïdes /ml par dose permet à la fois la mise en place immédiate et la conservation de la semence diluée quelques heures (jusqu'à 24h). Pour inséminer dans la journée de récolte, la technique d'une dose IAF de 200 millions de spermatozoïdes diluée dans 10ml est la plus couramment utilisée. Les doses sont majoritairement réalisées dans des seringues de 20 ml sans air, bouchées et insérées dans un manchon de protection. Le tout est entreposé à 4°C jusqu'à l'insémination. L'étiquetage des doses est primordial dès le début des manipulations.

Remarque: les doses peuvent aussi être conditionnées dans des tubes de 10 ml pour le transport.

6.1 Dilution :

6.1.1 Introduction:

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 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.

6.1.2 Les Dilueur:

Un diluer 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. Les principaux à l'heure actuelle sont

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

7. Insémination artificielle en semence réfrigéré (equine, 1999)

La température de 4 °C est couramment utilisée lors d'IA de semence fraîche différée.

Cependant la réfrigération de la semence de 37 °C à 4 °C met en jeu des remaniements des membranes des spermatozoïdes qui sont regroupés sous le terme de " choc froid " (" cold shock ").

Ceci provoque une cascade d'événements qui aboutissent à la perte du pouvoir fécondant et à la mort des cellules. Une des conséquences de ce " choc froid " est l'oxydation des membranes des spermatozoïdes.

Il est possible de limiter ces dégradations de ;

7.1 deux façons:

1. par la conservation des spermatozoïdes à une température plus élevée
2. par l'apport d'agents antioxydants dans les milieux de conservation.

Afin de limiter les effets néfastes de la descente de température jusqu'à 4 °C, des études sur la conservation des spermatozoïdes à des températures supérieures ont été réalisées. Certaines études de comparaison (5 °C vs 20 °C) réalisées aux Etats-Unis font état de résultats contradictoires. Par méthodes de diffusion. Il est donc indispensable de poursuivre les efforts entrepris afin de mieux maîtriser les éléments indispensables à une survie optimale des spermatozoïdes *in vitro* et au maintien de leur fertilité

8. Insémination artificielle en semence congelée (equine, 1999)

Les orientations actuelles portent sur l'apport de différentes molécules dans le milieu de congélation.

L'addition d'un acide aminé, la glutamine, améliore significativement la mobilité post-décongélation des spermatozoïdes *in vitro* ; un éventuel effet sur la fertilité est actuellement testé.

Cependant le mécanisme d'action de cet acide aminé n'est pas élucidé.

Une autre approche consiste à modifier la composition de la membrane des spermatozoïdes afin de la rendre plus résistante aux effets du froid.

L'apport de liposomes composés de cholestérol-phosphatidylsérine dans le milieu donne des résultats contradictoires tant en terme de mobilité que de fertilité.

Récemment l'incubation de spermatozoïdes avec une molécule "transporteur" de cholestérol a permis d'améliorer la mobilité des spermatozoïdes à la décongélation, mais l'effet sur la fertilité n'a pas encore été testé.

9. Insémination artificielle à petit volume :

Données générées au début des années 70 par des enquêteurs du Colorado a suggéré que l'insémination des juments avec une dose contenant 500 millions de spermatozoïdes

progressivement mobiles avec du sperme frais et du sperme refroidi maximiserait fertilité des étalons. Bien que le nombre d'étalons dans ces études fussent trop petites pour tirer ces conclusions, ce nombre a été largement accepté comme l'industrie Standard. (JL P. B., 1980)

Impressions cliniques et extrapolation de la recherche Provenant du bovin ont suggéré Que les juments peuvent être fécondées avec moins de Dose traditionnelle. Bien que 500 à 1 000 millions de spermatozoïdes Depuis des années comme dose standard pour les produits frais ou Le sperme refroidi, respectivement, et il est largement admis que la fertilité des spermatozoïdes d'étalons congelés-décongelés est inférieure que celle du sperme frais, de la moitié au cinquième des une dose de sperme frais est suggérée pour atteindre niveaux de fertilité avec du sperme équin congelé. Un empirique une dose de 200 à 250 millions de spermatozoïdes progressivement mobiles a été suggéré comme dose standard pour maximiser taux de grossesse avec du sperme congelé équin. (Wagtendonk, 1998)

Cependant, au cours des dernières années, l'industrie équine met en œuvre différentes procédures d'insémination pour déposer un nombre de spermatozoïdes chez l'inséminé.

9.1 Pourquoi utiliser une faible dose d'insémination

Bien qu'il semble contradictoire de réduire le nombre de spermatozoïdes déposés dans une jument en essayant de maintenir un haut niveau de fertilité, il existe plusieurs raisons pour lesquelles les cliniciens et les éleveurs ont essayé de mettre en œuvre cette technologie dans un programme d'élevage.

1. Bien que la plupart des étalons surproduisent du sperme pour leur la demande, l'utilisation croissante de la cryopréservation équine le sperme ainsi que les stratégies de commercialisation, le coût d'une dose d'insémination et / ou l'incapacité de quelques étalons pour faire face à leur demande de produits frais sperme;
2. L'application de techniques de tri par sexe sperme (JL B. B., 2000)
3. Même s'il n'est pas communément fait, l'utilisation de spermatozoïdes épидидymites pour l'insémination juments nécessite un inséminé à faible volume qui atteint de meilleurs résultats lorsqu'ils sont déposés près de l'oviductale Papille
4. La possibilité d'augmenter les taux de gestation des jumeaux à faible fertilité utilisant du sperme congelé
5. L'insémination des juments avec des spermés transportés refroidi lorsque la qualité du sperme n'est pas optimale
6. la réduction de l'inflammation utérine réaction post-reproduction ont été proposés comme principaux raisons de l'utilisation et de la mise en œuvre de faibles doses et

techniques d'insémination des cornes profondes dans l'industrie équine. Cependant, une fois qu'il a été établi que les taux de grossesse avec un nombre de spermatozoïdes inférieur pourrait atteindre acceptable les taux de grossesse, la réduction du nombre de spermatozoïdes et le fractionnement des doses d'insémination a été mise en œuvre en milieu clinique. (Rigby SL, 2001)

7. Cela est dû en partie à propriétaires et agents d'étalons, commercialisation à prix élevé services d'étalons à la dose. Tant que le cheval de sport l'industrie permet l'enregistrement de plusieurs progéniture d'une dose de sperme vendu au lieu de vendre un poulain vivant ou une garantie de grossesse, les propriétaires de juments continuer à essayer de maximiser l'argent investi dans un dose de sperme congelé.

9.2 Techniques d'insémination (m.tischner, 1992)

9.2.1 Insémination corne profonde guidée par voie rectale

Le placement du cathéter est effectué en introduisant un Pipette flexible de 65 cm de long (Mini tube, Tieffenback, Allemagne) dans le corps utérin. La main des inséminateurs est retirée du vagin et introduit dans le rectum préalablement évacué. La pointe de la pipette est identifiée et avancé par manipulation rectale et légère pression vers la pointe de la corne ipsilatérale à l'ovaire qui a le follicule pré ovulatoire. Une fois la pipette est placée à l'endroit souhaité, une paille de sperme est insérée dans la pipette et un piston en acier flexible (Mini tube) est utilisé pour pousser la paille à la pointe de la corne de sorte que l'extrémité ouverte de la paille se loge dans un embout de pipette comme une saillie évitant tout dos rinçage du sperme dans la lumière de la pipette. Si plus qu'une paillettes est utilisée pour une insémination, l'acier le piston est retiré avec la paille et le processus est répété sans retirer la pipette. Sédation de la jument est rarement nécessaire.

Insémination hystéroscopique (HI) Un vidéo endoscope flexible préchauffé de 1,2 m ou 1,6 m préalablement stérilisé au glutaraldéhyde est inséré dans le corps utérin de la jument. L'opérateur d'endoscope enlève la main du vagin et la place dans le rectum précédemment évacué et identifie la pointe de l'endoscope. Par manipulation rectale, l'endoscope est avancé vers la corne désirée. Une fois l'endoscope est dans le tiers proximal de la corne souhaitée, l'utérus est légèrement distendu avec de l'air pour observer l'oviductale papille. Lorsque la papille est identifiée et l'endoscope est à proximité de celui-ci, le système d'administration (Low Dose Kit d'insémination; Mila International Inc., Erlanger, KY, USA), qui était auparavant chargé de sperme et placé dans le canal de biopsie de l'endoscope, est avancé pour

qu'il touche la papille. Le sperme est livré lentement sur la papille oviductale. Volumes de supérieure à 1 ml délivrée par voie endoscopique (généralement) couler le klaxon après la livraison, en particulier si le la lumière utérine est étroitement distendue avec de l'air. L'endoscope est rapidement retiré après la livraison de sperme. Légère la sédation de la jument est souvent effectuée procédure (Morris LH, 2000)

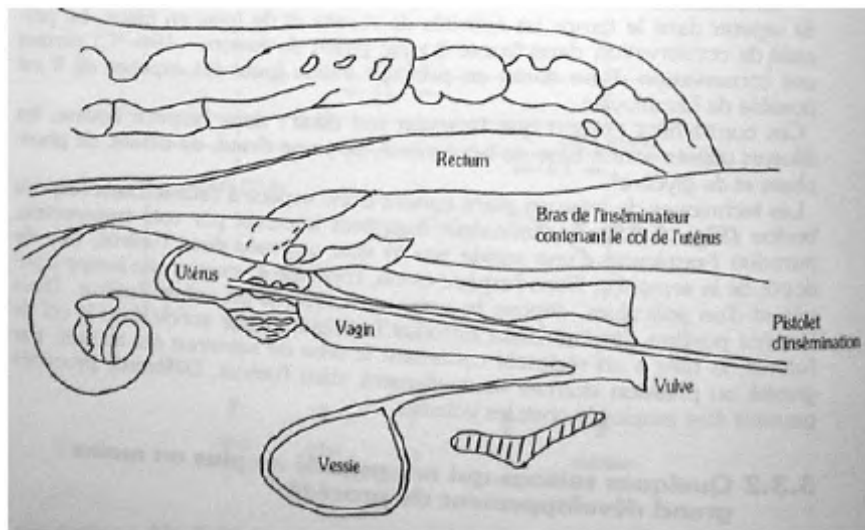


Fig.1 : Schéma de la technique d'insémination cornée profonde guidée par voie rectale (Pierre, 1992)

9.2.2 Avantages et inconvénients

La technique d'insémination cornée profonde guidée par voie rectale présente plusieurs avantages. C'est peu coûteux et seulement deux personnes sont requises tandis qu'au moins trois personnes sont nécessaires pour effectuer des inséminations hystéroscopiques. Avec l'expérience, les deux techniques peuvent être réalisées très rapidement. Insémination hystéroscopique si préformée en moins de 5 min ne provoque pas d'irritation ou de traumatisme de l'utérus. (Lyle SK, 2005)

