



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**EFFECT OF DIFFERENT EQUILIBRATION DURATION ON THE KINETIC
AND STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF FROZEN EQUIN
SPERMATOZOA(Revue bibliographique)**

Présenté par
**AIACHE MOHAMED YACINE
TAHARBOUCHET LOUNES**

Soutenu le 03/07/2025

Devant le jury :

Président(e) :	YAHIMI.A	MCA	ISV,BLIDA 1
Examineur :	KELANAMER.R	MCA	ISV,BLIDA 1
Promoteur :	BELALA.R	MCA	ISV,BLIDA 1
Co-promoteur :	MEDJKOUNE.M	DMV	ISV,BLIDA 1

Année : 2024/2025



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**EFFECT OF DIFFERENT EQUILIBRATION DURATION ON THE KINETIC
AND STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF FROZEN EQUIN
SPERMATOZOA(Revue bibliographique)**

Présenté par
**AIACHE MOHAMED YACINE
TAHARBOUCHET LOUNES**

Soutenu le 03/07/2025

Devant le jury :

Président(e) :	YAHIMI.A	MCA	ISV,BLIDA 1
Examineur :	KELANAMER.R	MCA	ISV,BLIDA 1
Promoteur :	BELALA.R	MCA	ISV,BLIDA 1
Co-promoteur :	MEDJKOUNE.M	DMV	ISV,BLIDA 1

Année : 2024/2025

REMMERCIEMENT:

Nous remercions le DIEU tout puissant de nous avoir donné le courage ,la force ,la patience pour réaliser se modeste mémoire.

*Nous tenon a exprimer notre profonds respect et remerciement a notre chère promoteur **Dr BELALA.R** pour son aide, ça disponibilité ,ses conseils et ces remarque pour pouvoir présenter notre travail.*

*Toute notre gratitudes s'adresse aussi a notre co-promotrice **Dr MEDJKOUNE.M** pour son aide , ça disponibilité et ses conseils.*

Nos sincère remerciement s'adressent aussi au membres du jury d'avoir accepté d'évaluer notre travail et de contribuer a son enrichissement par leurs valeureuse remarques :

***Dr YAHIMI .A** pour avoir accepté de présider le jury et d'évaluer notre travail.*

***Dr KELANAMER .R** pour avoir accepter d'examiner ce travail , d'avoir bien voulue prendre le temps d'évaluer et juger notre travail.*

Dédicace :

Je dédie ce mémoire à :

Mon chère père qui est pour moi un symbole de force, courage, discipline et je le remercie pour sa sagesse et son soutien inébranlable sans lui je n'aurais pas arrivé jusqu'ici .

A ma mère , pour son amour infini et ses encouragements quotidiens.

A mon frère et ma sœur , pour leur complicité et leur présence constante.

Au club IBN EL BAYTAR symbole d'amour, fraternité et de passion pour la médecine vétérinaire .

A l'équipe de **la clinique PETSIVETDZ** merci pour le soutien , le temps , l'enrichissement théorique et pratiques et votre accueil chaleureux , spécialement:
Dr.MOKRANE.L Dr.MOUYET.R .

Votre foi en moi a été ma plus grande force.

Ce mémoire vous est dédié , de tout mon cœur.

YACINE

Dedicace :

Je dédie ce mémoire a :

A mon père , dont la force tranquille et les conseils éclairés m'ont toujours guidé dans mes choix .

A ma mère , pour son amour inconditionnel,sa patience , et ses encouragements constants .

A mes frères compagnons de vie , de rire et de partage ,qui ont toujours cru en moi .

Au club IBN EL BAYTAR symbole d'amour, fraternité et de passion pour la médecine vétérinaire .

C'est à vous que je dois mon courage de poursuivre ce chemin .

Ce mémoire vous est dédié

LOUNES

RESUME :

La cryoconservation du sperme chez le cheval revue des avancées et des défis

La cryoconservation du sperme est une procédure essentielle dans le développement des biotechnologies de la reproduction assistée. Chez plusieurs espèces animales d'élevage, l'utilisation de sperme cryoconservé présente de nombreux avantages, qui sont devenus de plus en plus évidents au cours des dernières décennies. Toutefois, la qualité du sperme après décongélation varie considérablement selon les espèces, et même entre individus d'une même espèce.

L'amélioration de la conservation de la semence équine passe par une meilleure maîtrise de chacune des étapes de préparation du sperme. Parmi les étapes de congélation, le temps d'équilibration a été étudié chez de nombreuses espèces.

Dans l'espèce équine, (Crockett et al , 2010). ont étudié une période d'équilibration de 12h avant la centrifugation dans un milieu de réfrigération ne contenant pas de Glycérol. Ce travail a montré une amélioration de la qualité du sperme. 36 Mais l'impact d'une augmentation de la période d'équilibration dans un milieu de congélation contenant des cryoprotecteurs n'a pas encore été étudié.

Dans cette revue on a analysé, plusieurs étude sur les différents temps d'équilibration chez l'étalon ont étaient rechercher dans un milieu de congélation. **2, 4 et 6 heures d'équilibration** en utilisant le milieu de congélation commercial **INRA FREEZE**®. Pour caractériser la qualité du sperme après décongélation le système CASA (analyse de sperme assistée par ordinateur) à étaient utiliser ce qui a permis d'obtenir les paramètres cinétiques du sperme en post-décongélation.

Mots clés : étalon , semence , cryoconservation , centrifugation , équilibration

ABSTRACT :

Sperm cryopreservation is a key procedure in the development of assisted reproductive biotechnologies. In several livestock species, the use of cryopreserved sperm presents many advantages that have become increasingly evident over recent decades. However, sperm

quality after thawing varies greatly between species and even among individuals of the same species.

Improving the preservation of equine semen requires better control of each stage of sperm preparation. Among the freezing steps, the equilibration time has been studied in many species. In horses, Crockett et al. investigated a 12-hour equilibration period before centrifugation in a cooling medium without glycerol. This study showed an improvement in sperm quality. However, the impact of a longer equilibration period in a freezing medium containing cryoprotectants has not yet been studied.

In this revue we analyse multiple studies in different equilibration times (2, 4, and 6 hours) were tested in stallions using the commercial freezing medium INRA FREEZE®. To assess sperm quality after thawing, the CASA system (Computer-Assisted Sperm Analysis) was used, allowing evaluation of post-thaw sperm kinetic parameters.

Keywords : stallion , semen , cryoconservation ,equilibration ,centrifugation

الملخص :

تُعدّ تقنية حفظ السائل المنوي بالتجميد إجراءً أساسياً في تطوير تقنيات التكاثر بمساعدة البيوتكنولوجيا. في عدة أنواع من الحيوانات المزرعية، يوفر استخدام السائل المنوي المجمد فوائد عديدة أصبحت أكثر وضوحاً خلال العقود الأخيرة. ومع ذلك، تختلف جودة النطاف بعد الذوبان بشكل كبير بين الأنواع، وحتى بين الأفراد داخل النوع الواحد. السائل المنوي. من بين مراحل التجميد، تمت دراسة وقت التوازن (الاستقرار) في العديد من الأنواع في الخيول، قام كروكيت وآخرون بدراسة فترة توازن مدتها 12 ساعة قبل الطرد المركزي في وسط تبريد لا يحتوي على الجليسرول، وأظهرت النتائج تحسناً في جودة النطاف. ومع ذلك، لم تتم دراسة تأثير زيادة فترة التوازن في وسط تجميد يحتوي على عوامل واقية من التجميد (كرايوبروتكتور).

INRA في هذه الدراسة، تم اختبار فترات توازن مختلفة (2، 4، و6 ساعات) لدى الفحول باستخدام الوسط التجاري للتجميد FREEZE

لتقييم جودة النطاف بعد الذوبان، تم استخدام نظام CASA والذي مكن من الحصول على المعايير الحركية للنطاف بعد التجميد

الكلمات المفتاحية : السائل المنوي , الفحل , التبريد , موازنة , الطرد المركزي.

SOMMAIRE :

REMMERCIEMENT:
Dédicace :
RESUMER :
ABSTRACT :
SOMMAIRE :
LISTE DES TABLEAUX :
LISTE DES FIGURES :
LISTE DES ABREVIATIONS :
INTRODUCTION :	1
I. ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL DE L'ETALON :	3
I.1. La partie glandulaire(testicules):	3
I.1.1. Topographie des testicules:	3
I.1.2. Anatomie des testicules:	4
I.2. La partie tubaire(excrétrice):	5
I.2.1. les voies spermatiques intra-testiculaires:	5
I.2.2. les voies spermatiques extra-testiculaires :	5
I.3. La partie uro-génitale:	6
I.3.1. l'urètre d'étalon :	6
I.3.2. Glandes annexées à l'urètre :	6
II. PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL GENITAL DU CHEVAL :	6
II.1. La saison sexuelle de l'étalon :	6
II.1.1. Hormone :	7
II.1.2. Cycle saisonnier :	7
II.2. De la spermatogenèse à l'éjaculation :	8
II.2.1. spermatogenèse, spermiogénèse et la spermiation :	8
II.2.1.1. spermatogénèse (≈ 57 jours chez l'étalon) :	8
II.2.1.2. Maturation (dans l'épididyme) :	8
II.2.1.3. Capacitation (dans les voies génitales femelles) :	8
II.2.1.4. Transport, stockage des spermatozoïdes :	8
II.2.2. Régulation de la fonction endocrine du testicule:	9
II.3. CARACTÉRISTIQUE DE LA SEMENCE ÉQUINE:	10
II.4. Morphologie :	10
II.5. Composition chimique :	11
Caractéristiques :	11
III. TECHNIQUES ET MÉTHODES DE LA CRYOCONSERVATION :	12
III.1. Histoire et présent de la cryoconservation de sperme équin :	12
III.2. Effets cellulaire et moléculaire :	12
III.2.1. Les effets de la cryoconservation sur la semence :	12
III.2.1.2. Les effets sur les membranes cellulaires :	12
III.2.2. Les effets sur le noyau et l'ADN :	13
III.2.3. Les changements de type capacitation :	14
2.1.4.Effets des différentes étapes de cryoconservation sur les spermatozoïdes	14
III.2.3.1. Effet de l'ajout de l'agent cryoprotecteur :	14
III.3. Collecte de la semence et cryoconservation :	16
III.3.1. Méthodes de récolte de la semence :	16

III.3.1.1. récolte a l'aide du vagin artificiel :	16
III.3.2. contrôle de la semence :	18
III.3.2.1. Examens macroscopiques :	18
III.3.2.1.1. volume :	18
III.3.2.1.2. la couleur et aspect :	19
III.3.2.1.3. pH :	19
III.3.2.2. examen microscopique :	19
III.3.2.2.1. concentration :	19
III.3.2.2.2. la motilité:	20
III.3.2.2.3. La morphologie:	23
A l'aide des colorants de fonds :	23
Principe :	24
III.3.3. La cryoconservation dans l'espèce équine :	25
III.3.3.1. les agents cryoprotecteurs :	25
III.3.3.2. Les cryoprotecteurs non pénétrants :	25
III.3.3.3. Les cryoprotecteurs pénétrants:	26
III.3.3.4. Dilution du sperme:	26
III.3.3.5. Les dilueurs :	27
III.3.3.6.1. Récolte et évaluation de la semence:	28
III.3.3.6.3. La dilution:	29
III.3.3.6.7. La décongélation	31
IV. L'IMPACT DE LA DURÉE D'ÉQUILIBRATION LORS DE LA CONGÉLATION DU SPERME	
D'ÉTALON :	32
IV.1. MATERIEL ET METHODES :	33
IV.2. Resultats:	37
IV.3. DISCUSSION :	41
1. Échantillons	41
2. Paramètres de mobilité :	42
IV.4. CONCLUSION :	43
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	44

LISTE DES TABLEAUX :

TABLEAU 01	Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après: Fontbonne, 1992)	22
-------------------	---	-----------

TABLEAU 02	Note d'appréciation subjectif de la mobilité des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : : Fontbonne, 1992).	23
TABLEAU 03	composition de Kenney et l'INRA96 (pour 1L) (Marc Stéphanie, 2015) et le Burns and Renser.	27
TABLEAU 04	Liste des étalons participants à l'étude. Dans un souci d'anonymat, la référence de l'étalon est utilisée à la place de son nom	33
TABLEAU 05	Tableau des moyennes et des p-values de la mobilité totale en fonction des durées d'équilibration	38
TABLEAU 06	Tableau des moyennes et des p-values de la mobilité progressive en fonction des durées d'équilibration	39
TABLEAU 07	Tableau des différentes moyennes en fonction des paramètres de mobilité ainsi que les p-values associées	40

LISTE DES FIGURES :

