

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة ابن خلدون تيارت

UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET

معهد علوم البيطرة

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

قسم الصحة الحيوانية

DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Mémoire de fin d'études

en vue de l'obtention du diplôme de Master complémentaire

Domaine : Sciences de la Nature et de la vie

Filière : Sciences Vétérinaires

Présenté par :

AZZEDINE ELhadja Badra

Thème

Cryoconservation de la semence des étalons arabe-barbe par l'utilisation du miel d'euphorbe à Tiaret

Jury :

Président : M. AGGADE Hbibe

Encadreur : M. AYAD Mohamed Amine

Examinateur I : M. DERRAR Sofiane

Examinateur II : M. SAIM Mohamed Said

Grade :

Professeur

Maitre de conférence

Maitre de conférence

Maitre de conférence

Année universitaire: 2018/2019



Remerciements

Par la grâce de Dieu tout puissant j'ai pu réaliser ce mémoire de fin d'étude.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements :

*A Monsieur le Docteur **Ayad Mohamed Amine**, pour avoir encadré ce travail,
ses conseils, ses illustrations et sa gentillesse.*

*A Monsieur le Professeur **AGGAD Hbibe***

Pour m' avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ma thèse.

Sincères remerciement

*Mes remerciements vont également à messieurs **Saim Mohamed Said et Derrar Sofiane** pour avoir accepté de participer à ce jury et examinateurs de thèse, Soyez assurés messieurs de ma profonde gratitude.*



A photograph of a light-colored horse with a dark mane and tail, running towards the camera in a grassy field. The background is a soft, hazy landscape with a bright sky. The horse's tail is flowing, and its front legs are lifted in mid-stride.

*D*édicace

*A mes chers parents qui m'a donnée les coudes de
mains financière, pour votre patience, votre soutien et
votre amour , que dieu vous protéger , je vous aime*

A mes sœurs

A mon Frère

A mes chères amies : Fatima , Hadjer , Asmaa ,

Khaoula et Yousra

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير عسل النحل (عسل اللبينة من الصحراء الجزائرية) بتركيزات مختلفة مضافا الى مخفف التجمد (كيني المعدل) على حركية وطول عمر الحيوانات المنوية بعد الذوبان عند الفحل العربي البربري.

تما اخذ عينة من كل فحل لدراسة المعيارين الذين تم تحديدهما من الحصانين العربيين البربريين للحفاظ باستخدام وسائط متجمدة (كيني معدلة) ، دون أي إضافة (شاهد) و بتركيزات عسل اللبينة بنسبة 1% ، 2% ، 3% ، 4% و 5%.

بعد الذوبان ، تم الحفاظ على جميع العينات عند 37 درجة مئوية ، في حين أجريت التحليلات في 0 ، 2/1 ، 1 و 2 ساعة. تم تحديد نسبة حركة الحيوانات المنوية بالطرق المخبرية التقليدية.

مقارنة مع الشاهد ، أظهرت مكملات العسل تحسنا ملحوظا في (2% و 3%) ($P < 0.01$ على الاقل) بعد ذوبان الحيوانات المنوية في 0، 2/1 ، 1 و 2 ساعة . بالنسبة لحركية الحيوانات المنوية ، لا تظهر التركيزات (1% ، 4% و 5%) اختلافات كبيرة ($P > 0.05$) مقارنة بعنصر الشاهد.

المكملات من عسل النحل اللبينة في مخففات السائل المنوي من الفحول العربية البربرية حسنت من حركة الحيوانات المنوية وطول العمر بعد الذوبان مقارنة بالمجموعات الشاهدة.

الكلمات المفتاحية: السائل المنوي ، الفحل ، الحفظ بالتجميد ، عسل النحل الجزائري.

Résumé :

L'objectif de ce présent travail est d'étudier l'effet de la supplémentation d'un dilueur de congélation (le Kenney modifié) avec différentes concentrations de miel d'abeilles (le miel d'euphorbe du Sahara d'Algérie) sur la motilité et la longévité des spermatozoïdes après décongélation, chez l'étalon arabe-barbe.

Un seul éjaculat de chacun des deux étalons arabe-barbe à été soumis à une cryoconservation avec un milieu de congélation (le Kenney modifié), sans aucune supplémentation (témoin) ou avec des concentrations en miel d'euphorbe à 1%, 2%, 3%, 4% et 5%. Après décongélation, tous les échantillons ont été maintenus à 37 ° C, tandis que les analyses ont été effectuées à 0, 1/2, 1 et 2 h. Le pourcentage de mobilité des spermatozoïdes, a été déterminé par des méthodes de laboratoire conventionnelles.

Par rapport au groupe témoin, la supplémentation en miel a montré une amélioration significative (**2%** et **3%**) ($P < 0,01$ au moins) après la décongélation du sperme, à 0, 1/2, 1 et 2

h. Pour le paramètre de la motilité du sperme, les concentrations (**1%,4%** et **5%**) ne montrent pas de différences significatives ($P > 0,05$) par rapport au témoin.

La supplémentation en miel d'abeille (d'euphorbe) dans les dilueurs de sperme d'étalons arabes-barbes a permis de mieux améliorer les paramètres de la motilité et de la longévité du sperme après décongélation par rapport aux groupes témoins.

Mots clés: semence, étalon, cryoconservation, miel d'abeilles d'Algérie.

Abstract :

The objective of this work was to evaluate the effect of the freezing extender (modified Kenney) supplemented with different concentrations of honey bees (honey spurge of the Algerian Sahara) on the motility and longevity of the Arab-barbe breed stallion spermatozoa after thawing.

Only one ejaculate from each of the two Arabian-barbe stallions was cryopreserved with freezing media (modified Kenney), without any supplementation (control) or with concentrations of 1% spurge honey, 2%, 3%, 4% and 5%. After thawing, all samples were held at 37 ° C, while the analyzes were performed at 0, 1/2, 1 and 2 h. The percentage of motility of the spermatozoa was determined by conventional laboratory methods.

Compared to the control group, honey supplementation showed a significant improvement (2% and 3%) ($P < 0.01$ at least) after sperm thawing, at 0, 1/2, 1 and 2 h. For the sperm motility parameters, the lowest concentration (1%) and the highest concentrations (4% and 5%) did not show significant differences ($P > 0.05$) compared to the control.

Supplementation of bee honey (spurge) in sperm extenders of Arab-barbe stallions has improved the parameters of sperm motility and longevity after thawing compared to control groups.

Keywords: semen, stallion, cryopresevation, Algerian honey bee .

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
ملخص	
Résumé	
Abstract	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Première partie : Etude bibliographique	
Chapitre I :Miel d'euphorbe	
Miel d'euphorbe	4
Chapitre II : Collecte et conservation de la semence chez l'étalon	
I. Collecte de la semence.....	7
Méthodes de récolte de la semence	7
Récolte à l'aide du vagin artificiel... ..	7
A. Description... ..	7
B. Choix de type du vagin artificiel... ..	8
C. Préparation du vagin artificiel... ..	9
D. La collecte de sperme.....	9
La récolte par éjaculation chimique	9
II. Contrôle de la semence	9
Examens macroscopiques... ..	9
Volume	9
Couleur et aspect.....	10
PH	10
Examen microscopique	10
Concentration.....	10
La Motilité	10
La morphologie	10

III. Conservation de la semence	11
Conservation à court terme	11
Semence fraîche... ..	11
Semence refroidie... ..	11
Conservation à long terme (La Cryoconservation)... ..	11
A. Définition	11
B. Principe	11
La cryoconservation dans l'espèce équine	11
Les agents cryoprotecteurs.....	12
Dilution du sperme	12
Les dilueurs... ..	12
Les différentes étapes de la cryoconservation.....	14
Récolte et évaluation de la semence.....	14
Séparation des différentes phases du sperme par centrifugation	14
La dilution... ..	14
L'équilibration (la réfrigération)... ..	14
Le conditionnement... ..	15
La congélation.....	16
La décongélation	16
Evaluation de la qualité de la semence congelée	17

Deuxième partie : Etude expérimentale

Matériel et méthodes... ..	19
I. Lieu de l'expérimentation	19
II. Effectif de l'expérimentation	19
III. Déroulement des récoltes	19
La Préparation du vagin artificiel.....	19
La préparation d'étalon.....	21
La récolte	21
IV. Sélection des éjaculats pour la congélation	22
V. Préparation du milieu de dilution	22
Ingrédients	23
V.1. Ingrédients... ..	24
VI. Préparation du milieu de Cryo-congélation	25
Le Kenney modifié.....	25

Miel d'abeille (d'euphorbe) Kenney modifié (MEKM).....	26
VII. Evaluation des semences après la récolte	27
Examen macroscopique	27
Détermination de la concentration	27
Examen microscopique	27
VIII. Traitement de la semence	29
Dilution primaire	29
Centrifugation de la semence	30
Dilution secondaire	31
Equilibration	32
Conditionnement de la semence	32
Congélation des paillettes	32
Evaluation des paillettes après décongélation.....	33
Décongélation	33
Evaluation	34
IX. Test statistique.....	34
Résultats et discussion	35
Résultats	35
I. Evaluation de la semence après la récolte.....	35
II. Evaluation de la mobilité après décongélation.....	35
Discussion.....	36
Conclusion	42
Perspectives et recommandations.....	44
Références bibliographiques.....	46