Le principal inconvénient de l'IR est le risque de traumatisme à l'utérus ou le rectum lors des manipulations. De plus, il peut être difficile de manipuler le gros utérus d'un post-partum jument pour déposer le petit volume de sperme dans l'emplacement approprié, cependant, les principaux inconvénients de la technique HI sont le niveau de compétence nécessaire pour faire fonctionner l'endoscope, le travail intense requis à cause du nettoyage de l'instrument entre juments ainsi que le plus grand nombre de personnes nécessaires pour la procédure. Il a été proposé que la réaction inflammatoire induite après la reproduction est principalement due

au sperme cellules présentes dans l'inséminé. (Liu IK, 2008) Réduction du nombre de spermatozoïdes pour diminuer la l'incidence de l'endométrite après la reproduction a été signalé avec des résultats contradictoires. (Liu IK, 2008)

Ont signalé qu'il n'y avait pas d'inflammation supplémentaire avec l'utilisation de l'endoscope lui-même mais n'ont pas pu pour détecter une réduction du nombre de globules blancs quand un nombre élevé ou faible de spermatozoïdes ont été déposés dans l'utérus. Ont démontré que corne utérine profonde AI n'a causé aucune plus grande inflammation ou irritation que l'IA du corps utérin chez les juments normales 24 h après insémination. Cependant, les paramètres inflammatoires évalués n'étaient pas différentes chez les juments élevées avec 20 ou 200 millions de spermatozoïdes, à l'exception de la quantité d'utérus fluide qui était plus faible dans le groupe inséminé avec 20 millions de spermatozoïdes. D'autre part, dans une revue rapportée, un nombre inférieur de polymorphonucléaires cellules 24 h après la reproduction lorsque les juments se reproduisent avec 40 ou 800 millions de spermatozoïdes.

N'a signalé aucune différence de fertilité lorsque les juments normales ont été élevées avec une dose d'insémination standard ou faible. Cependant, la fertilité a diminué lorsque les juments où il a été élevé à faible dose et avait des antécédents de problèmes de reproduction. Les preuves aujourd'hui indiquent que la méthode d'insémination HI ou RI) en soi ne provoquer une inflammation utérine supplémentaire (Gu`venc K, 2005) et bien qu'il n'y ait pas de des preuves claires, la réduction de l'endométrite post reproduction en réduisant le nombre de spermatozoïdes doit être approfondi.

Les deux techniques d'insémination pourraient avoir des effets sur l'industrie du sang chaud. Tant qu'il est congelé le sperme est commercialisé internationalement par la dose et l'inscription des chevaux n'est pas obligatoire pour la compétition, l'utilisation commerciale de l'insémination à faible dose dans l'industrie des sangs chauds entraînera la production de plus de poulains dans le monde entier d'étalons particuliers qui pas générer le payme

10. Insémination artificielle par endoscope (horse&hound, 2005)

10.1 Utiliser un endoscope

Les endoscopes sont de longs tubes flexibles avec une source de lumière vive à l'extrémité. Ils permettent de visualiser les structures internes et sont couramment utilisés dans l'examen des voies respiratoires du cheval.

Il est possible de placer un endoscope dans l'utérus d'une jument à travers le vagin et le col de l'utérus de la même manière qu'un cathéter d'insémination. L'air passe ensuite à travers un canal de l'endoscope dans l'utérus, ce qui permet de voir l'intérieur de l'appareil reproducteur de la jument.

L'opératrice peut diriger doucement l'extrémité de l'endoscope dans l'utérus jusqu'à ce que l'entrée de l'oviducte (trompe de Fallope) soit atteinte. Un cathéter étroit spécial peut être passé dans un canal central à l'intérieur de l'endoscope, et la pointe du cathéter exposée au-delà de l'extrémité afin qu'il puisse être vu. En dirigeant soigneusement la pointe de l'endoscope, le cathéter peut être placé très près de l'entrée de l'oviducte.

Le sperme est ensuite expulsé du cathéter directement sur la surface de la papille. En utilisant cette technique, des taux de grossesse acceptables peuvent être atteints en utilisant aussi peu que cinq millions de spermatozoïdes. Cela représente une diminution au centuple du nombre habituel nécessaire.

En déposant le sperme si près du site de fécondation, la distance dont ils ont besoin pour voyager est réduite. De plus, l'exposition à l'environnement utérin potentiellement hostile est réduite. Ce sont les deux raisons les plus probables pour lesquelles le nombre de spermatozoïdes peut être considérablement réduit.

10.2 Technique - Insémination hystéoscopique (IVIS, 2004)

De toute évidence, une sélection appropriée des juments candidates à l'insémination à faible dose ainsi que la fertilité des étalons influenceront le succès de cette procédure. Les juments jeunes et fertiles sans antécédent d'endométrite post-reproduction sont des candidats optimaux.

Les juments plus âgées avec une mauvaise clairance utérine seront des candidats moins souhaitables et sont plus susceptibles d'avoir de la liquide intra-utérine accumulation après insémination hystéoscopique. Dans les études rapportées, l'incidence de l'accumulation de liquide intra-utérin varie. Dans les premiers rapports, jusqu'à 60% (6/10) des juments avaient une accumulation de liquide intra-utérin après la procédure (Liu, 1998) cependant, plus tard les rapports indiquent une incidence de 1% d'accumulation de liquide intra-utérin après insémination endoscopique

Équipement: L'utilisation d'un vidéo endoscope de 1,6 M avec un canal de fonctionnement facilite la visualisation de l'UTJ dans la plupart des juments.

Des endoscopes plus courts peuvent être utilisés; cependant, la longueur de l'endoscope peut limiter l'accès facile au canal de fonctionnement et à l'endoscope contrôles chez les juments plus grandes. L'entretien du canal de fonctionnement de l'endoscope est important pour garantir qu'aucun débris ne reste dans le après la procédure et pour s'assurer que tout le désinfectant chimique utilisé dans le traitement de l'endoscope est retiré.

Les petits volumes d'insémination utilisés dans cette procédure sont extrêmement sensibles aux contaminants restant dans la biopsie canal de l'endoscope.

Un cathéter à double lumière est généralement utilisé pour la procédure d'insémination. La double lumière aide à prévenir la contamination des l'inséminé lors du passage dans le canal de biopsie de l'endoscope. (Liu, 1998) La longueur du cathéter doit être d'au moins 20 cm Plus long que le canal de biopsie afin de fournir une longueur de travail adéquate pour l'insémination 1. Un minimum de trois personnes est généralement nécessaire pour terminer la procédure.

Préparation de la jument: généralement, une insémination à faible dose est effectuée après l'induction de l'ovulation avec de l'hCG ou de la desloréline administration d'acétate (Ovuplant®). Les intervalles de 24 à 30 heures entre l'administration d'hCG et l'insémination sont les plus souvent utilisé (tableau 1) avec des intervalles légèrement plus longs étant plus utiles après l'administration d'Ovuplant®. De manière optimale, pour l'insémination endoscopique, les juments doivent être maintenues dans les stocks. Selon le tempérament de la jument, une sédation (détomidine / butorphanol) peut être nécessaire. Le rectum de la jument doit être évacué et l'emplacement de la le follicule pré ovulatoire doit être confirmé. Une préparation minutieuse de la vulve et du périnée pour la procédure vaginale doit être effectué.

Deux méthodes d'introduction de l'endoscope dans l'utérus peuvent être utilisées. Dans l'approche hystéroscopique standard, le l'endoscope est introduit par le col de l'utérus, l'utérus est insufflé et l'endoscope est dirigé visuellement vers le haut de la corne utérine homolatérale au follicule pré ovulatoire. Alternativement, l'endoscope peut être introduit à travers le col et guidé par manipulation par rectum dans la corne utérine avant l'insufflation. En utilisant la première méthode, il est important de confirmer l'emplacement l'endoscope ipsilatéral au follicule pré ovulatoire car sous guidage visuel, il est facile de se désorienter à gauche contre les cornes utérines droites. Une fois l'UTJ identifié, le cathéter d'insémination doit passer par le canal de biopsie et l'inséminé déposé directement sur l'UTJ (Fig 2 & Fig 3). Aucune tentative n'est faite pour canuler l'oviducte pendant ce processus. Certains auteurs préconisent l'introduction de "bulles" d'air lors du dépôt de l'inséminé afin de maintenir un plus grand

contact de l'inséminé dans la région de l'UTJ par la tension superficielle. Une fois l'insémination terminée, l'air qui était introduit pendant la procédure doit être retiré par aspiration pendant que l'endoscope est retiré de l'utérus.

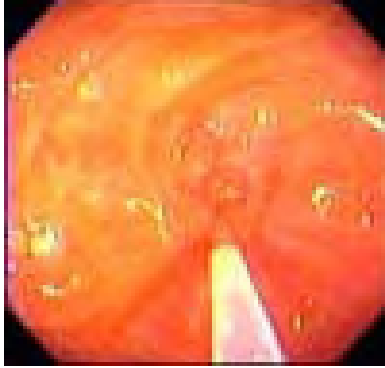


Fig.2 : Vue hystérocopiquement de l'UTJ et du cathéter d'insémination avant l'insémination.
(www.ivis.org)

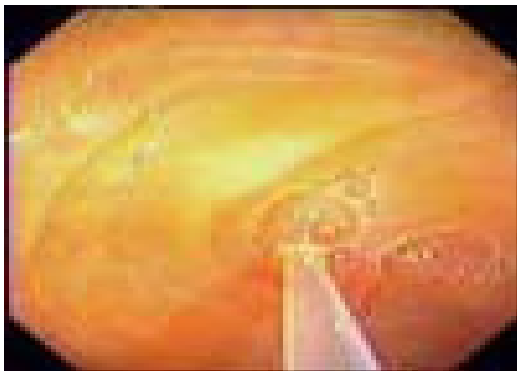


Fig.3 : Vue hystérocopiquement de l'UTJ et du cathéter d'insémination après insémination
(www.ivis.org)

Le faible nombre de spermatozoïdes ainsi que le petit volume de l'inséminé nécessitent une manipulation et un chargement plus cette procédure. Cela est particulièrement vrai si des spermatozoïdes cryoconservés sont utilisés car ces cellules sont beaucoup plus sensibles au froid le choc et les petits volumes utilisés rendent le transfert de chaleur et le choc thermique plus probables. Avant l'insémination, les cathéters et le matériel de laboratoire utilisé pour la manipulation du sperme doit être préchauffé à la température corporelle. Une fois l'endoscope en place et l'UTJ identifié, l'inséminé doit être aspiré dans l'extrémité distale du cathéter d'insémination en l'aspirant soigneusement autant que un embryon serait aspiré dans une pipette de transfert. L'insémination doit être effectuée rapidement après la pose du cathéter.