FIGURE 1	dessin du tractus reproductif de l'étalon vue en coupe sagittale (MC.kinnon. A1993)	3
FIGURE 2	testicule et épидидyme gauches du cheval. Conformation et moyen de fixité (BARONE.1956)	4
FIGURE 3	schéma d'une coupe transversal des testicules de cheval (enveloppe et pénis) (D'après TIBARY et al. (2005)).	4
FIGURE 4	organisation interne du testicule et de l'épididyme (Schatten ; 2007).	6
FIGURE 5	structure de pénis et du prépuce de l'étalon (P.L. Senger, Ph. D., 2003).	10
FIGURE 6	schéma de l'axe hypothalamus-hypothalamus-hypophyse-testicule chez l'étalon (D'apres Roser et al 2008)	10
FIGURE 7	les différentes étapes de la spermatogenèse (Senger,2012)	13
FIGURE 8	Les différentes cibles des Espèces Réactives (Poisson, 2013)	15
FIGURE 9	les taux de suivre cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement (courbičre et al, 2009).	16
FIGURE 10	vagin artificiel de type Missouri (Steven p.et al.2011).	17
FIGURE 11	vagin artificiel de type Colorado (John dascanio.2014).	17
FIGURE 12	schéma de principe Vagin artificiel japonais (nishikawa)	20
FIGURE 13	hématimètre : cellule de Thoma (https://www.ozyme.fr/ressources)	20
FIGURE 14	photomètre Minitube avec cuvette remplie en sperme (John Dascanio. 2014)	21
FIGURE 15	microscope a contraste de phase muni d'une plaque chauffante (Marie Allimant,2010.)	24
FIGURE 16	Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et quelque anomalie pouvant être rencontrées (Steven P. et al, 2011)	29
FIGURE 17	centrifugation de sperme dilué (A), puis aspiration de surnagent après centrifugation (B) (Steven P. et al. 2011)	30
FIGURE 18	Machine de remplissage et de sertissage de semence	31

FIGURE 19	(A) paillettes déposées sur une grille puis, (B) placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide, puis stockées dans une cuve d'azote liquide (C)	34
FIGURE 20	<u>Mannequin de monte utilisé lors de nos prélèvements à Oniris</u> <u>VetAgroBio</u>	37
FIGURE 21	Schéma résumant les étapes du protocole	37
FIGURE 22	Boxplot de la mobilité totale en fonction du temps d'équilibration (2h, 4h ou 6h)	39

LISTE DES ABREVIATIONS :

GH	GROWTH HORMONE
ATP	ADENOSINE TRIPHOS-PHATE
SPZ	SPERMATOZOIDES
CASA	COMPUTER-ASSISTED-SPERM ANALYSIS
ADN	ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE
ACT	ACTIVINE
INH	INHIBINE
PRL	PROLACTINE
IA	INSIMINATION ARTIFICIELLE
DMSO	DIMETHYLSOLFOXYDE
TMOT	Mobilité totale
VIAB	Viabilité
PMOT	LE POURCENTAGE DE SPERMATOZOIDE PROGRESSIVE
VAP	AVERAGE PATHE VELOCITY
VCL	CURVILINEAR VELOCITY
ALH	AMPLITUDE OF LATERAL HEAD DISPLACEMENT
FSH	FOLLICULE STIMULATING HORMONE
LH	LITEINIZING HORMONE
GNRH	GONADOTROPIN-RELEASING -HORMONE

INTRODUCTION :

L'utilisation du sperme d'étalons congelés pour l'insémination artificielle est en augmentation dans la filière équine. Cette technologie est d'une grande importance pour l'élevage équin, car elle permet le stockage et le transport à long terme de la semence (indépendamment du lieu et de la disponibilité des étalons), permet de conserver la semence d'animaux génétiquement supérieurs et permet le développement d'un programme d'élevage réussi, ainsi que de contrôler ou d'éradiquer les maladies vénériennes et autres maladies infectieuses.

Développée au cours des années 1980, l'insémination artificielle (IA) est maintenant communément utilisée pour la reproduction équine.

Mais malgré les progrès qu'ont connu les techniques de congélation et la qualité de la semence fraîche, il n'est pas possible de congeler avec succès tous les éjaculats. (Bottrel et al , 2019). En effet il y a une grande variabilité individuelle entre étalons, environ 20% d'entre eux produisent du sperme qui ne peut pas être congelé à cause d'une faible mobilité et viabilité après congélation et décongélation. Ils sont qualifiés de "poor" freezers. (Hidalgo et al , 2017)

Pour minimiser cette variabilité entre étalon, des études ont été conduites visant à développer un protocole optimal de congélation. Comme le protocole de congélation joue un rôle important sur la viabilité des spermatozoïdes après décongélation, des améliorations conduisant à une meilleure survie cryogénique des spermatozoïdes permettent de congeler avec succès d'avantage d'éjaculats provenant d'un plus grand nombre d'étalons. (AL-KASS Z , MORRELL JM ,2024)

Il existe de nombreuses étapes lors du protocole de congélation et chacune d'entre elles est importante pour la conservation de la qualité du sperme post-décongélation.

Les milieux de congélation utilisés sont aussi nombreux, avec des caractéristiques qui varient, et en constante recherche d'amélioration. 1 Notre étude ici porte sur une étape particulière, celle du refroidissement à 4°C dite d'équilibration juste avant la congélation. Cette étape permet au sperme de s'adapter à des températures plus faibles, au cryoprotecteur de traverser la membrane cellulaire, de permettre les mouvements d'eau en dehors du spermatozoïde et de réduire les dommages cellulaires. (MUIÑO R et al ,2002)

Parmi les recommandations actuelles, l'étape d'équilibration est de 75 min à 5°C.(Crockett et al , 2010)ont montré qu'une réfrigération de 12h avant la congélation dans un milieu de réfrigération pouvait être bénéfique pour la mobilité des spermatozoïdes après décongélation.³⁶ Mais aucune étude n'a testé l'allongement de la durée d'équilibration dans un milieu de congélation chez l'étalon.

Le but de cette étude est donc de tester différentes durées d'équilibration : 2h, 4h et 6h ; dans un milieu donné, l'INRA FREEZE[®], et de mesurer des paramètres cinétiques des spermatozoïdes après décongélation.

Dans une première partie, nous présenterons des rappels anatomiques et physiologiques de l'appareil reproducteur de l'étalon. Nous nous intéresserons dans une seconde partie aux méthodes de congélation et à l'étude de la qualité du sperme en post-décongélation. Enfin on va étudié une expérimentation dans une dernière partie les différentes durées d'équilibration lors de la congélation sur la qualité du sperme d'étalon.

I. ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL DE L'ÉTALON :

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

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

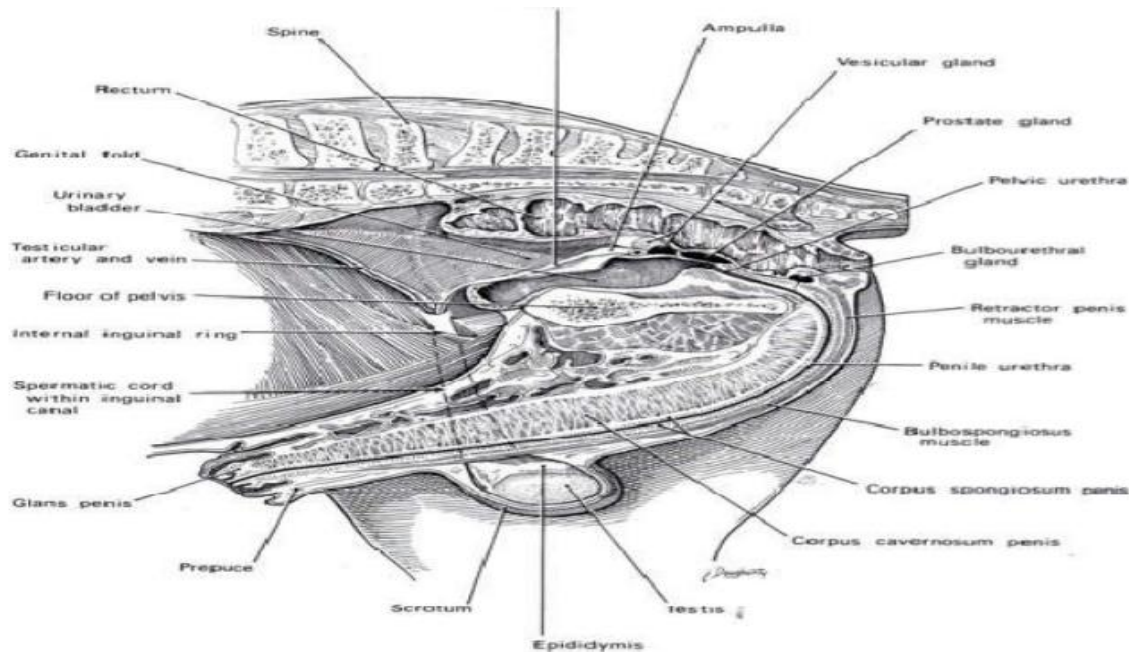


Figure 01 : dessin du tractus reproductif de l'étalon vue en coupe sagittale (**MC.kinnon. A1993**)

I.1. La partie glandulaire(testicules):

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

I.1.1. Topographie des testicules:

Les testicules sont des organes pairs de formes ovoïdes, suspendus en position horizontale par le scrotum en regard de la région pelvienne de l'étalon. Les testicules dont la taille et le poids sont proportionnels au poids de l'animal; taille de testicule en cm (9_11cm de long; 5_6 cm de large), poids en g (100_280g) (190g en moyenne). (**D'après baronne 2001, bruyas 2014**)

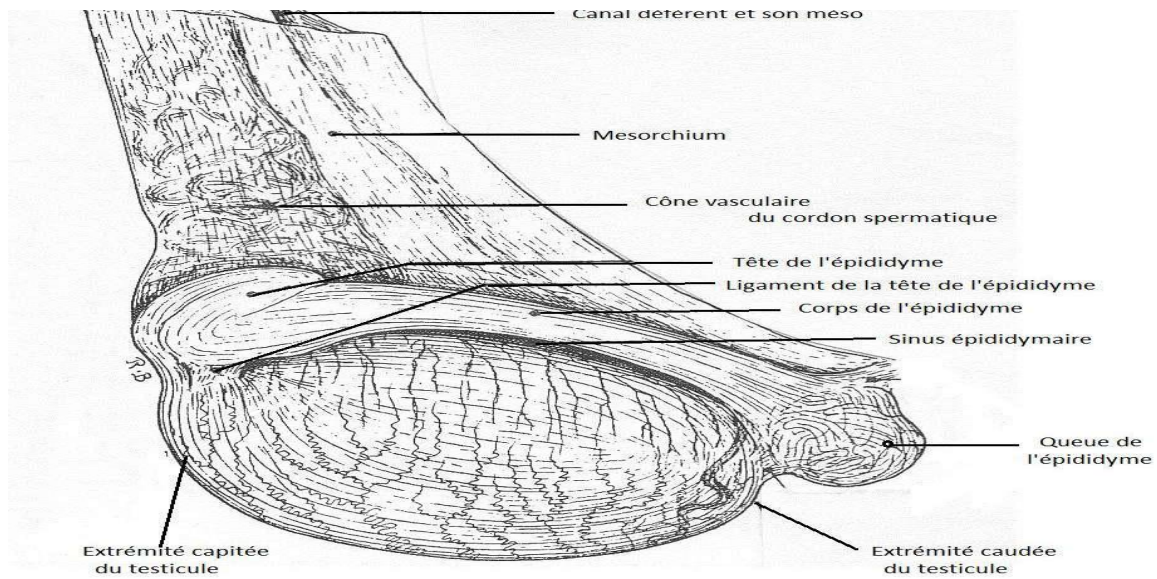


Figure 02 : testicule et épидидyme gauches du cheval. Conformation et moyen de fixité (BARONE.1956)

I.1.2. Anatomie des testicules:

Un testicule d'étalon pourrait mesurée **80_140mm** de long sur **50_80mm** de large et peser environ **225g**. Cependant, l'âge et la saison affectant grandement le poids des testicules, leur taille et poids augmente proportionnellement à ceux de l'individu jusqu'à environ l'âge de **4 à 5** ans.

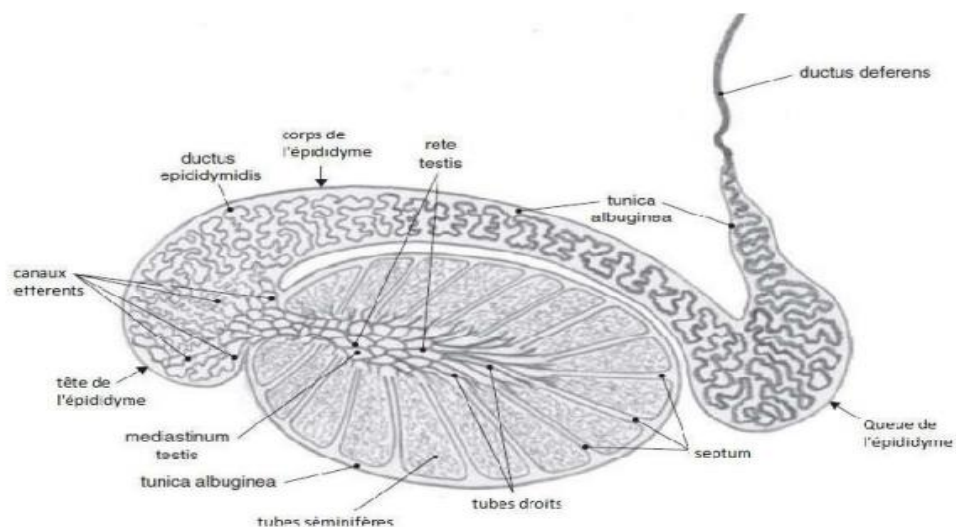


Figure 03 : organisation interne du testicule et de l'épididyme (Schatten ; 2007).

