



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 خميس مليانة
Université de Khemis-miliana
كلية علوم الطبيعة و الحياة و علوم الارض
Faculté des Sciences de la nature et de la vie et des Sciences de la terre



Mémoire de fin d'Etude

En Vue de l'obtention du diplôme Master en
Sciences Agronomiques
Option : Production animale

Thème

Contribution à l'étude de la conservation de la semence
équine.

Soutenu le 12/07/2021

Par: M^{elle} KOUATMIANI Meriem
M^{elle} TRITIRI Nadia

Devant le jury composé de :

Président	M ^r KOUACHE Ben moussa	Maitre de conférences	UDB KM
Promoteur	M ^{me} . AIZA Asma	Maître Assistante	UDB KM
Co-promoteur	M ^r BELALA Ridha	Maître de conférences classe B	USD. Blida1
Examineur	M ^r HAMIDI Djamel	Maître Assistant	UDB KM
	M ^r FANTAZI Khaled	Maitre de Recherche	INRA Alger

Promotion : 2020-2021

Remerciements

Nous commençons par remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la volonté, l'amour du savoir et surtout le courage et la patience pour effectuer ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre promotrice **Mme AIZA Asma**, pour sa confiance, son soutien, son attention, ses bons conseils et ses qualités humaines. Pour tout cela, on tient à lui exprimer toute notre gratitude, pour ces encouragements et surtout pour la grande patience qu'elle a manifesté, on se trouve incapable de formuler nos remerciements envers elle. Aujourd'hui nous témoignons que nous vous sommes redevables et on vous remercie par l'occasion, pour avoir bien voulu diriger notre travail.

Nos sincères gratitudees à notre co-promoteur **Mr BELALA Redha** qui fut à l'origine de ce travail, Pour m'avoir proposé ce sujet, et pour son expériences, qui nous a guidé le long de la réalisation de ce travail. ses remarques, ses conseils pleins de sens, et ses recommandations ont été précieux pour l'aboutissement de ce travail.

Nous remercions les membres de jury : examinateur **Mr HAMIDI Djamel** et **Mr FANTAZI Khaled** et président **Mr KOUACHE Ben moussa** d'avoir bien voulu accepter d'examiner ce travail. Nous vous en sommes très reconnaissants.

Enfin, pour tous ceux et toutes celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de nos sincères remerciements-

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents

A mon cher frère et à mes chères sœurs

Mes beaux-frères

A mes chers amis et surtout mes

meilleures Houda, Houria, Bahia et

Yassmine

Spécialement à KOUICEM Mohamed

Chérif pour son soutien

Et à MERAIMI Oussama

à KHOUATMIANI Khadidja.

Je vous aime...

KHOUATMIANI Meriem

Merci à dieu tout puissant pour ce que je suis aujourd'hui

Je remercie mes très chers parents Mohamed et Fatiha qui ont toujours été là pour moi

A ma chère mère

A mon cher père

Qui n'ont cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs

A mes frères, Ahmed Sami, abd elhafidh et Oussama

Pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études

A mon cher grand-père et ma chère grande mère

Que je souhaite une bonne santé

A mes amis Asma, Souad, Sabrina et Mohamed

Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles

A ma binôme, khouatmiani Meriem

Pour son entente et sa sympathie

A tout ma famille tritri et benaissa khouadri

A mes oncles et tantes

Mon oncle Tritri kamel

Et

Ma tante Alima qui grâce à eux je suis là

Merci à tous mes professeurs durant mon parcours académique

TRITRI Nadia

Résumé

L'Algérie est le pays type d'une grande et ancestrale tradition équestre, et les races de chevaux élevés en abondance sont Race Barbe, Race Arabe-Barbe, Race Pur-sang Arabe, Race Pur-sang Anglais et Race Trotteur Français. Le système reproducteur féminin se compose de deux ovaires, l'utérus (2 cornes, corps et col) et le vagin. L'activité ovarienne saisonnière, la durée moyenne du cycle est 21 jours et la gestation de la jument 338 jours en moyenne. La composition de l'appareil génital de l'étalon compose de deux testicules, ensemble d'enveloppes formant de 6 couches, glandes vésiculaire et le pénis. L'âge de puberté 11 à 19 mois. La production de chaque spermatozoïde 57 jours. La semence équine se caractérisent par : volume moyenne de 100ml, couleur blanchâtre, fonction gélatineuse et un ph entre 6,2 et 7,8, sa composition est plasma séminal et spermatozoïde.

Pour pratiquer l'insémination artificielle, la semence est collectée le plus souvent dans un vagin artificiel. Le volume est important, de l'ordre de 30 à 150 ml en moyenne, une partie étant constituée de gel. Le sperme filtré et dilué pour être utilisé soit frais, soit réfrigéré (dans les 10 heures), soit congelé après centrifugation pour éliminer le plasma séminal. En moyenne 200 millions de spermatozoïdes dans 15 à 30 ml sont mis en place à travers le col utérin dans le corps de l'utérus.

Mots-clés : Reproduction, cheval, insémination artificielle

Abstract

Algeria is the typical country of a great and ancestral equestrian tradition, and the breeds of horses bred in abundance are Arabian-Beard, Arabian-Purebred, English-Purebred and French Trotter. The female reproductive system consists of two ovaries, the uterus (2 horns, body and neck) and the vagina. The ovarian activity is seasonal, the average cycle length is 21 days and the gestation of the mare is 338 days on average. The composition of the genital apparatus of the stallion consists of two testicles, set of envelopes forming 6 layers, vesicular glands and the penis. The age of puberty 11 to 19 months. the production of each spermatozoon 57 days. The equine semen is characterized by: average volume of 100ml, whitish color, gelatinous function and a ph between 6,2and 7,8, its composition is seminal plasma and spermatozoon.

In order to perform artificial insemination, semen is usually collected in an artificial vagina. The volume is important, in the order of 30 to 150 ml on average, a part being constituted of gel. The semen is filtered and diluted to be used either fresh, refrigerated (within 10 hours), or frozen after centrifugation to eliminate the seminal plasma. An average of 200 million sperm in 15-30 ml are placed through the cervix into the body of the uterus.

Keywords: Reproduction, horse, artificial insemination

ملخص

الجزائر هي البلد النموذجي لتقاليد الفروسية العظيمة والمتوارثة، وسلالات الخيول التي تمت تربيتها بكثرة هي Race Barbe و Race Arabe-Barbe و Race Pur-sang Arabe و Race Thor-sang Anglais و Race Trotteur Français. يتكون الجهاز التناسلي للأنثى من مبيضين، الرحم (قرنان والجسم وعنق الرحم) والمهبل. يعتبر نشاط المبيض موسميًا، ويبلغ متوسط طول الدورة 21 يومًا وحمل الفرس 338 يومًا في المتوسط. يتكون تكوين الأعضاء التناسلية للفحل من خصيتين، ومجموعة من الأظرف تشكل 6 طبقات، والغدد الحويصلية والقضيب. سن البلوغ 11-19 شهرًا، وتنتج كل حيوانات منوية 57 يومًا. يتميز السائل المنوي للخيول ب: متوسط حجم 100 مل، لون أبيض، وظيفة هلامية ودرجة الحموضة بين 6.2 و7.8، تركيبته هي البلازما المنوية والحيوانات المنوية. لممارسة التلقيح الصناعي، غالبًا ما يتم جمع السائل المنوي في المهبل الاصطناعي. الحجم كبير، حوالي 30 إلى 150 مل في المتوسط، جزء منه عبارة عن مادة هلامية. يتم ترشيح السائل المنوي وتخفيفه للاستخدام إما طازجًا أو مبردًا في المساء (خلال 10 ساعات) أو مجمدًا بعد الطرد المركزي لإزالة البلازما المنوية. في المتوسط، يتم وضع 200 مليون حيوان منوي في 15 إلى 30 مل من خلال عنق الرحم في جسم الرحم.

الكلمات المفتاحية: التكاثر، الحصان، التلقيح الصناعي

Table des matières

Les abréviations.....	I
Liste de figure.....	II
Liste des tableaux.....	III
Résumé.....	IV
Abstract.....	IV
ملخص.....	IV
Sommaire	
Introduction.....	01

Partie Bibliographie

Chapitre I

Situation de l'élevage Equins en Algérie

I.1.	Historique du cheval en Algérie.....	02
I.2.	Origine du cheval Barbe	02
I.3.	Effectifs de la production équine et son évolution en Algérie	03
II.	Les races équines en Algérie	04
II.1.	Races autochtones.....	04
II.1.1.	Race barbe.....	04
II.1.2.	Race Arabe-Barbe.....	05
II.2.	Race induites.....	06
II.2.1.	Race Pur-sang Arabe	06
II.2.2.	Race Pur-sang Anglais	06
II.3.	Race Trotteur français	07
III.	Usage des chevaux en Algérie	09
III.1.	Utilisations traditionnelles du cheval.....	09
III.1.1.	Fantasia	09

III.1.2.	Travail agricole.....	10
III.2.	Utilisations modernes du cheval	10

Chapitre II

Rappels sur l'anatomie et physiologie des organes génitaux

I.	La jument	11
II.	Etalon	11
II.1.	La spermiogénèse.....	12
II.1.1.	La spermatocytogenèse	13
II.1.2.	La méiose.....	13
II.1.3.	La spermiogenèse	13
II.1.4.	Rôle des cellules de Sertoli dans la spermatogenèse.....	14
II.2.	Les hormones testiculaires.....	14
II.3.	Le mécanisme de l'érection	14
II.4.	La puberté de l'étalon	14
II.5.	La taille des testicules dépend de l'âge	14
II.6.	La taille des testicules dépend de la saison de l'année	14

Chapitre III

La semence équine

I.	Caractéristiques du sperme équin	16
I.1.	Le volume de l'éjaculat.....	16
I.2.	Couleur et consistance	16
I.3.	L'odeur.....	16
I.4.	Le ph	16
II.	Les composants de la semence équine.....	17
II.1.	Le plasma séminal.....	17
II.1.1.	Composition chimique.....	17
II.1.2.	Les rôles du plasma séminal	17

III.	Le spermatozoïde équin.....	17
III.1.	La tête	17
III.2.	La région intermédiaire	18
III.3.	Le flagelle.....	18
III.4.	Les différentes fraction de la semence	19
IV.	La récolte de sperme d'étalon.....	19
IV.1.	Les différents techniques de collecte.....	19
IV.2.	L'induction pharmacologique de l'éjaculation	21
IV.3.	Le vagin artificiel	22
IV.3.1.	Le choix du vagin artificiel.....	22
IV.4.	Déroulement de récolte.....	23
V.	Généralités sur les techniques de manipulation de semence	25
V.1.	Evaluation de la qualité de semence équine	26
V.1.1.	Evaluation de l'anomalies morphologiques	26
V.1.2.	Evaluation de la concentration.....	27
V.1.3.	Evaluation de la mobilité	27

Chapitre V

La conservation de la semence équine

I.	La réfrigération de la semence équine	29
I.1.	Les paramètres physiques de la réfrigération	29
I.1.1.	la température de réfrigération	29
I.1.2.	La vitesse de refroidissement	30
I.2.	La technique de réfrigération de la semence équine	31
I.3.	Les différentes étapes de la préparation des doses de semence réfrigérée	31
I.3.1.	La dilution	31
I.3.2.	Le conditionnement des doses et la maîtrise du refroidissement.....	34

I.3.3	Le matériel de transport de la semence équine réfrigérée	35
I.3.4.	Remise à température ambiante.....	35
II.	La congélation de la semence équine	35
II.1.	Les étapes de la congélation de la semence équine	36
II.1.1.	La première dilution	36
II.1.2.	La première descente en température (de +37°C à + 22°C)	36
II.1.3.	L'élimination du plasma séminal	36
II.1.4.	La seconde dilution	37
II.1.5.	La seconde descente en température (de + 22°C à + 4°C) suivie du conditionnement en paillettes	37
II.1.5.	La congélation des paillettes (de + 4°C à – 196°C)	38
III.	Inséminateur.....	39
III.1.	Fonctions.....	39
III.2.	Expérience.....	40
III.3.	Insémination artificielle équine	40
III.3.1.	Insémination artificielle en semence fraîche	41
III.3.2.	Insémination artificielle en semence congelée	41
III.4.	Le protocole d'insémination artificielle	41
III.5.	Les différents types d'insémination artificielle.....	42
IV.	Comparaison des techniques d'insémination	44
	Conclusion	45
	Référence bibliographique	V

Les abréviations

- IAF :** insémination artificielle en semence fraîche
- IAR :** insémination artificielle en semence réfrigérée
- IAC :** l'insémination artificielle en semence congelée
- IART :** insémination artificielle réfrigérée transporter
- IA :** Insémination artificielle
- ADN :** Acide de désoxyribonucléique
- IFCE :** Institut français du cheval et de l'équitation
- CGEA :** Confédération générale des entreprises algériennes
- INRA :** Institut national de la recherche agronomique
- PPCN :** Phospho-caséinate natif.

Liste des figures

Figure 01 : Schéma d'évolution de l'élevage équin en Algérie.....	04
Figure 02 : Aire de répartition de l'élevage équin dans le territoire Algérien.....	04
Figure 03 : photos des races équines en Algérie	08
Figure 04 : Figure 4. Spectacle équestre traditionnel de Fantasia.....	09
Figure 05 : schéma d'une transversale de la paroi d'un tube séminifère d'étalon la distribution spatiale de la spermatogénèse	12
Figure 06 : schéma de la principale évolution morphologique des spermatides des spermatides au cours de leur différenciation en spermatozoïdes, lors de la spermiogénèse	13
Figure 07: Schéma d'un spermatozoïde équin.....	12
Figure 08 : Mannequin utilisé pour la récolte de semence chez l'étalon.....	20
Figure 09 : Mannequin de récolte pour étalons.....	20
Figure 10 : Collecte de la semence d'un étalon au sol, sans chevauchement.....	21
Figure 11 : femelle immobilisée pour la Collecte de la semence d'un étalon au sol, sans chevauchement.....	21
Figure 12 : Vagin artificiel de type MISSOURI.....	23
Figure 13 : Vagin artificiel de type INRA (d'après IMV technologies).....	23
Figure 14 : Différents compartiments et montage d'un vagin artificiel.....	25
Figure 15 : Récolte de l'étalon sur un mannequin.....	25
Figure 16 : cuve pour bain-marie contenant le milieu de dilution et les récipients allant accueillir le sperme, à température corporelle (36.8°C) (Mckinnon et <i>al.</i> , 2011).....	26
Figure 17 : représentation schématique des anomalies chromosomiques possibles.	27
Figure 18 : représentation de cinq types de trajets de spermatozoïdes équins.....	28
Figure 19 : Graphique représentant le pourcentage de spermatozoïdes équins mobiles après stockage à différentes températures durant 48 heures.....	30
Figure 20 : Les conditions d'incubation des doses d'insémination réfrigérées équines.....	34
Figure 21 : mettre la semence dans un bain-marie a 22°C	36
Figure 22 : Phase d'équilibration de la semence a 4°C	38

Figure 23 : Machine à remplir et à souder MRS I.....	38
Figure 24 : Etalement des paillettes sur le rack portoir de congélation.....	38
Figure 25 : Le processus de congélation de la semence équine	39

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Composition du dilueur à base de lait ½ écrémé.....	32
Tableau 02 :	Composition du dilueur de KENNEY ® pour 1 L (préparation simplifiée par l'utilisation de glucose isotonique).....	32
Tableau 03 :	Composition chimique du dilueur INRA 82 - Hépès ®.....	33
Tableau 04 :	Composition chimique du dilueur INRA 96 ®.....	33
Tableau 05 :	Les différents types d'insémination artificielle.....	43

Introduction

Depuis des milliers d'années, la filière équestre s'est construit autour de l'utilisation du cheval en sport, loisir ou élevage. Récemment, les chevaux ont été particulièrement choisis en raison de leur talent et de leur forme athlétique, ce qui permet de créer des races équines. Ces dernières sont maintenues en sélectionnant les chevaux pour la reproduction selon l'objectif d'amélioration de la race. Désormais, les caractéristiques de chaque race équine sont inscrites sur des stud-books.