Effet de sélection rapide, transport facile, large diffusion de matériel génétique précieux, utilisation économique du sperme et utilisation rationnelle des taureaux, prévention des infections sexuellement transmissibles, réservation de sperme dans les cryobanques. Parmi les facteurs influençant le résultat de l'IA dans l'élevage de chevaux figure le temps, le taux de fréquence et la répétition d'insémination, la qualité et la quantité de sperme, la profondeur d'insertion du sperme dans l'utérus d'une jument, le respect du mode de température et les réglementations sanitaires pendant la procédure d'IA, les performances reproductives des juments. Il existe deux principales méthodes de congélation du sperme d'étalonnet donc deux technologies d'IA pour le conditionnement du sperme et des équipements pour son introduction dans l'utérus des juments. La première approche élaborée et utilisée en Russie repose sur un mode de conservation de la cryoconservation de sperme en grands volumes, 20-25 ml par dose. La seconde méthode, développée à l'étranger, permet un prétraitement des spermatozoïdes par centrifugation et une élimination maximale du plasma de sperme. Dans une autre procédure actuellement utilisée en Russie, les petits volumes (5-6 ml) de sperme sont cryoconservés après centrifugation, élimination de 50 à 60% du plasma de sperme et épaissement du sperme par dialyse. Ces dernières années, du sperme congelé d'étalons d'Europe et d'Amérique a été activement importé en Russie. Malgré les différences technologiques, les approches nationales et étrangères de la cryoconservation du sperme d'étalon fournit ses caractéristiques qualitatives similaires après décongélation. Le but de notre recherche était d'identifier les facteurs les plus significatifs affectant les taux de grossesse chez les juments inséminées artificiellement lorsque des protocoles nationaux et étrangers étaient utilisés pour congeler le sperme. Ici, un impact de cinq de ces facteurs (à savoir la technologie d'emballage / cryoconservation du sperme, le moment de l'insémination, l'état de reproduction et la solidité gynécologique des juments, l'activité du sperme) sur l'efficacité de l'IA avec du sperme congelé a été estimée chez des juments de différentes races (Arabian, Akhal-Teke, Trakehner, Hanoverian, Russian Riding horse, American Standardbred, Russian Trotter et Orlov Trotter). Des expériences ont été menées de 2012 à 2014 au haras de Tersk, dans une ferme privée (M. AA Kazakov le propriétaire) et dans une écurie expérimentale de l'Institut panrusse de recherche pour l'élevage de chevaux. Nous avons comparé les données de 106 cycles œstraux de 53 juments, inséminées artificiellement avec du sperme congelé domestique (granulés et tubes de 5 ml et 15-25 ml) et étranger (0,5 ml en paille). Tous les spermatozoïdes utilisés les doses dans divers emballages ont été divisées en deux groupes avec une activité supérieure et inférieure à 1,5 point (15%). Le temps recommandé pour l'IA avec du sperme congelé a été divisé en trois intervalles (12 h

avant l'ovulation, pendant l'ovulation, 6 h après l'ovulation). Les animaux étaient classiquement regroupés en juments stériles et vierges, juments allaitantes, juments après un avortement tardif (6 mois ou plus de la grossesse), et également en ce qui concerne l'absence ou la présence de pathologies gynécologiques telles que les pertes vaginales, les liquides et l'air dans l'utérus, endométrite induite par l'accouplement. L'efficacité de l'insémination artificielle a été évaluée en ce qui concerne le taux de grossesse, le nombre d'avortements survenus et le poulinage réussi. Ainsi, deux des cinq facteurs analysés ont été trouvés pour déterminer de manière fiable une IA réussie avec du sperme congelé à un niveau de signification élevé ($p < 0,001$). Il s'agissait de l'activité des spermatozoïdes d'environ 15% et de juments saines sans pathologie observée. La technologie de cryoconservation, le type d'emballage des doses de sperme ainsi que le statut reproductif de la jument (stérile, vierge, allaitante ou après un avortement tardif) sont d'une importance secondaire. Il est démontré que l'insémination artificielle des juments avec une dose de sperme pendant la période de 6 heures après l'ovulation fournit le même taux de gestation (67,7%) que l'insémination pendant la période de 12 heures avant l'ovulation (65,0%) ou l'insémination au moment où l'ovulation. Les progrès récents de la composition des dilueurs ont permis d'améliorer la qualité et la fertilité des Spermatozoïdes d'étalon congelé de sperme éjaculé et épидидymaire.

L'utilisation de nouvelles techniques de laboratoire pour sélectionner et mieux protéger les spermatozoïdes a permis la réussite de la congélation du sperme d'étalons dont le sperme est plus susceptible d'être endommagé pendant Le processus de congélation-décongélation.

Différents tests de contrôle qualité sont disponibles pour mieux déterminer la qualité du sperme congelé.

Cependant, il n'y a pas de test in vitro fiable pour prédire la fertilité

III. chapitre II

1. INTRODUCTION : (alvareng, 2016)

L'utilisation de sperme d'étalon congelé minimise la propagation des maladies, élimine barrières géographiques et préserve le matériel génétique de l'animal pour une durée illimitée temps.

Progrès significatifs dans le processus de la semence d'étalon congelée décongelée et par conséquent la fécondité a été atteints au cours de la dernière décennie. Des progrès ont été associés avec l'utilisation de nouvelles techniques d'IA, telles que l'insémination artificielle utérine profonde (IA), qui permet l'utilisation d'un petit nombre de spermatozoïdes; autres cryoprotecteurs que le glycérol et les nouveaux extenseurs disponibles dans le commerce qui se traduisent par une meilleure cryosurvie du sperme et des techniques de sélection des spermatozoïdes pour augmenter la qualité du sperme congelé. (Anderson, 2010)

De nouvelles approches de laboratoire sont également disponibles pour évaluer et surmonter les effets délétères effets de la cryoconservation.

Ces améliorations ont non seulement augmenté les taux de fertilité mais ont également permis la cryoconservation de sperme d'étalons «mauvais congélateur», induisant un impact positif sur l'intérêt de différentes associations et propriétaires de races de chevaux dans l'utilisation de sperme congelé d'étalon avec des milliers de juments inséminées chaque année dans le monde.

Environ 20% des juments donneuses d'embryons ont été élevées au Brésil avec du sperme congelé et 90% des poulains de juments pure sang sont produites par IA en Australie avec des spermes congelé ou refroidis.

2. Traitement de semence pour la congélation :

Après la collecte, le sperme doit être filtré pour éliminer la partie gélatineuse et les débris du sperme pour assurer la qualité et la quantité ainsi que la concentration du sperme placé dans chaque paille.

Le sperme doit ensuite être dilué avec un dilueur à base de lait écrémé et évalué. Il est recommandé après cette période d'effectuer une nouvelle analyse de la motilité, de la viabilité. Après cela, une centrifugation est effectuée pour éliminer le plasma séminal et le culot de sperme est remis en suspension dans un dilueur contenant un cryoprotecteur au volume nécessaire pour atteindre la concentration souhaitée. Enfin, le sperme est chargé dans des pailles. Le sperme est congelé en utilisant une courbe de congélation prédéterminée selon le

milieu à utiliser. Les pailles sont stockées dans des conteneurs d'azote liquide jusqu'à décongélation et utilisées pour l'insémination. Il est recommandé d'effectuer une autre analyse de la motilité et viabilité du sperme après décongélation, pour vérifier la qualité du sperme à l'insémination (Fig. 4).

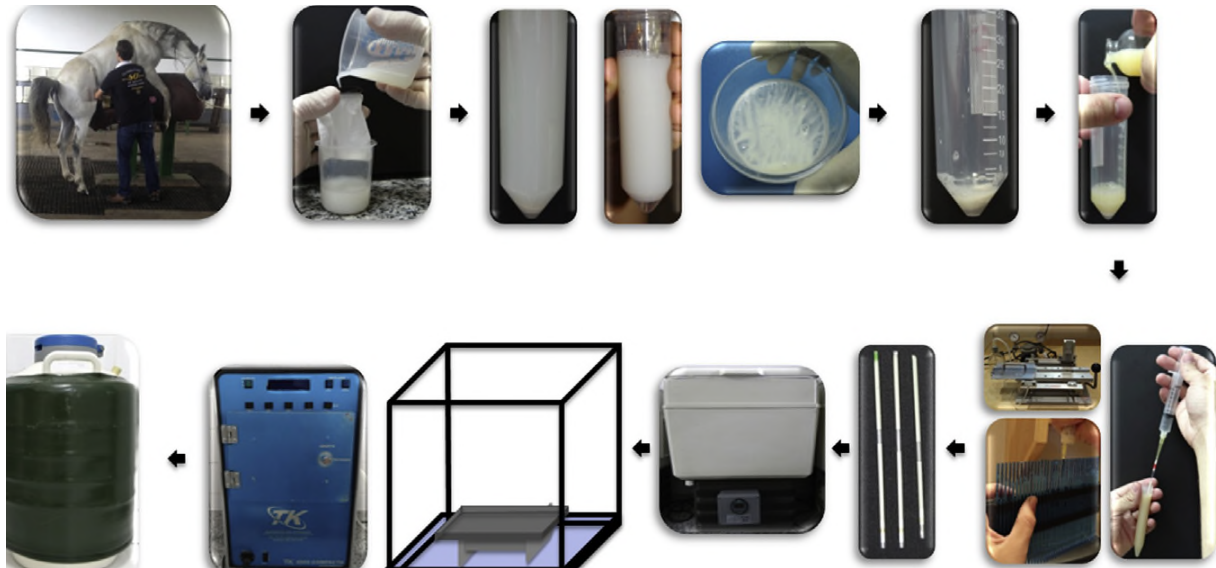


Fig. 4 : Étapes du processus de congélation du sperme. Le sperme est d'abord collecté, filtré pour éliminer le gel, et dilué avec un dilueur (lait écrémé au lait semi écrémé). Une fois le plasma séminal retiré, le culot de sperme est remis en suspension avec un dilueur de congélation et finalement congelé.




3. Procédures standard pour la collecte de sperme : (alvareng, 2016)

Le pénis doit être lavé, en particulier la fosse urétrale, avec de l'eau tiède pour éliminer smegma et micro-organismes juste avant la collecte. Il est important d'éviter l'utilisation de solutions bactéricides pouvant perturber la flore bactérienne normale du pénis.