I.1.2.1. Les tubes séminifères:

Chaque lobule du parenchyme testiculaire contient deux à quatre tubes séminifères contournés, qui sont rassemblés par des tubes séminifères droits(**Baronne 1956**)

il comporte deux types de cellules:

-**les cellules de sertoli:** L'évolution des spermatogonies en spermatozoïdes se fait entre les cellules de Sertoli, qui jouent différents rôles.(**marie Allimant,2010**).

-**Les cellules germinales aux différents stades de leur évolution :**

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

I.2. La partie tubaire(excrétrice):

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

I.2.1. les voies spermatiques intra-testiculaires:

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

I.2.2. les voies spermatiques extra-testiculaires :

Sont composée de l'épididyme , le canal déférent , les glandes vésiculaires(**Baronne R.2001;Thibault C.;2001**).

I.3. La partie uro-génitale:

I.3.1. L'urètre d'étalon :

L'urètre mâle est un long conduit impair servant à l'excretion de l'urine et au transport du sperme. Il part du col de la vessie, reçoit les voies spermatiques, longe le plancher pelvien, sort du bassin et se prolonge dans le penis, se terminant par le méat urinaire.(**BARONE 2001**).

I.3.2. Glandes annexées à l'urètre :

A l'urètre sont annexées des glandes dont les sécrétions sont déversées au moment de l'éjaculation et diluent le sperme, lui donnant ainsi sa composition finale(**BARONE,2001**).

On distingue :

La prostate ,Les glandes de Cowper , la verge ou pénis(**Baronne 2001;Noakes et al.2009**)

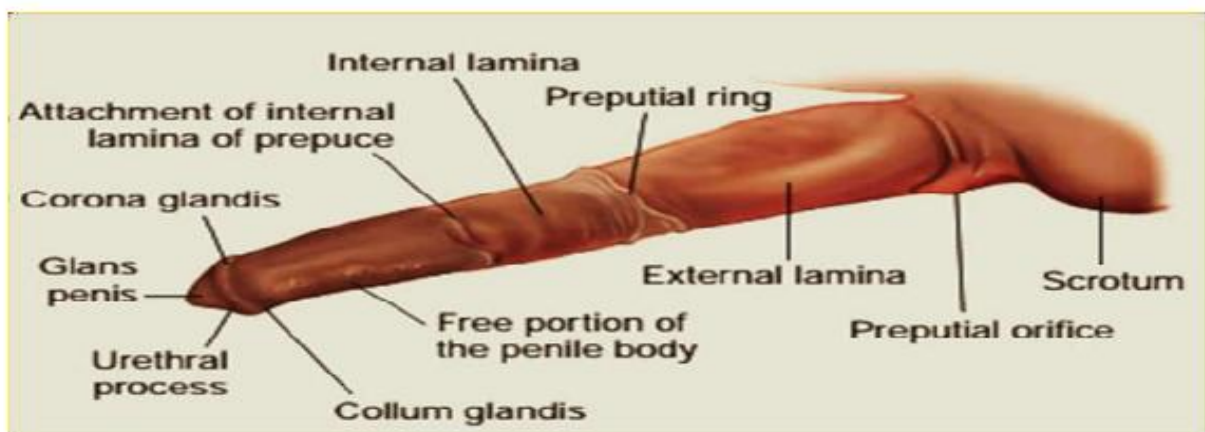


Figure 04 : structure de pénis et du prépuce de l'étalon (P.L. Senger, Ph. D., 2003).

II. PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL GENITAL DU CHEVAL :

II.1. La saison sexuelle de l'étalon :

L'étalon peut se reproduire physiologiquement toute l'année, mais son comportement sexuel est influencé par la saisonnalité, notamment en période de jume. Cependant, il est

possible de prélever des étalons toute l'année pour analyser la semence ou congeler des paillettes de sperme(Tibary et Bakkowy, 2005).

II.1.1. Hormone :

Voici certaines des hormones qui interviennent dans la reproduction chez l'étalon :

Hormone folliculo-stimulante - Produite par l'hypophyse, elle stimule la production de sperme.

Hormone lutéinisante et testostérone - Nécessaires pour compléter le processus de production de sperme.

Testostérone - Favorise le développement et le fonctionnement des glandes sexuelles annexes, cause l'apparition des caractères sexuels secondaires et est nécessaire à l'accouplement, notamment parce qu'elle joue un rôle dans l'intérêt sexuel, l'érection et l'éjaculation. La testostérone stimule également la croissance corporelle.

II.1.2. Cycle saisonnier :

Chez l'étalon comme chez la jument, la performance de reproduction varie selon les saisons, en raison de l'influence que la longueur du jour exerce sur la production hormonale. (Tibary et Bakkowy, 2005). l'accroissement de la performance par rapport aux mois d'automne ou d'hiver s'observe à plusieurs niveaux :

Accroissement du volume séminal - Pendant les mois d'été, un étalon moyen à maturité produit environ 8 milliards de spermatozoïdes par jour.

Accroissement de l'intérêt sexuel les saisons influencent le temps de réaction des étalons à la mise en présence de la jument.

Accroissement de la capacité d'éjaculation - les saisons influencent la capacité d'éjaculation.

II.2. De la spermatogenèse à l'éjaculation :

II.2.1. spermatogenèse, spermiogénèse et la spermiation :

II.2.1.1. spermatogénèse : (≈ 57 jours chez l'étalon) :

- Spermatogonies → Spermatocytes → Spermatides → Spermatozoïdes
- Processus sous contrôle hormonal, avec brassage génétique via la méiose. **(Brito 2007)**.
- nombre total de spermatozoïdes par éjaculat (15 milliards), **(Bruyas 2014)**.
- La spermatogenèse est divisée en plusieurs étapes au sein des tubes séminifères :
 - **La spermatocytogenèse** : étape de méiose permettant la maturation des spermatogonies en spermatides.
 - **La spermiogenèse**: étape au cours de laquelle les spermatides évoluent en spermatozoïdes.
 - **La spermiation** : libération des spermatozoïdes dans les tubes séminifères.

II.2.1.2. Maturation (dans l'épididyme) :

- Acquisition de la mobilité et de la capacité fécondante. **(Senger, 2005)**.
- Transformation biochimique de la membrane.
- Absorption de carnitine et réorganisation membranaire.

II.2.1.3. Capacitation (dans les voies génitales femelles) :

- Réorganisation membranaire rendant possible la réaction acrosomique.
- Activation des mécanismes de fécondation. **(Thibault. C, 2001 ; Heymon. Y ; 2005)**.

II.2.1.4. Transport, stockage des spermatozoïdes :

Le temps stockage des spermatozoïdes dans l'épididyme est influencé par l'éjaculation. En effet, le nombre de spermatozoïdes e cours de stockage est plus important chez les étalons peu collectés ou sexuellement peu actifs. **(MCKINNON et al.,1993)**.

II.2.2. Régulation de la fonction endocrine du testicule:

La fonction de reproduction est régulée par le système neuroendocrinien. Il est prouvé que la glande pinéale et l'axe hypothalamo hypophyso-testiculaire sont responsables de la régulation de la fonction de reproduction chez l'étalon.(ROSER et al., 2008) ,(ARAI et al.2006),(GERLACH et al.,2000).

II.2.2.1. L'axe hypothalamus-hypophyse-testicules (HPT) :

La glande pinéale située dans le cerveau, sécrète la mélatonine, hormone régulant la libération de Gonadolibérine (GnRH) par l'hypothalamus, qui stimule la sécrétion de deux hormones clés par l'hypophyse :

- LH (hormone lutéinisante)
- FSH (hormone folliculo-stimulante)

Ces hormones agissent sur les testicules pour :

- Stimuler la spermatogenèse
- Réguler la production de testostérone, œstrogènes, inhibine et activine

Un rétrocontrôle négatif intervient :

- La testostérone et les œstrogènes inhibent la GnRH, la LH et la FSH
- L'inhibine et l'activine modulent la FSH

D'autres hormones comme la prolactine, l'hormone de croissance et les hormones thyroïdiennes participent aussi à la régulation de la fonction reproductive.(YOUNGQUIST et al., 1997)..

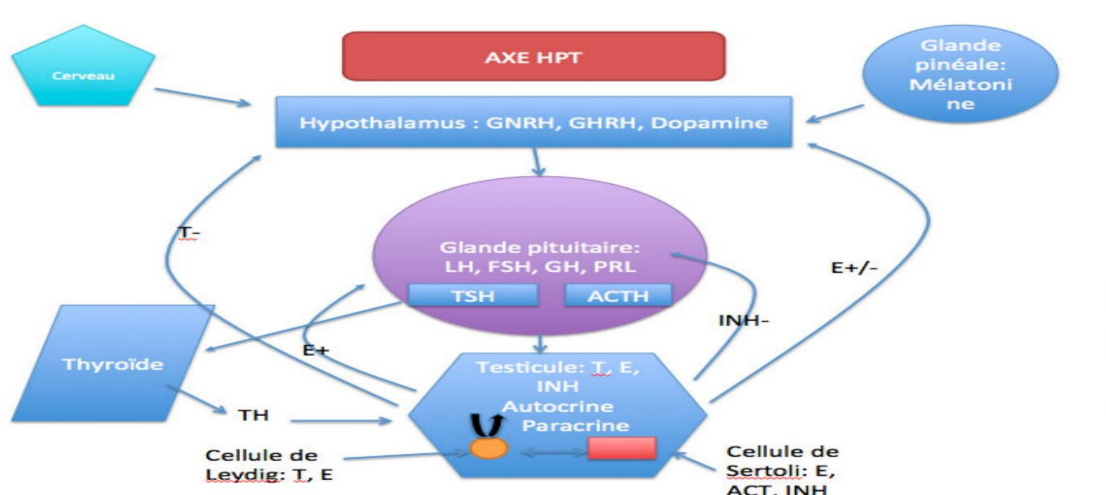


Figure 11: Schéma de l'axe hypothalamus-hypophyse-testicule (HPT) de l'étalon. E: oestradiol et estrogènes; Inh: Inhibine; ACT: Activine; PRL: Prolactine; TH: Hormone Thyroïde; GH: Hormone de croissance; GHRH: Hormone de libération de l'hormone de croissance; GnRH: Gonadolibérine; LH: Hormone lutéale; FSH: Hormone follicule-stimulante; T: Testostérone. D'après Roser et al., (2008).

FIGURE 05 : schéma de l'axe hypothalamus-hypophyse-testicule chez l'étalon (Roser et al 2008)

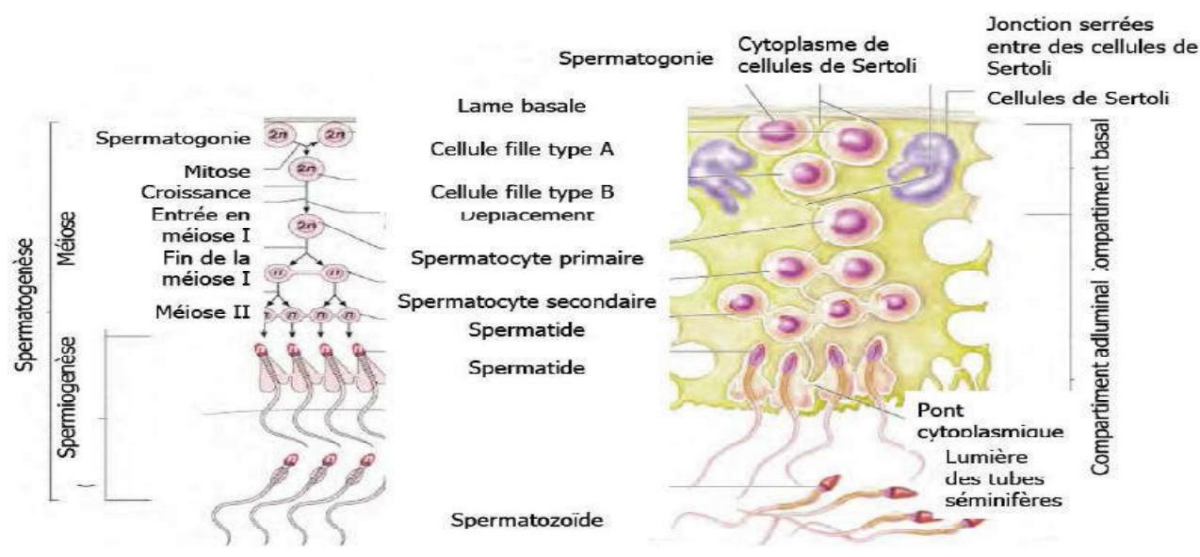


FIGURE 06 : les différentes étapes de la spermatogenèse (Senger,2012)

II.3. CARACTÉRISTIQUE DE LA SEMENCE ÉQUINE:

II.4. Morphologie :

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

-La tête, formée :

- **du noyau** (qui contient l'information génétique dans l'ADN fortement condensé)
- **de l'acrosome** (contenant les enzymes nécessaires à la fécondation) avec une portion spécialisée de l'acrosome appelée segment équatorial.

- **Le flagelle formé :**

- **Du cou**, point d'attachement du flagelle sur la tête, par un système de rotule. C'est la pièce la plus vulnérable du spermatozoïde.

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

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

II.5. Composition chimique :

La composition chimique du sperme est la suivante :

- eau (80%) ,matière organique (6%) ,ions (calcium, phosphate...) , lipides ,glucides (fructose) ,albumines et globulines ,bases aminé (**Heymon et Vignon, 2005**).

Caractéristiques :

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

Couleur : Normalement, le sperme est blanc laiteux.