Dans le domaine de la reproduction, l'insémination artificielle est très fréquente, et la plupart des stud-books acceptent désormais cette technique de reproduction. Les nombreux avantages qu'elle offre en font une technique de choix par sa nature de conservation : insémination artificielle en semence fraîche (IAF), insémination artificielle en semence réfrigérée (IAR) Et enfin l'insémination artificielle en semence congelée (IAC). Leur développement permet notamment la reproduction entre des chevaux éloignés géographiquement, la reproduction de chevaux pendant leur carrière sportive, ou encore la multiplication des produits de chevaux à haut potentiel génétique.

Notre travail consiste à une recherche bibliographique sur les différentes techniques de conservation de la semence en vue de la préservation et de l'obtention de nouvelles races équines

Chapitre I : Situation de l'élevage Equins en Algérie

I. Situation équine en Algérie

I.1. Historique du cheval en Algérie

L'Algérie est le pays type d'une grande et ancestrale tradition équestre. Le cheval fut le compagnon de peuples nomades cavaliers dans les tribus berbères de Syphax, Jugurtha et Massinissa, Il fut de toutes les guerres et de toutes les conquêtes des Musulmans lors des épopées de l'Emir Abdelkader, d'El Mokrani et de Bouamama (Rahal et *al*, 2009).

La population équine Algérienne, estimée à 250.000 chevaux, est constituée à 90% de chevaux Barbe et Arabe Barbe (et Selle algérien). Les 10% restant se répartissent entre chevaux Arabe, Pur-sang Anglais et Trotteur Français (Rahal et *al*, 2009)

L'Algérie, ainsi que les autres pays du Maghreb, berceau de la race Barbe a pris conscience au plus haut niveau de l'importance du cheval Barbe, Arabe-Barbe et Selle algérien. L'engouement européen et les objectifs de l'équitation populaire –qui cherchent plus des chevaux de performance-, mais plutôt des chevaux dociles ont fait le succès du cheval Barbe et son dérivé l'Arabe-Barbe.

I.2. Origine du cheval Barbe

Il y a plusieurs théories sur l'origine de la race Barbe. L'une dit que ce cheval descendrait d'un groupe de chevaux sauvages qui ont survécus à l'ère glaciaire. Des docteurs en paléontologie animale soutiennent entre 1987 et 2002 qu'il est vraisemblablement un cheval propre au nord de l'Afrique, issu d'un cheval sauvage domestiqué qui y vivait depuis plusieurs dizaines de milliers d'années. Le cheval Barbe serait l'une des plus anciennes races au monde. Il était établi que le cheval était absent durant la préhistoire saharienne. Celui-ci n'aurait été introduit qu'au IIe millénaire. Des recherches menées en Algérie établissent que des ossements d'espèce chevaline sont trouvés dans des gisements datant de 4000 ans et plus. En Afrique du Nord, le cheval fait partie intégrante de la vie de l'homme, dans toute son histoire. Des peintures rupestres représentant des chevaux ont été trouvées en Algérie. Le cheval Barbe est une race autochtone du Maghreb et de l'Afrique du Nord (Mauritanie, Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), d'après des études paléontologiques et des analyses d'ADN. Cette origine est renforcée par les gravures et peintures rupestres et par les monuments qui existent sur le sol de l'Afrique du Nord depuis la Libye jusqu'au Maroc. Ces inscriptions représentent la domestication d'un cheval ayant les caractéristiques morphologiques du cheval barbe actuel. Le cheval Barbe est élevé

depuis l'antiquité pour la chasse, la guerre, la parade et le travail. Il est le compagnon traditionnel des nomades et des éleveurs des Atlas et des Hauts Plateaux (Bataille, 2008).

Les sources romaines attestent (sous le nom de cheval de Barbarie) de la présence de ces chevaux chez les « barbares » (Berbères). Ces animaux font l'objet d'un commerce dans tout l'Empire romain, et gagnent de nombreux pays de la Méditerranée comme l'Italie et la France. Monture des Numides, le Barbe est employé par les armées de Jules César déployées pendant la Guerre des Gaules. Aux VII^e SIECLE et VIII^e siècle, de nombreux chevaux Barbes arrivent en Europe avec la colonisation musulmane. Ces chevaux remontent les écuries royales des cours d'Europe depuis le XIV^e siècle (Bataille, 2008).

Le Barbe a influencé de nombreuses races dans le monde comme la Pure race espagnole et son voisin, le Lusitanien ainsi que le cheval Navarrin, le Criollo argentin et le Mustang, descendant de chevaux Barbes et ibériques retournés à l'état sauvage. Un étalon présumé Barbe, Godolphin Arabian, fait partie des trois étalons fondateurs de la race du pur-sang anglais. Erwin Rommel réquisitionne de nombreux chevaux Barbes pour la campagne de Russie (Bataille, 2008). En France, la race est redécouverte à la fin du XX^e siècle après une longue période d'oubli. En 1987, une poignée de passionnés Français organise la journée mondiale du cheval Barbe à Alger. Le stud-book est ouvert en 1989 en France. On compte à peine plus de 100 naissances dans le stud-book français de la race en 2006(Bataille, 2008).

I.3. Effectifs de la production équine et son évolution en Algérie

La filière équine connaît un développement considérable sur les dernières années, aussi bien en nombre de chevaux existants, qu'en nombre d'éleveurs et de pratiquants de l'équitation. Plus de 256.000 chevaux vivent sur le territoire Algérien (selon les derniers recensements du Ministère Algérien de l'Agriculture en 2012). Ces données ne reflètent que partiellement la réalité puisqu'aujourd'hui, de nombreux équidés échappent à ce recensement. L'Algérie est ainsi classée au deuxième rang après la Tunisie des pays du Maghreb en termes d'effectifs d'équidés (Rahal et *al*, 2009).

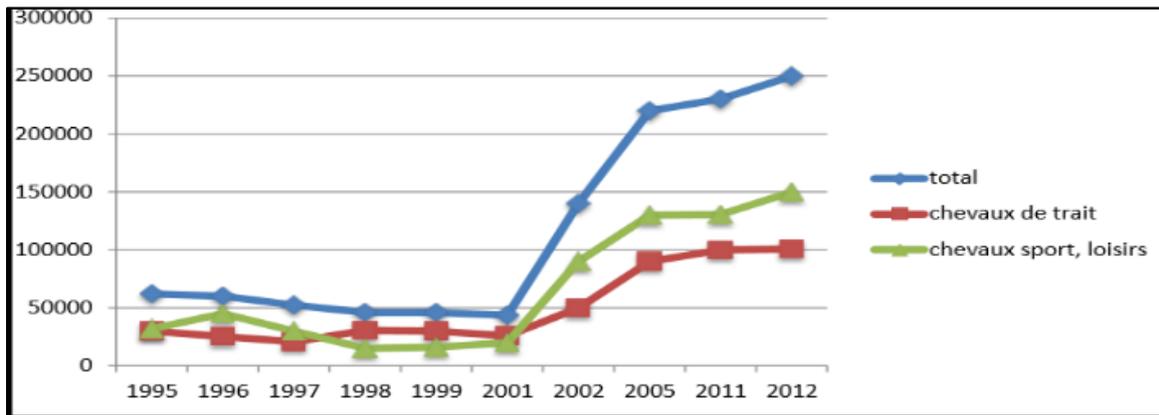


Figure 1 :Schéma d'évolution de l'élevage équin en Algérie (Ministère Algérien de l'Agriculture, 2012).

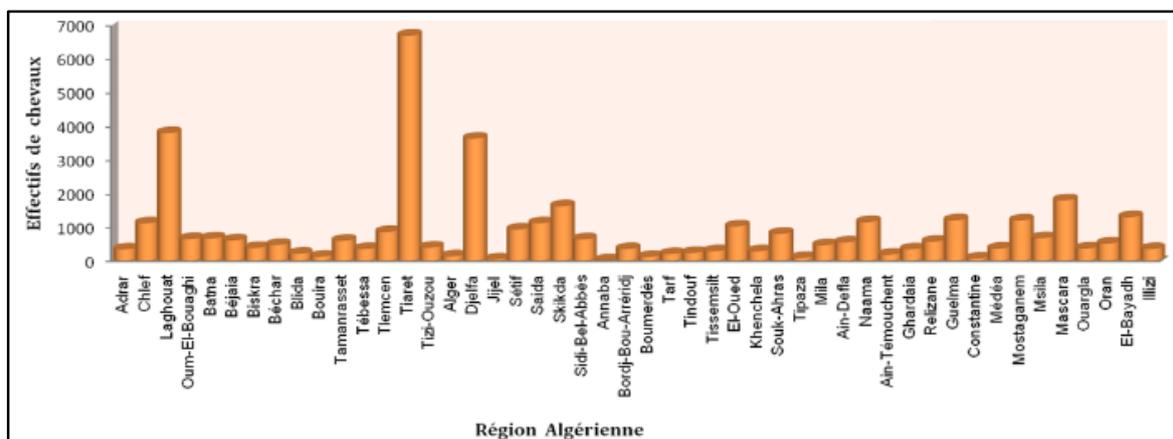


Figure 2 : Aire de répartition de l'élevage équin dans le territoire Algérien (ONDEEC2005).

II. Les races équines en Algérie

II.1. Races autochtones

II.1.1. Race Barbe :

Le cheval Barbe (Figure 03) est originaire du Maghreb. Il a été appelé d'abord barbare et ce n'est qu'en 1534 que la dénomination Barbe est apparue (Roux, 1987). C'est un cheval polyvalent, docile et endurant qui s'adapte facilement à différents climats aussi bien dans les

pays du berceau de la race (Algérie, Maroc, Tunisie et Lybie), que dans les pays où il a été longtemps exporté, en Europe aussi bien qu'en Afrique subsaharienne (Rahal *et al.*, 2009).

La population Barbe d'Algérie s'élève à environ 10.000 têtes auxquelles on peut adjoindre quelques 90.000 Arabe-Barbes à moins de 25 % de sang arabe pour le plus grand nombre (Kadri, 2006).

Cependant, entre « purs » et « présumés », la distinction n'est pas toujours facile à effectuer. En effet, la majorité de cette population est composée de sujets non-inscrits au studbook du Barbe et dont la caractérisation est basée uniquement sur quelques aspects morphologiques, « à l'œil » pour les connaisseurs. Le standard officiel de la race Barbe, fixé par l'Organisation mondiale du Cheval Barbe (OMCB), créée à Alger en juin 1987 (Organisation mondiale du Cheval barbe, 1989 ; El-Kohen, 2006).

définit le Barbe sur le plan morphologique comme une race eumétrique, médioligne dont les principaux caractères sont: une taille moyenne de 1,55 m (1,50 m-1,60 m) ; une longueur scapulo-ischiale sensiblement égale à la taille avec un indice corporel de profil égal à 1 (cheval carré) ; une tête assez forte, chargée en ganache avec des naseaux effacés ; un profil céphalique convexe légèrement busqué ; une encolure bien greffée, rouée, épaisse et courte ; un garrot bien édifié et fortement marqué ; une poitrine large et haute avec un périmètre thoracique d'au minimum 1,70 m ; un dos tendu et tranchant avec un rein court, puissant et parfois voussé ; une croupe en pupitre avec une queue attachée bas ; un tour de canon minimum de 18 cm et une robe essentiellement grise, baie, alezane avec des crins abondants et épais (Organisation mondiale du Cheval barbe, 1989 ; Tamzali, 1989 ; Chabchoub, 1998).

II.1.2. Race Arabe-Barbe:

L'Arabe-Barbe, création de la Jumenterie de Tiaret (instaurée en 1877), dédiée d'abord à l'élevage des races Arabe et Barbe, constitue la race prédominante en Algérie (Benabdelmoumene, 2003 ; Kadri, 2006). L'Arabe se différencie du Barbe en étant plus léger, présentant plus de sécheresse et de finesse, une encolure plus allongée et peu épaisse, un profil de la tête rectiligne ou concave, une queue courte et attachée haut et une croupe plus horizontale (Gaudois, 1989 ; Haras nationaux français, 2010). Le nombre de produits Arabe-Barbes purs, inscrits au stud-book algérien du cheval Barbe, nés entre 1993 et 2004, est de 3379 selon les données de l'Office national du Développement de l'Élevage équin et camelins (ONDEEC) (Rahal *et al.*, 2009).

II.2. Races induites

En plus de ces deux races locales, on distingue aussi des Pur-sang Arabes, des Pur-sang Anglais et le Trotteur Français utilisés essentiellement dans le monde du sport, représenté par les courses hippiques, les concours de saut d'obstacle et les raids d'endurance. Ces races importées et élevées depuis plusieurs décennies sont inégalement réparties dans le territoire algérien et mieux adaptées aux reliefs montagneux et arides des régions d'Afrique du nord (Rahal et *al.*, 2009).