Les deux méthodes les plus traditionnelles pour recueillir le sperme d'un étalon impliquent l'utilisation d'un fantôme ou une jument en chaleur. L'utilisation de fantômes est la plus sûre pour l'animal et l'opérateur et les étalons peuvent facilement être formés pour effectuer une collecte dans un vagin artificiel. Il existe différents modèles de vagin artificiel pour recueillir le sperme des étalons.

Les modèles Missouri et Colorado aux États-Unis, Hanovre INRA en Europe, et Botucatu au Brésil sont les modèles les plus utilisés. Ces modèles sont tous basés sur le concept d'une

poche remplie d'eau chaude pour fournir une pression adéquate et la température pour stimuler les étalons à éjaculer. L'utilisation d'un intérieur en plastique jetable la doublure est fortement recommandée pour des raisons sanitaires.

		
<p>Fig. 5 : vagin artificiel de type Colorado (McCue, 2014)</p>	<p>Fig. 6 : vagin artificiel de type Hanovre (equideos)</p>	<p>Fig. 7 : vagin artificiel de type Nishikawa (Schumacher, 2011)</p>

Les étalons peuvent abriter un potentiel agent pathogènes sur le pénis, tels que *Pseudomonas*, qui peuvent être transmis à la jument pendant la reproduction. Il faut également être prudent avec l'utilisation du vagin artificiel en latex (AV) doublures intérieures car elles peuvent être toxiques au contact du sperme, en particulier lorsque ces doublures sont neuves.

Le vagin artificiel doit être rempli d'eau chaude à environ 50 ° C et peut ou non être lubrifié avec un gel lubrifiant neutre non spermicide.

Une autre méthode pour effectuer la collecte de sperme est avec l'animal au sol.

Cette technique est recommandée pour les étalons souffrant de problèmes musculo-squelettiques et les étalons incapables de faire une monte sûr. Cette technique expose l'opérateur à un plus grand risque et donc doit être effectuée avec prudence. L'animal doit être stimulé par une jument la chaleur correctement contenue et le vagin artificiel doit être introduit sur le pénis, permettant à l'étalon d'effectuer des poussées pelviennes et d'éjaculer.

4. Dilution du sperme après la collecte :

Le sperme sans gel doit être dilué avec un lait écrémé ou un dilueur à base de caséine. Cette dilution doit être au minimum de 1: 1 ratio (vol / vol). Lorsque vous travaillez avec un sperme très concentré, il est recommandé d'effectuer des dilutions plus importantes (2: 1) pour réduire les dommages et la perte de spermatozoïdes lors de l'ablation du plasma séminal.

Le milieu de dilution doit être ajouté au sperme et doit être préchauffé à 37 ° C pour éviter les chocs froids.

Il existe une grande variété de dilueurs de sperme de cheval du commerce à base de lait écrémé ou de caséine.

Ils fournissent les nutriments nécessaires au métabolisme des spermatozoïdes, fonctionnent comme tampons pour maintenir le bon pH et le contrôle de l'osmolalité, et aussi protéger la membrane plasmique contre les chocs froids et les dommages oxydatifs. En outre, en raison de la présence d'antibiotiques, ces dilueurs jouent un rôle important dans la prévention des dommages.

5. Comment concentrer le sperme :

Le plasma séminal est principalement produit par les glandes sexuelles accessoires et expulsé en fractions pendant l'éjaculation. Celui-ci transporte du liquide et du sperme, et participe également au processus de capacitation du sperme. Le volume élevé de l'éjaculat d'étalon le rend non conservable alors il est nécessaire de retirer la partie non spermatique (liquide séminale et gel) avant la cryoconservation.

La centrifugation est la technique la plus couramment utilisée pour concentrer le sperme éjaculé d'un étalon. Cependant, certaines études soulignent les effets néfastes de la centrifugation sur le sperme: la force et la durée de centrifugation nécessaires pour retirer le plasma séminal peut affecter négativement la motilité, l'intégrité et le taux de récupération des spermatozoïdes.



Fig.8 : Centrifugeuse (group)

Pour éliminer le plasma séminal par centrifugation conventionnelle, le sperme dilué avec le dilueur est placé dans des tubes coniques de 50 ml et chargé dans une centrifugeuse. La force et le temps de centrifugation peut avoir un impact négatif sur la motilité, l'intégrité et la récupération des spermatozoïdes taux. Des forces centrifuges élevées provoquent une forte adhérence de la pastille, ce qui est nocif pour spermatozoïdes, tandis que de faibles forces favorisent une faible récupération des spermatozoïdes. Dans notre expérience la meilleure combinaison de force et de temps pour un bon taux de récupération des spermatozoïdes et moins de dommages à la qualité du sperme est de 600 x g pendant 10 minutes. Immédiatement après la centrifugation, le surnageant doit être retiré à l'aide d'un cathéter ou aiguille couplé avec une seringue ou une pompe à vide, et le culot remis en suspension dans le dilueur de cryoconservation sélectionné. Si le culot résultant est trop compacté, la force de centrifugation doit être réduite dans les collections suivantes, ou d'autres techniques doivent être utilisées pour réduire au minimum la condensation excessive de spermatozoïdes.

Une méthode alternative pour éliminer le plasma séminal de l'éjaculat visant à minimiser l'endommagement des spermatozoïdes est la technique de centrifugation coussinée. Cette méthode tente pour maximiser la récupération des spermatozoïdes à partir du sperme équin centrifugé en utilisant une forces de centrifugation, et prévenir les dommages avec un fluide de coussin placé au fond du tube à centrifuger. Trois produits commerciaux sont disponibles: Eqcellsire (IMV, Lisieux, France), Coussin Fluid (Minitube, Tiefenbach, Allemagne), et plus récemment Red Cushion (Botupharma, Botucatu, Brésil). Le coussin rouge est une solution rouge qui permet une meilleure visualisation du culot de sperme concentré.

Pour retirer le plasma séminal par centrifugation coussinée, le sperme doit être dilué 1: 1 avec un dilueur à base de lait écrémé et placé dans un tube conique de 50 ml. Un à cinq ml de coussin sont soigneusement placés au fond du tube à l'aide d'un cathéter couplé à une seringue, et la centrifugation est effectuée à 1000 g pendant 20 minutes. (SS, 2012)

Après centrifugation, le surnageant doit être soigneusement éliminé par aspiration utilisant un cathéter couplé à une seringue ou à une pompe à vide. Ensuite, le fluide du coussin est soigneusement retiré à l'aide d'un cathéter, et le culot remis en suspension dans le dilueur (Fig.9).

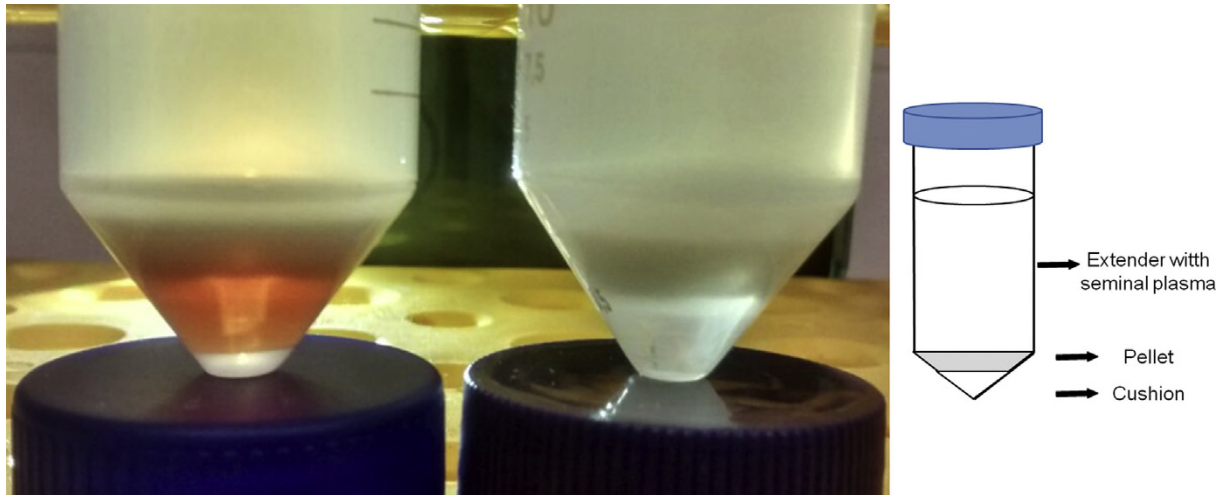


Fig. 9 : Différences entre l'utilisation du coussin rouge et du liquide de coussin conventionnel pour centrifuger semence équine

Une alternative à l'utilisation de la centrifugation pour concentrer le sperme est de filtrer le sperme à travers une membrane hydrophile synthétique (Sperm Filter, Botupharma, Botucatu, Brésil), qui retient les spermatozoïdes et ne permet que l'élimination du plasma séminal.

Le sperme doit être dilué deux parties de sperme et une partie de dilueur à base de lait écrémé, placé sur le filtre, et en utilisant un mouvement doux le filtre est touché contre la surface d'une boîte de Pétri de 25 cm. La taille des pores et la capillarité du filtre sont telles que le plasma séminal s'écoule, mais les spermatozoïdes sont retenus sur la membrane. Un volume prédéterminé du milieu de congélation est ensuite ajouté au filtre, et le mélange est homogénéisé. L'ensemble du processus dure 5 à 10 minutes et le même filtre peut être utilisé jusqu'à 10 fois pour le même étalon sans affecter la qualité et la récupération des spermatozoïdes.

Le filtre présente également l'avantage de ne pas nécessiter de centrifugation, ce qui peut causer des dommages mécaniques aux spermatozoïdes (Fig. 10).