Liste des figures

Première partie : Etude bibliographique

Figure 01 : Plante d'euphorbe.....	4
Figure 02 : vagin artificiel de type Missouri (Steven P. et al. 2011)	8
Figure 03 : vagin artificiel de type Colorado (John Dascanio.2014).....	8
Figure 04 : vagin artificiel de type Nishikawa (Steven P. et al. 2011).....	8
Figure 05 : Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et quelque anomalie pouvant être rencontrées (Steven P. et al, 2011).....	10
Figure 06 : Les principaux dilueurs.....	13
Figure 07 : identification (A), remplissage (B) et bouchage (C) des paillettes (John Dascanio. 2014).....	15
Figure 08 : paillettes déposées sur une grille (A) ensuite placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide (B) puis stockées dans une cuve d'azote liquide(D) (John Dascanio. 2014 ; Steven P. et al. 2011).....	16

Deuxième partie : Etude expérimentale

Figure 09 : Le laboratoire de la reproduction équine de l'institut des sciences vétérinaires.....	19
Figure 10 : Les étapes de préparation du vagin artificiel de type Missouri... ..	20
Figure 11 : L'excitation de l'étalon en présence de la jument « boute-en-train ».	21
Figure 12 : Les étapes de la récolte de sperme	22
Figure 13 : Les ingrédients du milieu Kenney mesurés... ..	23
Figure 14 : Les étapes de préparation du milieu Kenney... ..	24
Figure 15 : La préparation de plasma du jaune d'œuf.....	26
Figure 16 : Les solutions de miel préparées	26
Figure 17 : Le vagin artificiel acheminé au laboratoire	27
Figure 18 : La détermination de la concentration à l'aide d'un photomètre Minitube	28
Figure 19 : Le diluant Kenney et l'éjaculat misent à l'étuve réglés à 37°C... ..	29

Figure 20 : La dilution de sperme et le remplissage des tubes coniques à centrifuger	30
Figure 21 : L'aspect du sperme après centrifugation (à gauche), et du culot après l'aspiration de surnageant... ..	30
Figure 22 : Les aliquotes de Kenney modifié enrichie en miel à des différentes concentration.....	31
Figure 23 : Le conditionnement des paillettes	32
Figure 24 : Les paillettes placées au-dessus d'azote liquide en phase vapeur (à gauche), puis plongées en phase vapeur (à droite)...	33
Figure 25 : Les étapes de décongélation des paillettes.....	33
Figure 26 : L'évaluation de la motilité des spermatozoïdes sous le microscope optique ..	34

Liste des tableaux

Première partie : Etude bibliographique

Tableau 01 : les modèles du vagin artificiel couramment utilisés et leurs caractéristiques principales (Steven P. et al.2011).....	8
---	----------

Deuxième partie : Etude expérimentale

Tableau 02 : La composition du Kenney (pour 1l).....	23
Tableau 03 : Les caractéristiques séminales individuelles obtenues pendant le protocole.....	35
Tableau 04 : Les résultats générales d'évaluation de la motilité des spermatozoïdes obtenues après décongélation	36
Tableau 05 : L'effet du miel additionné au diluant Kenney modifié sur la motilité des spermatozoïdes des étalons arabe-barbe.....	37

Introduction

Introduction

Depuis une vingtaine d'années, la semence congelée a été bien utilisée pour l'insémination artificielle dans la filière équine, après qu'elle a été limitée pendant de nombreuses années dans certains pays de monde, notamment en Grande-Bretagne. et ce n'est qu'en 2001 que les deux plus grandes associations de race du monde, l'American Quarter Horse et l'American Paint Horse, ont autorisé l'insémination des juments avec de la semence congelée, stimulant un intérêt nouveau pour la technologie de cryoconservation de la semence d'étalon, ce qui a permis de diffuser la génétique des meilleurs étalons et d'importer celle des champions, (**Marc, 2015**).

Les congélations effectuées en dehors des saisons sportives permettent d'inséminer de nombreuses juments pendant la saison de reproduction pendant que les étalons concourent dans des lieux éloignés. En outre, la congélation a donné l'avantage de conserver le matériel génétique à long terme et d'accéder au sperme congelé si le sperme frais ou refroidi n'est pas disponible, et c'est grâce à elle que l'assurance contre la perte imprévue d'un étalon et la possibilité d'expédier le sperme dans le monde entier sont rendues possibles (**John , 2014**).

Malheureusement, des inconvénients subsistent suite aux effets structurels néfastes sur les spermatozoïdes induits par la cryoconservation, du fait de leur exposition au stress thermique, mécanique, osmotique et oxydants lors de la congélation-décongélation. D'une part, après décongélation la durée de vie des spermatozoïdes est courte et la motilité est réduite, ce qui diminue la capacité de fertilisation des spermatozoïdes (**Daels, 2003**). Face à ces faits, un intérêt international pour l'application de sources médicales naturelles notamment dans le domaine de la cryoconservation de la semence équine devient existant, afin d'améliorer la qualité du sperme congelé.

Les effets bénéfiques du miel d'abeille sur la protection de la santé de la reproduction ont été fortement mis en évidence par de nombreux auteurs, ils sont principalement attribués à sa teneur en éléments nutritifs, tels que des sucres, des minéraux, l'acide caféique, les glycosides, flavonoïdes ainsi que les vitamines.

L'objectif de ce travail est de tester l'effet de la supplémentation du milieu de conservation de la semence équine par le miel d'euphorbe Algérien sur les paramètres de motilité et de longévité post décongélation.

Etude

bibliographique

Chapitre I

Miel D'euhphorbe

Le miel d'euphorbe est sans doute le miel le plus utilisé en Algérie et ce depuis la nuit des temps. Produit local par excellence, ce nectar de l'atlas est riche en vitamines, antioxydants et un bon nombre de micro-aliments tous nécessaires pour nous maintenir en bonne santé.



Figure 01 :Plante d'euphorbe

Qu'est-ce que l'euphorbe ?

L'euphorbe est une plante de la famille des Euphorbiacées originaire de l'Afrique du nord, notamment la région du Maghreb plus précisément dans les hauts plateaux de l'Atlas

L'euphorbe est une plante épineuse pouvant atteindre 1 à 1,5 m de haut dans son habitat naturel. Les tiges vert pâle, parfois grisâtres ou bleutées, comportent quatre côtes bien distinctes.

Ladite plante forme des coussins compacts qui peuvent couvrir de larges étendues. A l'arrivée du printemps, l'euphorbe se voit couvrir de nombreuses petites fleurs jaunes et dont les fruits, sous forme de petites capsules sont suspendues à l'extrémité des tiges .

Les caractéristiques du miel d'euphorbe :

Le miel d'euphorbe est un délicieux nectar de couleur ambrée et particulièrement fort en bouche .

Composition du miel :

Le miel est essentiellement composé de sucres (78 % à 80 %) qui se répartit grossièrement en fructose (ou lévulose) pour 38 %, glucose (ou dextrose) pour 31 % et pour 31 % restant nous trouverons du maltose, du saccharose et une grande variété de polysaccharides. Le miel contient également environ 17 % d'eau.

On retrouvera dans le miel une concentration exceptionnelle d'acides aminés :

aspartique, glutamique, alanine, arginine, asparagine, cystine, glycine, histidin, isoleucine, leucine, lysine, phénylalanine, proline, sérine, tryptophane, tyrosine, valine.

Des minéraux jusqu'à 1 % : argent, baryum, béryllium, brome, calcium, chrome, cobalt, cuivre, fer, lithium, magnésium, manganèse, molybdène, or, palladium, phosphore, potassium, rubidium, scandium, silicium, sodium, soufre, strontium, titane, vanadium, zinc, zirconium. Si tous ces éléments ne sont pas présents ensemble dans tous les miels certains comme le potassium, le magnésium et le zinc sont systématiquement là.

Des vitamines en quantité qui sans couvrir nos besoins journaliers présentent l'avantage d'être hautement assimilables : Vitamine A, Vitamine B1, Vitamine B2, Vitamine B3, Vitamine B5, Vitamine B6, Vitamine B8, Vitamine B9, Vitamine C, Vitamine D, Vitamine K.

Des acides gras en faibles quantités : palmique, oléique et linoléique

Des enzymes dont amylases a et amylases b, gluco-invertase et gluco-oxydase

Et de nombreuses autres substances biologiques et aromatiques dont des flavonoïdes, des alcools, des esters, des pigments et des grains de Pollens.

Des antioxydants notamment la chrysin, les pinobanques, la vitamine C, la catalase et la pinocembrine.