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

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

Nombre total : vers 10 milliards de spz en moyenne.

III. TECHNIQUES ET MÉTHODES DE LA CRYOCONSERVATION :

III.1. Histoire et présent de la cryoconservation de sperme équin :

Les premiers spermatozoïdes de mammifères ont été conservés avec succès à -79°C, démontrant les propriétés cryoprotectrices du glycérol, avec une naissance issue d'insémination en 1957 (**Smith et al., 1960; Barker & Gandier, 1957**). La cryosurvie varie entre étalons, avec 20% produisant une semence bien congelée, 60% acceptable, et 20% mal, influençant la fertilité (**Sieme et al., 2008**). La sélection privilégie performances et phénotype, pas la qualité du sperme.

III.2. Effets cellulaire et moléculaire :

III.2.1. Les effets de la cryoconservation sur la semence :

III.2.1.1. Les effets sur le métabolisme cellulaire :

L'intensité du métabolisme est sous l'influence de la température. Une diminution de la température entraîne une nette réduction de l'activité métabolique. A des températures suffisamment basses, c'est-à-dire négatives, la plupart des processus métaboliques sont stoppés. La congélation des spermatozoïdes induit donc un ralentissement voire un arrêt de leur métabolisme (**Loomis et Graham, 2008**).

III.2.1.2. Les effets sur les membranes cellulaires :

La cryoconservation affecte la membrane plasmique par des modifications chimiques, topographiques et mécaniques. Cette membrane, une bicouche lipidique avec parties hydrophiles et hydrophobes orientées respectivement vers l'extérieur et le centre, contient des lipides sensibles aux radicaux libres générés lors de la congélation, causant une peroxydation. Chaque lipide a une température de changement de phase (fluide à gel), et en dessous, les

lipides forment des microdomaines, réorganisant la membrane et créant des "trous" (cold shock), fragilisant la membrane et causant dommages ou ruptures (**Marc Stéphanine, 2015**). Après décongélation, les lipides retrouvent leur forme liquide, mais des altérations membranaires multiples affectent la membrane plasmique, notamment dans les spermatozoïdes où l'acrosome et les mitochondries, sensibles à la cryoconservation, subissent de sévères conséquences .

III.2.2. Les effets sur le noyau et l'ADN :

Le noyau des spermatozoïdes peut être altéré lors de la cryoconservation, affectant l'intégrité de l'ADN, cruciale pour une descendance viable conforme aux parents. Les spermatozoïdes endommagés produisent des radicaux libres, notamment après congélation, causant une peroxydation délétère pour l'ADN, avec cassures et modifications de bases. Ces altérations ont des conséquences dramatiques sur le génome de la descendance, sa viabilité et son développement (**Labbé et al., 2002; Luvoni, 2003**).

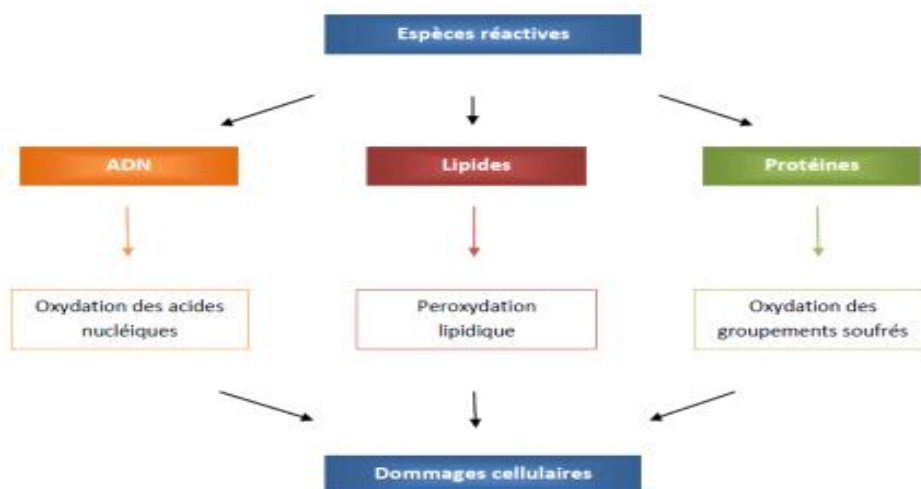


Figure 07 : Les différentes cibles des Espèces Réactives (Poisson, 2013)

III.2.3. Les changements de type capacitation :

La déstabilisation des membranes lors de la cryoconservation entraîne une réaction acrosomique prématurée, réduisant la durée de vie et la fécondité des spermatozoïdes. La membrane subit des changements de composition durant la capacitation, la rendant perméable aux ions calcium, déclenchant la réaction acrosomique qui permet la fusion avec l'ovocyte. Pendant la congélation et décongélation, les spermatozoïdes subissent une "cryocapacitation", montrant des mouvements hyperactifs linéaires et vigoureux, typiques des spermatozoïdes non capacité. Ces changements membranaires, dus au refroidissement, altèrent la fonctionnalité du canal de calcium, augmentant la concentration intracellulaire de calcium, un phénomène observé lors de la capacitation et la réaction acrosomique (Luvoni, 2003 ; Rota et al., 2006 ; Cortes et al., 2006 ; Pena Martinez, 2004 ; Burgess et al., 2012).

2.1.4.Effets des différentes étapes de cryoconservation sur les spermatozoïdes:

Chaque étape du processus de congélation, de la dilution jusqu'à la congélation proprement dite, peut avoir des effets néfastes sur la survie du spermatozoïde et être à l'origine de la diminution de la fécondité.

III.2.3.1. Effet de l'ajout de l'agent cryoprotecteur :

L'ajout d'un agent cryoprotecteur améliore la survie des cellules en augmentant la concentration totale en solutés dans le milieu extérieur, réduisant la quantité de glace formée. Initialement, il déshydrate la cellule, mais une pénétration ultérieure équilibre la cellule, la protégeant des dommages. La perméabilité varie selon la composition membranaire et l'agent utilisé, influençant la survie des spermatozoïdes (Loomis, 2008 ; Elits, 2005b ; Day et Stacey, 2007 ; Graham, 2008 ; Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Oldenhof et al., 2013).

III.2.3.2. Conséquences de l'étape de congélation proprement dite et de décongélation :

Pendant la congélation, le stress osmotique provoque des changements de volume cellulaires, dépassant parfois les limites viables. Lors du refroidissement, la glace extracellulaire crée un gradient osmotique, provoquant un mouvement des lipides et une déshydratation pour

maintenir l'équilibre des solutés. Une décongélation rapide peut causer des ruptures membranaires et une déshydratation excessive, endommageant la membrane plasmique et dénaturant les protéines (Graham, 2007 ; Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Oldenhof et al., 2013) .

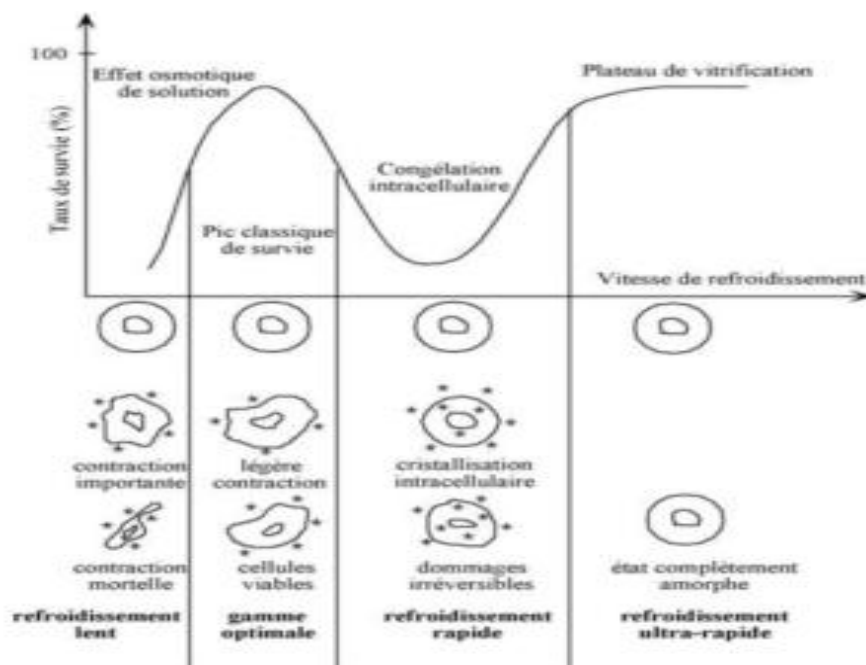


Figure 08 : les taux de suivre cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement (courbière et al, 2009).

Pendant la décongélation, les spermatozoïdes subissent des conditions hypotoniques dues à l'absorption d'eau, provoquant un stress hypotonique préjudiciable, suivi d'un stress hypertonique après cryoconservation. Une décongélation rapide prévient la recristallisation de l'eau intracellulaire, réduisant les dommages. Les spermatozoïdes décongelés rapidement sont exposés à des solutés concentrés, tandis qu'une décongélation lente altère leur survie (Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Oldenhof et al., 2013). La capacité de survie dépend de la perméabilité membranaire et de la gestion des microdomaines, nécessitant des protocoles optimisés pour limiter les dommages (Briand-Amirat et al., 2006 ; Loomis et Graham, 2008).

III.3. Collecte de la semence et cryoconservation :

III.3.1. Méthodes de récolte de la semence :

III.3.1.1. récolte a l'aide du vagin artificiel :

A. Description

Le vagin artificiel, adapté à l'espèce en fonction de la conformation du pénis et de la taille de l'animal, est un appareil simple constitué d'un manchon extérieur en caoutchouc rigide, d'un manchon intérieur gonflable, maintenus à 45-48°C avec une pression équivalente à celle du vagin femelle. Un cône en silicone prolonge l'appareil, relié à un tube pour recueillir la semence, avec une extrémité lubrifiée pour introduire le pénis (**Noakes et al., 2009**).

B. Choix de type de vagin artificiel

Le choix du vagin artificiel et sa préparation conditionnent l'efficacité et la qualité de la semence récoltée. De nombreux modèles de vagins artificiels sont disponibles, (**Blanchard et al, 2003**). Les modèles du vagin artificiel les plus couramment utilisés et leurs principales caractéristiques sont :

Vagin artificiel Missouri :

Le vagin artificiel Missouri est largement utilisé, surtout avec les étalons. Il est relativement peu coûteux, léger, facile à assembler et à nettoyer, retient bien la chaleur, et présente un faible risque de contamination du sperme. Deux longueurs (16 et 22 pouces) sont disponibles, les étalons à grand pénis préférant le plus long (**Steven P. et al., 2011**).



Figure 09 : vagin artificiel de type Missouri (Steven p.et al.2011).

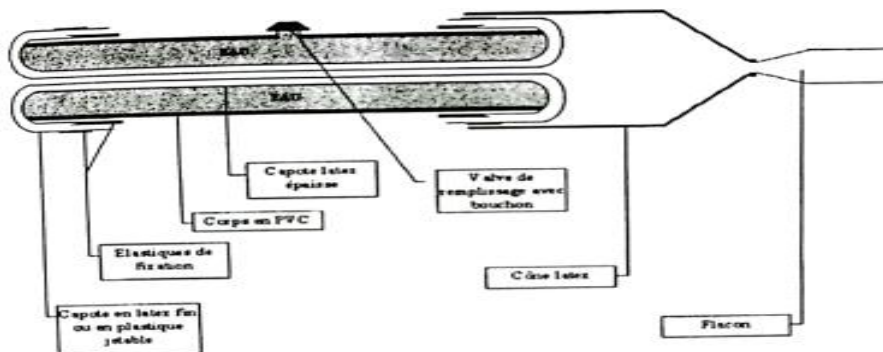
Vagin artificiel colorado :

Le vagin artificiel Colorado est plus lourd mais offre une bonne rétention de chaleur avec deux doublures en caoutchouc, réduisant la contamination du sperme. Sa longueur nécessite une régulation soignée de la température pour éviter les dommages causés par la chaleur au sperme éjaculé (Steven P. et al., 2011).



Figure 10: vagin artificiel de type Colorado (John dascanio.2014).

Vagin artificiel japonais(nishikawa) :



Une bonnette isotherme viendra couvrir l'ensemble cône latex et flacon de récolte

Comme montré ci-dessous, il est possible d'adjoindre 2 bourrelets qui auront pour effet de maintenir les élastiques en place et de rendre les bords du vagin artificiel moins « agressifs »
Ces bourrelets peuvent être soit montés en usine (cf. liste du matériel) soit réalisés avec de la gaine en mousse isotherme

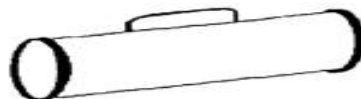


FIGURE 11 : schéma de principe Vagin artificiel japonais (nishikawa)

Le vagin artificiel japonais est léger, facile à assembler et nettoyer, avec une seule doublure en caoutchouc minimisant le contact du sperme. Cependant, l'eau peut couler, augmentant la pression et le risque de contamination, tandis que des trous dans la gaine peuvent causer une fuite d'eau (Steven P. et al., 2011).