II.2.1. Race Pur-sang Arabe

Les chevaux Arabes constituent la plus ancienne des races pures, ils sont à l'origine de toutes les races modernes de chevaux de modèle léger et, en dépit de la contradiction apparente de leurs deux qualités essentielles, c'est également eux qui sont les plus célèbres pour leur exceptionnelle beauté et pour leur incomparable endurance (Edwards, 1974).

A partir de l'année 1983, la situation de cette race a eu un tournant décisif avec l'instauration de courses de Pur-sang arabe à l'hippodrome du Caroubier (Alger) puis d'Oran, alimentées au départ avec des chevaux arabes polyvalents, nés et élevés en Algérie. Le Haras de Tiaret a joué un rôle prépondérant à ce niveau, puisqu'il a injecté à lui seul plus de 700 coursiers dans les hippodromes. C'est à cette époque qu'ont commencé les premiers croisements de Pur-Sang Arabe en vue d'obtenir des modèles coursiers. Ainsi, le haras national de Tiaret achetait les chevaux qui se distinguaient en course, alors que des propriétaires privés ont réussi à sélectionner et produire des chevaux arabes de course renommés à cette époque (Hammam, Dimachk, Mesk ...). La tendance actuelle ira vers un croisement de souches locales avec des étalons importés. Les lignées françaises sont pour l'heure les meilleures au monde (Manganate, Tidjani, Dormane...) (Rahal et *al.*, 2009).

II.2.2. Race Pur-sang Anglais

Créée au 17^{ème} siècle, cette race est issue du croisement de juments anglaises, avec des étalons Arabes et Barbes. Parmi ces étalons, citons *Godolphin Barb*, *Darley Arabian* et *Beyerly Turck*. Ils produiront le cheval le plus rapide du monde (Benabdelmoumène, 2003).

Splendide animal de course à la musculature puissante, très longiligne et extrêmement rapide, de 3 types : le sprinter (haut et allongé, très rapide), le stayer (petit, meilleur en fond) et l'intermédiaire (court, apte aux obstacles). Il est élevé pour les courses de vitesse, mais aussi le saut d'obstacle, a servi à améliorer la plupart des races et à en créer de nouvelles (Hellowtejiozem, 2007).

L'introduction de cette race en Algérie, remonte au 19^{ème} siècle. Les effectifs actuels sont de l'ordre de 500 têtes, et la production est réservée exclusivement aux courses hippiques (Benabdelmoumène, 2003).

La région d'élevage du Pur-sang Anglais en Algérie est par excellence Laghouat et à un moindre degré Blida (jumentrie de Chebli). Des naissances sont enregistrées dans d'autres régions, notamment par le biais de propriétaires de chevaux de course (hippodrome Zemmouri, Oran, Msila, Djelfa) (Rahal et *al*, 2009).

II.3. Race Trotteur Français

L'introduction de cette race en Algérie, remonte au 19^{ème} siècle. Les effectifs actuels sont de l'ordre de 500 têtes (Rahal et *al*, 2009), et la production est réservée exclusivement aux courses hippiques. Issue du croisement Pur-sang Anglais avec des chevaux Normande. C'est aujourd'hui une race à part entière avec un stud book semi ouvert (Rahal et *al*, 2009).



a- race Barbe



b- Race Arabe-Barbe



c- Race PUR-sang Arabe



d- Race PUR-sang Anglais



e- Race Trotteur Français

Figure 3 : photos des races équines en Algérie Tirée du site : <http://www.hippologie.fr/race-de-chevaux.html>

- a- Race barbe
- b- Race Arabe-Barbe
- c- Race Pur-Sang Arabe
- d- Race PUR-Sang Anglais
- e- Race Trotteur Français

III. Usages des chevaux en Algérie

On peut noter la présence d'équidés dans tout le territoire Algérien. Leur utilisation prend de nombreuses formes : le travail agricole, le spectacle, et également des disciplines équestres sportives au plus haut niveau, en passant par les compétitions équestres, les courses et le loisir. (Rahal et *al*, 2009).

III.1. Utilisations traditionnelles du cheval

III.1.1. Fantasia

C'est une la tradition équestre ancestrale dans nos régions rurales. La fantasia désigne différents spectacles équestres traditionnels simulant des assauts militaires, pratiqués essentiellement au Maghreb, où elle est appelée « jeu de la poudre » ou « jeu des chevaux ». Elle prend le plus souvent la forme d'évolutions équestres au cours desquelles des cavaliers, munis de fusils à poudre noire et chevauchant des montures richement harnachées, simulent une charge de cavalerie dont l'apothéose est le tir coordonné d'une salve de leurs armes à feu (Figure 4). La fantasia accompagne le plus souvent les fêtes importantes (mariages, naissances, fêtes religieuses, etc.), même si l'aspect touristique l'emporte largement de nos jours. (Benabdelmoumène, 2003).



Figure 04 : Spectacle équestre traditionnel de Fantasia. Tirée du site : [http://www. La fantasia- spectaculaire](http://www.La-fantasia-spectaculaire)

III.1.2. Travail agricole

Tout au long du XXe siècle, le cheval a été délaissé suite à la mécanisation de la société dans les pays industrialisés. De nos jours, son utilisation est en nette recrudescence, pour accomplir de nombreuses tâches. Dans les pays en développement, en général, et en Algérie en particulier, en milieu rural, malgré le développement de l'automobile, le cheval contribue notamment au transport des matériaux de construction et de l'eau dans les endroits souvent inaccessibles aux véhicules à moteur. Le cheval intervient aussi dans le transport des personnes, des marchandises et des ordures ménagères. En agriculture le cheval est toujours utilisé comme un auxiliaire de travail pour les paysans. (Benabdelmoumène, 2003).

III.2. Utilisations modernes du cheval

Les sports équestres regroupent toutes les disciplines équestres sportives. Il existe de nombreux autres sports équestres pratiqués à travers le monde, certaines étant réglementées par la Fédération Équestre Internationale (FEI), tandis que d'autres ont une portée locale. La FEI réglemente et organise les compétitions internationales des sept disciplines parmi les plus connues et les plus pratiquées dans le monde : attelage, concours complet, dressage, raids d'endurance, saut d'obstacles, courses hippiques et tourisme équestre. (Benabdelmoumène, 2003).

Chapitre II : Rappels sur l'anatomie et physiologie des organes génitaux

I. La jument

Chacun des 2 ovaires pèse 60 g en moyenne (20-170 g), avec une longueur moyenne de 6,5 cm (5-8 cm) et une largeur de 2 à 4 cm. Les ovaires sont ovoïdes, en forme de reins, incurvés autour de la fosse d'ovulation. Les corps jaunes sont en forme de poire d'un diamètre de 1 à 2,5 cm. La bourse ovarique facilite le passage de l'œuf vers l'oviducte (Nicolich, 1989 ; Tibary et *al.*, 1994).

Les oviductes ou trompes utérines ont une longueur de 20 à 30 cm. Le calibre externe se rétrécit de l'ampoule à l'utérus : de 5-9 mm à 2-3 mm. L'utérus de type bipartite, a 2 cornes, un corps et un col dont les longueurs sont 12 à 25 cm pour les cornes, 14 à 24 cm pour le corps et 5 à 8 cm pour le col. Le col est dur et fermé en période de repos, mou et congestionné pendant l'œstrus. Il se contracte et se relâche en alternance au moment de l'ovulation.

Le vagin a une longueur de 20 à 35 cm en moyenne. Latéralement, la glande de Bartholin sécrète un liquide visqueux plus abondant au moment de l'œstrus. (Mayer, 2009)

La jument a une activité ovarienne saisonnière liée à la durée du jour. L'hiver correspond à une période de repos sexuel.

Les chaleurs : la durée moyenne du cycle est de 21 jour (15 à 33 jour). Celle-ci dépend de la saison, des races et des individus. La grande variabilité constatée dans la durée des chaleurs et dans le moment de l'ovulation est caractéristique de l'espèce et constitue le principal obstacle au succès de la reproduction.

La gestation de la jument est une des longues des femelle domestiques 338 jours en moyenne. Soit 11 et 1 semaine le sexe du fœtus, la race, l'individu, l'effet de la saison entraînent une forte variabilité de sa durée de 310 à 365 jours (Deblay et Enesad, 2002).

II. Etalon

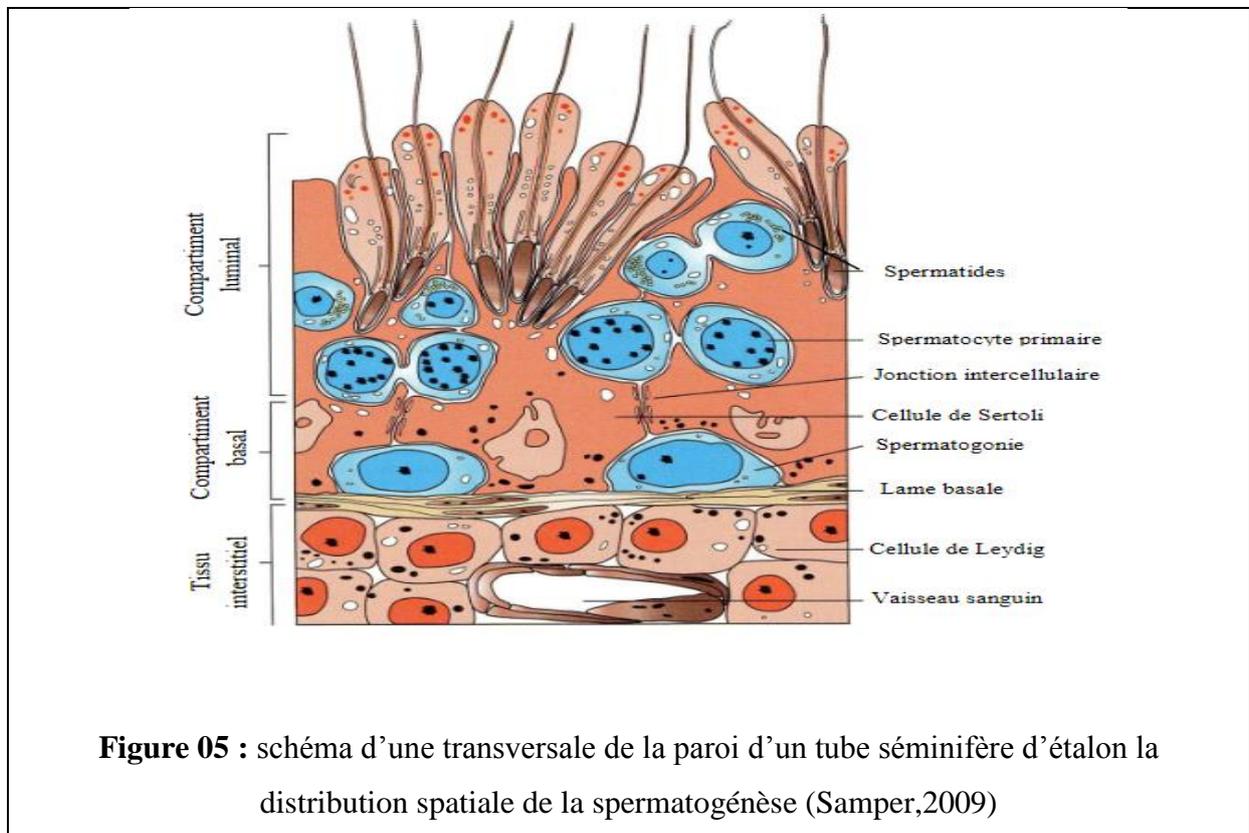
Les 2 testicules sont logés dans le scrotum, un ensemble d'enveloppes formant 6 couches : peau, dartos, fascia spermatique externe, crémaster, fascia spermatique interne, et tunique vaginale. D'un poids moyen de 180 g, ils mesurent 9 cm de long pour un diamètre de 6 cm en moyenne.

Les glandes vésiculaires ou vésicules séminales sont bien développées : longueur 15 cm, largeur 5 cm en moyenne. La prostate est bilobée. Le pénis a une longueur totale de 50 cm, dont 20 cm libres. Il comporte un processus urétral de 3 cm de long en moyenne (Nicolich, 1989).

II.1. La spermiogénèse

La spermatogénèse est un phénomène physiologique permettant de produire les spermatozoïdes à partir de cellules souches appelées spermatogonies. La spermatogénèse se déroule dans les tubes séminifères eux-mêmes situés dans le Parenchyme testiculaires. Les Tubes séminifères contiennent des cellules somatiques les cellules de Sertoli et les cellules myoïdes ainsi que des cellules germinales (Johnson et *al.*1997).

Les deux testicules d'un étalon adulte produisent 70000 spermatozoïdes chaque seconde pendant la saison reproductrice mais la production de chaque spermatozoïde requiert 57 jours (Amann ,2011).



La spermatogénèse déroule de façon continue et toute la vie de l'animal à partir de la puberté (située 18 et 22 mois d'âge). Chez l'étalon, la spermatogénèse permet de produire 16×10^6 spermatozoïdes par jour par gramme de testicule. Ce qui représente environ $5,37 \times 10^9$ spermatozoïdes. Dure en moyenne 57,7 jours dans l'espèce équine, et se déroule en trois phases successives :

II.1.1. La spermatocytogenèse :

Dure 19,4 jours chez l'étalon, elle se caractérise par une phase de multiplication par mitoses et par une phase de différenciation des spermatogonies en spermatocytes (Amann, 1993).

En plus de la production des spermatogonies par la mitose. Le renouvellement de ces cellules est nécessaire pour assurer le maintien de suffisamment de cellules souches (Little Et Holyoak ,1992).

II.1.2. La méiose :

Dure 19,4 jour chez l'étalon et se caractérise par échange de matériel génétique entre chromosomes homologues des spermatocytes primaires, elle se déroule en deux divisions de méiose produisant des spermatides haploïdes (Amann, 1993).

II.1.3. La spermiogenèse :

Dure 18,6 jours chez l'étalon, elle se caractérise par de la différenciation et de la spécialisation de fonction. Les spermatides qui résultent de cette étapes sont complètement différenciés et nommés spermatozoïdes après leur départ l'épithélium spermatogène, cette dernière étape se nomme spermiation (Amann, 1993).

Cette étape consiste en quatre phases successives:

- -La phase golgienne.
- -La phase de la coiffe.
- -La phase de l'acrosome.
- -La maturation.



Figure 06 : schéma de la principale évolution morphologique des spermatides des spermatozoïdes au cours de leur différenciation en spermatozoïdes, lors de la spermiogénèse (Schatten et constantinescu,2007).

II.1.4. Rôle des cellules de Sertoli dans la spermatogenèse

Plus il y a de cellules de Sertoli et plus le testicule peut produire des spermatozoïdes cependant le nombre de cellules de Sertoli présentes dans le testicule et le nombre maximum de cellules germinales sont caractéristiques de l'espèce (Amann, 2011).