Action anti-oxydante :

Les radicaux libres sont constitués d'un électron dit «libre», ils prennent donc l'électron libre d'autres molécules, c'est ce qu'on appelle l'oxydation, et les transforment à leur tour en radicaux libres. C'est à ce moment là qu'interviennent les anti-oxydants, ils empêchent l'oxydation des cellules en neutralisant les radicaux libres, évitant ainsi que les membranes cellulaires soient détruites et que les enzymes soient endommagées et par conséquent inefficaces. Ils permettent aux cellules de garder leur intégrité, de préserver leurs gènes et donc de vivre sans dangerosité pour elle-même et les tissus alentours. L'oxydation d'une cellule est un signe de son vieillissement, de son rapprochement vers la mort. L'antioxydation ralentit donc le vieillissement cellulaire et permet une bonne santé cellulaire.

Chapitre II

*Collecte et conservation de
la semence chez l'étalon*

I. Collecte de la semence

Méthodes de récolte de la semence

Récolte à l'aide du vagin artificiel

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

A. Description

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

- **Un manchon extérieur** : c'est un cylindre en caoutchouc rigide, dont la longueur et le diamètre intérieur varient selon le type du vagin artificiel utilisé lors de la collecte chez l'étalon.
- **Un manchon intérieur** : c'est une capote amovible et gonflable, également en caoutchouc. La paroi qui le constitue est donc double et l'espace entre les deux manchons peut être rempli d'eau chaude en quantité suffisante à l'aide d'une valve extérieure de façon à ce que la température de la lumière du vagin artificiel soit comprise entre 45 et 48°C et la pression soit également équivalente à celle du vagin de la femelle.
- **Un cône en silicone** : qui prolonge le vagin artificiel, à l'extrémité duquel est fixé un tube de collecte en verre ou en plastique gradué pour recueillir le sperme, et l'autre extrémité servant à introduire le pénis est lubrifiée (Noakes et al. 2009).

B. Choix de type du vagin artificiel

Tableau 01 : les modèles du vagin artificiel couramment utilisés et leurs caractéristiques principales (Steven P. et al. 2011).

Vagin artificiel Missouri	Vagin artificiel Colorado	Vagin artificiel Japonais (Nishikawa)
<p>-C'est le plus largement utilisé surtout aux États-Unis.</p> <p>-Peu couteux, léger, facile à assembler et à nettoyer.</p> <p>- La température interne de sa lumière peut dépasser le seuil de tolérance au sperme de 45 à 48 °C, une propriété avantageuse pour les étalons qui préfèrent les températures plus élevées.</p> <p>-La chance de contamination du sperme collecté par une fuite d'eau est très minime.</p> <p>-deux longueurs sont disponibles (16 pouces et 22 pouces), les étalons avec un grand pénis peu préférer le liner plus long.</p>	<p>-Le modèle Colorado original Est plus encombrant à utiliser que le modèle Missouri.</p> <p>-Il offre une bonne rétention de la chaleur du fait qu'il y a deux doublures en caoutchouc entre la chambre d'eau et la lumière du vagin.</p> <p>-Le risque de contamination du sperme collecté est aussi réduit.</p> <p>-La température doit être soigneusement réglée pour éviter tout dommage thermique excessif au sperme éjaculé car la veste d'eau est plus longue que le pénis.</p>	<p>- Il n'est plus disponible aux États-Unis.</p> <p>-Il est composé d'un petit boîtier en aluminium, avec un matériel léger facile à assembler et à nettoyer.</p> <p>-Le contact du sperme avec le liner en caoutchouc est très minime.</p> <p>-L'eau peut facilement couler ce qui réduit la pression du vagin et augmente le risque de contamination de l'eau dans l'éjaculat.</p> <p>-Des trous très ponctuels peuvent se développer dans la gaine en caoutchouc entraînant une fuite d'eau dans la lumière du vagin.</p>
 <p>Figure 02 : vagin artificiel de type Missouri (Steven P. et al. 2011).</p>	 <p>Figure 03 : vagin artificiel de type Colorado (John Dascanio.2014)</p>	 <p>Figure 04 : vagin artificiel de type Nishikawa (Steven P. et al. 2011).</p>

C. Préparation du vagin artificiel

Juste avant la collecte du sperme, la chemise d'eau est remplie d'eau à 45 - 50°C pour fournir une température luminale de 44 à 48°C, supérieure à celle du corps afin de stimuler le pénis et faciliter l'éjaculation. Et la pression doit être ajustée et adéquate pour assurer un bon contact uniforme autour du pénis et une érection complète.

La surface interne de vagin artificiel doit être lubrifiée avec un lubrifiant stérile non- péricide.

D. La collecte de sperme

Une fois que l'étalon a été taquiné à la source, le pénis en érection est lavé à l'eau tiède et séché .

L'étalon doit s'approcher de la source de montage, avec l'entraîneur et le collecteur du même côté du cheval. Une fois qu'il est monté, le pénis est dévié dans le vagin artificiel .

Une fois que l'éjaculation commence, le vagin est retiré du pénis tout en abaissant lentement son extrémité distale, et le filtre est retiré rapidement tout en évitant la contamination de sperme collecté par du gel (**John. 2014 ; Steven P. et al. 2011**)

La récolte par éjaculation chimique

Le sperme peut être prélevé sur des étalons présentant un handicap physique ou un problème éjaculatoire selon la procédure d'éjaculation chimique, connue sous le nom

« **d'éjaculation ex copula induite par un médicament** ». Les étalons reproducteurs pour lesquels cette procédure est bénéfique incluent les chevaux avec des problèmes musculo-squelettiques graves, des défauts neurologiques, une paralysie de pénis et autres problèmes (**John Dascanio. 2014**).

II. Contrôle de la semence

Examens macroscopiques

Volume

Le volume de l'éjaculat est évalué par lecture directe sur le tube de collecte gradué juste après la récolte. Celui-ci est très variable en fonction des individus, de leur âge, de leur taille, la fréquence des récoltes et la méthode de récolte. Ainsi que la saison et le temps de préparation de l'étalon .

Couleur et aspect

Normalement, la semence présente un aspect blanc laiteux, homogène mais trouble. Elle est également inodore. La présence d'une odeur anormale peut évoquer une contamination de l'éjaculat par de l'urine, du pus ou des bactéries.

PH

Le pH normal du sperme d'étalon varie entre 7,2 et 7,7. Il subit des variations physiologiques selon la saison, la fréquence des éjaculations et la concentration. (Tibary A, 2005. Blanchard TL, 2003).

Examen microscopique

Concentration

C'est un critère important pour le jugement de la qualité de la semence, dont l'objectif est de redéterminer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de semence pure. Elle peut être déterminée directement par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique, ou à l'aide d'un spectrophotomètre dans la plupart des laboratoires de reproduction équine.

La Motilité

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

La morphologie

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



Figure 05 : Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et quelque anomalie pouvant être rencontrées (Steven P. et al, 2011).

III. Conservation de la semence

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

Conservation à court terme

Semence fraîche

Pour les étalons ayant de bonne fertilité, le sperme collecté est utilisé immédiatement ou jusqu'à 6 heures après sa récolte et ce n'est pas nécessaire de le refroidir.

Semence refroidie

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

Conservation à long terme (La Cryoconservation)

A. Définition

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

B. Principe

La cryoconservation du sperme implique le stockage du sperme à des températures inférieures à zéro (c'est-à-dire congelées), car il n'est pas possible de garder les spermatozoïdes à la température du corps vue de la mortalité cellulaire importante qui s'ensuit à cause d'une activité métabolique intense (Varner et al. 1988).

La cryoconservation dans l'espèce équine

Grace à la cryoconservation, un intérêt plus vif est apporté à la reproduction des chevaux de course, ce qui a permis de diffuser la génétique de nos meilleurs étalons et d'importer celle

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

des champions, garantir une assurance contre la perte imprévue d'un étalon et permettre l'accès au sperme congelé si le sperme frais ou refroidi n'est pas disponible avec la possibilité d'expédier le sperme dans le monde entier (**John ; 2014**).

Les agents cryoprotecteurs :

- **Les cryoprotecteurs non pénétrants**

Ils agissent uniquement dans le milieu extracellulaire.

- **Le lait** : constitue le composant de base de nombreux dilueurs. Il permet un apport en phosphates, citrates et sucres aux spermatozoïdes, possède un pH proche de celui du sperme .

- **Le jaune d'œuf** : Il a été démontré que sa présence protégeait contre le choc par le froid, il assure la protection des membranes des spermatozoïdes lors de la congélation grâce aux phospholipides qu'il contient.

- **Les cryoprotecteurs pénétrants**

- **Le glycérol** : est resté le principal agent protecteur cryogénique pour la congélation du sperme, Son mode d'action reste obscur, même s'il est connu qu'il modifiera la formation de cristaux de glace pendant la congélation et la décongélation.

Dilution du sperme

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

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour la dilution de la semence .

Les dilueurs

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

Les principaux dilueurs à l'heure actuelle sont (**Figure06**) :

Le lait UHT, le Kenney aussi appelé **EZ-Mixin (CST Colorado)** ou **Non-Fat Dried Milk SolidsGlucose (NFDMSG)** ou encore **Skim Milk Glucose extender (SKMG)**, le **KMT**, surtout utilisé pour remettre en suspension le sperme centrifugé car une interaction néfaste avec le plasma séminal a été mise en évidence (**Rigby et al, 2001**), l'**INRA96**.