C. Préparation du vagin artificiel

Avant la collecte, le vagin artificiel est rempli d'eau à 45-55°C pour maintenir 44-48°C, aidant à stimuler le pénis et faciliter l'éjaculation. La pression doit être ajustée pour un contact uniforme, avec température et pression constantes pour maximiser la récolte (Steven P. et al., 2011). La surface interne est lubrifiée stérile, et le sperme est recueilli à température corporelle. Un filtre sépare les fractions liquide et gélatineuse, le gel étant retiré immédiatement (**Blanchard TL et al., 2003**).

D. La collecte de sperme :

Dans La collecte de sperme chez les étalons se fait souvent avec un vagin artificiel, nécessitant une jument en œstrus comme leurre, préparée pour minimiser les risques. Le montage doit éviter obstructions et assurer une bonne assise, avec l'éjaculation facilitée par une pression uniforme et une température constante. Le gland du pénis doit rester lubrifié, et le vagin est retiré après éjaculation pour éviter contamination (**John Dascanio, 2014 ; Steven P. et al., 2011**).

III.3.2. contrôle de la semence :

III.3.2.1. Examens macroscopiques :

III.3.2.1.1. volume :

La mesure du volume de l'éjaculat, utilisée pour calculer le nombre total de spermatozoïdes, se fait avec une éprouvette graduée après la récolte, mais n'indique pas la qualité de la semence, variable selon les individus, leur âge, taille, fréquence des récoltes et la méthode utilisée. Le volume dépend aussi des sécrétions des glandes annexes (**Marc Stéphanine, 2015**).

III.3.2.1.2. la couleur et aspect :

A l'état normal, la semence est blanche, laiteuse, homogène et trouble, inodore, mais une odeur anormale peut indiquer une contamination par l'urine ou des bactéries (**Johnston et al., 2001**). Une couleur jaune signale de l'urine ou un exsudat inflammatoire, verte une infection, rouge ou brune du sang. En cas d'anomalie, la semence est centrifugée (300-1000 tours/min, 5 min) avec un dilueur Tris ou solution saline antibiotique, puis re-suspendue pour insémination (**Simpson et al., 1998**).

III.3.2.1.3. pH :

Le pH normal du sperme d'étalon varie entre 7,2 et 7,7, mesuré avec un papier pH ou pH-mètre après récolte pour éviter les biais métaboliques. Un pH supérieur à 7,7 indique une infection, inflammation, contamination urinaire, produit alcalin ou éjaculation incomplète (**Blanchard TL, 2003 ; Tibary A, 2005 ; Simpson et al., 1998**).

III.3.2.2. examen microscopique :

III.3.2.2.1. concentration :

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

A. Évaluation par utilisation d'une cellule hématimétrique :

Le sperme est dilué dans une solution hypertonique avec 3% de chlorure de sodium pour faciliter le comptage. La dilution est efficace dans des mélangeurs Potain, et le sperme concentré est examiné au microscope. Une goutte diluée est déposée sur une lame hématimétrique (**Neubauer, Malassez, Thoma**) pour compter les spermatozoïdes dans un quadrillage, avec un grossissement de x400, en ignorant ceux sur les bords (**Johnston et al., 2001**).

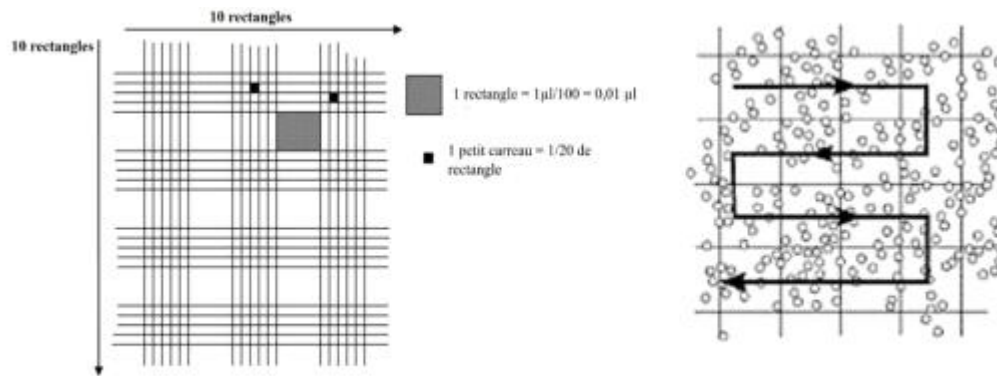


Figure 12 : hématimètre : cellule de Thoma (<https://www.ozyme.fr/ressources>).

B. Évaluation par utilisation du spectrophotomètre :

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



Figure 13 : photomètre Minitube avec cuvette remplie en sperme (John Dascanio. 2014)

III.3.2.2.2. la motilité:

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

Méthode classique:

- Dilution:

La mobilité des spermatozoïdes est d'abord évaluée au niveau de la semence « pure » (non diluée) afin de déterminer un éventuel effet délétère du dilueur de semence sur la semence :

elle apporte une indication de la performance des spermatozoïdes dans leur milieu naturel. La mobilité des spermatozoïdes est ensuite évaluée après dilution de la semence dans un dilueur adapté. La fiabilité et la répétabilité de cette évaluation sont ainsi généralement nettement améliorées. Il est préférable d'effectuer une dilution à une concentration définie (par exemple 20 millions de spermatozoïdes par millilitre) à l'aide d'un dilueur de semence identique afin de limiter les biais d'observation (**Blanchard TL. 2003 ; Tibary A. 2005**).

- Évaluation visuelle:

L'estimation de la mobilité par observation au microscope est la méthode la plus simple, la plus rapide et la moins chère pour évaluer la qualité du sperme bien qu'elle soit subjective et ne constitue donc pas une méthode répétable par différentes personnes pour prédire le Pouvoir fécondant de la semence observée (**Johnston et al. 2001; Freshman 2002; Pe a Marnez 2004**).

L'évaluation visuelle de la mobilité des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante et comporte une estimation de:

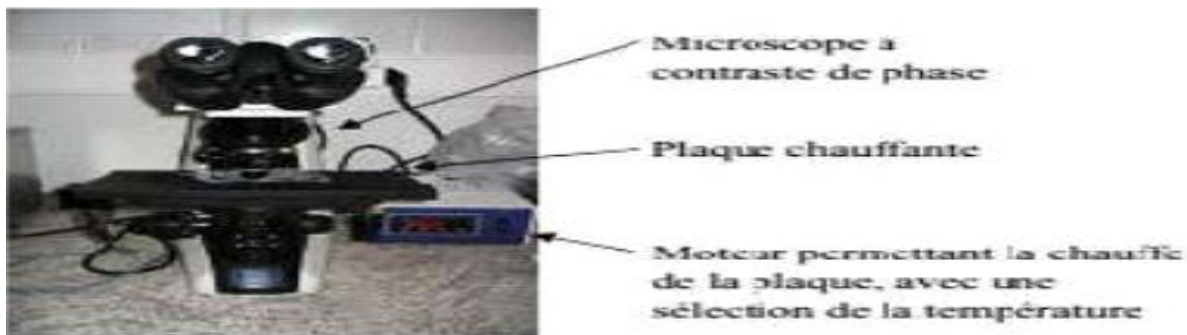


Figure 14 : microscope a contraste de phase muni d'une plaque chauffante (Marie Allimant, 2010.)

-la mobilité massale:

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

l'observateur (tableau) . Cette observation simple mais peu précise est révélatrice à la fois de la vitesse de progression et de la concentration des spermatozoïdes (**Fontbonne et al. 1992**).

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

Tableau 01 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après: Fontbonne, 1992)

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

On distingue deux aspects :

- **la mobilité simple:** on considère tous les spermatozoïdes plus ou moins mobiles par opposition aux immobiles. Deux comptages sont réalisés par observation de quatre champs microscopiques à fort grossissement (X 400). Celle-ci s'exprime en pourcentage (note de 0à 100%) et reflète partiellement la qualité du sperme (sperme de bonne qualité : plus de 70%de spermatozoïdes mobiles).

- **la mobilité progressive:** elle permet d'affiner le déplacement réel des spermatozoïdes. La vitesse de progression est appréciée subjectivement par l'opérateur dans le champ de vision du microscope. Les spermatozoïdes peuvent avoir des mouvements oscillants (ils vibrent et n'ont pas de direction définie) et des mouvements fléchants (ils se déplacent de façon rapide et en ligne droite). Sur une échelle de 1à 5, on classe les spermatozoïdes en fonction de leur mouvement (**Fontbonne et al. 1992; Olivier Salson 2008**).

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

Tableau 02 : Note d'appréciation subjectif de la mobilité des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : : Fontbonne, 1992).

III.3.2.2.3. La morphologie:

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

- Coloration :

A l'aide des colorants cytologiques

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

A l'aide des colorants de fonds :

Utilisation de l'éosine-nigrosine ou de l'encre d'Inde pour observer les spermatozoïdes au microscope. L'éosine-nigrosine (mélange 5% éosine, 10% nigrosine) distingue les vivants (blancs) des morts (rouges/roses) par perméabilité membranaire. La fixation au formol améliore les détails. La coloration à l'éosine-nigrosine est utilisée pour l'étude morphologique des spermatozoïdes ainsi que pour la détermination du taux de spermatozoïdes vivants et morts **(Tiraby A.2005).**

-Évaluation et classification:

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont traditionnellement classées en anomalies primaires, Des anomalies secondaires. Les anomalies tertiaires Un minimum de 100 Spermatozoïdes doit être observé pour évaluer ces défauts de morphologie (**Blanchard TL. 2003 ;Varner DD. 2008**), et Selon (**Amann et Graham, 2011**), la proportion de spermatozoïdes anormaux doit être inférieure à 35 %.

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

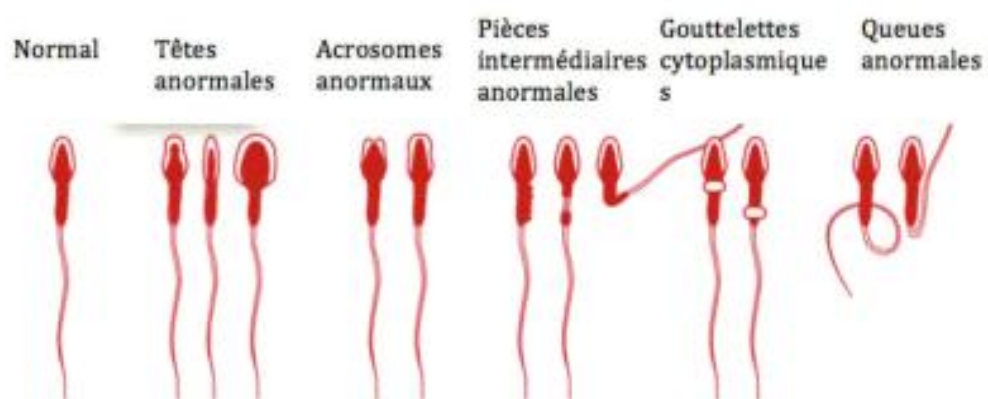


Figure 15 : Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et quelques anomalies pouvant être rencontrées (Steven P. et al, 2011)

III.3.2.3. conservation a long terme (la cryoconservation) :

Principe :

La cryoconservation du sperme utilise l'azote liquide (-196 °C) pour stocker les spermatozoïdes, réduisant leur activité métabolique et permettant une conservation potentielle sur des siècles si le cycle gel-dégel est bien géré. Sans cryoprotecteurs, la congélation augmente la pression osmotique, extrait l'eau des cellules, et concentre les sels,

nécessitant une diminution contrôlée de la température pour protéger les protéines. Des taux de congélation trop rapides ou trop lents causent des dommages structurels. (**Varner et al. 1988**)

III.3.3. La cryoconservation dans l'espèce équine :

L'insémination artificielle chez les espèces équines a été limitée pendant des années, notamment au Royaume-Uni et dans l'industrie de l'élevage de Pur-sang. Cependant, elle a été plus largement utilisée en Europe, en particulier dans l'élevage de chevaux de course. En 2001, les associations de chevaux **American Quarter Horse** et **American Paint Horse** ont autorisé l'insémination de juments avec du sperme congelé, suscitant un intérêt pour la cryoconservation du sperme équin. La sélection de spermatozoïdes équins est un outil précieux dans les techniques d'élevage équin assisté.

III.3.3.1. les agents cryoprotecteurs :

Les agents cryoprotecteurs, comme le glycérol, améliorent la survie des cellules en augmentant les solutés extracellulaire, réduisant la glace formée et exposant la cellule à un environnement hypertonique, entraînant une déshydratation initiale. Après pénétration et équilibre, la cellule retrouve sa taille normale, mais un retrait rapide peut nuire aux spermatozoïdes, les dommages dépendant de la taille cellulaire et de la perméabilité membranaire. Les cryoprotecteurs non pénétrants agissent extracellulairement pour ralentir la congélation et protéger les membranes

III.3.3.2. Les cryoprotecteurs non pénétrants :

Les cryoprotecteurs non pénétrants agissent extracellulairement en diminuant la température de congélation, prévenant la formation de glace et protégeant les membranes des spermatozoïdes. En médecine vétérinaire, des composés comme le lait ou le jaune d'œuf sont utilisés pour leur disponibilité et valeur nutritionnelle, ajustant protéines, glucides et lipides pour soutenir les spermatozoïdes. Le lait apporte phosphates, citrates et sucres, tandis que le

jaune d'œuf protège via ses phospholipides. Chez le cheval, des études montrent que la mobilité post-décongélation reste limitée (**Pillet et al. 2011, 2012**).