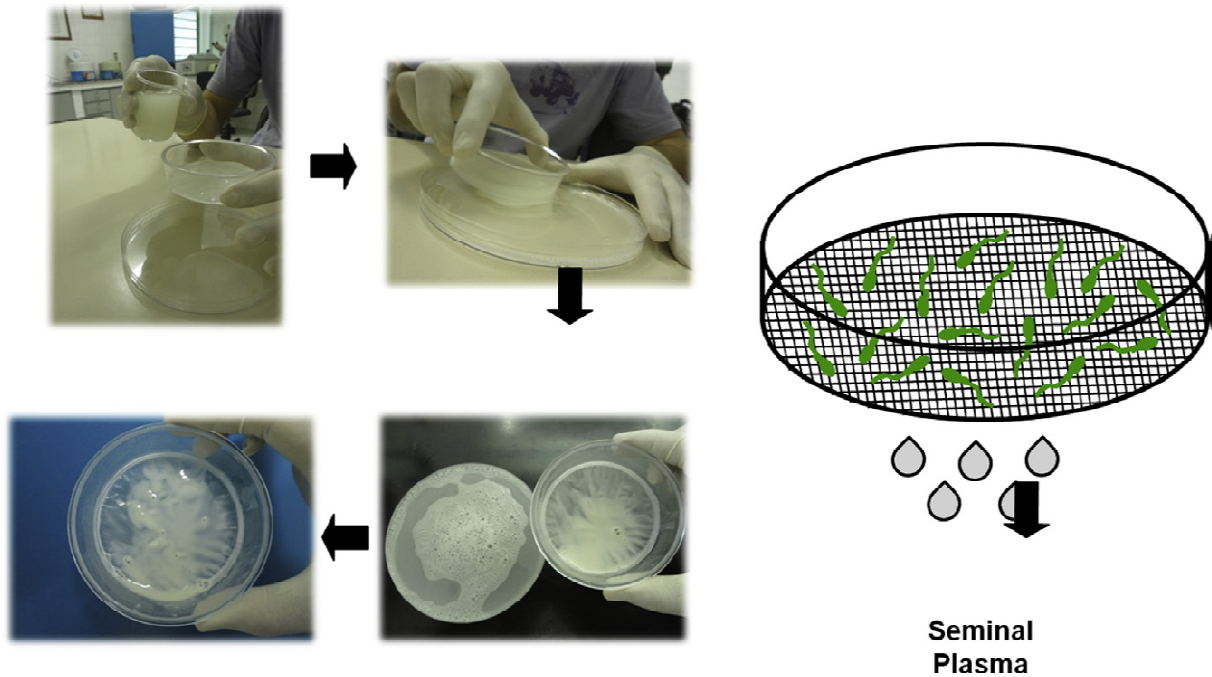


Fig. 10 : Étapes et conception schématique de l'utilisation du filtre à sperme pour éliminer le plasma séminal.

5.1 Ajout du milieu de congélation :

En général, les milieux utilisés pour congeler le sperme sont composés de substances pour stabiliser le pH, neutraliser les produits toxiques produits par le métabolisme des spermatozoïdes, protéger contre les chocs thermiques, maintenir l'équilibre électrolytique et osmotique, inhiber la croissance des bactéries et l'approvisionnement en énergie.

Les dilueurs doivent également contenir des cryoprotecteurs pour empêcher la formation de glace intracellulaire et extracellulaire. Plusieurs dilueurs commerciaux sont disponibles, les plus courants étant le Lactose EDTA (Animal Reproduction Systems, Chino, Californie), gel INRA (IMV) et BotuCrio (Botupharma).

Plusieurs cryoprotecteurs ont été utilisés pour congeler le sperme d'étalon. Ces cryoprotecteurs sont classés comme pénétrants ou non pénétrants et intracellulaires ou extracellulaires.

Les cryoprotecteurs intracellulaires agissent via leur capacité à lier l'eau ou leur propriétés colligatives. Les agents extracellulaires protègent les spermatozoïdes par osmose effets pour créer un environnement hypertonique qui induit le mouvement de l'eau hors de les cellules, déshydratant le sperme et réduisant les chances de formation de cristaux de glace à l'intérieur

des cellules. Ainsi, les dommages aux spermatozoïdes causés par la formation de glace sont évités. Les cryoprotecteurs non pénétrant sont efficaces pour protéger les spermatozoïdes pendant la congélation sans pénétration. Certains exemples incluent le jaune d'œuf, le lait et certains sucres.

Au cours des 65 dernières années, le jaune d'œuf a été régulièrement utilisé comme dilueur pour la cryoconservation de sperme des mammifères et pour protéger les spermatozoïdes contre les chocs thermiques, en raison de la présence de lipoprotéines de faible densité dans le jaune d'œuf. Ces lipoprotéines adhèrent à la membrane cellulaire pendant la congélation, restaurant les phospholipides perdus.

Le jaune d'œuf induit apparemment un changement transitoire dans la composition des phospholipides pour éviter la rupture de la membrane cellulaire et protéger les spermatozoïdes. Généralement, le jaune d'œuf est utilisé à une concentration de 20%. Les sucres fournissent un autre type de cryoprotection non pénétrante; ils agissent sur la déshydratation osmotique des cellules sous pression, et ainsi réduire la quantité d'eau intracellulaire disponible pour la formation potentielle de glace. De plus, les sucres sont une source d'énergie pour le sperme pendant l'incubation et protéger la membrane plasmique pendant la congélation et la décongélation par interaction directe avec la membrane cellulaire. Le glycérol est le cryoprotecteur universel utilisé pour la cryoconservation du sperme. Le glycérol pénètre dans la membrane cellulaire par diffusion passive et reste dans la membrane et le cytoplasme. Bien que ces substances traversent la membrane cellulaire jusqu'à l'équilibre est atteint, le mouvement de l'eau se produit plus rapidement et provoque des cellules déshydratés. En plus de ses effets osmotiques indésirables, le glycérol peut exercer une action directe sur la membrane cellulaire, où il se lie aux groupes des phospholipides réduisant la fluidité de la membrane.

Le méthylformamide a également été utilisé et, selon notre expérience, il provoque moins d'osmose des dommages aux spermatozoïdes par rapport au glycérol en raison du poids moléculaire et de la viscosité inférieurs.

Pour les étalons dont le sperme a une capacité de congélation satisfaisante («bons congélateurs»), les dilueurs contenant du diméthylformamide et du méthylformamide peuvent ne pas augmentés significativement de la motilité des spermatozoïdes après la décongélation; cependant, cela augmente la fertilité du sperme congelé. Chez les étalons dont le sperme a une faible résistance à la cryoconservation («Mauvais congélateurs»), l'utilisation de dilueurs contenant du diméthylformamide et du méthylformamide fournit une amélioration

significative de la motilité et de la fertilité des spermatozoïdes par rapport au dilueurs contenant du glycérol.

L'utilisation d'une combinaison de cryoprotecteurs offre une meilleure protection aux spermatozoïdes par rapport à l'utilisation d'agents uniques. Plusieurs centres de reproduction équine en Europe, les États-Unis et le Brésil ont utilisé de préférence un dilueur commercial (BotuCrio), qui comprend une combinaison de méthylformamide et de glycérol.

Le dilueur utilisé en cryoconservation doit être ajouté au sperme immédiatement après élimination du plasma séminal. Le nombre total de spermatozoïdes dans le sperme récupéré doit être déterminé pour calculer le volume final d'agent cryoprotecteurs requis. Habituellement, le sperme d'étalon est cryoconservé à une concentration comprise entre 200 et 400 x 10⁶ sperme / ml ou 100 et 200 x 10⁶ spermatozoïdes par paillette de 0,5 ml.

5.2 Emballage :

Après élimination du plasma séminal et ajout de dilueur approprié, le sperme doit être emballé. Actuellement, le sperme est conditionné dans des paillettes en plastique d'un volume de 0,5 ml ou 0,25 ml. Le sperme est chargé dans des pailles à l'aide d'un équipement automatisé (coûteux) ou manuellement. Une fois rempli, les paillettes doivent être scellées en utilisant l'une des techniques disponibles, telles que poudre d'alcool polyvinylique, billes de métal et de verre ou scellant à ultrasons. Est important d'avoir une bulle d'air au centre de la paillette pour permettre l'expansion du fluide pendant cryoconservation et éviter la rupture de la paillette lors de la décongélation.

5.3 Courbes de congélation :

Une fois le sperme emballé, le processus de refroidissement des échantillons à 5 ° C commence. Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre à 5 ° C varie en fonction du dilueur utilisé et de l'instruction du fabricant. Le processus de congélation doit être suffisamment lent pour permettre la déshydratation à la cellule, en évitant la formation de cristaux de glace intracellulaires et si elle est suffisamment rapide elle va empêcher l'exposition des spermatozoïdes aux solutions sursaturées comme l'eau extracellulaire.

La courbe de congélation doit être effectuée en deux étapes : d'abord les paillette °C de sperme sont refroidies de la température ambiante à 5 C à une vitesse de 3 °C à 5 °C par minute, puis ils sont congelés à 196 °C à raison de 20 à 50 °C par minute.

Il existe des particularités entre les dilueurs dans le protocole de congélation du sperme d'étalon. Pour l'INRA 96, le laboratoire recommande un refroidissement de 2 heures à 5 °C avant de démarrer le processus de congélation. Pour BotuCrio, un temps d'équilibrage plus rapide est recommandé (20 minutes à 5 °C). La courbe de congélation recommandée après l'équilibration est similaire entre extenseurs.

Deux techniques sont disponibles pour congeler le sperme équin: l'une utilise des boîtes de polystyrène, et l'autre utilise des congélateurs de sperme programmables.

Des études ont montrés que lors de la comparaison des deux techniques de congélation aucune différence entre elles n'a été observé; cependant, l'utilisation de systèmes programmables permet un meilleur contrôle de toutes les procédures décrites précédemment. On préfère utiliser une boîte en polystyrène de 45 L remplie d'azote liquide et les paillettes sont placé dans un portoir flottant à 3 cm au dessus de l'azote liquide. Il est important d'avoir suffisamment d'azote liquide pour maintenir la température stable pendant toute la durée de la procédure et attendre également au moins 3 minutes avec le couvercle fermé avant de placer les paillettes sur l'azote liquide.

6. Analyse du sperme après-décongélation :

Plusieurs protocoles sont disponibles pour décongeler la semence équine. Certaines études indiquent que les températures et les temps de 46 °C pendant 20 secondes ou 37 °C pendant 1 minute sont les protocoles les plus appropriés pour les paillettes de 0,5 ml. La dilution du sperme après décongélation doit être évitée car elle peut induire des dommages osmotiques à la cellule.

Le sperme doit être évalué après décongélation pour déterminer la motilité des spermatozoïdes (total et progressive), la morphologie des spermatozoïdes, la vigueur du mouvement des spermatozoïdes et le nombre de spermatozoïdes par paillette.

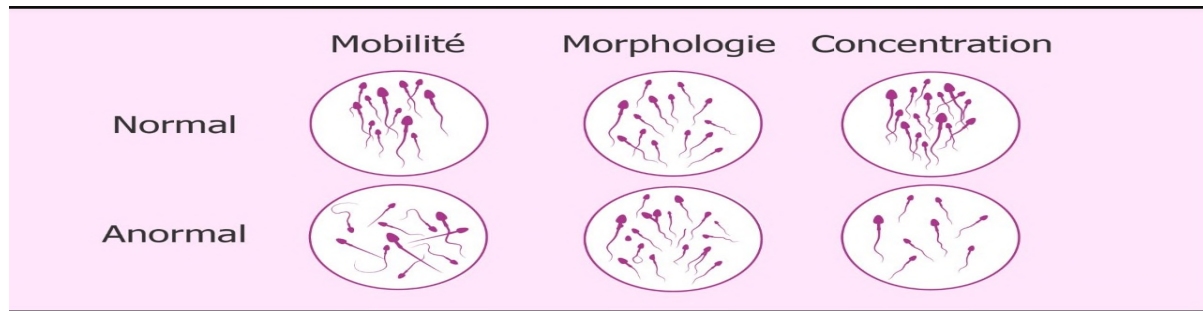


Fig.11 : Représentation schématique de la morphologie, mobilité, concentration des spermatozoïdes (Reus, 2017)

Pour le sperme ayant une motilité après décongélation acceptable mais une faible fertilité, nous recommandons l'utilisation de méthodes plus sophistiquées pour l'analyse du sperme, telles que l'analyse de l'intégrité de la membrane et l'analyse de l'ADN via la cryométrie en flux. (ES, 2007)

Les valeurs acceptables pour la qualité du sperme après décongélation sont plus de 50% de la motilité totale, plus de 30% de la motilité progressive et des taux de fertilité attendus de 40% à 60% par cycle.