Name	Formula*
Kenney extender	<ol style="list-style-type: none"> Mix nonfat dry milk solids (2.4 g) and glucose (4.9 g) with 92 mL of deionized water. Add crystalline penicillin G (150,000 U) and crystalline streptomycin sulfate (150,000 µg) or gentamicin sulfate (100 mg) mixed with 2 mL of 7.5% sodium bicarbonate.
Modified Kenney extender (TAMU† formula)	<ol style="list-style-type: none"> Mix nonfat dry milk solids (24 g), glucose (26.5 g), and sucrose (40 g) with 907 mL of deionized water. Add potassium penicillin G (1,000,000 U) and amikacin sulfate (1 g). Buffer to pH 6.8 to 6.9
Skim milk extender	<ol style="list-style-type: none"> Heat 100 mL of nonfortified skim milk to 92°C to 95°C for 10 minutes in a double boiler. Cool. Add polymyxin B sulfate (100,000 U).
Cream-gel extender	<ol style="list-style-type: none"> Dissolve 1.3 g of unflavored gelatin in 10 mL of sterile deionized water. Sterilize. Heat half and half cream to 92°C to 95°C for 2 to 4 minutes in a double boiler. Remove scum from surface. Mix gelatin solution with 90 mL of heated half-and-half cream (100 mL total volume). Cool. Add crystalline penicillin G (100,000 U), streptomycin sulfate (100,000 µg), and polymyxin B sulfate (20,000 U).
Modified cream-gel extender	<ol style="list-style-type: none"> Heat half and half cream (1 pint) to 85°C to 92°C in a glass flask in a double boiler for 10 minutes. Remove scum from surface. Dissolve 6 g of unflavored gelatin in 40 mL of 5% dextrose and heat to 65°C in a water bath. Add hot gelatin solution to cream and allow to cool covered to 35°C to 40°C. Add potassium penicillin G (1,000,000 U) or amikacin sulfate (0.5 g).

*Many different antibiotics and antibiotic dosages have been used with these basic extenders, including potassium penicillin G (1000 to 2000 U/mL), streptomycin sulfate (1000 to 1500 µg/mL), polymyxin B sulfate (200 to 1000 U/mL), gentamicin sulfate (100 to 1000 µg/mL), amikacin sulfate (100 to 1000 µg/mL), ticarcillin (100 to 1000 µg/mL), or timentin (100-1000 µg mL). Use of reagent grade gentamicin sulfate or reagent grade amikacin sulfate may necessitate the addition of sodium bicarbonate to adjust the pH of the extender to 6.8 to 7.0. Gentamicin and amikacin must be 'reagent grade', and not the injectable formulations that contain spermicidal preservatives. The extenders can be stored in small packages at -20°C and thawed immediately before use.

†TAMU, Texas A&M University.

Trade Name	Manufacturer	Comments
INRA 96 extender	IMV Technologies 11725 95th Ave North Maple Grove, MN 55369	Available only with gentamicin in low concentration. Should broader-spectrum antimicrobial activity be desired, timentin (100 to 1000 µg/mL) may be added immediately before mixing with semen.
E-Z Mixin	Animal Reproduction Systems 14395 Ramona Ave Chino, CA 91710	Available with or without different antibiotics.
Skim Milk Extender	Lane Manufacturing Co 2045 S Valentia St, Unit 1 Denver, CO 80231	Available with or without antibiotics.
Kenney Skim Milk Extender	Har-Vet Inc 219 S McKay Ave Box 39 Spring Valley, WI 54767	Available with or without antibiotics.
Kenney Extender	Hamilton Research Inc PO Box 2099 South Hamilton, MA 01982	Available without antibiotics.
Dr. Kenney Ready Mix Extender	Equine Breeders Services 1102 "S" Street Penrose, CO 81240	Available with or without antibiotics.
Next Generation Universal Stallion Semen Extender	Exodus Breeders Supply 5470 Mt Pisgah Rd York, PA 17406	Available with or without antibiotics.

*No endorsement of products is intended.

Figure 06 : Les principaux dilueurs .

Les différentes étapes de la cryoconservation

Récolte et évaluation de la semence

Il existe de nombreuses techniques de récolte de la semence, rappelons que la technique la plus utilisée dans l'espèce équine est celle du vagin artificiel.

Le sperme est dilué une première fois avec le premier milieu à base de lait ou de composants de lait .

Séparation des différentes phases du sperme par centrifugation

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

La semence est diluée avec un dilueur primaire à 37°C, Les tubes sont centrifugés, idéalement à 600xg pendant 10 minutes (**Barrier-Battut 2013 ; Neto et al. 2013**). Ensuite,

le surnageant est enlevé, et les spermatozoïdes du culot sont alors remis en suspension dans une quantité appropriée de dilueur (**Barrier-Battut 2013**). L'ajout des milieux coussin à base d'une solution d'iodixanol, au fond des tubes a permis d'augmenter jusqu'à plus de 90 % le pourcentage de récupération des spermatozoïdes après centrifugation (**Waite et al, 2008 ; Hoogewijs et al, 2010**).

La dilution

Une fois que le culot riche en spermatozoïdes est obtenu, il est dilué avec le milieu de congélation contenant un agent cryoprotecteur.

La concentration finale après congélation dépend de la dilution avec le milieu de congélation et donc des options de commercialisation choisies lors de la production, mais aussi de la contrainte technique imposée par le milieu de congélation.

L'équilibration (la réfrigération)

Le premier palier de la descente en température consiste à équilibrer la température du sperme à 4°C pendant 75 minutes (**Ponthier et al. 2014**). Cette étape d'équilibration fait suite à

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

la centrifugation et à la dilution et correspond à la réfrigération préalable de la semence avant la congélation proprement dite. Elle permet au glycérol de pénétrer dans la cellule et serait à l'origine d'une meilleure survie des spermatozoïdes après décongélation en leur évitant un refroidissement trop brutal (Marc, 2015).

Le conditionnement

La semence est conditionnée juste avant d'être congelée, dans le but de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable. Deux principaux supports sont disponibles pour la congélation : les pastilles et les paillettes.

Une fois remplies, les paillettes qui sont identifiées (nom du mâle prélevé, de son numéro d'identification, de la date de récolte, de dilueur et de sa concentration et de l'identification du centre d'insémination) sont bouchées au moyen de poudre d'alcool polyvinylique et une légère agitation permettra de ménager une place pour l'obturation et la bulle d'air nécessaire pour permettre la dilution du sperme lors de la congélation

(Loomis 2006 ; Hanzen 2014 ; Dumon 2007).

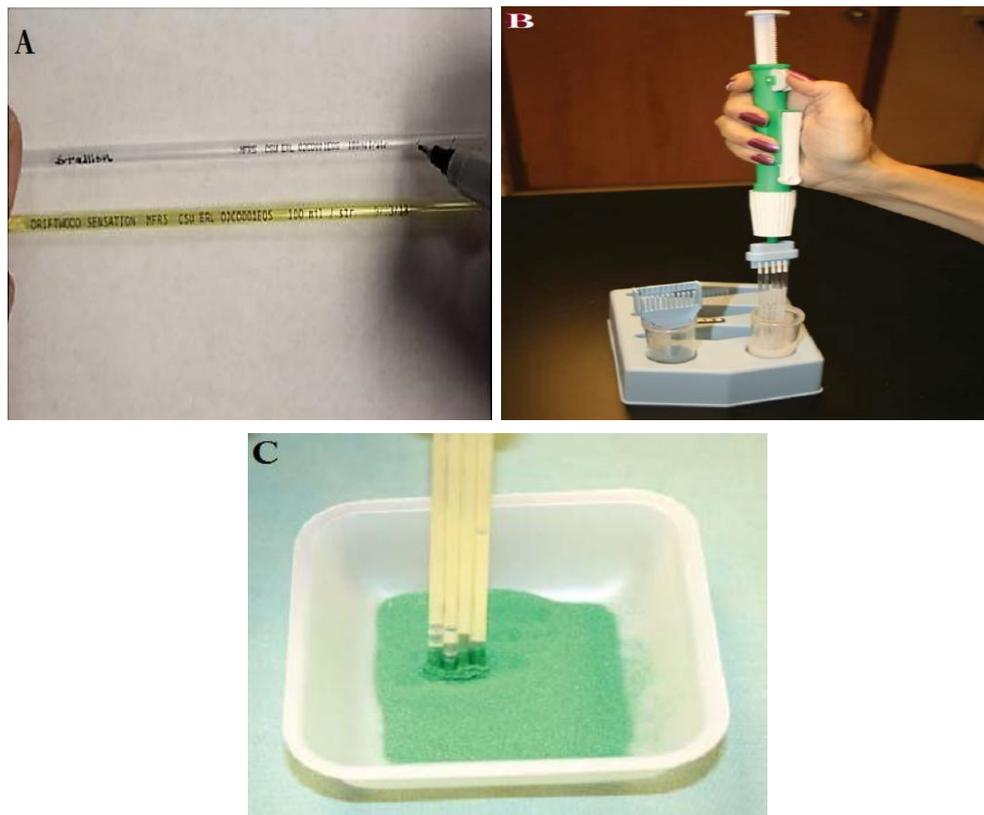


Figure 07: identification (A), remplissage (B) et bouchage (C) des paillettes

(John Dascanio. 2014).