II.2. Les hormones testiculaires

Les principales hormones sécrétées par les testicules sont **les hormones stéroïdes sexuelles** les hormones stéroïdes sexuelles se divisent en trois grandes familles : les **androgènes**, les **œstrogènes** et les **progestagènes**. Les hormones stéroïdes sexuelles chez l'étalon sont produites **par les cellules de Leydig dans le tissu interstitiel testiculaire** à partir du cholestérol cependant d'autres hormones sont sécrétées par le testicule, notamment **l'activine** et **l'inhibine** produites **par les cellules de Sertoli de l'épithélium séminifère** (Kiner, 2013).

II.3. Le mécanisme de l'érection

L'érection est contrôlée par le système nerveux autonome. Le mécanisme de l'érection est ensuite purement vasculaire. Les cavités du tissu érectile se remplissent de sang et la longueur du pénis passe alors de 60 à 90 cm. On observe également une augmentation du diamètre de la partie renflée du gland (10 cm de diamètre). Le système orthosympathique, via le nerf hypogastrique, permet le remplissage des lacunes par le sang en agissant sur la vasomotricité du corps caverneux et a un rôle excito-sécrétoire sur les glandes annexes. Le système parasympathique provoque l'érection du corps spongieux de l'urètre et du corps érectile du gland via le nerf érecteur (rameau du nerf honteux). Le nerf honteux assure l'innervation sensitive du périnée, du scrotum et du pénis (Blanchard, 2003 ; Heymon, 2005).

II.4. La puberté de l'étalon

Se définit comme le moment à partir duquel l'étalon peut prendre part avec succès dans la reproduction. La puberté implique la production de spermatozoïdes et l'achèvement des événements pré-pubères, elle a lieu 9 et 11 mois chez l'étalon. (Amann, 2011).

II.5. LA taille des testicules dépend de l'âge

L'âge influence significativement la taille testiculaire : la taille des testicules des étalons adultes est plus grande que celles des étalons plus jeunes elle est donc maximale chez les étalons âgés de plus de 7 ans (Thompson et al., 1979).

Ceci s'explique par le fait que les étalons ne sont pas matures sexuellement avant 6 ans voire plus et que le développement des organes sexuels se poursuit jusque l'âge de 12-13 ans (Squires et Pickett, 2011).

II.6. La taille des testicules dépend de la saison de l'année

La taille des testicules évolue au cours de l'année en corrélation avec la production de sperme qui s'explique en grande partie par la modulation de l'activité de spermatogenèse. Pendant la saison de reproduction, il y a une augmentation du nombre de spermatogonies et moins de dégénérescence de ces cellules. Une dégénérescence des spermatides a lieu hors de la saison de reproduction et le nombre de cellules de sertoli est plus bas en hiver qu'en été (Squires et Pickett, 2011).

La prise de médicament, le stress de l'entraînement d'activité sexuelle des étalons peuvent être à l'origine d'une taille de testicules plus réduite (Woods, 1980 ; Little et Holyoak, 1992).

CHAPITRE III : la semence équine

I. Caractéristiques du sperme équin

Le sperme, émis par l'étalon au moment de l'éjaculation, est un mélange composé de cellules (les spermatozoïdes) dans une phase liquide (le plasma séminal). Comme nous l'avons vu plus haut, les spermatozoïdes sont produits au niveau des tubes séminifères, dans les testicules, par le processus de spermatogenèse. Le plasma séminal est un ensemble de sécrétions accompagnant les spermatozoïdes, qui proviennent des tubes séminifères, de la queue de l'épididyme, de l'ampoule du conduit déférent, et des glandes annexes de l'appareil reproducteur de l'Étalon (notamment les vésicules séminales et la prostate). (Cécile et Barge, 2017).

I.1. Le Volume de L'éjaculat :

Le volume de l'éjaculat est très variable. Il est fonction de l'individu, de la race, de l'âge, de la saison et des conditions de récolte.

Il est en moyenne de 100 mL, et peut varier de 20 à 300 ml (Barrier et *al*, 2014)

I.2. Couleur et consistance :

La couleur normal de l'éjaculat équin est grisâtre à blanchâtre selon la concentration en spermatozoïdes .cette couleur peut devenir rose , rougeâtre ou rouge vif le sperme contient du sang (hémospermie) .une couleur jaunâtre peut signaler la présence d'urine (uro spermie) ou de pus (pyospermie) l'éjaculat est homogène et de consistance aqueuse scuf l'orsqu'il contient une partie de la fonction gélatineuse il peut paraitre trouble (Tibary et Bakkowy, 2005 ; Blanchard Et *al*, 2003 ; Heymon et Vignon, 2005) .

I.3. L'odeur :

L'évaluation de l'odeur de l'éjaculat fait partie de son examen classique. Il est normalement inodore. L'apparition d'une odeur d'urine ou putride témoigne d'une contamination de l'éjaculat et conduit à l'écarter de l'utilisation. (Samper et *al*, 2007 ; Samper, 2009)

I.4. Le Ph :

Le pH de la semence équine est compris entre 6,2 et 7,8, et le pH optimal est de 7,7(Chenoweth et Lorton, 2014 ; Samper et *al*, 2007)

II. Les Composants De La Semence Equine

II.1. Le plasma séminal :

II.1.1. Composition chimique :

La composition chimique du sperme est la suivante :

- Eau 80
- Matière organique 6
- Ions : les macroéléments (calcium, sodium, potassium, magnésium, phosphate et chlore)
- Lipides
- Glucides (fructose)
- Albumines et globulines
- Bases aminées. (alliment, 2010)

II.1.2. Les rôles du plasma séminal

Le plasma séminal accompagne les spermatozoïdes depuis leur production jusqu'à leur migration dans le tractus génital femelle. Ses rôles sont nombreux, et font encore aujourd'hui l'objet d'investigations. Les principaux rôles du plasma séminal sont :

- Rôle de transport
- Rôle dans la maturation épидидymaire des spermatozoïdes
- Rôle bactéricide
- Modulation de la réponse immunitaire de l'utérus
- Rôle métabolique
- Rôle dans l'acquisition du pouvoir fécondant
- Rôle dans les interactions entre le spermatozoïde et l'ovocyte et leur fusion (Chenoweth et Lorton, 2014)

III. Le spermatozoïde équin

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée, ce qui se traduit dans sa morphologie. Elle est de petite taille et flagellée. La longueur du spermatozoïde équin est de 55 à 86µm. Sa structure comporte deux parties, réunies par le col : la tête et la queue (le flagelle) (Knobil et Neill, 1999)

III.1. La tête :

Le cytoplasme est très peu présent et l'essentiel de l'espace est occupé par le noyau et l'acrosome. Le noyau présente exclusivement de l'hétérochromatine, qui est particulièrement

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

III.2. La région intermédiaire :

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

III.3. Le flagelle :

Le flagelle est la formation locomotrice qui permet d'amener le contenu chromosomique mâle jusqu'au gamète femelle. La pièce principale est constituée de neuf faisceaux de fibres denses ainsi que d'une gaine protéique fibreuse périphérique. La pièce terminale n'est constituée que de l'axonème enfermé dans la membrane plasmique (Knobil et Neill, 1999)

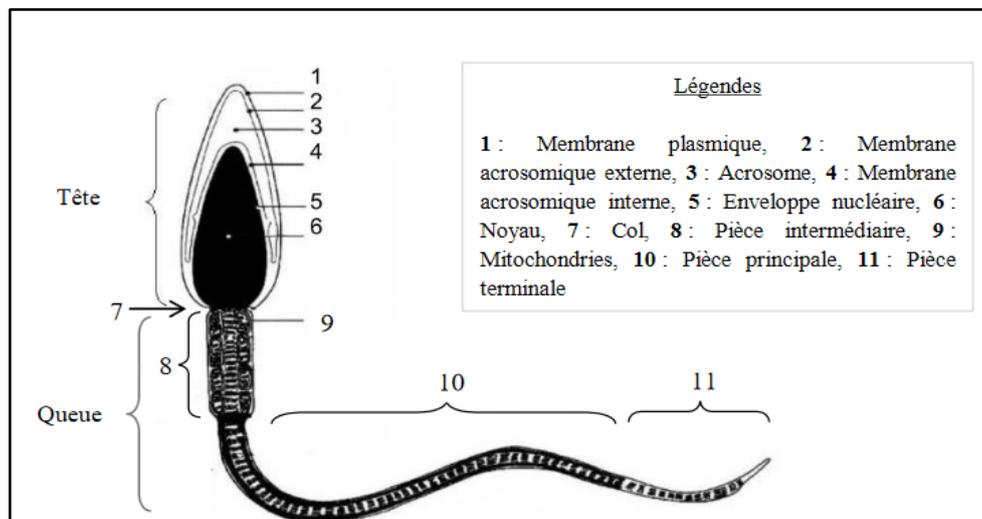


Figure 07 : Schéma d'un spermatozoïde équin (Rathi, 2002 ; pillet, 2009)

III.4. Les Différentes Fractions De La Semence

- le pré-sperme, une sécrétion visqueuse qui coule pendant l'excitation sexuelle, avant le vrai sperme (rôle lubrifiant), - la fraction riche des premiers jets, un mucus blanchâtre ou incolore, de 30 à 75 ml,
- le post-sperme, un gel trouble et visqueux, de 8 à 85 ml (rôle antimicrobien),
- la fraction post-coïtale, incolore, peu visqueuse et avec peu de gel (Knobil et Neill, 1999)

IV. La récolte de sperme d'étalon

La récolte consiste à collecter l'éjaculat de l'étalon afin qu'il puisse être utilisé pour l'insémination artificielle. Ce n'est qu'en se rapprochant des conditions naturelles et en habituant l'étalon à la procédure que cela peut être effectué en toute sécurité et avec succès. Il existe plusieurs options de chevauchement et le choix du vagin artificiel est également important pour s'adapter aux conditions matérielles disponibles pour chaque étalon et chaque structure. (Cuir et Ferry *et al.*, 2014).

IV.1. Les différents techniques de collecte

La récolte du sperme peut être réalisée par chevauchement, d'un mannequin ou d'une jument boute-en-train, ou sans chevauchement, au sol. (Cuir et Ferry *et al.*, 2014).

L'utilisation d'un mannequin présente de nombreux avantages par rapport à l'utilisation d'une jument taquine. Tant que la conception et l'emplacement du mannequin respectent certaines normes, les risques pour la santé seront réduits, la commodité et la sécurité de la collecte seront améliorées :

- Une hauteur et une inclinaison ajustables, afin d'adapter le mannequin au gabarit de l'étalon.
- Un maintien par un unique pied central, permettant d'éviter les blessures au niveau des pieds ou des membres postérieurs de l'étalon. Le cas échéant, le pied arrière du mannequin sera distant d'au moins 80 cm de l'arrière-main du mannequin.
- Le corps doit avoir une forme confortable et solide, avec une échancrure latérale ou ventrale et centrale à l'arrière-main, pour placer le vagin artificiel.
- Un rembourrage suffisant (notamment au niveau de l'arrière-main du mannequin), avec un revêtement résistant, non abrasif et facilement nettoyable.
- Une installation dans un local suffisamment spacieux et dépourvu de tout obstacle, comportant également un travail ou un espace pour placer une éventuelle jument boute-en-train.
- Un sol synthétique homogène, facilement lavable et non glissant. (Brinsko *et al.*, 2011).



Figure 08 : Mannequin utilisé pour la récolte de semence chez l'étalon. (Samper, 2009)



Figure 09 : Mannequin de récolte pour étalons (Letenre, 2016)

La collecte de semence à l'aide d'un mannequin est possible pour la plupart des étalons. Idéalement, les étalons doivent être habitués à monter des modèles sans avoir à avoir des juments chauffées à proximité. Mais pour certains étalons délicats, d'autres techniques de récolte doivent être envisagées. (Mckinnon *et al*, 2011).

Lorsque l'étalon refuse de chevaucher le mannequin, il est possible être remplacé par une jument en chaleur. Cette jument doit avoir le même statut sanitaire que l'étalon et réservée à cet effet. Sa préparation comprend le nettoyage de la vulve et de l'arrière-main (de la même façon que l'insémination), la mise en place de dispositifs de protection et la couverture de l'arrière-main. La queue est enroulée autour des cuisses de la jument et tirée en arrière pour couvrir la vulve, évitant ainsi le risque de pénétration. La retenue est généralement assurée par des torsions de nez et d'éventuels crochets et boucles (faites attention, car les étalons risquent de s'emmêler lorsqu'ils se chevauchent ou tombent). La procédure de collecte est identique à celle décrite avec un mannequin. (Samper, 2009).

Enfin, lorsque certains étalons ne peuvent chevaucher ni mannequin ni jument dans certaines circonstances ou pour des raisons médicales (par exemple, lors d'une pathologie

locomotrice, l'étalon n'est pas autorisé à monter un mannequin). La dernière option est la collecte au sol (voir figure 09 et 10) L'étalon est placé contre un mur lisse pour éviter les mouvements latéraux et faciliter sa contention. Une fois l'érection obtenue (par la vue d'une jument en chaleur ou non, voire d'un hongre), la semence collectée à l'aide d'un vagin artificiel. (Bonnes et *al.*, 2005)



Figure 10 : Collecte de la semence d'un étalon au sol, sans chevauchement. (Brinsko et *al.*, 2011)



Figure 11 : femelle immobilisée pour la Collecte de la semence d'un étalon au sol, sans chevauchement. (Brinsko et *al.*, 2011)

IV.2. L'induction pharmacologique de l'éjaculation

Certains étalons ont des problèmes d'érection ou d'éjaculation, ou sont incapables de monter (en raison de troubles sportifs ou neurologiques). Dans ces cas, l'induction pharmacologique de l'éjaculation est très utile. Les principales molécules utilisées à cet effet sont les suivantes:

Xylazine ($\alpha 2$ -sympathomimétique) : Les résultats varient selon le degré d'excitation de l'étalon pendant le traitement. Un environnement calme et paisible garantit de meilleurs résultats. En termes de volume, de concentration de spermatozoïdes, de pH et de nombre total de spermatozoïdes, les caractéristiques des éjaculats obtenus sont similaires à celles obtenues par accouplement.