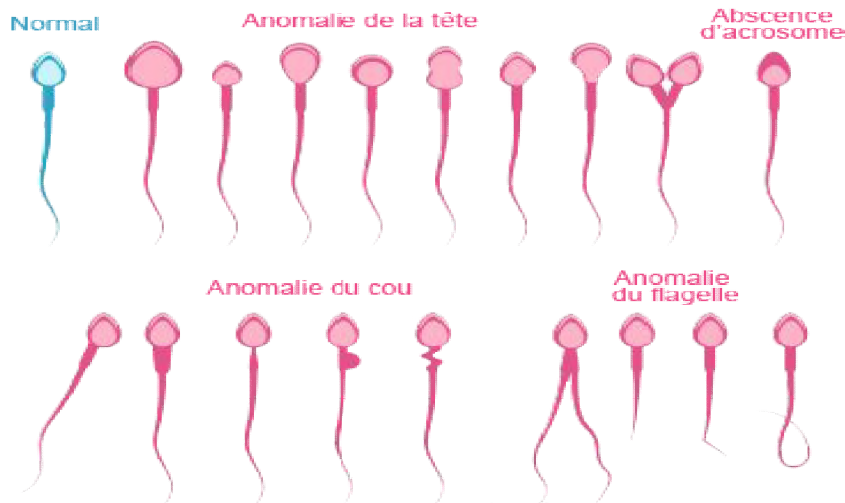


Fig.12 : Schéma du spermatozoïde normal et quelque anomalie pouvant être rencontrées (spermiologie)

7. Insémination à l'aide de sperme congelé :

La fenêtre de temps idéale pour l'insémination à l'aide de sperme congelé est de 12 heures avant à 6 heures après l'ovulation. Gestion des juments pour l'insémination avec du sperme

congelé nécessite une évaluation échographique quotidienne pendant l'œstrus et l'induction de l'ovulation utilisant de la gonadotrophine chorionique humaine (1 500 UI) ou une hormone libérant la gonadotrophine (acétate de desloréline, 1 mg) dès qu'un follicule de plus de 35 mm est détecté en présence d'œdème utérin. 24 heures après l'induction de l'ovulation, évaluation échographique doit être effectuée toutes les 6 heures et l'insémination est effectuée une fois l'ovulation détectée. Alternativement, l'insémination est effectuée à des heures fixes à 24 et 40 heures ou à 30 et 48 après induction de l'ovulation.

8. Stratégies pour améliorer la qualité de la semence :

La sélection de l'étalon est effectuée par des évaluations phénotypiques, telles que la conformation de l'animal et de ses performances athlétiques, contrairement aux bovins où les paramètres de reproduction sont évalués chez les taureaux avant de devenir un taureau commercial. Un autre facteur qui affecte la qualité du sperme est l'âge, et souvent les propriétaires décident de congeler le sperme des étalons qui ont un âge avancé et peuvent être infertiles.

Plusieurs techniques ont été développées pour augmenter la qualité du sperme des étalons.

Etalons dont le sperme ne résiste pas au processus de centrifugation, l'utilisation de tels techniques telles que Sperme filtré et la centrifugation avec cousinée peuvent être bénéfiques. Pour les étalons dont le sperme a une faible résistance à la cryoconservation, l'utilisation d'un dilueur avec des cryoprotecteurs spécifiques, tels que les amines, peuvent améliorer la cryosurvie des spermatozoïdes.

Lorsque la qualité initiale du sperme est mauvaise, la sélection des spermatozoïdes à l'aide de produits disponibles dans le commerce a des gradients de densité, comme EquiPure (Nidacon, Göteborg, Suède) ou Androcoll-E (Minitube) peut être réalisé avant la cryoconservation. Ces gradients sélectionnent les spermatozoïdes qui présentent une motilité progressive, une intégrité cellulaire et aucune morphologie défectueuse (Fig.11).

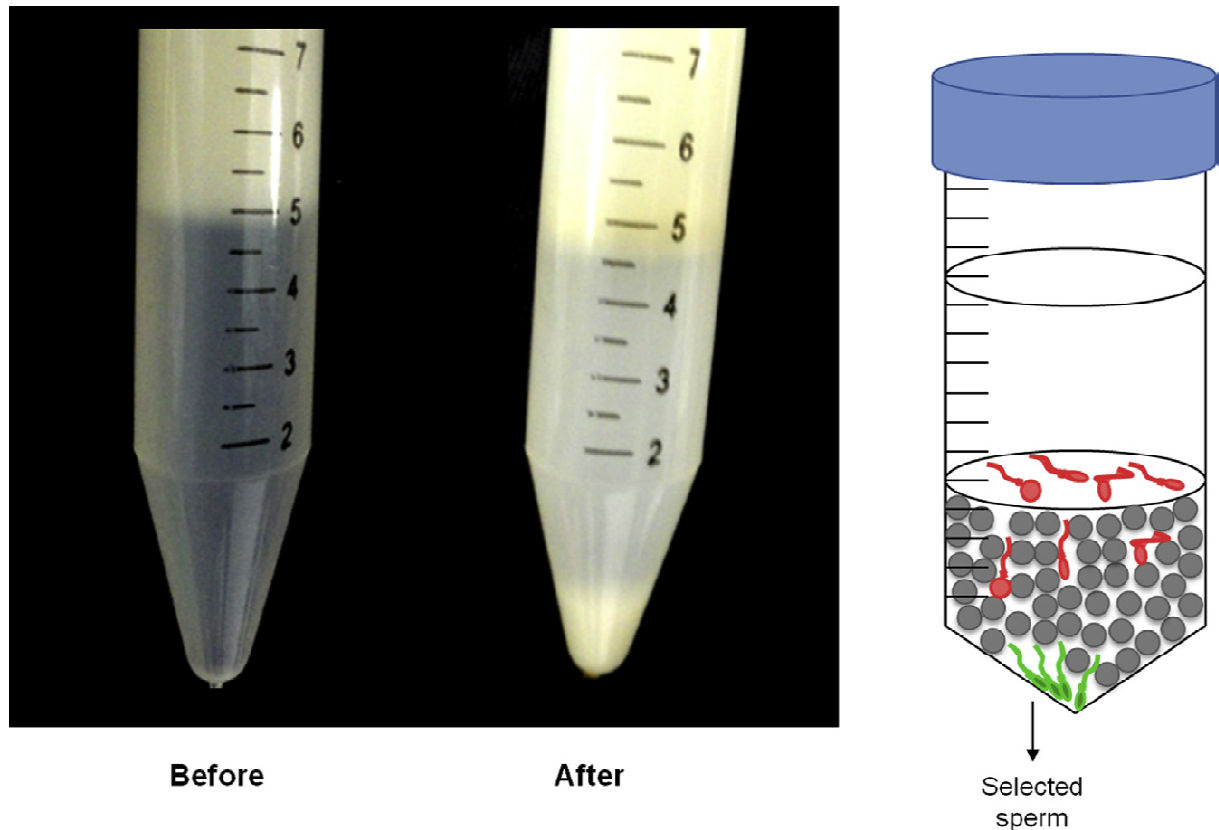


Fig. 13 : Image du sperme avant et après centrifugation avec Equipure.

Une autre alternative consiste à sélectionner le sperme après décongélation. Pour cette procédure, le contenu de quatre pailles est délicatement posé sur 2 ml d'Equipure, centrifugées à 300 x g pendant 20 minutes, et le culot remis en suspension avec le dilueur de congélation. Ce protocole améliore la motilité et la fertilité de certains étalons (Les données non publiés). Il est postulé que l'élimination des spermatozoïdes de mauvaise qualité ou morts générer des réactifs oxydants peut améliorer la fertilité.

9. Congélation semence épидидymaire :

La cryoconservation du sperme épидидymaire est la dernière chance de préserver le sperme d'un étalon. Après la mort ou la castration, le sperme peut rester viable dans l'épididyme pendant 24 à 48 heures. Chez les étalons présentant des conditions toxiques sévères, ou lorsque le prélèvement du testicule après la mort a été retardé, la qualité du sperme épидидymaire, et donc la le sperme congelé peut être compromis.

Une autre application intéressante pour le sperme épидидymaire congelé est la possibilité de congeler le sperme de jeunes étalons sans expérience sexuelle qui sera soumis à une orchidectomie élective.

Le développement de nouveau dilueur a permis une augmentation significative de la qualité et par conséquent la fertilité du sperme épидидymaire d'étalon. BotuCrio s'est révélé être le meilleur dilueur pour préserver la motilité et la fertilité du sperme épидидymaire congelé fournissant des taux de fertilité similaires au sperme congelé éjaculé. (al, 2011)

Le sperme épидидymaire peut également être utilisé dans des techniques telles que intra-cytoplasmique cell injection (ICSI). Par conséquent, il est conseillé de congeler certaines paillettes avec un faible nombre de paillette (par exemple, 5 millions de cellules) pour une utilisation ultérieure dans l'injection intra-cytoplasmique.

9.1 Techniques pour récupérer le sperme de l'épididyme :

Les testicules doivent être retirés de l'animal immédiatement après sa mort ou dès que possible. Dans ce cas et en cas d'orchidectomie, le canal déférent doit être ligaturé pour éviter la perte de sperme. Les testicules et l'épididyme attaché doivent être rincés avec Ringer lactate ou une solution saline, puis emballés dans des sacs en plastique ou des gants de palpation. Quand la récupération des spermatozoïdes de l'épididyme n'est pas effectuée immédiatement, le testicule avec l'épididyme peut être conservé à 5 ° C pendant 24 heures, en utilisant les mêmes récipients pour refroidir le sperme. Il existe deux techniques pour obtenir le sperme de l'épididyme

9.2 Technique de rinçage et de flottation rétrograde :

La technique de rinçage rétrograde est la technique la plus utilisée et implique la création d'une pression dans le canal déférent en injectant un dilueur jusqu'à ce que les spermatozoïdes épидидymaire soient transportés par l'extension à travers les incisions sur la queue de l'épididyme. Le sperme peut être récupéré en lavant la queue de l'épididyme avec le même dilueur utilisé pour la cryoconservation (15–20 ml), ou en lavant avec le dilueur utilisé pour la centrifugation. Nous n'avons pas observé de différence sur la qualité du sperme après décongélation lors du rinçage avec le dilueur de congélation ou le rinçage avec du lait, puis centrifugation de l'échantillon.