III.3.3.3. Les cryoprotecteurs pénétrants:

Les cryoprotecteurs pénétrants, comme le glycérol, DMSO (**Gilmore et al., 2009**) et les amides (**Alvarenga et al., 2005**), agissent intra- et extracellulairement, modifiant la configuration de la glace pour arrondir les cristaux, réduisant le risque de perforation des membranes. Le glycérol baisse la température de congélation de l'eau extracellulaire, limitant le gradient osmotique et la déshydratation des spermatozoïdes. La concentration optimale varie par espèce, ne dépassant idéalement 3,5% (**Barbas & Mascarenhas, 2009; Ponthier et al., 2014**). DMSO et l'éthylène glycol, plus perméables, causent moins de stress osmotique que le glycérol. Les amides améliorent la qualité post-décongélation, comme dans le dilueur Botu-Crio® avec méthylformamide (**Melo et al., 2008; Neto et al., 2014; Squires et al., 2004**).

III.3.3.4. Dilution du sperme:

La dilution du sperme est essentielle pour sa conservation, car sans elle, sa durée de vie ne dépasse pas une heure, entraînant une forte diminution de la fécondation (**Katila, 1997a**). Elle réduit la compétition entre spermatozoïdes pour les nutriments et l'accumulation de métabolites nocifs, tout en limitant les effets délétères du plasma séminal. Une concentration excessive de plasma séminal est toxique pour les spermatozoïdes. La dilution optimise la congélation, avec une concentration finale de spermatozoïdes dépendant du taux de dilution, visant au moins 200 millions par dose pour l'insémination artificielle, avec un volume maximal de 1/3 de sperme pour 2/3 de dilueur (**Isabelle Barrier-Battut, 2013**).

-Méthodes de dilution :

La dilution du sperme est cruciale pour sa conservation, utilisant des techniques comme l'utilisation d'un vagin ouvert ou la centrifugation pour isoler la fraction riche de l'éjaculat. Une approche alternative centrifuge le sperme, mais un retrait excessif de plasma séminal réduit la mobilité (**Jasko et al., 1991**) et peut perdre jusqu'à 15 % des spermatozoïdes (**Brinsko et al., 2000a**), surtout chez les étalons « poor coolers ». La centrifugation n'est pas toujours bénéfique

et ses effets néfastes sur la mobilité dépendent de la vitesse, du temps et du dilueur (**Brinsko et al., 2000a**). La méthode la plus utilisée dilue l'éjaculat entier à 5-20 % selon **Katila (1997a)**.

III.3.3.5. Les dilueurs :

Les dilueurs sont des milieux qui conservent, protègent et maintiennent les propriétés fécondantes des spermatozoïdes, ajustant leur concentration dans les paillettes. À base de lait ou de solution saline, ils visent à améliorer la survie des spermatozoïdes. Leur composition inclut des cryoprotecteurs (pénétrants ou non), antibiotiques, substances nutritives (sucres, sels, détergents) et doit être isotonique (300mOsm/L, pH 7.4-7.6), avec un pouvoir tampon, stabilisateur et protecteur des membranes. Les dilueurs principaux incluent le lait UHT, Kenney (EZ-Mixin, NFDMSG, SKMG) et INRA96, ce dernier optimisant mobilité et fertilité (**Barbas & Mascarenhas 2009; Ponthier et al. 2011; et al. 2014; Batellier et al. 1998, 2001; Rigby et al. 2001**

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

Tableau 03 : composition de Kenney et l'INRA96 (pour 1L) (Marc Stéphanie, 2015) et le Burns and Renser.

III.3.3.6. Les différentes étapes de la cryoconservation :

III.3.3.6.1. Récolte et évaluation de la semence:

Il existe de nombreuses techniques de récolte de la semence. Ces techniques ont déjà été décrites précédemment mais rappelons que la technique la plus utilisée dans l'espèce équine est celle du vagin artificiel, le sperme est filtré immédiatement après la récolte pour extraire la fraction gel du sperme, une sécrétion filamenteuse des glandes annexes. Après la récolte, le sperme est analysé afin de déterminer ses caractéristiques (concentration en spermatozoïdes, mobilité...). **(Ponthier et al. 2014).**

Le sperme est dilué une première fois avec le premier milieu à base de lait ou de composants de lait et ne contenant pas d'agent cryoprotecteur dont le volume de la fraction sans gel du sperme obtenue après éjaculation est mélangé avec un volume égal de dilueur.

III.3.3.6.2. Séparation des différentes phases du sperme par centrifugation :

La semence, composée de spermatozoïdes viables et non viables dans un milieu hétérogène, peut être concentrée par centrifugation pour augmenter la proportion de spermatozoïdes viables, réduisant ainsi les contaminants et améliorant la fertilité **(Anzar & Graham, 1994; Loomis, 2006)**. Chez le cheval, cette concentration est moins marquée qu'au bœuf **(Baracaldo, 2007)**. La centrifugation routine élève la concentration en spermatozoïdes et réduit le plasma séminal **(Vidament et al., 2000, 2001)**, mais son bénéfice pour la congélation est limité **(Moore et al., 2005)**. Une fraction de 5% du volume final est idéale **(Salazar et al., 2008; Ponthier et al., 2013)**. La centrifugation à 600xg pendant 10 minutes **(Barrier-Battut, 2013; Neto et al., 2013)** permet de séparer les spermatozoïdes anormaux et débris, améliorant la qualité post-congélation en sélectionnant les spermatozoïdes normaux et potentiellement fertiles **(Glander et al., 1990; Kobayashi et al., 1991; Loomis, 2006; Morrell, 2006)**, avec un coussin d'iodixanol augmentant le taux de récupération **(Waite et al., 2008; Hoogewij et al., 2010)**.

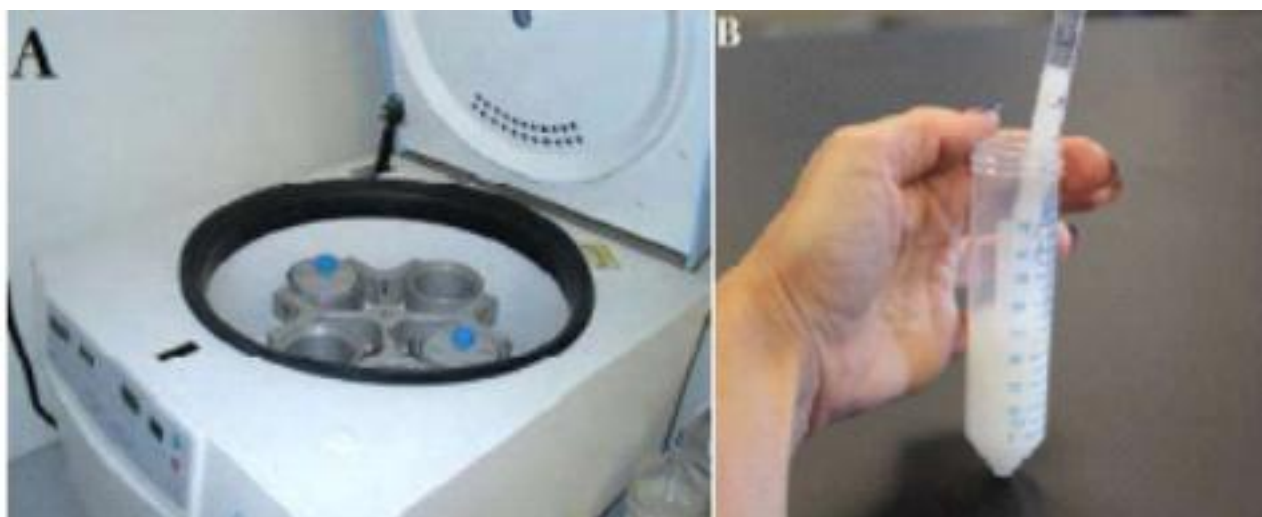


Figure 16 : centrifugation de sperme dilué (A), puis aspiration de surnagent après centrifugation (B) (Steven P. et al. 2011)

III.3.3.6.3. La dilution:

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

La concentration finale après congélation dépend de la dilution avec le milieu de congélation et donc des options de commercialisation choisies lors de la production, mais aussi de la contrainte technique imposée par le milieu de congélation. En effet, si les dilueurs utilisés contiennent de Basses concentrations en agent cryoprotecteur, il faudra minimiser le rapport entre le volume du milieu de congélation et le volume du culot cellulaire afin que la concentration en âge Cryoprotecteur ne soit pas trop basse dans la dilution finale. Il est conseillé d'inséminer avec des doses finales contenant au moins 400 millions spermatozoïdes **(Ponthier et al. 2014).**

III.3.3.6.4. L'équilibration (la réfrigération):

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

III.3.3.6.5. Le conditionnement:

La semence La semence est conditionnée avant congélation pour être identifiable, stockable et utilisable, utilisant des pastilles ou paillettes. En France, la congélation en paillettes ("straws") en chlorure de polyvinyle, obstruées par du coton et remplies de 0,25 à 5 ml, est courante. Les paillettes sont identifiées par le nom du mâle, son numéro, la race, la date de récolte et le centre d'insémination (Loomis, 2006; Dumon, 2007; Hanzen, 2014). Elles sont soudées avec une machine à remplir (MRS1 dual V2) après étiquetage par une imprimante (Domino a420i).



Figure 17 : Machine de remplissage et de sertissage de semence(hadjalla ikram , oukham yasmine ,2020)

III.3.3.6.6. La congélation :

Après équilibrage, les paillettes sont refroidies à -140°C dans un congélateur programmable (vitesse -20°C à $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$), puis immergées dans l'azote liquide à -196°C (Ponthier et al., 2013). Elles sont placées dans une boîte de polystyrène avec une grille pré-refroidie à 5°C , maintenue à 3-6 cm au-dessus de l'azote pendant 10 minutes jusqu'à -120°C , avant plongée finale. Les paillettes sont stockées dans un réservoir d'azote liquide à -196°C (John Dascanio, 2014). La vitesse de congélation, déterminant l'équilibre du spermatozoïde, doit être initialement lente pour une déshydratation suffisante, puis rapide pour éviter une déshydratation excessive



Figure 18 :(A) paillettes déposées sur une grille puis, (B) placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide, puis stockées dans une cuve d'azote liquide (C) (hadjalla ikram , oukham yasmine 2020)

III.3.3.6.7. La décongélation

La semence est décongelée juste avant son utilisation, lors d'une insémination artificielle .

le plus Souvent. Quelle que soit l'espèce, la décongélation s'effectue de manière semblable à l'aide d'un Bain-marie. Les paillettes sont directement transférées de l'azote liquide dans le bain-marie (Ponthier et al. 2014). Dans la majorité des cas les paillettes de 0,5 ml sont décongelées à 37°C pendant 30 secondes, alors que certains chercheurs ont suggéré que la décongélation de ces paillettes à 75°C pendant 7 secondes pouvait générer une mobilité accrue des spermatozoïdes après décongélation tandis que pour d'autres chercheurs une

température de 46°C pendant 20 minutes, peut-être recommandée, Bien que cela puisse être le cas **(Steven P. et al. 2011)**.

III.3.3.6.8. Évaluation de la qualité de la semence congelée:

Après décongélation, un contrôle de qualité sur l'éjaculat est recommandé pour évaluer le pouvoir fécondant via un spermogramme sur deux paillettes, mesurant le pourcentage et le nombre de spermatozoïdes vivants et mobiles (microscopie optique ou CASA). La fertilité peut diminuer malgré un spermogramme satisfaisant **(Marc Stéphanie, 2015)**. **Jasko et al. (1992a,b) et Kenney et al. (1971)** notent que l'évaluation qualitative est faisable, mais prédire quantitativement la fertilité est difficile, car les paramètres (mobilité, concentration, anomalies) sont peu corrélés. Un test de décongélation, souvent sur une paillette par éjaculat **(Ponsart et al., 2014)**, est admis, avec une mobilité progressive post-décongélation d'au moins 30% **(Dascanio, 2014)**.

IV. L'IMPACT DE LA DURÉE D'ÉQUILIBRATION LORS DE LA CONGÉLATION DU

SPERME D'ÉTALON :

Pour optimiser la conservation des semences équine, il est essentiel de perfectionner chaque étape du processus de préparation du sperme. Le temps d'équilibration lors du processus de congélation a été examiné chez une multitude d'espèces.

La durée d'équilibration, qui fait référence au temps pendant lequel le sperme est maintenu à une température spécifique avant sa cryoconservation. En ce qui concerne le sperme d'étalon, une période d'équilibration typique de deux heures à 4°C est généralement observée. Toutefois, des études ont proposé que l'allongement de cette durée avant la congélation pourrait améliorer la qualité du sperme post-décongélation, comme constaté chez d'autres

ainsi, cette étude visait à évaluer l'impact de la conservation du sperme à 4°C pendant différentes durées **(2, 4 ou 6 heures)** après dilution avant congélation, et son effet subséquent sur la qualité du sperme après décongélation;.(**Paola SAUTEJEAU-RIZZONI et al ,2024**)

IV.1. MATERIEL ET METHODES :

1/Étalon étudiant :

Sur une étude faite par (**Paola SAUTEJEAU-RIZZONI, et al 2024**) sur 5 étalon de la station de monte **d'ONIRIS VetAgroSup** à Nantes. Ces étalons, de races différentes, sont âgés entre 3 et 16 ans au cour de l'année 2023-2024 Chacun d'entre eux est resté dans la structure au moins 15 jours .