Imipramine (antidépresseur tricyclique) : Chez l'homme, cette molécule est connue pour induire des érections et une émission spontanée. Chez les étalons, il peut être utilisé par voie intraveineuse ou orale. Injection intraveineuse, éjaculer dans les 10 à 45 minutes après l'injection. Cependant, le risque d'hémolyse gêne cette voie d'administration. Le même résultat est obtenu par administration orale, évitant le risque d'hémolyse. Le volume d'éjaculation qui en résulte est réduit, la concentration en spermatozoïdes et le nombre total de spermatozoïdes sont plus élevés et le pH de l'éjaculation est plus faible. Ces résultats peuvent s'expliquer par une meilleure contraction du bulbe du canal déférent et une moindre contraction des glandes accessoires (diminuant ainsi le volume plasmatique séminal).

Détomidine ($\alpha 2$ -sympathomimétique) : En termes de propriétés d'éjaculation, les résultats obtenus avec cette molécule sont similaires à ceux obtenus avec l'imipramine.

PGF2 α : L'effet de cette molécule sur les caractéristiques de l'éjaculation est controversé. Dans certaines études, le résultat est une augmentation du volume d'éjaculation et du nombre total de spermatozoïdes. Dans d'autres cas, aucune augmentation du nombre total de spermatozoïdes n'a été observée. 50% des étalons éjaculent dans les 10 à 50 minutes suivant l'administration. Ce traitement est déconseillé en raison de sa faible efficacité et des effets secondaires importants ont été observés (transpiration, contractions abdominales, miction contaminent l'éjaculation).

Ocytocine : Ceci est utile lorsqu'un étalon a un syndrome d'accumulation de spermatozoïdes dans les vésicules du canal déférent. La contraction du muscle lisse peut éliminer le sperme stocké.

Le protocole le plus fiable et le plus couramment utilisé est la combinaison d'imipramine et de xylazine. Habituellement, le chlorhydrate d'imipramine est pris par voie orale 2 à 3 mg/kg, et 0,66 mg/kg de xylazine est injecté par voie intraveineuse 2 heures plus tard. Selon les études, le taux de réussite varie de 30% à 70%. En ajustant la dose de chaque molécule pour adapter le protocole à chacun, le taux de réussite peut atteindre 80% à 100%. (Samper et al., 2007).

Le volume de l'éjaculat obtenu diminue, la concentration de sperme augmente et le nombre total de spermatozoïdes et la valeur du pH sont similaires à ceux d'éjaculats obtenus naturellement. (Mcdonnell, 2005).

IV.3. Le vagin artificiel

Un vagin artificiel permet de récolter la semence de l'étalon dans des conditions optimales de temps et de sécurité. Le principe d'un vagin artificiel est d'obtenir une « chambre » simulant les conditions de température, de pression et de lubrification du vagin de la jument. (Barrier-Battut et al., 2014).

IV.3.1. Le choix du vagin artificiel

Il existe différents vagins artificiels sur le marché. Ils permettent de reproduire au mieux les conditions naturelles rencontrées au moment de la reproduction, En adaptant la température, la pression et la lubrification. La verge déviée sur le côté au moment du chevauchement est introduite dans le vagin artificiel, à l'extrémité duquel un flacon permet ensuite la collecte de l'éjaculat. (Barrier-Battut et al., 2014).

Il existe trois grands types de vagins artificiels, correspondant à trois différentes techniques de prélèvement :

- **Le modèle « INRA » ou « COLORADO »** : C'est un vagin artificiel fermé et rigide. La totalité de l'éjaculat est collecté. La filtration de l'éjaculat est possible par ajout d'un filtre au niveau du flacon de collecte.

- **Le modèle « MISSOURI »** : ce modèle est américain. C'est un vagin artificiel fermé et souple. La totalité de l'éjaculat est collecté. Ce modèle permet également la filtration de l'éjaculat.

- **La technique à « VAGIN OUVERT »** : utilisation d'un vagin artificiel rigide (tel que le modèle « INRA ») sans y adapter le cône en latex. Uniquement les 3 premiers jets de sperme émis sont collectés (fraction riche en spermatozoïdes), au moyen d'un entonnoir à large ouverture, et le gel s'écoule à terre. (Samper, 2009).



Figure 12 : Vagin artificiel de type MISSOURI. (Schatten et Constantinescu, 2007)



Figure 13 : Vagin artificiel de type INRA (d'après IMV technologies). (Schatten et Constantinescu, 2007)

La sélection du modèle tient compte des besoins et des caractéristiques de l'étalon, de la méthode de traitement de la semence et des habitudes de l'éleveur. (Mckinnon et *al.*, 2011).

IV.4. Déroulement de la récolte

Les étalons doivent être capturés dans un environnement calme, avec un minimum de personnes présentes pour ne pas distraire les étalons, et de manière plutôt rituelle : l'habitude de l'étalon est d'enchaîner les pas dans le même ordre et de la même manière. Le but est d'assurer la sécurité et les normes de l'opérateur, et de minimiser les changements iatrogènes

ou environnementaux dans le sperme. Le but est d'éjaculer en un seul saut et de recueillir le sperme de la meilleure qualité possible. (Barrier-Battut et *al.*, 2014).

La préparation en amont et la planification sont les points clé, assurant une collecte efficace de l'éjaculat, puis une manipulation correcte de la semence immédiatement après sa récolte. (Mckinnon et *al.*, 2011).

Le laboratoire est préparé à l'avance : tous les matériaux en contact avec la semence sont maintenus propres et maintenus à une température appropriée entre +35 et +37 °C, comme par exemple les mettre au bain-marie (tube fermé à dilution moyenne), au four (bouteilles de collecte, cônes en latex, tube de type flacon de filtration du sperme, entonnoirs, gaze) ou sur les platines chauffantes de paille et du microscope (lames, lamelles, cônes). La préparation du vagin artificiel consiste à l'installer et à remplir le réservoir d'eau chaude. La température de l'eau chaude est comprise entre + 43 et + 48 °C, et de façon suffisante pour obtenir une pression suffisante dans le vagin. Bien entendu, ces deux paramètres doivent être adaptés aux habitudes de chaque étalon. L'étalon est emmené dans la zone de collecte, et une fois en érection, son pénis est lavé à l'eau tiède puis séché. La température et la pression dans le vagin artificiel ont été ajustées (la température correcte est comprise entre +42 et +45°C) et lubrifiée au dernier moment, à l'aide d'un gel non spermicide. Au moment du chevauchement du mannequin, La verge de l'étalon est doucement déviée par le collecteur et introduit dans le vagin artificiel, puis maintient le vagin parallèle à l'abdomen de l'étalon et aide à stabiliser l'étalon sur le mannequin. Pour des raisons évidentes de sécurité, L'étalonnier, à la tête de l'étalon, et le récolteur doivent être placés du même côté du mannequin lors du chevauchement. Après l'éjaculation, le vagin descend immédiatement, permettant à l'éjaculation de s'écouler dans le récipient collecteur, évitant ainsi le choc thermique. Une fois que l'étalon quitte le mannequin, la semence est transportée au laboratoire pour traitement et évaluation. Le vagin artificiel est immédiatement démonté, nettoyé et désinfecté, puis mis à sécher dans un lieu propre en vue d'une utilisation ultérieure. (Samper, 2009).

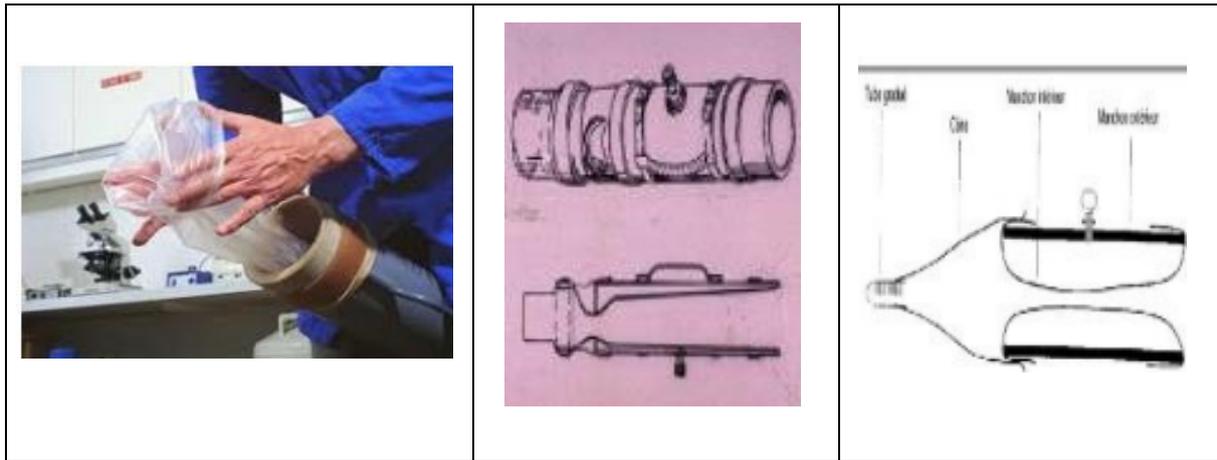


Figure 14 : Différents compartiments et montage d'un vagin artificiel (Letenre, 2016)



Figure 15 : Récolte de l'étalon sur un mannequin.

V. Généralités sur les techniques de manipulation de semence

Immédiatement après le prélèvement, la semence est rapidement transportée au laboratoire pour réduire les risques d'altération liée à l'action de la lumière ou à un choc thermique (température ambiante trop froide ou trop chaude). Tout le matériel entrant en contact avec la semence, ainsi que les milieux de dilutions, doivent être préalablement chauffés à température corporelle [figure8]. Lorsqu'il n'y a pas de filtre de semence placé lors du prélèvement au niveau de l'entrée du récipient de recueil une filtration de l'échantillon au travers d'un filtre non toxique doit être immédiatement réalisée, afin d'éliminer le gel et les débris. La partie gélatineuse du sperme peut également être éliminée par aspiration avec une seringue mais la perte en spermatozoïdes est alors en général plus importante (Brinsko et *al.*, 2011).



Figure 16 : cuve pour bain-marie contenant le milieu de dilution et les récipients allant accueillir le sperme, à température corporelle (36.8°C) (Mckinnon et *al.*, 2011).

Quelques minutes après la récolte, le sperme est dilué dans un milieu approprié pour maintenir la motilité des spermatozoïdes. Lorsque la semence est destinée à être immédiatement utilisée, diluer un volume de semence dans un à deux volumes de dilueur est suffisant. Une autre option consiste à placer le dilueur, préalablement réchauffé, directement dans le flacon de récolte : ainsi les spermatozoïdes bénéficient immédiatement du support nutritionnel et de la protection conférée par le milieu de dilution. Cette procédure est utile pour certains étalons dont le plasma séminal semble détériorer la mobilité des spermatozoïdes ou leur pouvoir fécondant. (Mckinnon et *al.*, 2011).

V.1. Evaluation de la qualité de semence équine

V.1.1. Evaluation de l'anomalies morphologiques

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont traditionnellement divisées en anomalies primaires, secondaires et tertiaires. On pense que l'anomalie primaire est causée par un obstacle dans le processus de spermatogenèse et a donc une origine testiculaire. On pense que les anomalies secondaires sont causées par des changements lors du passage dans les voies génitales. Les anomalies tertiaires se produiraient *in vitro*, du fait d'une mauvaise technique de récolte ou d'une mauvaise manipulation au laboratoire. (Blanchard et all ; 2003).

Actuellement, la classification comprend la liste des spermatozoïdes en fonction de la localisation anormale observée : tête sans décollement de la queue, tête anormale, acrosome en bouton, gouttelettes cytoplasmiques proximales ou distales, Intermédiaires courbés ou irréguliers, queues coudées ou enroulées [Figure15]. Ceci permet de faire des observations plus claires et plus représentatives de tous les spermatozoïdes, tout en évitant des hypothèses plus ou moins fausses sur l'origine de défauts spécifiques. De plus, certaines anomalies morphologiques telles que le décollement de la tête peuvent être primaires. Secondaire, ou

tertiaire pour éviter les erreurs d'interprétation. De plus, le choc osmotique peut provoquer une coudure ou un enroulement de la queue du spermatozoïde et donc être abusivement interprété comme étant une anomalie morphologique secondaire, quand bien même il s'agit d'une anomalie tertiaire. (Marie, 2010).

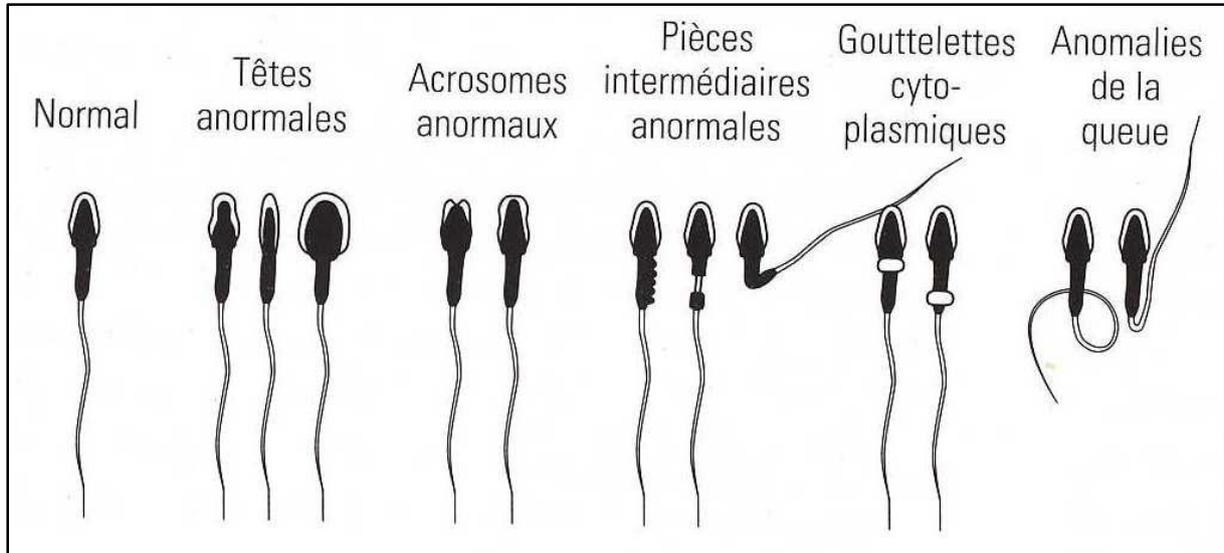


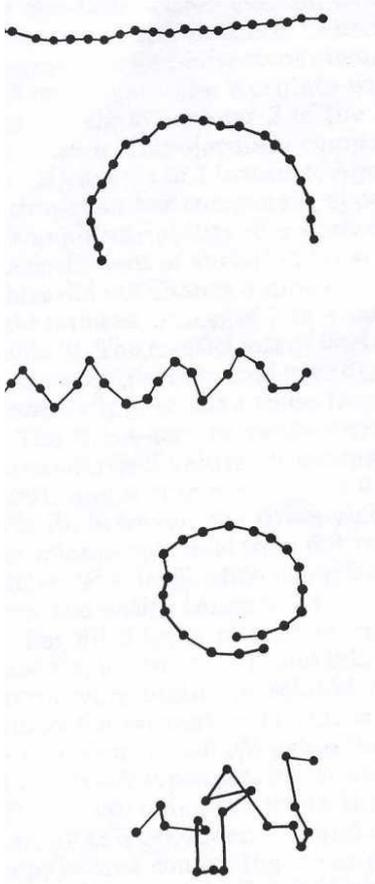
Figure 17 : représentation schématique des anomalies chromosomiques possibles.(Blanchard et al., 2003)

V.1.2. Évaluation de la concentration

La mesure de la concentration en spermatozoïdes de l'échantillon permet de calculer le nombre total de spermatozoïdes de l'éjaculat. Elle se réalise selon trois techniques principales : la cellule hématimétrique, le spectrophotomètre et le compteur électronique de particules. (Tibary et Bakkowy, 2005 ; Blanchard et al., 2003)

V.1.3. Evaluation de la mobilité

L'évaluation de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes est une étape indispensable lors de l'examen de la semence. La mobilité des spermatozoïdes reflète généralement la viabilité de l'ensemble des spermatozoïdes d'un éjaculat et une corrélation positive (mais non absolue) existe entre la mobilité et la fertilité [figure 18].