Le rinçage avec le dilueur de congélation élimine l'étape de centrifugation. L'épididyme est disséqué manuellement pour retirer le fascia qui entoure la queue de l'épididyme.

9.3 Méthode de flottation :

Dans cette technique, la queue de l'épididyme est tranchée avec une lame de scalpel en plusieurs petits pièces pour exposer le sperme épидидymaire à l'environnement extérieur. La queue du l'épididyme est ensuite placée dans le dilueur de congélation et incubé pour permettre au sperme de couler dans le milieu pendant 15 minutes. Ensuite, l'échantillon est filtré à l'aide d'un filtre en nylon pour enlever les débris. Cette méthode peut également être effectuée après la technique de rinçage rétrograde pour améliorer la récupération des spermatozoïdes, surtout lorsque l'épididyme n'est pas complètement disséqué.

9.4 Étapes de la cryoconservation du sperme épидидymaire :

Après la récupération du sperme de la queue de l'épididyme, le sperme doit être concentré en utilisant les techniques discutées précédemment. Lorsque la queue de l'épididyme est rincée avec le dilueur de congélation, le sperme récupéré peut être congelé directement, sans centrifugation. Après remise en suspension avec le dilueur de congélation, il est important d'attendre environ 10 à 20 minutes pour permettre au sperme d'atteindre les meilleurs paramètres de motilité. La motilité des spermatozoïdes s'améliore généralement de moins de 5% à plus de 70% après 10 minutes d'incubation dans le dilueur de congélation. Après la remise en suspension du sperme épидидymaire, les autres étapes de la cryoconservation sont les mêmes que décrit précédemment pour le sperme éjaculé.

IV. La partie expérimentale

1. L'objectif du travail :

L'objectif de notre travail est de comparer les résultats de l'insémination artificielle des étalons des semences diluées et transporté par rapport aux saillies naturelles et a l'insémination artificielle par une semence fraîche pour servir des femelles (juments) en chaleur.

2. Lieu et période de l'étude :

Notre travail a été réalisé dans l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret et au niveau du haras el-mesk de feghouli (privé) a Tiaret durant la période allant de 10 octobre au 30 novembre de l'année 2020.

3. Animaux de l'expérimentation :

3.1 Etalons :

Trois étalons deux ARABE et un étalon Barbe sont utilisés dans notre expérimentation :

HOUBOUB âgé de 10ans (arabe).

SNOUPI âgé de 16 ans (arabe).

DJAMEL EL-MISK âgé 8 ans (barbe) .

Ces étalons sont logés dans des boxes individuels et rationné d'une manière équilibrée deux fois par jours en plus d'un fourrage de bonne qualité, l'abreuvement a volantié durant toute la journée.

3.2 Juments :

16 juments on été incluse dans notre expérimentation, 8 inséminés par une semence réfrigérer et le reste 8 juments par une saillie naturelle

Les juments sont ramenées au haras el-mesk feghouli pour le suivi de reproduction et l'insémination artificielle.

3.3 Matériel utilisé :

Durant la période du suivi et de l'insémination artificielle nous avons utilisés le matériel suivant :

Un échographe de la marque Draminski iScan d'une fréquence 5 Mhz

Un vagin artificielle type missouri

Un dilueur à base de lait semi écrémé UHT

Une glacière pour le transport de la semence

Des seringues pour l'insémination artificielle

Des gaines d'insémination artificielle type IMV

Des filtres pour la filtration de la semence après la collecte

Une verrerie pour la manipulation de la semence

Un bain marie réglé à 37°C

Prostaglandines

4. Préparation du vagin artificielle :

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





Figure 14 : les étapes de préparation du vagin artificiel de type Missouri

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 été 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.

5. Méthode de récolte :

5.1 La préparation d'étalon

Avant d'accéder à la récolte du sperme, l'étalon qui est maintenue dans son boxe individuel a eu tout d'abord le pénis lavé à l'eau tiède puis séché par des serviettes en papier jetable pour éliminer toute la saleté et les débris.

Le cheval est ensuite déplacé par un opérateur de son boxe vers la zone de récolte où il est stimulé dans un premier temps par la vue de la jument en œstrus, la monte demande un effort pour l'étalon, donc il lui faut une petite séance d'échauffement.

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



Figure 15 : l'excitation de l'étalon en présence de la jument « boute-en-train »

5.2 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 tient 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 16 : les étapes de la récolte de sperme

5.3 Sélection des éjaculats pour l'insémination :

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

6. Manipulation de la semence et préparation des doses :

6.1 Evaluation des semences après la récolte :

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



Figure 17 : le vagin artificiel acheminé au niveau du laboratoire.

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 :

6.2 Examen macroscopique :

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

6.2.1 Volume :

Le volume en ml a été évalué par lecture directe sur les graduations du tube de collecte. La mesure du volume été nécessaire pour calculer le nombre total de spermatozoïdes contenus dans l'éjacula.

6.2.2 Couleur et aspect :

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

6.2.3 Détermination de la concentration :

La concentration en spermatozoïdes par **ml** de sperme était déterminée en utilisant un photomètre Minitube (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 18 : un photomètre Minitube.

6.3 Examen microscopique :

6.3.1 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 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.

6.3.2 Mobilité individuelle :

Une dilution au 25x 10⁶ 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 diluer.

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%**).

7. Protocole expérimentale

Suivi des juments :

Toutes les juments sont suivi pour leurs croissance folliculaire et diagnostic d'ovulation ainsi que la confirmation de la gestation ; pour cela des échographies transrectales sont faites et le test à la bar (soufflage par un étalon souffleur) est pratiquer pour voir l'expression de chaleur des juments et leur taux d'acceptation.(figure)

Des fiches de suivi de reproduction individuelles sont faites pour chaque jument depuis le premier examen jusqu'à conception ou non (figure)

Une fois les juments sont prêtes pour être servi (saillie ou inséminé), on a choisi au hasard celle qui doivent être inséminé par IAF et celle avec une IAR.

8. Etapes d'insémination et de saillie :

8.1 Insémination artificiel :

8.1.1 Préparation de la jument :

- Mettre la jument dans la barre d'insémination ou l'entraver.
- Mettre un protège-queue ou une bande de queue à usage unique. Attacher la queue.

8.1.2 Lavage de la jument :

1. A la douchette :

- Mettre 1 gant à usage unique.
- 1er lavage : arroser la vulve de la jument à l'eau (tiède si possible) ; mettre un savon antiseptique (par exemple: Vétédine SavonND) sur le gant. Laver la vulve de haut en bas, puis les côtés de la vulve, le dessous du clitoris et terminer par l'anus et la base de la queue.

Attention à ne pas introduire de l'eau savonneuse à l'intérieur du vagin en appuyant trop fort sur la vulve. Ne jamais revenir sur la vulve après avoir nettoyé la région alentour.

Arroser abondamment à l'eau le gant qui a servi à laver la vulve jusqu'à ce que l'eau qui s'écoule soit claire puis rincer la région vulvaire.



Figure 19 : Lavage de la jument a la douchette par Savon anti septique.

Effectuer au total trois lavages.

2. Au seau :

-mettre 2 gants à usage unique.

-mettre suffisamment de papier à usage unique (6 feuilles) dans un seau d'eau et réserver la main gauche pour prendre ce papier dans le seau afin que cette main soit toujours propre et ne souille pas l'eau. Effectuer le 1er lavage de la jument (avec la main droite). Avec la main gauche, faire écouler l'eau du papier absorbant sur le gant de la main droite pour le rincer (se positionner à côté du seau). Mouiller à nouveau le papier, le prendre dans la main droite afin de rincer la vulve.

-recommencer un 2ième lavage, puis un 2ième rinçage, puis un 3ième lavage et enfin un 3ième rinçage. Ne pas laver l'anus, ni la base de la queue lors du 3ième lavage afin de ne pas souiller la vulve avec les eaux d'écoulement.

3. Séchage :

Prendre une feuille de papier absorbant sec et essuyer la vulve, puis les côtés de la vulve, puis le dessous et enfin l'anus et la base de la queue. La feuille de papier absorbant doit être propre à la fin de l'essuyage. Ne pas oublier d'essuyer les gouttes présentes sur la poche de queue.

Afin de préserver l'appareil génital de la jument, il est important de veiller à ne pas y introduire de germes externes. Dans ce but ce protocole de lavage-rinçage-séchage doit être respecté.



Figure 21 : Séchage par papier absorbant.

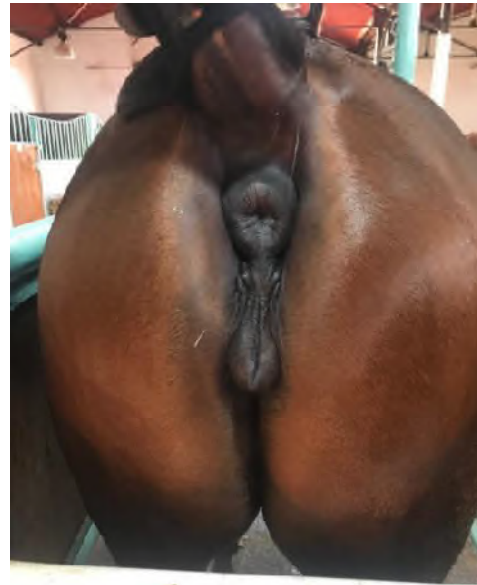


Figure 22 : Jument bien nettoyée et séchée.

8.1.3 La préparation des doses :

Les grands principes à respecter dans la préparation des doses visent :

1) à préserver le pouvoir fécondant de la semence :

-raccourcir la durée pendant laquelle la semence reste à 35°C

-supprimer l'effet du plasma séminal par dilution (1 volume de sperme pour au moins 2 volumes de diluer) ou par récolte à vagin ouvert

-éviter les chocs thermiques et mécaniques

2) apporter une dose nécessaire et suffisante à la jument :

-un nombre suffisant de spermatozoïdes totaux (≥ 200 millions en sperme frais ou ≥ 400 millions en sperme congelé)

-un volume de la dose compris entre 10 et 20 ml (frais ou réfrigéré).