La congélation

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

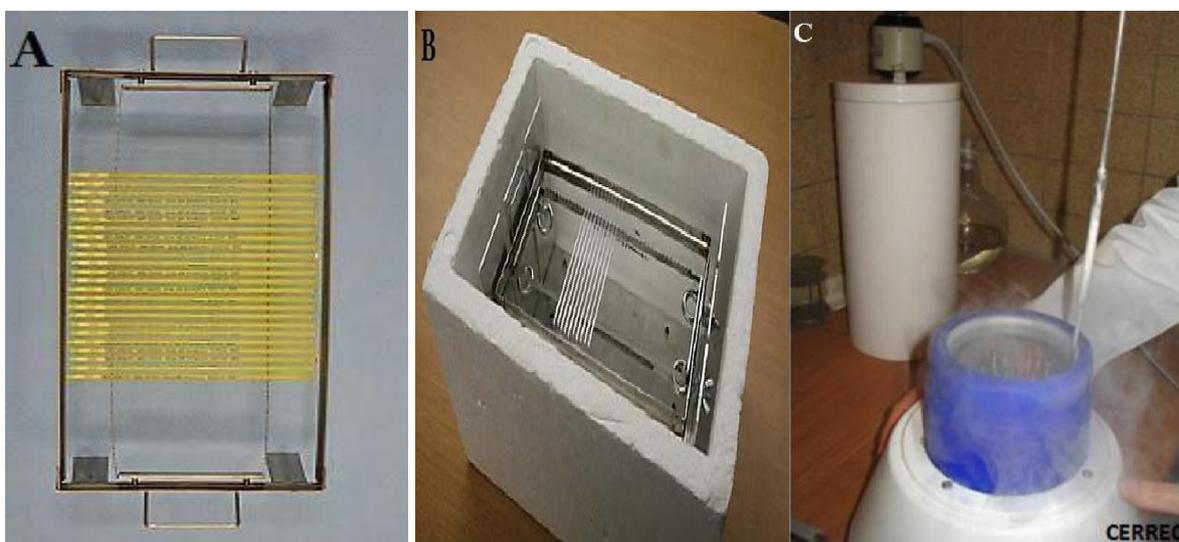


Figure 08 : paillettes déposées sur une grille (A) ensuite placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide (B) puis stockées dans une cuve d'azote liquide(D) (John Dascanio. 2014 ; Steven P. et al. 2011)

La décongélation

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

Evaluation de la qualité de la semence congelée

Après la décongélation, et avant toute utilisation de la semence, il est recommandé d'effectuer un contrôle de qualité sur chaque éjaculat pour essayer de prédire le pouvoir fécondant, et cela en prenant deux paillettes au hasard pour effectuer un spermogramme qui porte sur l'évaluation de pourcentage et de nombre des spermatozoïdes vivants et mobiles estimés en microscopie optique ou à l'aide du système CASA .

Etude

Expérimentale

Etude Expérimentale

L'objectif de cette étude expérimentale est de tester l'effet du miel d'abeille (miel d'euphorbe) supplémenté à des différentes concentration (**1%, 2%, 3%, 4% et 5%**), au milieu de congélation que nous avons utilisé, sur la qualité de la semence après décongélation.

Matériel et méthodes

I. Lieu de l'expérimentation

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

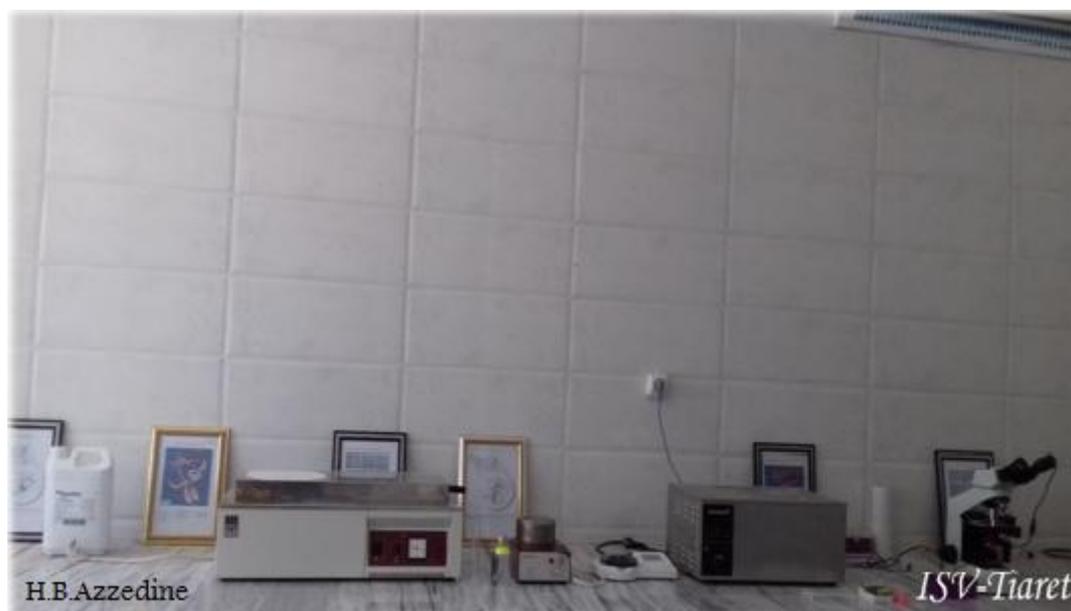


Figure 09: Le laboratoire de la reproduction équine de l'institut des sciences vétérinaires(2019).

II. Effectif de l'expérimentation

L'expérimentation a été réalisée durant la saison de monte **2019** (saison administrative du 01 février au 30 Juin) .sur la semence de deux étalons d'éleveurs privés de race arabe-barbe. **ANBAR** : un cheval âgé de **11 ans** avec une robe grise-pommelée, et **REZKI** : un étalon âgé de **6ans** avec une robe grise-foncée.

Etude Expérimentale

III. Déroulement des récoltes

Les deux étalons étaient récoltés au moins deux fois par semaine. Pour que la concentration en spermatozoïdes ne diminue pas.

La Préparation du vagin artificiel

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

Avant le prélèvement, la surface interne du vagin artificiel est lubrifiée avec un lubrifiant stérile. le biberon de récupération du sperme avec un filtre à sperme est placé à la température corporelle et ceci afin d'éviter d'éventuels chocs thermiques.

Le filtre à sperme placé à l'entrée du biberon de récupération du sperme était utilisé afin d'augmenter le nombre de spermatozoïdes récupérés dans chaque éjaculat en permettant de séparer la partie liquide de l'éjaculat, qui renferme les spermatozoïdes, de la partie épaisse et gélatineuse, le gel, qui correspond à la dernière fraction de l'éjaculat.



Figure 10 : Les étapes de préparation du vagin artificiel de type Missouri(2019).

Etude Expérimentale

La préparation d'étalon

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

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



Figure 11 : L'excitation de l'étalon en présence de la jument « boute-en-train »(2019).

La récolte

Une fois qu'il est monté, la verge du cheval est alors détournée par l'opérateur qui l'insère dans le vagin artificiel et le sperme est recueilli dans le biberon de récupération du sperme. Cela dure quelques secondes, le vagin est ensuite retiré soigneusement du pénis, il est mis en position verticale et vidé de l'eau chaude pour essayer de récupérer la totalité de l'éjaculat et évité un contact prolongé de l'éjaculat avec la paroi interne du vagin chaude, puis il est directement acheminé vers le laboratoire qui se trouve juste à côté de la zone de collecte. L'étalon est ensuite remis au box.



Figure 12: Les étapes de la récolte de sperme (2019).

IV. Sélection des éjaculats pour la congélation

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

V. Préparation du milieu de dilution

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

Etude Expérimentale

Ingrédients

Tous les composants de milieu Kenny que nous avons utilisés sont disponibles dans tous les laboratoires de recherches. Ces composants sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 02 : La composition du Kenney (pour 1l)

Glucose $C_6 H_{12} O_6$	49g
Lait en poudre	24g
Eau distillée stérile	q.s.p. 1 L

* **q.s.p.** : quantité suffisante pour **1L**.