Trajet linéaire

Trajet fléchissant

Trajet en zig-zag

Trajet circulaire

Trajet irrégulier

Figure 18 : représentation de cinq types de trajets de spermatozoïdes équins (Varner et *al.*, 1991).

Chapitre V

La conservation de semence équine.

I. La réfrigération de la semence équine.

L'utilisation de l'insémination artificielle, de la réfrigération et du transport de la semence est courante chez les espèces qui le permettent. Contrairement à la plupart des races bovines qui utilisent de la semence congelée pour l'insémination, la capacité de congélation de la semence équine est très variable, c'est pourquoi la réfrigération de la semence est si développée chez cette espèce animale. (Prien et Iacovides, 2016).

La répartition des saillies en 2012 en France en fonction du type de monte, pour les juments de sang ainsi que les ponettes, indique qu'en moyenne 12% des saillies étaient réalisées en IAC, tandis que 20% l'étaient en IAR, ce qui montre bien l'importance de cette dernière technique. (Ponthier et *al.*, 2014)

I.1. LES PARAMETRES PHYSIQUES DE LA REFRIGERATION

Le seul but de la réfrigération de la semence de cheval est d'augmenter la durée de vie du sperme afin que la dose de semence puisse être transportée jusqu'à la jument loin de l'étalement pour l'insémination (Chiren, 2015).

La réfrigération aide à réduire le métabolisme des spermatozoïdes. En conséquence, ils peuvent économiser des réserves d'énergie, réduire les déchets métaboliques et restaurer la mobilité une fois le sperme réchauffé. Cependant, comme nous l'avons vu plus haut, ils subissent certaines pressions et leurs effets néfastes peuvent être mortels (Batellier et *al.*, 2002).

Afin de limiter ces pressions et contrôler leurs effets néfastes sur la survie des spermatozoïdes, les principaux paramètres de la réfrigération doivent être compris. (Samper, 2009).

I.1.1. La température de réfrigération

La semence de cheval ne doit pas être conservée entre +35 et +38 °C pendant plus de 15 à 20 minutes. Si vous souhaitez l'utiliser après ce délai, il doit être dilué et réfrigéré, comme indiqué sur le graphique suivant. (Samper, 2009).

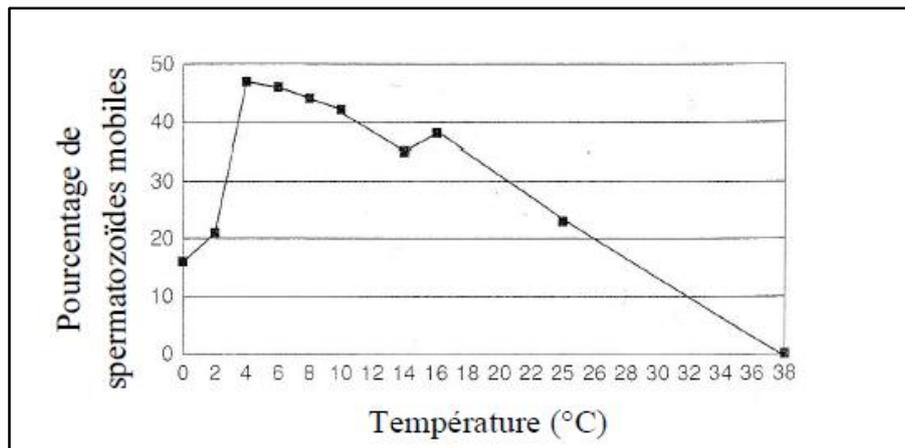


Figure19 : Graphique représentant le pourcentage de spermatozoïdes équin mobiles après stockage à différentes températures durant 48 heures (Mckinnon et *al.*, 2011).

Par conséquent, en abaissant la température à + 4 °C, la durée de conservation du sperme peut être prolongée. A cette température, l'ensemble du métabolisme cellulaire est réduit à 7 % de la température corporelle (BARRIER-BATTUT et *al.*, 2014).

L'objectif est d'atteindre un équilibre entre l'énergie nécessaire au sperme pour maintenir sa vitalité et sa capacité de transport (nutriments et déchets métaboliques) (Batellier et *al.*, 2002).

À des températures de stockage élevées, le métabolisme cellulaire ne ralentira pas suffisamment. Entre 0 et + 2°C, soit le métabolisme est trop lent (la production d'ATP n'est pas suffisante pour maintenir la vitalité des spermatozoïdes), soit il y a un déséquilibre entre métabolisme et capacité de transport cellulaire. (Mckinnon et *al.*, 2011).

Selon les chercheurs, la température de réfrigération peut varier de + 4 à + 6 °C. Dans tous les cas, le passage à cette température fera systématiquement subir aux spermatozoïdes les effets néfastes du « choc froid ». Une autre façon d'éviter cela est de stocker à +15°C, mais il manque la disponibilité d'un système qui produit un refroidissement conventionnel à cette température (Varner et *al.*, 1988).

I.1.2. La vitesse de refroidissement

Des études ont permis de déterminer les taux optimaux de refroidissement du sperme d'étalon, pour éviter les effets néfastes du « cold-shock » (Mckinnon et *al.*, 2011).

Ces taux dépendent du milieu de dilution utilisé. Pour les diluants à base de lait écrémé, la température corporelle peut être rapidement refroidie à +19 °C. Le passage de +19 °C à +9°C doit être plus lent (la vitesse maximale est de -0,05 °C/min) : c'est la zone chaude

critique où s'effectue la transition de phase de la membrane plasmique du sperme de l'étalon. 9 °C à +5 °C, le refroidissement peut à nouveau être rapide. Le diluant à base de jaune d'œuf refroidit plus rapidement que le diluant à base de lait écrémé (Foll, 2008 ; Varner et *al.*, 1988).

I.2. LA TECHNIQUE DE REFRIGERATION DE LA SEMENCE EQUINE

Les grands principes de préparation de la semence ont plusieurs objectifs : maintenir la capacité de fécondation de la semence, et fournir les doses nécessaires et suffisantes pour la fécondation des juments. (Barrier-Battut et *al.*, 2014).

Pour atteindre ces objectifs, les opérateurs doivent manipuler les semences avec précaution, éviter les chocs thermiques et mécaniques et raccourcir le temps de conservation des semences à +35°C. Evitez également l'exposition directe au soleil. Prélever ou diluer le sperme par le vagin ouvert pour réduire les effets nocifs du plasma séminal sur les spermatozoïdes. Le volume de sperme de la dose ne doit pas dépasser un tiers du volume total (sperme + diluant). La concentration de spermatozoïdes dans le sperme d'origine est supérieure à 30 millions de spermatozoïdes/mL et la concentration finale est de 20 millions de spermatozoïdes/mL. (Mckinnon et *al.*, 2011).

Le nombre total de spermatozoïdes dans une dose d'IAF (insémination frais) d'IAR (insémination artificiel réfrigérée) devrait être de 200 millions ou plus. Enfin, le volume de la dose d'insémination est compris entre 10 et 20 millilitres. (Mckinnon et *al.*, 2011).

I.3. Les différentes étapes de la préparation des doses de semence réfrigérée

La dose d'insémination doit être préparée de manière stricte et standardisée pour maintenir au maximum la qualité de la semence. Ici, nous décrivons les 200 millions de spermatozoïdes standardisés dans la méthode 10 mL, mais il existe d'autres méthodes, comme la méthode sans perte de sperme. (Barrier-Battut et *al.*, 2014).

Tout le matériel nécessaire est préparé avant la récolte de l'étalon, et placé soit à l'étuve soit au bain-marie. (Barrier-Battut et *al.*, 2014).

I.3.1. La dilution

La mobilité du sperme est d'abord évaluée au niveau du sperme « pur » (non dilué) pour déterminer les éventuels effets néfastes des fluidifiants de la semence sur la semence : elle fournit un indicateur de la performance du sperme dans son environnement naturel. Cependant, en raison de l'agrégation des spermatozoïdes sur la lame de verre, il est difficile d'évaluer avec une concentration élevée de spermatozoïdes. Ensuite, après avoir dilué le

sperme dans un diluant approprié, la mobilité du sperme est évaluée, de sorte que la fiabilité et la répétabilité de l'évaluation sont généralement considérablement améliorées. Il est préférable d'utiliser le même diluant de sperme pour diluer à une concentration définie (par exemple, 20 millions de spermatozoïdes par millilitre) pour limiter les biais d'observation. (Tibary et Bakkowy, 2005 ; Blanchard et al., 2003).

I.3.1.a. Les dilueurs de réfrigération

Les principaux dilueurs de réfrigération employés dans l'espèce équine sont le lait demi-écrémé additionné d'antibiotiques, l'INRA 96 ® et le KENNEY ®.

Tableau 01 : Composition du dilueur à base de lait ½ écrémé (Barrier-Battut et al., 2014)

Composants	Quantité
Lait UHT ½ écrémé	1 L
Gentamycine	50 mg
Amoxicilline	100 mg

Tableau 02 : Composition du dilueur de KENNEY ® pour 1 L (préparation simplifiée par l'utilisation de glucose isotonique) (Barrier-Battut et al., 2014)

Composants	Quantité
Lait écrémé en poudre	6,1 g
Soluté isotonique de glucose 5%	250 mL
Volume total, une fois la poudre de lait dissoute	255 mL

Le dilueur KENNEY ® n'est pas commercialisé : il faut compter 5 à 10 minutes pour le préparer.

Tableau 03 : Composition chimique du dilueur INRA 82 - Hépès® (Pillet, 2009)

Composants	Quantité (g/l)
Glucose	25
Lactose	1,5
Raffinose	1,5
Citrate de sodium	0,25
Citrate de potassium	0,4
Hépès (tampon) [uniquement en cas de fabrication de dilueur de congélation]	4,76
Eau distillée	Qsp 0,5L
Lait UHT écrémé	0,5L

Lors de son utilisation pour la semence réfrigérée, il est additionné d'antibiotiques.

Tableau 04 : Composition chimique du dilueur INRA 96® (Pillet, 2009)

Composants	Quantité (g/L)
Glucose	13,21
Lactose	45,39
Hépès	4,76
Eau déminéralisée	Qsp 1L
PPCN	27
Dichlorure de calcium	0,14
Chlorure de potassium	0,4
Phosphate de potassium	0,06
Sulfate de magnésium	0,2
Chlorure de sodium	1,25
Phosphate disodique	0,118
Bicarbonate de sodium	0,35
Citrate disodique	1,12

Ce diluant est prêt à l'emploi sur le marché et contient déjà des antibiotiques et des antifongiques. Sa composition est déterminée chimiquement, et la concentration en micelles

de caséine qu'il contient est le double de la concentration du milieu INRA 82®. De plus, ces caséines sont présentes dans le milieu INRA 96® sous leur forme naturelle, représentée par la fraction de caséine purifiée : la phosphocaséine naturelle.

I.3.2. Le conditionnement des doses et la maîtrise du refroidissement

Chaque dose d'insémination de 10 ml est conditionnée individuellement dans une seringue de 20 ml ou un tube de 10 ml à température ambiante. (Mckinnon et *al.*, 2011).

Les conditions de stockage des seringues peuvent varier. En effet, la fertilité obtenue après 3 jours de conservation en milieu INRA 96® est la même et correcte, que la semence soit conservée en anaérobie à +4°C ou en aérobie à +15°C. (Mckinnon et *al.*, 2011).

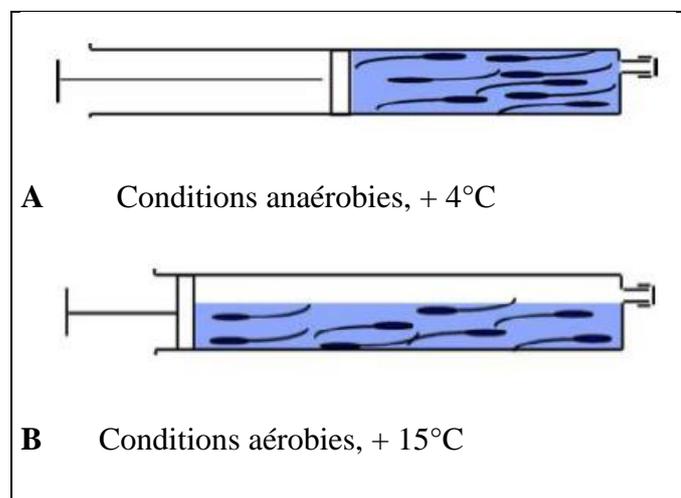


Figure 20 : Les conditions d'incubation des doses d'insémination réfrigérées équines (Decuadro-Hansen, 2004).

En plaçant chaque tube dans un "tube à air" de 50 ml ou en utilisant un manchon en mousse isolante pour la seringue, les changements de température peuvent être atténués. (Mckinnon et *al.*, 2011).

Ces doses sont ensuite placées au réfrigérateur et placées verticalement sur l'étagère. Il doit y avoir suffisamment d'espace entre eux pour permettre à l'air de circuler et s'assurer que la température baisse correctement. En 1 à 2 heures, la température descend de +4 à +6°C. (Mckinnon et *al.*, 2011).