8.1.4 Insémination artificiel proprement dite :

La technique idéale pour travailler en conditions stériles est d'utiliser un double gant sur la main introduite dans le tractus génital. Avec cette technique, les souillures de l'entrée de l'appareil génital restent sur le gant externe et la main introduite jusqu'au col est alors plus propre.

Le double gant est utilisé de la façon suivante :

- Enfiler un gant stérile
- Prendre le cathéter d'insémination et le protéger dans le creux de sa main comme
- précédemment
- Enfiler le deuxième gant à moitié.
- Couper le bout du deuxième gant et en tenir l'extrémité coupé dans sa main.
- Lubrifier le dos de la main à l'aide de gel stérile non spermicide.
- Introduire sa main dans l'appareil génital et lâcher le deuxième gant après avoir passé la vulve.
- Retenir l'avancée du deuxième gant avec la main libre pendant la progression de la main stérile jusqu'au col.

9. Saillie naturel :

9.1 La Monte en main :

La gestion de la reproduction par l'homme fait que globalement on contrôle le cycle de la jument par échographie et en soufflant. Lorsqu'elle est prête, on la fait saillir par un étalon reproducteur. Par échographie, on contrôle et observe la taille de follicule ovarien. Ensuite, on la souffle (grâce au test de la barre, le plus souvent). Ceci signifie que l'on teste la jument pour voir comment elle répond à l'approche de l'étalon.

Dans cette situation, soit on entrave la jument, soit on l'attache derrière un bas flanc, puis on approche un male entier appelé souffleur ou boute-en train. On regarde alors les réactions de la jument. En général, le souffleur, en état d'excitation, renifle la jument, d'abord de façon noso-nasale puis noso-génitale.

La partie expérimentale

Si, à l'approche de l'entier, la jument tape, rue et s'énerve, c'est qu'elle n'est pas prête. Mais si elle se met à uriner, adopte la position campée et même accepte que l'étalon soit là parfois sur son dos, c'est le bon moment pour la conception du petit poulain. On va pouvoir préparer la jument à la saillie. Dans beaucoup de cas quand on a des poulinières qui produisent des poulains de façon intense, les vulves des juments sont distendues et elles peuvent absorber de l'air et des bactéries qui provoquent l'apparition de fluide, c'est-à-dire d'infections vaginales. Pour remédier à cela et faire que la jument prenne à la saillie, on coud partiellement les vulves des juments. Pour la saillie, quand la jument est prête, on va alors découdre la vulve de la jument, la laver et lui mettre du gel lubrifiant. On entrave la jument afin qu'elle ne blesse pas l'étalon en cas de ruade intempestive et on l'amène au lieu de monte ou de saillie.

Dans le cas de la monte en main, on amène, à ce moment là, l'étalon reproducteur. En générale, il renifle un peu la jument, ce prépare et très vite il la saillie. Il n'y a aucun comportement d'acceptation comme au sein d'un troupeau

La partie expérimentale

Juments	Age	Utérus	Diamètre a l'ovulation	Technique de Saillie	Résultat
MANIGANCE	22 ans	Sain	34/40	IA semence réfrigérer	Echo - (13jr)
DJAOUHARA		Sain	MF/42	IA semence réfrigérer	Echo - (18jr)
VELIANE DU CROATE		Sain	40+30/PF	IA semence réfrigérer	Echo + (12jr)
MARIHA		Sain	42/48	IA semence réfrigérer	Echo + (14jr)
JOURAT DILMI	8 ans	Sain	42/PF	IA semence réfrigérer	Echo - (12jr)
RIMEHE	10 ans	Sain	45/PF	IA semence réfrigérer	Echo - (14jr)
TAMDA		Sain	44/PF	IA semence réfrigérer	Echo - (16jr)
RACHA	3 ans	Sain	42/PF	IA semence réfrigérer	Echo + (12jr)

Tableau 1 : tableau récapitulatif des juments inséminée et suivies

La partie expérimentale

Juments	Age	Utérus	Diamètre a l'ovulation	Technique de Saillie	Résultat
GRAINE DE L'OUEST	6 ans	Sain	PF/43	saillie naturelle	Echo + (12jr)
ASSILA MDOUKAL	4 ans	Sain	44/PF	saillie naturelle	Echo - (12jr)
BOUS 1		Sain	PF/46 pré OV	saillie naturelle	Echo + (13jr)
BENT HANANE	4 ans	Sain	43/PF	saillie naturelle	Echo + (19jr)
MAGHRABIA		Sain	30/53	saillie naturelle	Echo + (17jr)
GALMIA	20 ans	Sain	44/PF	saillie naturelle	Echo + (12jr)
OUARDA		Sain	45/PF	saillie naturelle	Echo + (21jr)
BECBEC	10 ans	Sain	28/44	saillie naturelle	Echo + (16jr)

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des juments saillies et suivie

La partie expérimentale

Les deux tableaux ci-dessus montrent les âges des juments, la taille du follicule à l'ovulation, la technique de saillie ainsi que le résultat de l'échographie ?

Le tableau montre que l'utérus des 8 juments était intact cliniquement et échographiquement avec des femelles d'une moyenne d'âge de 10 ans, les résultats des saillies par échographie à donnée une moyenne de 3 gestations sur 8 femelles inséminées.

Le tableau 2 montre que l'utérus des 8 juments était intact cliniquement et échographiquement avec des femelles d'une moyenne d'âge de 8 ans, les résultats des saillies par échographie à donnée une moyenne de 7 gestations sur 8 femelles saillies naturellement.

10. Discussion :

Parmi les techniques de reproductions assistées nous pouvant classés la technique d'inséminations artificielle comme étant la plus ancienne la plus utilisé en reproduction chez les différentes espèces et plus précisément l'espèce équine.

Le bute de l'insémination artificielle est de réduire l'utilisation des étalons par rapport aux juments inséminées, faire circulé les gènes des meilleurs étalons dans le monde entier, réduire la transmission des germes véneriennement transmissibles (MCE, Dourine, AIE,...etc.) par le traitement rigoureux des semences, favoriser les chevaux de courses ou des chevaux athlètes par la récoltes durant les périodes non compétitifs, évité les accidents durant les saillies naturelles.

De ces avantages on peut citer un autre avantage est que le recours à l'insémination artificielle chez la jument n'interfère pas avec une bonne fertilité ou bien une bonne fécondité, suite à ces avantages nous avons trouvé que les taux de fécondation chez les groupes saillies par rapports aux groupes inséminés ont changé et ne sont pas similaires.

Nos résultats sont contradictoire a ceux citées par (**HUGHES et AL, 1970**) qui ont trouvé un bon taux de gestation 78.9% et 67.4% suite à l'insémination artificielle de 218 par trois étalons pur-sang anglais, ils ont attribué les baisses des taux de gestation au fait que certaines juments non pas poulinés depuis une longue période.

Selon (**Pickett,1994**), les facteurs primaires qui affectent la fertilité en utilisant l'insémination artificielle est le nombre et la qualité des spermatozoïdes dans le temps et la fréquence de l'insémination, le volume, les manipulation de la semence, les dilueurs de la semence et l'hygiènes des produits et des équipements utilisés ; le nombre des SPZ varie selon le type d'insémination et dépond de l'âge des étalons, de la saison, de l'année, de la taille des testicules, de la fréquence des collectes et le comportement sexuelle des étalons.

Autres facteurs qui affectent en général est la fertilité ultérieur de l'animal, la nutrition, les maladies, la concentration hormonale dans le sang et le management.

V. Conclusion

11. Conclusion :

Dans le travail présent nous concluons que l'utilisation de l'insémination artificielle pour les juments avec une semence transportés n'a pas montré une satisfaction par rapport à la saillie naturelle qui l'a dépasser de loin dans la pratique courante et ceux par le pourcentage de femelles gestantes, une efficacité moindre en matière de taux de gestation à celle de la saillie naturelle, néanmoins l'insémination artificielle et le suivi échographique ont montrés une gestion et un suivi des chaleurs plus rigoureux pour évité l'utilisation à tors et a travers des étalons et en fin un choix plus prestigieux de la race et de la qualité de l'étalon reproducteurs de point de vue transport et disponibilité.

VI. Bibliographie

12. Bibliographies:

1. al, M. G. (2011). Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim Reprod Sci*.
2. alvareng, f. o.-c.-m. (2016). advances in stallion semen cryopreservation .
3. Anderson, N. M. (2010). Reproductive efficiency of Thoroughbred.
4. equideos. (n.d.). Guide reproduction equine.
5. equine, e. r. (1999, 12). *INRA prod anim*. Retrieved from inra.e.fr:
https://www6.inrae.fr/productions-animales/layout/set/print/content/download/4206/43045/version/1/file/Prod_Anim_1999_12_5_01_8.pdf
6. ES, M. (2007). The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology*.
7. group, v. (n.d.). *medicalexpofr*. Retrieved from hermle-labortechnik.
8. Gu' venc K, R. T. (2005). Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology*.
9. horse&hound. (2005, 05 13). *understanding new equine artificiel insemination techniques*. Retrieved from horse and hound:
<https://www.horseandhound.co.uk/horse-care/horse-breeding/understanding-new-equine-artificial-insemination-techniques-63983>
10. ifce, l. h. (avril 2014). *insémination artificielle équine*. le pin au haras: librairie ifce .
11. IVIS. (2004, 12 20). *recent advances in equine reproduction*. Retrieved from pdfs semanticscholar:
<https://pdfs.semanticscholar.org/e8a3/72e646ec26d39f2afc637b1583441e444153.pdf>

12. JL, B. B. (2000). Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. 53, 1333–1344.
13. JL, P. B. (1980). The effect of semen extenders and sperm number on mare fertility. (95–98).
14. Liu IK, T. M. (2008). The diagnosis and treatment of endometritis in the mare. *yesterday and today*.
15. Liu, V. M. (1998). Nonsurgical uterotubal insemination in the mare.
16. Lyle SK, F. M. (2005). Low-dose insemination. 64.
17. McCue, J. D. (2014). Equine Reproductive Procedures.
18. meyer, c. (2009, 05). *microsoft word repro cheval 0905*. Retrieved from agritrop cirad: https://agritrop.cirad.fr/549748/1/document_549748.pdf
19. Morris LH, H. R. (2000). hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 118.
20. Pierre, B. J. (1992). Zootechnie générale. (180).
21. Reus, R. P. (2017, 02 06). *invitra.com*.
22. Rigby SL, L. A. (2001). Pregnancy rates in mares following. *Reprod Dom Anim*.
23. Schumacher, S. B. (2011). Manual of equine reproduction.
24. spermologie. (n.d.). *labodrouot.com*.
25. SS, B. S. (2012). The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology*.
26. Wagtendonk, D. D. (1998). The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive. p. 81.
27. www.ivis.org. (n.d.).