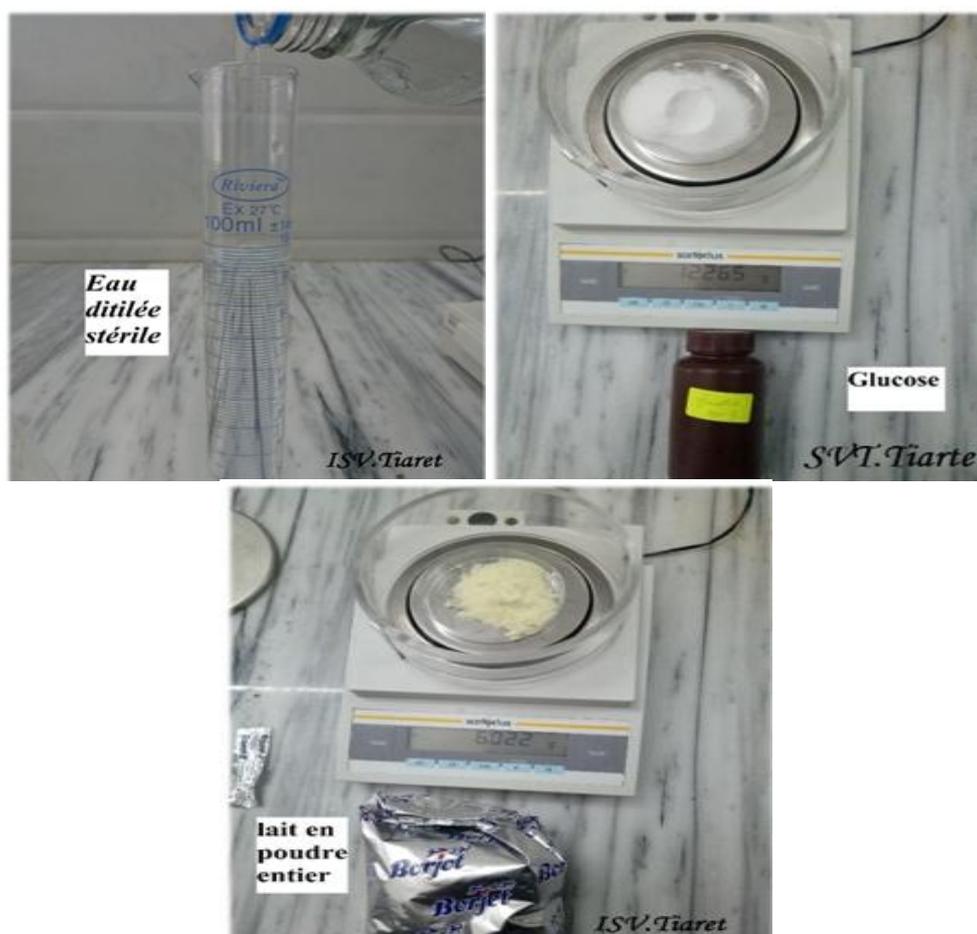


Figure 13: Les ingrédients du milieu Kenney mesuré(2019).

Etude Expérimentale

Préparation

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



Figure 14: Les étapes de préparation du milieu Kenney(2019).

VI. Préparation du milieu de Cryo-congélation

Le Kenney modifié

Tous d'abord, le milieu de dilution (**SKMG**) que nous avons préparé a été modifié en lui ajoutant **5%** de glycérol avec **15%** de plasma du jaune d'œuf. Le glycérol est pour améliorer l'aptitude à la fécondation des spermatozoïdes fragilisés ou endommagés pendant le processus de congélation, alors que le jaune d'œuf était ajouté dans le but d'améliorer la protection de la membrane plasmique des spermatozoïdes et ceci en fournissant un pouvoir tampon et des propriétés anti-oxydantes au dilueur de congélation (**John, 2014**).

❖ Préparation de plasma du jaune d'œuf

Tout d'abord, comme il est important de n'utiliser que du jaune d'œuf sans albumine ni parties riches en membrane, **2 à 3** jaunes d'œuf ont été doucement enroulés chacun sur une à deux feuilles d'un papier filtre, pour se débarrasser complètement de toute l'albumine, tout en gardant le jaune d'œuf intact.

La quantité du jaune d'œuf filtré était versé dans une éprouvette graduée stérile jusqu'à atteindre un volume de **21 mL**, ce volume obtenu était dilué par la suite en ajoutant **7 mL** d'eau distillée stérile pour diminuer la viscosité du jaune d'œuf. Le mélange ainsi obtenu était remplie dans un tube conique stérile de **45 ml** puis soumis à la centrifugation dans une centrifugeuse pendant 45 mn à 2000 x g (**g : gravité**), permettant d'avoir trois fraction, le culot (membranes) la fraction moyenne (la partie à prélevée) et le surnageant (les lipides).

Un volume de **15 mL** du plasma de jaune d'œuf était aspiré à l'aide d'une seringue stérile et supplémenté à un volume de **80 mL** du milieu du dilution (**le Kenney**), un volume de **5 mL** de glycérol était en dernier lieu ajouté à ce mélange à cause de ces propriétés toxiques, rappelons que tous les constituants étaient mis préalablement à une température de **37°C**. Des aliquotes du dilueur Kenney modifié ont été complétées par différentes concentrations de miel d'abeille.



Figure 15 : La préparation de plasma du jaune d'œuf(2019).

Miel d'abeille (d'euphorbe) Kenney modifié (MEKM)

Une solution de miel a été préparée dans un tube à essai stérile, en ajoutant **1 mL** de miel à **9 mL** d'eau distillée stérile pour obtenir une solution de miel à **10%** de concentration. Cette solution a été ajoutée à des aliquotes de **Kenney modifié** réparties sur **5** tubes à essai encore stérile à des concentrations de :

0,5 ml de la solution (10% de miel)/ **4,5 ml** de **Kenney modifié** qu'on a déjà préparé = (**1%** de miel enrichi en Kenney modifié =**1%** MEKM)), la même procédé a été suivi pour les autres concentrations.

1/4 (MEKM 2%), **1,5 / 3,5** (MEKM 3%), **2 / 3** (MEKM 4%), **2,5 / 2,5** (MEKM 5%), pour obtenir un volume final de **5 ml** dans chaque tube, et un aliquote sans miel pour représenter le lot témoin **5 ml** du Kenney modifié sans miel.



Figure 16: Les solutions de miel préparées (2019).

VII. Evaluation des semences après la récolte

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



Figure 17 : Le vagin artificiel acheminé au laboratoire(2019).

Avant d'accéder à l'évaluation, tout le matériel entrant en contact avec la semence, ainsi que les milieux de dilution étaient préchauffés à la température corporelle, et la fraction sans gel récupérée a subi les tests suivants :

Examen macroscopique

a. Volume

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

b. Couleur et aspect

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

Détermination de la concentration

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



Figure 18: La détermination de la concentration à l'aide d'un photomètre Minitube(2019).

Examen microscopique

a. Mobilité massale

Immédiatement après évaluation macroscopique, le volume de la semence exempte de gel était analysé par le dépôt d'une goutte de sperme entre lame et lamelle propres, secs et chauffés à environ **37°C** et placés par la suite sous le microscope optique (OLYMPUS CX21).

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

Etude Expérimentale

b. Mobilité individuelle

une dilution au 25×10^6 SPZ/mL est nécessaire pour l'estimation de la mobilité individuelle, cela à été fait par l'ajout d'une goutte de sperme dans un épendorphe rompli de **1.5 mL** de dilueur.

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

VIII. Traitement de la semence

Après que la semence des étalons soit examinée, l'étape suivante était sa dilution, son conditionnement dans des paillettes et sa congélation :

Dilution primaire

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



Figure 19 : Le diluant Kenney et l'éjaculat misent à l'étuve réglés à 37°C (2019).



Figure 20: La dilution de sperme et le remplissage des tubes coniques à centrifuger (2019).

Centrifugation de la semence

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

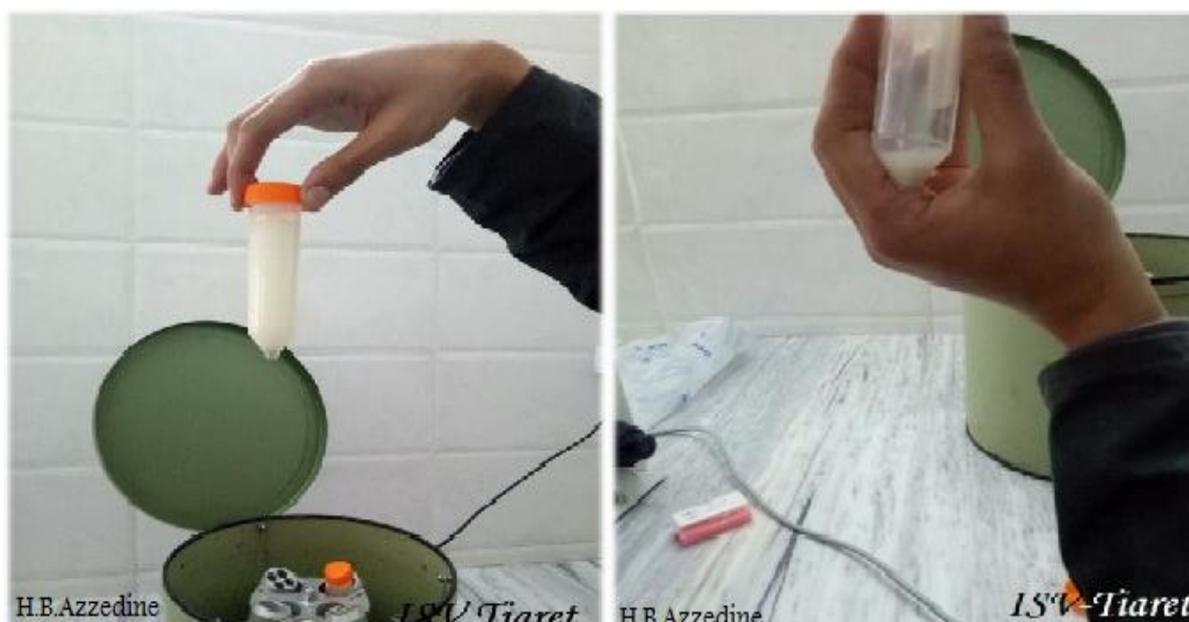


Figure 21: L'aspect du sperme après centrifugation (à gauche), et du culot après l'aspiration de surnageant (à droite)(2019).