Etalon	Race	Âge (ans)	Nombre de prélèvements
M	Pur sang	14	5
A	Espagnol	10	7
S	Espagnol	8	4
V	Poney Francais de Selle	16	4
J	Poney Francais de Selle	4	3

Tableau 04: Liste des étalons participants à l'étude. Dans un souci d'anonymat, la référence de l'étalon est utilisée à la place de son nom

2/recolte de sperme:

Le vagin artificiel utilisé est de type Colorado ,La température de l'eau introduite dans le vagin avant les prélèvements oscillait entre 45 et 50 °C en fonction des préférences des étalons.

Les collectes de sperme ont eu lieu pendant les années 2023 et 2024, après avoir effectué au moins deux purges. Avant l'utilisation du vagin artificiel, le membre de l'étalon est purifié avec de l'eau tiède, puis essuyé à l'aide d'un papier absorbant. Ce nettoyage n'a pas toujours

été possible, en particulier chez les jeunes étalons, car le risque était trop élevé. Après la collecte, le sperme est immédiatement placé au bain-marie à une température de 37°C.



Figure 19: Mannequin de monte utilisé lors de nos prélèvements à Oniris VetAgroBio

3/congélation des paillette :

Suite à la collecte de l'éjaculat, celui-ci est immédiatement filtré à l'aide de gazes stériles. On chauffe d'abord le matériel à une température de 37°C. Par la suite, le volume de l'éjaculat est quantifié à l'aide d'une pipette graduée. On analyse alors la mobilité des spermatozoïdes et leur concentration dans l'éjaculat en utilisant un microscope à platine chauffée avec un grossissement de 100x. Le système CASA est également utilisé pour analyser un échantillon de sperme afin de déterminer sa concentration et sa mobilité. Le sperme a été mélangé avec un diluant de centrifugation INRA 96[®] qui a été préalablement chauffé au bain-marie à une température de + 37°C. La dilution est d'un quart de sperme pour trois quarts de diluant, sans excéder une concentration de 2 milliards de spermatozoïdes par tube. Par centrifugation, le plasma séminal est ensuite extrait. Cette étape se déroule à température ambiante pendant 10 minutes à 600 x g, après quoi le surnageant est éliminé.

Une seconde dilution est effectuée après la centrifugation. Cette dilution est effectuée à l'aide de l'INRA FREEZE[®] et vise à atteindre une concentration finale de 100 millions de

spermatozoïdes par mL. On préchauffe cet environnement au bain-marie à +37°C et on le ramène à température ambiante lors de la centrifugation pour prévenir un choc thermique.

Le tube contenant le sperme dilué est conservé à une température de +4°C dans un espace réfrigéré, tout comme l'équipement requis pour la création de paillettes. Les paillettes de 0,5 mL sont d'abord identifiées. Il s'agit de **paillettes Cassou**. Les paillettes sont donc par la suite remplies à la main deux, quatre et six heures après avoir été réfrigérées, puis elles sont disposées sur la rampe de congélation. En fonction du volume de sperme, entre 3 et 4 paillettes sont généralement effectuées par lot.

Dans le processus de congélation, les paillettes sont positionnées à 4 cm au-dessus du niveau d'azote liquide dans un récipient pendant une durée de 10 minutes. Finalement, elles sont immergées dans une tasse d'azote qui est elle-même positionnée dans le réservoir de stockage rempli d'azote.

4/Décongélation des paillette : préparation des paillette

Pour le processus de décongélation d'un éjaculat, deux paillettes de chaque lot (2h, 4h et 6h) ont été extraites aléatoirement du réservoir d'azote liquide à l'aide d'une pince, puis rapidement immergées dans un bain-marie à une température supérieure à 37°C pendant une durée de 30 secondes. Par la suite, les paillettes sont essuyées avec du papier absorbant. Chaque paire de chaque lot est coupée à l'aide de ciseaux, et leur contenu est vidé dans un tube qui a été préalablement rempli de milieu de dilution INRA 96[®] sans glycérol. Chaque paillette de sperme est diluée en une partie sur quatre dans l'INRA 96[®], puis soigneusement réhomogénéisée. Donc, 3 échantillons de sperme dilué (un pour chaque lot), chacun contenant une concentration de 25 millions de spermatozoïdes/mL sont obtenues par éjaculat avant l'analyse des paramètres cinétiques.

Enfin les tubes sont placés à l'étuve à 37°C pendant 10 minutes puis analysés avec le système CASA.

5/ analyse avec le système casa :

On a utilisé l'analyseur d'images **IVOS II® (Hamilton Thorne, USA)** pour cette étude. Avant les mesures, les lames Leja® et l'appareil sont préchauffés à 37°. Chaque lame Leja® est ensuite chargée avec la solution puis placée sur la plaque chauffante de l'équipement. Les paramètres examinés avant et après congélation, grâce à l'analyseur d'images CASA, comprennent : le taux de mobilité, le taux de mobilité progressive, **la VAP, la VSP, la VCL, l'ALH, la BCF**, ainsi que la linéarité et l'élongation.

6/ analyse statistique :

Pour comparer les effets des différentes durées d'équilibration sur les paramètres de mobilité, une Analyse de la Variance (ANOVA) a été utilisée. L'ANOVA est une méthode statistique qui permet de tester si les moyennes des différents paramètres mesurés sont significativement différentes entre les trois durées d'équilibration. En effectuant l'ANOVA, on obtient une statistique de test appelée F, qui mesure le rapport entre la variance entre les lots et la variance au sein des lots. À partir de cette statistique, une p-value est calculée.

Un code est utilisé pour évaluer l'intensité des différences significatives suivant les valeurs des p-value obtenues :

- pour une p-value supérieure à 0,05 il n'y a pas de différence significative
- pour une p-value entre 0,01 et 0,05 la différence significative n'est pas très marquée
- pour une p-value comprise entre 0,01 et 0,001 la différence est très significative
- pour une p-value inférieure à 0,001 la différence est hautement significative

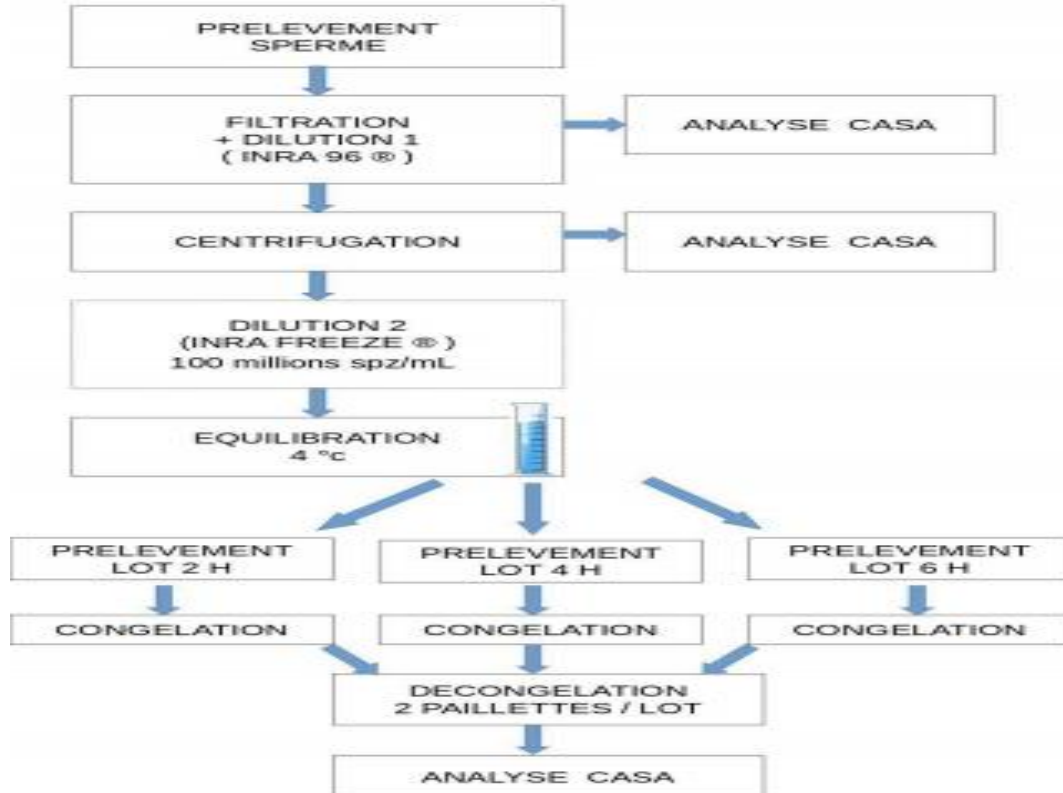


Figure 20 : Schéma résumant les étapes du protocole

IV.2. Resultats:

1/ Mobilité :

Les moyennes des pourcentages de spermatozoïdes mobiles en fonction de la durée d'équilibration sont représentées dans le tableau 5. il est remarquable que plus le temps d'équilibration des spermatozoïdes à +4°C est lent plus la mobilité post-décongélation est élevée

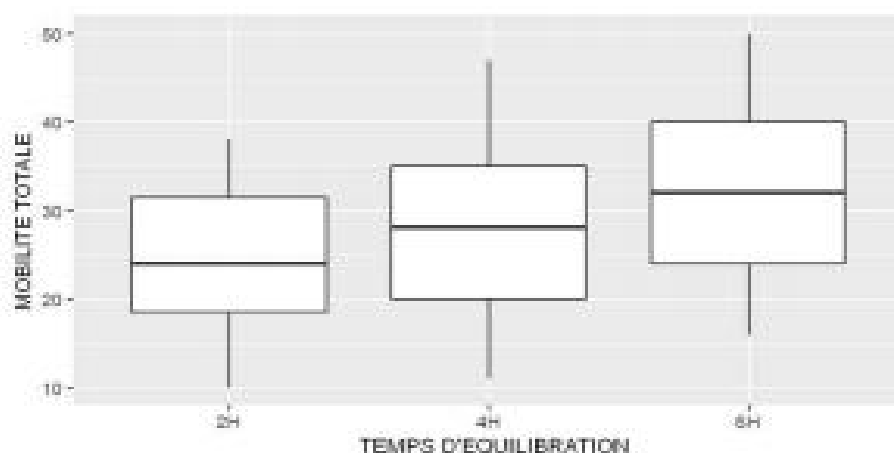


Figure 21 : Boxplot de la mobilité totale en fonction du temps d'équilibration (2h, 4h ou 6h)

On constate que la différence est hautement significative entre un temps d'équilibration de-deux heures et un temps de six heures.

Le tableau suivant nous montre cependant qu'il n'y a pas de différence significative entre les temps d'équilibration de 2h et 4h et de 4h et 6h.

	2H	4H	6H
2H	23,9 %	p-value : 0,12	p-value : 0,0004**
4H		27,7 %	p-value : 0,087
6H			31,8 %

Tableau 05 : Tableau des moyennes et des p-values de la mobilité totale en fonction des durées d'équilibration

2/ Mobilité progressive :

Les moyennes des pourcentages des spermatozoïdes progressifs en fonction de la durée d'équilibration sont représentées dans le tableau 10. il est remarquable que plus le temps d'équilibration des spermatozoïdes à +4°C est augmenté, plus le pourcentage des spermatozoïdes progressifs post-décongélation est important.

La différence est significative entre un temps d'équilibration de deux heures et six heures.

	2H	4H	6H
2H	12 %	0,087	0,0042**
4H		14,6 %	0,45
6H			16 %

Tableau 06 : Tableau des moyennes et des p-values de la mobilité progressive en fonction des durées d'équilibration

Le tableau suivant montre cependant qu'il n'y a pas de différence significative entre les temps d'équilibration de 2h et 4h et de 4h et 6h.

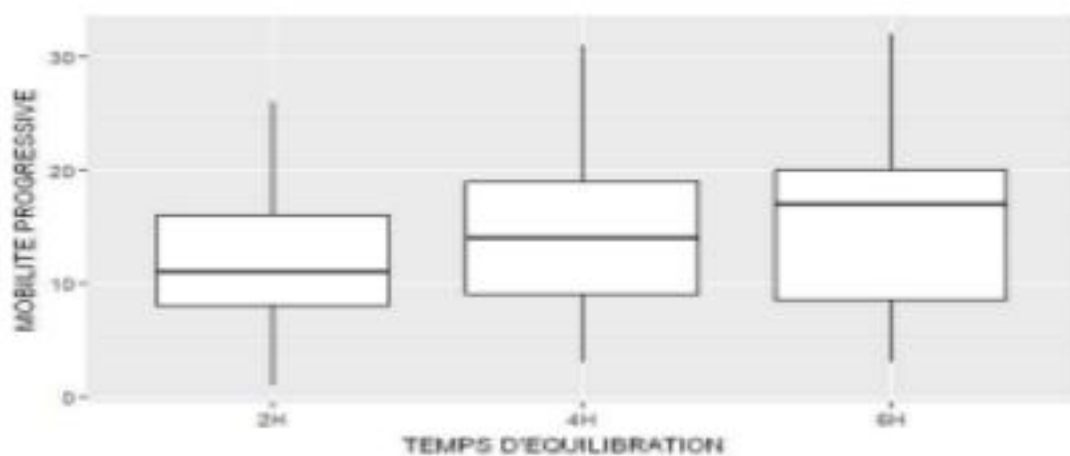


Figure 22 : Boxplot de la mobilité progressive en fonction du temps d'équilibration (2h, 4h ou 6h)

3/ Autres paramètres :

	Moyenne Lot 2 (4h)	Moyenne Lot 1 (2h)	Moyenne Lot 3 (6h)	p-value (Lot1-Lot2)	p-value (Lot2-Lot3)	p-value (Lot1-Lot3)
ELONG	72.1	72.3	73.3	0.96	0.17	0.27
LIN	41	41.5	42.3	0.85	0.37	0.69
STR	82.6	82.3	82.1	0.93	0.75	0.93
BCF	34.3	34.2	34.1	0.98	0.94	0.98
VAP	63.4	60.9	63.4	0.93	0.99	0.31
VCL	133	127	131	0.085	0.63	0.42
VSL	52.4	50.2	52.1	0.38	0.98	0.47
ALH	6.69	6.62	6.83	0.9	0.64	0.38

Tableau 07: Tableau des différentes moyennes en fonction des paramètres de mobilité ainsi que les p-values associées

Quelle que soit la durée d'équilibration, les tests statistiques nous indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents paramètres cinétiques (**ELONG, LIN, STR, BCF, VAP, VCL, VSL, ALH**) ça se voit de manière clairement significative que pour les paramètres de mobilité et de mobilité progressive, qui restent les paramètres reconnus comme étant déterminants dans les critères décisionnels de l'insémination artificielle, la durée optimale d'équilibration est de six heures.