Lors de l'envoi de la dose d'insémination par la poste, il existe une variété de systèmes de transport parmi lesquels choisir sur le marché. (Mckinnon et *al.*, 2011).

I.3.3. Le matériel de transport de la semence équine réfrigérée :

De nombreux systèmes peuvent être utilisés pour transporter des doses d'insémination artificielle réfrigérée (IART). Le choix du système dépend de sa qualité, de son coût et des conditions de température extérieure. Nous ne montrerons ici que deux de ces systèmes : les réducteurs Equitainer ® et Minitüb ®. Il s'agit d'enceintes à refroidissement passif dans lesquelles les colis contenant des liquides réfrigérés ou congelés laissent baisser la température.

Equitainer ® est une enceinte permettant d'envoyer 8 doses simultanément. La température descend très lentement entre + 4 et + 6 °C (à raison de -0,3 °C par minute) et y reste pendant environ 48 heures. Bien qu'elle soit relativement onéreuse, s'agit du réservoir de conservation et d'envoi de semence équine le plus utilisé. (Decuadro-Hansen, 2004).

Il existe également une variété de boîtes de transport jetables avec différentes qualités parmi lesquelles choisir. La mallette de transport Minitüb ® offre un certain degré de sécurité d'utilisation, même si la température extérieure affectera ses performances. Deux seringues de sperme sont placées dans une boîte entre les deux emballages en verre, et leur température s'adaptera à la température extérieure. Au-dessus de + 22 °C de température ambiante, il est recommandé d'utiliser un système plus efficace pour délivrer la dose d'insémination. (Decuadro-Hansen, 2004).

Après avoir reçu une dose de sperme réfrigérée, il doit être placé au réfrigérateur à + 4°C jusqu'à utilisation. (Decuadro-Hansen, 2004).

I.3.4. Remise à température ambiante

Bien que le taux de stockage au froid du sperme doive être contrôlé, l'effet de l'augmentation de la température des récepteurs du sperme du cheval semble être beaucoup plus faible. Dans tous les cas, dans une fourchette raisonnable, l'intégrité du sperme sera maintenue. (Mckinnon et *al.*, 2011).

Avant utilisation, la dose est continuellement inversée et secouée, puis déposée dans l'utérus de la jument par insémination vaginale artificielle. (Mckinnon et *al.*, 2011).

II. LA CONGELATION DE LA SEMENCE EQUINE :

Les règles à respecter lors de la fabrication des doses d'insémination artificielle congelées

Une dose d'IAC doit contenir au moins 400 millions de spermatozoïdes au total. Une dose se compose généralement de 8 paillettes de 0,5 ml chacun, avec une concentration en spermatozoïdes de 100 millions de spermatozoïdes par ml. (Barrier-Battut et *al.*, 2014).

II.1. Les étapes de la congélation de la semence équine

II.1.1. La première dilution

Immédiatement après la récolte, la semence est filtrée avec de la gaze et sa concentration est mesurée avec un spectrophotomètre. (Anton et *al.*, 2003).

Diluer la semence avec le premier diluant D1 placé dans un bain-marie à +35°C. D1 est également appelé un dilueur de centrifugation. Selon les protocoles, il peut s'agir de milieu INRA 82 supplémenté avec 2% de jaune d'œuf ou de lait écrémé UHT supplémenté en antibiotiques, voire l'actuel INRA 96. (Anton et *al.*, 2003).

Pour l'éjaculat normalement concentré, le taux de dilution est de 1/4 de sperme à 3/4 de diluant, et chaque réservoir ne dépasse pas 2,5 milliards de spermatozoïdes. (Anton et *al.*, 2003).

II.1.2. La première descente en température (de + 37°C à + 22°C) :

La préparation est placée au bain-marie à + 22°C durant 10 minutes. (Moore et *al.*, 2005).



Figure 21 : mettre la semence dans un bain-marie a 22°C (Ponthier et Van Den Berghe, 2014)

II.1.3. L'élimination du plasma séminal

Cette étape permet de concentrer les spermatozoïdes et de réduire les effets nocifs du plasma séminal. En effet, des études ont montré les effets néfastes d'une exposition prolongée des spermatozoïdes au plasma séminal : par rapport à des échantillons contenant 20 %, les spermatozoïdes seront plus fluides après incubation avec 5 % de plasma séminal avant congélation. Par conséquent, un contact prolongé avec le plasma séminal réduira la capacité de fécondation des spermatozoïdes après décongélation, car l'environnement auxquels ils sont

soumis est inapproprié, d'où l'intérêt de l'étape d'élimination du plasma séminal dans les protocoles de congélation de la semence équine. (Tibary et *al.*, 2005).

Plusieurs techniques pour éliminer le plasma séminal :

- Par récolte à vagin ouvert, pour ne collecter que la fraction de l'éjaculat riche en spermatozoïdes

- Par centrifugation de l'éjaculat

La centrifuger de l'éjaculat à température ambiante pour éliminer complètement le plasma séminal. Centrifuger la semence à 600 x g pendant 10 minutes, puis aspirer pour éliminer le surnageant (constitué de diluant D1 et de plasma séminal).

Lors de la centrifugation, une perte importante en spermatozoïdes est déplorée : 20 à 50% des spermatozoïdes peuvent ainsi être éliminés dans le surnageant. De récents dispositifs que nous développerons plus loin permettent d'améliorer les résultats de cette étape.

II.1.4. La seconde dilution :

La deuxième dilution permet d'ajouter du cryoprotecteur (glycérine) et d'obtenir une concentration finale de 100 millions de spermatozoïdes par millilitre. (Aurich et *al.*, 1996).

Le dilueur de congélation D2 aura été préalablement réchauffé au bain-marie à + 22°C.

Ajoutez-le au culot de sperme en suspension deux fois de suite et séparez-le en mesurant la concentration de sperme pour ajuster avec précision le volume de D2 ajouté. (Aurich et *al.*, 1996).

II.1.5. La seconde descente en température (de + 22°C à + 4°C) suivie du conditionnement en paillettes :

Le tube de semence dilué est bouché et placé à +4°C pendant 1 heure et 20 minutes. L'équilibrage consiste à incuber le sperme avec un diluant congelé avant la dose congelée. Cette étape permet de stabiliser l'équilibre osmotique entre les environnements extracellulaire et intracellulaire, permettant au glycérol de pénétrer dans le sperme. (Brinsko et *al.*,2011).

Le matériel nécessaire à la mise en paillette est placé à + 4°C, et l'enceinte de congélation est préparée, ainsi que le jonc d'identification. (Brinsko et *al.*,2011).

Les paillettes de 0,5 ml préalablement déterminées sont remplies manuellement ou avec une machine de remplissage et de fermeture de pailles, puis placées sur l'étagère du congélateur. (Brinsko et *al.*,2011).

La paillette la plus fréquemment utilisée est la paillette Cassou, dont une extrémité est obstruée par deux tampons de coton entre lesquels se trouve de la poudre d'alcool polyvinylique (l'ensemble devient étanche au contact d'un liquide), et l'autre extrémité est fermée soit par soudure, soit en la trempant dans de la poudre d'alcool polyvinylique. (Brinsko et *al.*,2011).



Figure 22 :Phase d'équilibration de la semence a 4°C (Ponthier et Van Den Berghe, 2014)



Figure 23 : Machine à remplir et à souder MRS I (Ponthier et Van Den Berghe, 2014)

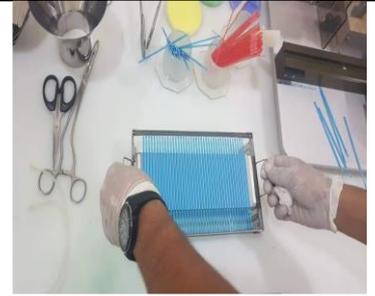


Figure 24 : Etalement des paillettes sur le rack portoir de congélation.(Ponthier et Van Den Berghe, 2014)

L'opérateur veillera à ne pas attraper les paillettes à mains nues en leur milieu, pour éviter d'éventuelles variations de températures. (Brinsko et *al.*,2011).

II.1.5. La congélation des paillettes (de + 4°C à – 196°C)

Deux dispositifs permettent la congélation des paillettes :

-Soit en adaptant la hauteur des paillettes au-dessus du niveau d'azote liquide dans un récipient contenant de l'azote liquide.

Placer les paillettes à 4 cm au-dessus du niveau d'azote liquide pendant 10 minutes. Puis plongez-les dans une coupelle d'azote et placez la coupelle dans un réservoir de stockage rempli d'azote. Chaque coupe contient un sperme.

-Soit en utilisant un congélateur programmable, réglé avec une vitesse de refroidissement de – 60°C par minute entre + 4 et – 140 °C.

Le contrôle de qualité consiste ensuite à observer au microscope 3 paillettes de chaque éjaculat, pour évaluer la mobilité des spermatozoïdes après décongélation. (Barbas Et Mascarenhas, 2008).

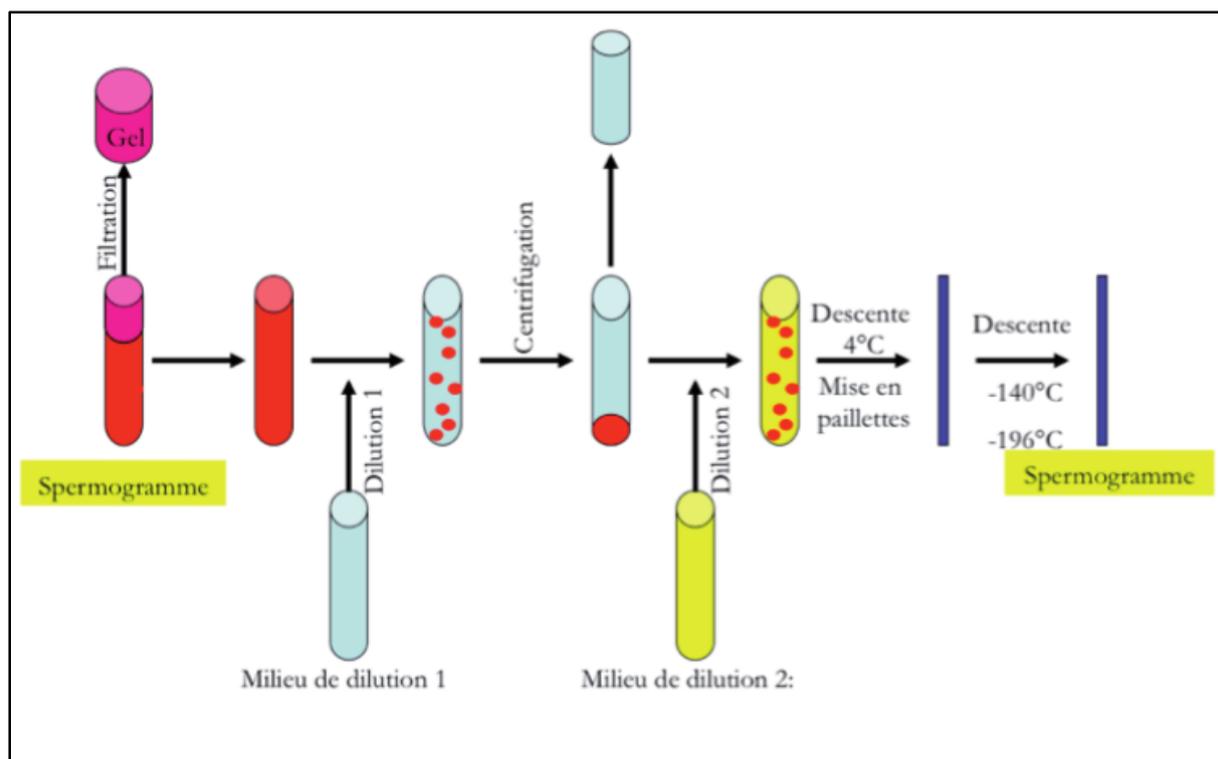


Figure 25 : Le processus de congélation de la semence équine
(Ponthier Et Van Den Berghe, 2014)

III. Inséminateur :

Maîtrisant les techniques modernes de reproduction veillent à ce que les juments soient inséminées avec de la semence fraîche, réfrigérée ou congelée. Il s'agit d'un travail saisonnier (de février à juillet) et nécessite généralement des activités supplémentaires en dehors de la saison de reproduction. L'inséminateur peut intervenir dans les centres d'insémination ou se déplacer entre les éleveurs. (IFCE, 2016).

III.1. Fonctions :

L'inséminateur collecte la semence des étalons, confectionne les doses et réalise l'insémination artificielle des juments à l'aide de sperme frais, réfrigéré ou congelé, selon la demande du propriétaire. Il se déplace dans l'élevage au moment de l'ovulation. La manipulation des doses est un acte très technique qui peut se révéler délicat.

Il maîtrise les règles d'hygiène de laboratoire, les règles de sécurité des hommes et des animaux et possède de bonnes connaissances du droit et de la réglementation. Il joue un rôle de conseil en matière de reproduction et de génétique. Et pour instaurer une relation de confiance, ses qualités humaines sont aussi importantes que ses connaissances (Une bonne connaissance

des chevaux, de l'élevage et de la manipulation d'étalons est un prérequis). Très souvent, les inséminateurs sont déjà des professionnels (vétérinaire, éleveur, assistant d'élevage). (IFCE, 2016).

Formation

Licence d'inséminateur accessible après le bac pro Conduite et gestion de l'exploitation agricole (CGEA). (IFCE, 2016).

III.2. Expérience

- Possibilité de devenir chef de centre d'insémination ou de se spécialiser dans l'insémination d'autres espèces animales
- Diversifier ses activités en y intégrant des activités d'élevage. (IFCE, 2016).

III.3. L'insémination artificielle équine

L'Insémination Artificielle (IA) consiste à récolter la semence d'un étalon, à la conditionner en doses et à la déposer ensuite dans l'utérus de la jument en chaleur. Utilisée en semence Fraîche (IAF) (immédiate), en semence Réfrigérée (IAR) ou en semence Congelée (IAC).

Pour réaliser l'insémination dans les meilleures conditions, il est préférable de placer la jument dans un travail et de lui attacher la queue de façon à ce qu'elle soit relevée. Dans tous les cas, pour des raisons de sécurité et de réussite, il est important de réaliser l'insémination dans un lieu calme et de limiter le stress de la jument. (Suleiman, 2018).