Etude Expérimentale

Dilution secondaire

Après centrifugation, au moins **95%** du surnageant a été éliminé, les culots ont été ensuite rassemblés dans un seul tube et remis en suspension avec de Kenney modifié (contenant **15%** de jaune d'œuf et **5%** de glycérol). Le volume de Kenney modifié ajouté était calculé dans l'ordre d'atteindre dans un premier temps une concentration finale en spermatozoïdes de **$200 \times 10^6/\text{mL}$** :

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

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

[CT] : Concentration totale, [C] : Concentration, SPZ : spermatozoïde, V : Volume de la fraction sans gel de l'éjaculat.

Le volume des culots dilué était par la suite répartie dans des tubes à essais stériles sur des aliquotes de diluants Kenney modifié qui ont été complétées par différentes concentrations de miel d'abeille (**1%, 2%, 3%, 4%, 5%**) et sans miel (**0%, témoin**). Dans ce cas afin d'atteindre une concentration finale en spermatozoïdes de **$100 \times 10^6/\text{mL}$** .



Figure 22 : Les aliquotes de Kenney modifié enrichie en miel à des différentes Concentration(2019).

Equilibration

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

Conditionnement de la semence

Après équilibrage, la semence diluée est conditionnée dans des paillettes minitube contenant un volume de **0,5 mL**. Les paillettes sont tout d'abord identifiées à l'aide d'un marqueur indélébile en mentionnant le nom d'étalon, la concentration en miel, et la date de la récolte. Après le refroidissement de la semence diluée, celles-là sont remplies par aspiration buccale à travers l'extrémité bouchonnée de la paillette. A l'aide des pointes de micropipette, un petit volume de la semence est retiré de la paillette de manière à laisser un vide d'environ **1cm**. Les paillettes sont obstruées par la poudre d'alcool polyvinyle et elles subies une légère agitation afin d'amener la bulle d'air au milieu de la paillette pour éviter tous éclatement par le processus de dilatation.



Figure 23: Le conditionnement des paillettes (2019).

Congélation des paillettes

Les paillettes chargées en sperme ont été déposées sur une grille pré-refroidie (à **4°C**) puis placées en premier lieu à **4 cm** au-dessus de l'azote liquide en phase vapeur dans une boîte de polystyrène pendant **15 mn** avant d'être plongées en phase liquide (**Cristanelli MJ et al, 1985**). Les paillettes ont ensuite été stockées dans des fuseaux puis placées dans des canisters et maintenues immergées dans l'azote liquide jusqu'à décongélation.

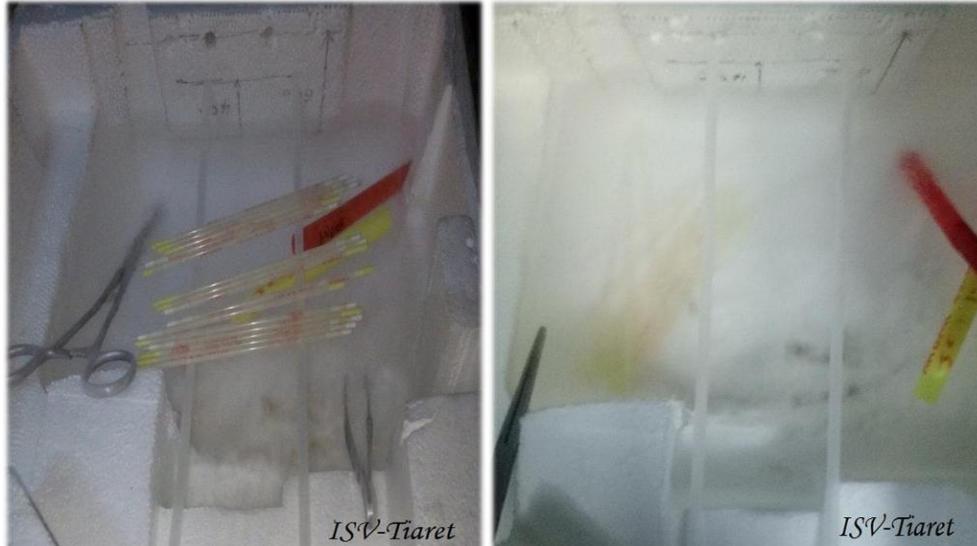


Figure 24 : Les paillettes placées au-dessus d'azote liquide en phase vapeur (à gauche), puis plongées en phase vapeur (à droite)(2019).

Evaluation des paillettes après décongélation

Décongélation

Pour décongeler, juste avant leur évaluation qui a été faite après **24 heures**, deux paillettes de chaque concentration sont directement transférées de l'azote liquide dans un bain-marie réglé à **37°C** pendant **30 secondes**, elles sont par la suite bien essuyées et leur contenu est vidé dans des tubes eppendorf qui sont mis à l'étuve à **37°C** en absence de la lumière.



Figure 25 : Les étapes de décongélation des paillettes

Evaluation

La motilité des spermatozoïdes a été examinée et enregistrée à l'aide d'un microscope optique juste à **0, 1/2, 1, et 2 heures** après décongélation des paillettes, une goutte de sperme est déposée entre lame et lamelle préchauffées à **37°C**, l'évaluation et le calcul de pourcentage de motilité ont été réalisés comme nous l'avons décrit précédemment, cela était fait pour chaque concentration.



Figure 26 : L'évaluation de la motilité des spermatozoïdes sous le microscope optique(2019).

IX. Test statistique

Des tests statistiques (à l'aide du programme **SPSS version 22**) ont été réalisés pour les données obtenues concernant les qualités de sperme congelé-décongelé. Des comparaisons multiples des moyennes ont été effectuées avec le test T (**Snedecor GW, 1989**). La valeur de P a été fixée à $<0,05$ pour définir la signification statistique.

Résultats et discussion

Résultats

I. Evaluation de la semence après la récolte

Les résultats d'évaluation de la qualité de la semence des deux étalons à la récolte sont enregistrés et présentés dans le tableau (3) :

Tableau 03: Les caractéristiques séminales individuelles obtenues pendant le protocole.

	Paramètres	ANBAR	REZKI
Examen macroscopique	Volume (mL)	70	90
	Couleur et aspect	Blanche laiteux homogène	Blanche laiteux homogène
/	Concentration (spz/mL)	149×10^6	111×10^6
Examen microscopique	Motilité massale	3	3
	Motilité individuelle	80%	75%

II. Evaluation de la mobilité après décongélation

Les effets de différentes concentrations de miel dans le dilueur Kenney modifié supplémenté par les concentration de miel et témoins sur la mobilité des spermatozoïdes des étalons arabe-barbes après décongélation sont rapportés dans les deux tableaux (4 et 5):

Etude Expérimentale

Tableau 04 : Résultats générales d'évaluation de la motilité des spermatozoïdes obtenues après décongélation.

Concentration en miel	Valeurs de la motilité après décongélation (%)							
	0 h		½ h		1 h		2 h	
	REZKI	AMBAR	REZKI	AMBAR	REZKI	AMBAR	REZKI	AMBAR
MLKM 0% (témoin)	47%	60%	45%	58%	40%	55%	10%	8%
MEKM 1%	45%	45%	38%	33%	6%	20%	4%	3%
MEKM 2%	68%	70%	65%	64%	60%	55%	55%	7%
MEKM 3%	60%	75%	45%	68%	30%	55%	8%	10%
MEKM 4%	60%	30%	57%	28%	55%	25%	20%	3%
MEKM 5%	55%	25%	48%	22%	45%	20%	8%	3%

Etude Expérimentale

Tableau 05 : Moyennes de l'effet du miel additionné au diluant Kenney modifié sur la motilité des spermatozoïdes des étalons arabe-barbe.