IV.3. Analyse des résultats et discussion de l'étude réalisée par

(Paola SAUTEJEAU-RIZZONI, et al 2024)

1. Échantillons

23 éjaculas provenant de 5 étalons différents ont été étudiés afin que l'analyse statistique soit significative. plusieurs éjaculas et plusieurs étalons ont été écartés avant même de congeler car ils présentaient une très faible mobilité, non compatible avec la congélation.

D'autres étalons ne sont pas restés assez longtemps au centre pour effectuer une purge et plusieurs prélèvements. donc les étalons ayant été prélevés une seule fois ou deux fois sont aussi écartés pour que les statistiques soient significatives.

Les étalons ont été prélevés régulièrement une fois par jour ou tous les deux jours pendant certaines périodes et ont été purgés. Malgré cela, certains étalons ont gardé une semence de mauvaise qualité. toutes les données dans l'analyse statistique sont gardées , y compris les échantillons avec une mobilité inférieure à 35% après décongélation pour avoir un nombre de répétitions exploitables. Mais dans les centres de reproduction les paillettes avec des résultats de mobilité faible sont retirées.(**MORENO D.,et al 2012**) Cela peut laisser espoir qu'avec plus d'échantillons et avec une semence de meilleure qualité, les résultats soient plus satisfaisants.

Des appareils fiables et précis ont été utilisés, ce qui permet d'avoir une bonne répétabilité pour les paramètres cinétiques. Pour l'analyse des paramètres cinétiques : l'appareil **IVOS** équipé du logiciel **IMSI-STRICTTM imaging analysis software de Hamilton Thorne II** , les consignes du constructeur et la dilution ont été respectées pour avoir le moins d'erreur possible notamment avec les spermatozoïdes morts. En effet, lorsque la dilution est trop faible les spermatozoïdes vivants peuvent percuter les morts et ainsi créer un mouvement ce qui peut fausser les résultats.

2. Paramètres de mobilité :

Dans cette étude la mobilité des spermatozoïdes est considérée comme critère principal pour évaluer la qualité du sperme de l'étalon. Cette technique a été utilisée de manière similaire par d'autres auteurs. (LOVE CC, et al 2015),.(BARRIER BATTUT A et al 2017) , En effet, les spermatozoïdes doivent être transportés vers l'oviducte pour rencontrer et pénétrer l'ovocyte. Le pourcentage de spermatozoïdes ayant une mobilité totale et progressive suffisante peut indiquer une bonne fertilité du sperme.

Cette étude montre qu'une mobilité après décongélation pour une durée d'équilibration de six heures est meilleure. Cette variation d'environ 8% entre un temps d'équilibration de 2h et de 6h est importante. En effet, avec la dilution initiale de 100 millions de spermatozoïdes, cela fait environ 8 millions de spermatozoïdes mobiles en plus. Donc affirmer le fait qu'une augmentation de la durée d'équilibration augmente de manière significative les pourcentages de spermatozoïdes mobiles totaux et progressifs.

Des durées d'équilibration de plus de six heures n'ont pas été étudiées pour des raisons pratiques. Mais il serait peut-être intéressant de travailler sur une durée d'équilibration plus importante comme cela a été fait dans d'autres espèces.

La mobilité est un facteur important à prendre en compte en ce qui concerne la fertilité. En effet, elle est nécessaire pour la fusion des gamètes, puisqu'elle permet le rapprochement de celles-ci. Mais si la membrane plasmique est endommagée ou si l'acrosome est déjà capacité alors la fécondation ne peut pas avoir lieu car la fusion entre les membranes de l'ovocyte et du spermatozoïde est impossible.

Il serait donc intéressant d'aller plus loin dans la recherche et d'étudier sur la morphologie et le taux de lésions acrosomales en plus des paramètres cinétiques, afin de déterminer plus précisément l'impact de la durée d'équilibration sur la fertilité.

Pour étudier la fertilité il serait aussi idéal de pouvoir mesurer les taux de gestation après insémination avec les paillettes des différents lots.

IV.4. CONCLUSION :

cette étude réalisée par (Paola SAUTEJEAU-RIZZONI, et al 2024) s'est ainsi attachée à démontrer que l'augmentation de la durée d'équilibration de 2h à 6h dans le dilueur INRA FREEZE[®] directement permettait de perfectionner la méthode de congélation en améliorant certains paramètres de mobilité des spermatozoïdes. Pour cela différents paramètres de mobilité sont testés grâce à l'analyseur d'image CASA.

Ce travail a permis de montrer, malgré le faible nombre d'étalons testés, qu'une durée d'équilibration de 6h avait un impact significatif sur la mobilité totale et progressive sans affecter les autres paramètres tels que les mouvements et la fréquence de battements de la tête, la linéarité, l'élongation ou encore les différentes vitesses étudiées. Ces résultats sont en accord avec certaines études menées sur des espèces différentes comme chez les chiens.

Il serait cependant intéressant de tester d'autres paramètres grâce à d'autres technologies comme la cytométrie en flux pour avoir une idée plus précise de l'impact de cette phase d'équilibration sur la fertilité du sperme. En effet la mobilité est nécessaire au spermatozoïde mais insuffisante, car cela ne garantit pas sa capacité à réaliser les différentes réorganisations intracellulaires aboutissant à la fécondation, comme la capacitation ou encore la réaction acrosomique.

Au vu des résultats obtenus avec l'analyseur d'image, on peut supposer qu'avec une poursuite de l'étude sur un plus grand nombre d'étalons ainsi qu'avec d'autres biotechnologies, un nouveau protocole de congélation pourrait être mis au point et conseillé pour améliorer la qualité du sperme en post-décongélation et donc sa fertilité .

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- 1- Baronne ,1978**, Anatomie comparée des mammifères domestiques. Editions Vigot frères – Tome3. LYON, 851p.
- 2-Chirent Mylène. 2015**. Les alternatives à la castration chirurgicale chez l'étalon ; Thèse Présentée à l'université Claude Bernard – Lyon.
- 3- Pickett B.W. 1993**. Collection and evaluation of stallion semen for artificial insemination. In: Equine Reproduction, McKinnon AO, Voss JL (Ed.), Williams & Wilkins, pp.705-14.
- 4- TIBARY A et al,2005** Equine Reproduction. Tome2. L'étalon. Vol. 2. Actes Éditions. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Maroc, 554p.
- 5- marie Allimant,2010** Actualites sur les methodes d'évaluation de la qualite de la semence de letalon .these de doctorat veterinaire , université claud-bernard, lyon,138p
- 6- Mc. Donald Me. 1980**. « Veterinary endocrinologie and reproduction ». Lea ET Febiger edition 3rd 560p. **Albert et Jean. 2001**. « Biologie du développement » .5ème édition de l'abrégé.
- 7- Thibault C. 2001**. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses
- 8-Delphine, Marie, Ghislaine Fehrenbach. 2003**. L'éventration post-castration chez le cheval ; Thèse Présentée à la faculté de médecine de Créteil
- 9- Johnston S.D., Root Kustritz M.V. ET Olson P.N.S. (2001)**. Canine and Feline Theriogenology. Saunders Company. 592p.
- 10- Tibary, A., Bakkourym. 2005**. Equine Reproduction. Tome2. L'étalon. Vol. 2. Actes Éditions. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Maroc, 554p.
- 11-Pickett et Voss , 2011** Anatomie, physiologie et reproduction de l'étalon
- 12-BRITO(L.F.C.,(2007),("Evaluation of Stallion Sperm(Morphology."**(Clinical' Techniques' in'Equine' Practice (6((4), (249–64).
- 13-Senger P.L. 2005**, Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions: Pullman,373p

- 14-Braun J., Sakai M., Hochi S., Oguri N. 1994.** Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology*, 41, 809-818.
- 15-Dadoune J-P., Demoulin A. 2001.** « Structure et fonction du testicule » dans « La reproduction chez mammifères et l'homme » de **C. THIBAULT, Levasseur édition marketing**, p 256 à 288 .
- 16- Sostaric E., Aalberts M., Gadella B.M., Stout T.A.E. 2008.**The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 107, 237-248
- 17-Thibault C. 2001.** La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses
- 18-Heymon Y., Vignon X. 2005.** Reproduction des animaux d'élevage. Educagri.
- 19-McKinnon, A.O.; Squires, E.L.; Vaala, W.E.; Varner, D.D.** Equine reproduction, 2nd ed.; Wiley-Blackwell:Oxford, UK, 2011; pp. 867-1571.
- 20- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros AS.** Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Anim Reprod Sci* 2005;89:105– 13
- 21- Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing:** Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci* 2008;105:119–28
- 22- Morrel JM.** Stallion sperm selection: past, present, and future trends. *J Equine Vet Sci* 2012;32:436–40
- 23-Marc Stéphanie. 2015.** Thèse : Actualités En Cryoconservation Des Semences Des Principales Espèces D'intérêt Vétérinaire, Université CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie).
- 24-LABBÉ C., BLESBOIS E., LEOEUF B., GUILLOUET P., STRADAIOLI G. et MAGISTRINI M. (2002)** Technologie de la conservation du sperme chez plusieurs vertébrés domestiques: protection des lipides membranaires, intégrité du noyau et élargissement des méthodes. Congrès du Bureau des Ressources Génétiques, La Châtre (FRA). Vol. 10, p. 15–17
- 25-LUVONI G. (2003)** . Conservation of feline semen Part II: Cold-induced damages on spermatozoal fertilizing ability. *J. Feline Med. Surg.* Vol. 5, n° 5, p. 257-263.

- 26-ROTA A., MILANI C., CABIANCA G. et MARTINI M. (2006).** Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*. Vol. 65, n° 9, pp. 1848-1858.
- 27-Noakes D.E., Parkinson timothy j. ET England G.C. 2009.** Veterinary reproduction and obstetrics. Ninth edition. Saunders Elsevier. 961p.
- 28-Brinsko S.P., Blanchard T.L., Rigby S.L., Love C.C., Varner D.D. 2003.** Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. *Theriogenology*, 59,735-742
- 29-Sтивен P. Brinsko, Terry L. Blanchard, Dickson D. Varner, James Schumacher, Charles C. Love, Katrin Hinrichs, David L. Hartman. 2011.** Manual of equine reproduction – 3rd edition, 325p (p161-162).
- 30-John Dascanio and Patrick McCue. 2014.** Equine Reproductive Procedures, First Edition. Edited by John Wiley & Sons, Inc. Published 2014 by John Wiley & Sons, Inc. 560p (p333)
- 31-Tibary, A., Bakkourym. 2005.** Equine Reproduction. Tome2. L'étalon. Vol. 2. Actes Éditions. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Maroc, 554p.
- 32-Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner. 2011.** Equine Reproduction, Second Edition. Blackwell Publishing Ltd
- 33-Varner DD. 2008.** Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*; 70:448-62.
- 34-Neto C.R., Monteiro G.A., Sancler-Silva Y.F.R., Papa P., Guasti P.N., Resende H.L., Papa F.O., Dellaqua JR. J.A. et Alvarenga M.A. 2014.** Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. *Journal of Equine Veterinary Science*. Vol. 1, n° 34, pp. 58-60
- 35-PILLET E., LABBE C., BATELLIER F., DUCHAMP G., BEAUMAL V., ANTON M., DESHERCES S., SCHMITT E. et MAGISTRINI M. (2012)** Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*. Vol. 77, n° 2, pp. 268-279.
- 36-MELO C.M., PAPA F.O., FIORATTI E.G., VILLAVERDE A.I.S.B., AVANZI B.R., MONTEIRO G., DELL'AQUA J.A., PASQUINI D.F. ET ALVARENGA M.A. (2008)** Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 107, n° 3-4, p. 331.
- 37-SQUIRES E.L, KEITH S.L et GRAHAM J.K (2004)** Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*. Vol. 62, n° 6, pp. 1056-1065.

**38-Paola SAUTEJEAU—RIZZONI 2024 Thèse : CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA CONGÉLATION
DU SPERME ÉQUIN: INFLUENCE DE LA DURÉE D'ÉQUILIBRATION**