L'insémination artificielle est une technique de monte qui consiste à récolter l'éjaculat du mâle, sans qu'il soit en contact avec une femelle. Elle présente des avantages essentiellement sanitaires et techniques. D'un point de vue sanitaire, l'absence de contact entre individus permet de réduire la circulation des maladies vénériennes (AIE : Anémie Infectieuse des Equidés, MCE : Métrite Contagieuse Equine, AVE : Artérite Virale Equine) et des maladies contagieuses (grippe et rhino-pneumonie essentiellement).

D'un point de vue technique, l'insémination artificielle permet d'optimiser la gestion des étalons et des juments. Grâce à la division du sperme récolté en plusieurs doses, un étalon pourra réaliser moins de sauts et saillir un nombre plus important de juments. De plus, le développement des Techniques de conservation de la semence par congélation permet aujourd'hui d'étaler les récoltes, ou d'obtenir de la semence lorsque l'étalon est indisponible (localisation géographique, carrière sportive, maladie, mortalité). Pour les juments, la mise à la monte artificielle permet dans le cadre d'un suivi rapproché de la fonction ovarienne, de limiter

le nombre de saillies et la quantité de sperme utilisée, Enfin d'un point de vue génétique, l'insémination artificielle offre un choix d'étalon plus large et une conservation du patrimoine génétique. D'autre part, en cas d'utilisation déraisonnable et d'utilisation excessive des étalons, l'insémination artificielle réduira également l'utilisation de ce patrimoine génétique et entraînera le risque de consanguinité à l'avenir. (Vidament M 2014).

III.3.1. Insémination artificielle en semence fraîche

L'insémination avec du sperme frais a été utilisée sur place dans les 8h depuis la collecte. Pour une jument suivie uniquement à la barre, il est conseillé de la faire saillir ou inséminer toutes les 48 heures pendant la durée des chaleurs et jusqu'au refus. C'est la façon la plus fiable pour « couvrir l'ovulation ».

III.3.2. L'insémination artificielle en semence congelée :

La paillette contenant la semence est retirée du récipient de transport, et est immédiatement immergée dans une bouteille thermos (Boite à décongélation) contenant de l'eau à 34°C à 36°C après l'avoir secouée légèrement pour la débarrasser de la goutte d'azote qui reste emprisonnée dans la partie vide de l'extrémité scellée. Elle y séjourne 20 à 30 secondes pour être décongelée ; sa température est alors entre 15 et 20°C.

III.4. Le protocole d'insémination artificielle

- La seringue est fixée sur un cathéter d'insémination (à aucun moment la dose de semence n'entre en contact avec du matériel non stérile)
 - Pour une IA en semence fraîche (IAF), la seringue est maintenue dans le creux de la main pour éviter les déperditions de chaleur et l'exposition à la lumière.
 - Pour une IA en semence congelée (IAC), 8 paillettes sont nécessaires pour réaliser une Dose (400.106 spermatozoïdes) de 4 ml qui est agitée doucement et inséminée en moins de 3 minutes.
- Afin de faciliter la mise en place de la semence, le rectum peut être vidé des crottins.
- La queue doit ensuite être placée dans un protège-queue en plastique avant le nettoyage de la région périnéale afin de limiter les contaminations du tractus génital lors de l'insémination, et ainsi de préserver le tractus génital de la jument et d'optimiser la réussite de l'insémination.
- Le lavage de la région périnéale peut se faire à la douchette ou au seau. Une série de trois lavages à la povidone iodée est recommandée.

- Protéger l'ensemble [extrémité du cathéter et gaine sanitaire] en le plaçant dans le creux de la main.
- Lubrifier le dos de la main à l'aide de gel stérile non spermicide.
- Introduire la main jusqu'au fond du vagin.
- Repérer l'entrée du col de l'utérus et introduire l'index dans le canal cervical.
- Faire progresser le cathéter en dessous de l'index, en l'orientant vers le bas, et en retenant la gaine sanitaire qui reste ainsi dans le vagin.
- Pousser le cathéter dans l'utérus sur environ 10 cm.
- Mettre la seringue en position verticale, et pousser doucement la dose.
- Retirer le matériel de la jument et rincer le périnée et la vulve (Suleiman .2018).

III.5. Les différents types d'insémination artificielle

« IA immédiate » : la mise en place (IA) a lieu sans réfrigération, dans l'heure qui suit la récolte.

« IA 12 heures » : la semence est réfrigérée et utilisée dans la journée.

« IA 24 heures » : la semence est réfrigérée et utilisée le lendemain de la récolte.

« IA congelée » : la semence est congelée. Les paillettes seront décongelées juste avant l'insémination.

Comme le montre le tableau ci-dessous, à chaque technique correspond un dilueur, un conditionnement, une vitesse de réfrigération et une température de conservation adaptés. (Margat et Doligez, 2017).

Tableau 05 : Les différents types d'insémination artificielle. (Margat et Doligez, 2017).

	IA immédiate (IAI)	IA 12 ou 24 heures (IAR)	IA congelée (IAC)
Dilueur utilisé	Lait 1/2 écrémé	Lait 1/2 écrémé, Kenney, INRA 82, INRA96	INRA 82 + 2% jaune d'oeuf + 2.5% glycérol, INRA freeze
Antibiotiques	Sans	Oui	Oui
Conditionnement	Seringues	Tubes ou seringues	paillettes ou pailles
Nb minimum de spermatozoïdes par dose IA	200 millions	200 millions	400 millions
Nb de doses d'IA produites par récolte en moyenne	25	25	environ 12
Température de conservation	22°C	4°C	- 196°C
Délai de conservation	1 heure	24 heures max.	Indéterminé

Remarques :

Lorsque l'étalon utilisé a une semence de qualité "inférieure", le nombre de spermatozoïdes par dose doit être augmenté. Le nombre de juments pouvant être servies par récolte est par conséquent diminué.

Plus l'IA est différée de la récolte dans le temps (ce qui implique la réfrigération ou la congélation), plus la fertilité diminue et plus le coût de fabrication d'une dose d'IA augmente.

IV. Comparaison des techniques d'insémination

L'insémination artificielle peut être réalisée avec différents types de semence. Lors de l'insémination en semence fraîche, le sperme récolté est utilisé pour inséminer une jument dans les 30 minutes qui suivent la récolte. Ceci nécessite que les deux reproducteurs soient à proximité l'un de l'autre et de pouvoir procéder à la récolte de l'étalon dès que la jument est prête à ovuler. Lorsqu'un transport est nécessaire ou lorsque la jument ne peut être inséminée immédiatement, la semence récoltée peut être utilisée jusqu'à 24 heures après la récolte en étant refroidie à 4°C. Il s'agit alors de semence réfrigérée utilisée sur place ou transportée. Enfin, lorsque la semence est récoltée pour une conservation de durée indéterminée, elle est congelée dans l'azote liquide. Dans ce dernier cas, le suivi de la jument devra être strict pour obtenir une fécondation, car une fois décongelé le sperme ne sera viable que quelques heures. (Mourier, 2010)

Au cours du développement de la monte artificielle, ces différentes techniques d'insémination ont connu des évolutions différentes. Au début de l'année 2012, les inséminations artificielles se font essentiellement avec de la semence fraîche, les inséminations en semence congelée ne concernent alors que quelques individus en 2013. Cependant l'insémination en semence congelée connaît un développement exponentiel en 2015, passant d'après les statistiques du haras de 50 juments en 2016 pour atteindre son apogée en 2017, avec 70 saillies et à 78 inséminations jusqu'à fin mai de l'année 2018. (Suleiman, 2018).

Conclusion

Cette étude mériterait d'être élargie à l'échelle de plusieurs praticiens spécialisés en reproduction équine en Algérie. Par ailleurs, dans le cadre d'une évolution de production équine de pure race qui nous permet de développer notre pays sur le plan agronomique et zootechnique par la production de chevaux de sport performants qui représente L'Algérie dans les événements et les concours sportifs Mondiale.

Au cours de ce travail nous avons étudié comment les techniques de reproduction sont réglementées. Les techniques de monte naturelle sont peu concernées, tandis que les techniques de reproduction avec intervention humaine, telles que l'insémination artificielle réfrigérée et l'insémination artificielle congelée, et que l'insémination artificielle réfrigérée est la plus utilisée en Algérie.

La réfrigération de la semence équine est très importante, on a compté de tester cette technique avec deux différents protocoles et de faire la comparaison entre eux mais malheureusement à cause de covid-19 on n'a pas eu l'occasion de le faire.

Références

- ALLIMANT M., ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON .: ACTUALITES SUR LES METHODES D'EVALUATION DE LA QUALITE DE LA SEMENCE DE L'ETALON.138 p,2010.
- AMANN RP .physiology and Endocrinology. In MCKINNON AO ,VOSS. JL eds Equine reproduction .1ed .Philadelphia :lea and FEBIGER 1993/1137.
- AMANN RP.Pysiology and Endocrinology .IN : MCKINNON AO ,SQUIRS EI ,VAAL WE ,VARNER DD.eds .equine reproduction .united kingdom :wiley-blackweel,2011b :881-909.
- ANTON M., MARTINET V., DALGALARRONDO M., BEAUMAL V., DAVID-BRIAND V., RABESONA H.: Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.*, 2003, 83, 175-183.
- AURICH J.E., KÜHNE A., HOPPE H., AURICH C.: Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, 1996, 46, 791-797.
- BARRIER-BATTUT I., CUIR F., FERRY B., MAGISTRINI M., MARGAT A., PROVOST E.: Insémination artificielle équine. Cinquième édition. 258 pages, Institut Français du Cheval et de l'Equitation., Le Pin au Haras, 2014.
- BATELLIER F., VIDAMENT M., FAUQUANT J., DUCHAMP G., ARNAUD G., YVON J.M., MAGISTRINI M.: Advances in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci.*, 2002, 68, 181-190.
- Blanchard TL, et al.Manual of equine reproduction. 2nd edition. Mosby 2003
- BRINSKO S.P., BLANCHARD T.L., VARNER D.D., SCHUMACHER J., LOVE C.C., HINRICHS K., HARTMAN D.L.: Manual of Equine Reproduction. Troisième édition. 325 pages, Mosby., Maryland Heights (Missouri, USA), 2011.
- Cécile, BARGE K ., ECOLE NATIONALE VETERINAIRE, AGROALIMENTAIREET DE L'ALIMENTATION NANTES ATLANTIQUE – ONIRIS. : ETAT DES LIEUX DES TECHNIQUES DE REFRIGERATION ET DE CONGELATION DE LA SEMENCEDANS L'ESPECE EQUINE.166p,2017.

- CHIREN M.: Les alternatives à la castration chirurgicale chez l'étalon. Th. Méd. Vet: Lyon: 2015; 123p.
- Christian Meyer. La reproduction et l'insémination artificielle du cheval : Note bibliographique. UR18 Systèmes d'élevage et produits animaux, Dep. Environnement et Société, Cirad, TA C18/A, BP 5035, 34 398 Montpellier Cedex 5, France.2009.
- DECUADRO-HANSEN G.: La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l' animal. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 2004, 32, 887-893.
- FOLL (LE) Y.J.F.: Etude sur la conservation de la semence dans une boîte de transport jetable exposée à différentes températures positives pendant 22 heures. Th. Méd. Vet: Paris: 2008; 91p.
- Heymon Y., Vignon X. Reproduction des animaux d'élevage. Educagri 2005
- IFCE - équi-ressources. Institut français du cheval et de l'équitation. 2016
- JOHNSON L , VARNER DD , THOMPSON DL , Jr effect of age and season on the establishment of spermatogenesis in the horse .*J Reprod fertile suppl* .1991;44:87-97.
- Knobil E, Neill JD. Spermatozoa. In: Encyclopedia of Reproduction. Volume 4 (Pro-Z). 1999;586-596.
- LITTLE TV.HOLYOAK GR .reproductive anatomy and physiology of stallion .1992;8:1-29.
- LOOMIS P.R.:Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am. -Equine Pract.*, 2006, 22, 663-676.
- MCDONNELL S.M.: Techniques for Extending the Breeding Career of Aging and Disabled Stallions. *Clin. Tech. Equine Pract.*, 2005, 4, 269-276.
- MCKINNON A.O., SQUIRES E.L., VAALA W.E., VARNER D.D.: Equine 162 reproduction. Volume 1. Part II : The Stallion. Seconde édition. 1571 pages, Wiley-Blac., 2011.
- MEYER C. : La reproduction et l'insémination artificielle du cheval.19p,2009.
- MOORE A.I., SQUIRES E.L., GRAHAM J.K.: Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 2005, 63, 2372-2381.
- Nicolich C., 1989. L'insémination artificielle équine. Thèse méd vét Nantes n° 22, ENV Nantes, Nantes, 205 p.
- PILLET E.: Mise au point d'un milieu pour la cryopréservation de la semence équine et mécanismes de cryoprotection impliqués. Th. Univ.: Rennes: 2009; 316p.

- PONTHER J., VAN DEN BERGHE F., PARRILLA-HERNANDEZ S., HANZEN C., DELEUZE S.: Congélation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives. *Ann. Médecine Vétérinaire*, 2014, 158, 57-72.
- PRIEN S., IACOVIDES S.: Cryoprotectants in cryopreservation of equine semen : a review of industry cryoprotectants and the effects of cryopreservation on equine semen membranes. *J. Dairy, Vet. Anim. Res.*, 2016, 3, 1-8.
- RATHI R., COLENBRANDER B.: Capacitation and acrosome reaction in stallion spermatozoa : functional and clinical aspects. Th. Univ.: Utrecht (Pays-Bas): 2002; 88p.
- SAMPER J.C., PYCOCK J.F., MCKINNON A.O.: Current therapy in equine reproduction. 492 pages, Saunders., St Louis (Missouri, USA), 2007.
- SAMPER J.C.: Equine breeding management and artificial insemination. Seconde édition. 310 pages, Saunders., St Louis (Missouri, USA), 2009.
- SCHATTE H., CONSTANTINESCU G.M.: Comparative reproductive biology. Première édition. 402 pages, Blackwell., USA., 2007.
- THOMPSON DL ,Jr , pickett bw , squires el , amannrp .testicular measurement and reproductive characteristics in stallions . j reprod fertile suppl.1979:13-17.
- Tibary A, Bakkowy M. Reproduction équine. Tome II: l'étalon. Actes 2005
- TIBARY A., BAKKOURY M., ANOUASSI A., OURAGH L., SGHIRI A.: Reproduction équine - Tome III : biotechnologies appliquées. 532 pages, Actes Editions, Rabat (Maroc), 2005.
- VARNER D.D., BLANCHARD T.L., LOVE C.L., GARCIA M.C., KENNEY R.M.: Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, 1988, 29, 1043-1054.
- Varner DD. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 2008;70:448-62.