Enrichissement en miel (%)	Valeurs de motilité après décongélation			
	0 h	½ h	1 h	2h
MLKM 0% (témoin)	53	51.5	47.5	9
MEKM 1%	45	35.5	13	3.5
MEKM 2%	69	64.5	57.5	31
MEKM 3%	67.5	56.5	42.5	9
MEKM 4%	45	42.5	40	11.5
MEKM 5%	40	35	32.5	5

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 05, il y'avait des différences nettement apparentes entre les différentes concentrations pour la mobilité totale des spermatozoïdes à 0, 1/2, 1 et 2h après décongélation. Une augmentation de pourcentage des spermatozoïdes mobiles à été observée en présence de miel d'abeille à 2% et 3% par rapport au témoin (0%), l'enrichissement de milieu de congélation (Kenney modifié) pour l'étalon avec le miel d'abeille (MEKM 2%) avait augmenté de façon très importante le pourcentage la motilité des spermatozoïdes après décongélation (à 0, 1/2, 1 et 2h) par rapport au témoin et MEKM (1%, 4% et 5%) comme indiqué dans le tableau 06. Alors que l'enrichissement en MEKM à 3% (à 0, 1/2, 1 et 2h après décongélation) n'a pas différée de manière très importante des résultats MEKM 2% (à 0, 1/2, 1 et 2h après décongélation) comme indiqué dans le tableau 06 .

L'analyse statistique des résultats mentionnées précédemment dans les tableaux (05 et 06) concernant l'évaluation de la motilité de sperme après décongélation à révéler une différence significative entre le lot témoin (non supplémenté) et MEKM 1%, et MEKM 2%

Etude Expérimentale

avec un ($p=0,001$, $p=0,025$) respectivement par contre l'analyse n'a montré aucune différence significative avec le reste des lots ($P\geq 0,05$).

Le test T a montré une différence très significative entre le lot MEKM 1% et MEKM 2%, MEKM 3% avec un ($p= 0,001$; $p=0,004$) respectivement sans aucune signification avec le reste des lots.

La comparaison des moyennes entre MEKM 2% et MEKM 4% MEKM 5% apporte une nette différence entre ces dernier avec de ($p= 0,007$; $p=0,003$) respectivement sans qu'il est une signification avec le MEKM 3%.

Discussion

Plusieurs variantes des médiateurs de dilution ont été utilisés à des fins de traitement de sperme congelé (Jerez et al., 2016). La composition des dilueurs de sperme dépend de l'utilisation du sperme, de la température et de la période de stockage. Les spermatozoïdes chez les mammifères ont besoin de substrats exogènes pour remplir diverses fonctions, par exemple ; préserver les ressources énergétiques intracellulaires, les constituants des cellules et plus particulièrement la motilité (Salisbury et al., 1978). Le lait (lait écrémé, homogénéisé ou entier) fournit les phospholipides nécessaires à la stabilisation de la membrane à basse température et minimise l'activation de la membrane acrosomique (Bustamante et al., 2009). Les sucres sont des composants essentiels des dilueurs pour fournir l'énergie nécessaire à la glycolyse du sperme (Aboagla et Terada, 2003).

Dans la présente étude, nous avons utilisé un miel d'abeille de notre sahara (miel d'euphorbe) dans un dilueur de sperme d'étalon arabe-barbe comme substrat énergétique, cryoprotecteur et pour son effet antioxydant bénéfique sur la stabilité de la membrane du sperme. Le miel a été utilisé avec un dilueur cryoprotecteur pour des étalons Arabe-barbe à différentes concentrations : 1%, 2%, 3%, 4% et 5%. Les résultats de la présente étude ont conclu que l'incorporation de différentes concentrations de miel au dilueur de congélation (MEKM) augmentait la motilité des spermatozoïdes des étalons après décongélation. Il y avait des valeurs significatives de motilité élevée des spermatozoïdes lorsque le dilueur contenait du miel (2% et 3%) à 0, 1/2, 1 et 2h après la décongélation par rapport au témoin (0%).

Le pourcentage de spermatozoïdes étaient significativement plus élevés dans les concentrations de miel (2% et 3%) que chez les témoins. L'enrichissement du milieu Kenny modifié en miel d'abeille à (MEKM 2%) a montré les enregistrements moyens significatifs les plus élevés concernant la motilité des spermatozoïdes et la viabilité.

Etude Expérimentale

Ces résultats sont en accord avec Olayemi et al. 2011; Jerez et al. 2013 et qui ont rapporté que la présence de miel dans les milieux de congélation augmentait la motilité des spermatozoïdes et améliorait la qualité des spermatozoïdes dans le sperme de bouc, de bélier et de taureau, respectivement. De plus, Fakhrildin et Alsaadi., 2014 ont indiqué que la supplémentation en miel (10%) à la solution de cryoprotecteur de sperme humain entraînait une amélioration de la qualité du sperme après la décongélation. Récemment, Jerez-Ebensperger et al, 2015 ont conclu qu'ils existait des valeurs significatives de qualité élevée de sperme de bélier (spermatozoïdes mobiles totaux, intégrité de l'acrosome et HOST) lorsque le milieu de dilution contenait du miel à 0 et 2 h après la décongélation et que le fructose pouvait être remplacé par du miel dans le dilueur de sperme de bélier, sans nuire à la qualité du sperme après cryoconservation.

D'un point de vue physique, le miel ne gèlera pas à des températures très basses. La viscosité du miel augmente et deviendra épaisse et se condensera avec la diminution de la température. Le miel a une transition vitreuse comprise entre -42 et -51 ° C. En dessous de cette température, le miel entre dans un état vitreux et deviendra un solide amorphe (non cristallin) et empêchera la formation de cristaux de glace (Kantor. Z et al, 1999). En outre, le miel possède des propriétés chimiques uniques dans la mesure où il contient un mélange de 25 sucres représentant environ 95% - 97% de sa matière sèche (principalement du fructose et du glucose). Outre les saccharides, de nombreuses autres substances bioactives, telles que des acides organiques, des enzymes, des antioxydants et des vitamines, sont présentes dans le miel (Bogdanov S et al, 2008). Une telle composition produit divers effets nutritionnels, biologiques et pharmacologiques sur les cellules vivantes, à savoir des activités antimicrobiennes (antivirales, antifongiques et antibactériennes), antioxydantes et antitoxines, anti-inflammatoires, antimutagènes (Bogdanov S et al, 2008 ; Manyi-Loh CE et al, 2011). Le fructose et le glucose agissent comme des cryoprotecteurs extracellulaires non pénétrants en raison de leur poids moléculaire élevé et maintiennent l'équilibre osmotique (Meryman HT, 1971).

De plus, les sucres constituent la principale source d'énergie dont les spermatozoïdes ont besoin pour développer leurs processus métaboliques (Gil L et al, 2010). De nos jours, il existe des preuves des effets antioxydants du miel (Orsolio N et al, 2007 ; Aljady AM et al, 2000). Les flavonoïdes du miel d'abeille possèdent une activité de balayage des radicaux libres, inhibant ainsi les dommages de l'ADN induit par ces derniers (Chen CH et al, 2014). Des études portant sur différentes espèces : bovines (El-Sheshtawy et al. 2014), ovines (Jerez-Ebenspergera RA et

Etude Expérimentale

al, 2015 ; Jerez-Ebenspergera RA, 2015b), caprines (Olayemi et al. 2011), carpes communes (Ogretmen F et al, 2014) et humaines (Fakhrildin MB et al., 2014). ont permis de déterminer les propriétés antioxydantes du miel lors de la cryoconservation des spermatozoïdes.

Les scientifiques s'efforcent actuellement de trouver une alternative aux antibiotiques pour enrayer l'utilisation des antibiotiques dans les agents de cryoconservation du sperme. Le miel, un produit d'origine naturelle, possède une activité antibactérienne puissante (Zoheir et al., 2015) et constitue une bonne source d'énergie pour les spermatozoïdes en raison de la présence de glucose et de fructose (Al-Waili., 2004). Les microorganismes présents dans le sperme réduisent la motilité, la longévité et l'intégrité acrosomique des spermatozoïdes en concurrençant directement les spermatozoïdes avec des nutriments ou en produisant des produits toxiques (Catry et al., 2010; Morrell et Wallgren, 2014). Alors que les résultats obtenues par (Banday, M.N, 2017) n'ont pas pu être comparés faute de littérature sur cet aspect, o'u il' à conclu que le miel ne pouvait pas être utilisé comme alternative aux antibiotiques dans les milieux de cryoconservations de sperme de béliers mais qui peut être utilisé comme source d'énergie à une concentration supérieure à 2,5%.

Les résultats de la présente étude sont aussi en accord étroit avec l'étude (d'El-Nattat et al., 2016) qui ont également obtenu une meilleure motilité et une meilleure viabilité des spermatozoïdes après décongélation avec un taux de miel de 2%, contre 3%, 4% et 5%. (El-Sheshtawy et al., 2014) ont également signalé une amélioration de la motilité des spermatozoïdes et du nombre de spermatozoïdes vivants à 1% pour le sperme de taureau cryoconservé et à 3% pour le sperme de taureau refroidi et autres. Les résultats de (Mohamed Mahmoud et al, 2017). ont montré que l'impact primordial du miel sur les agents de dilution et de cryoconservation du sperme était de soutenir la motilité des spermatozoïdes réfrigérés de buffle. L'effet d'incorporation de miel était évident dans le dilueur, au moment où il entre en contact avec le sperme (0 h) et par la suite. L'addition de 2% de miel était associée au taux de motilité le plus élevé 1, 2 et 4 h après le refroidissement. Le miel est un mélange de sucres (fructose ~ 38,5% et glucose ~ 31,0%) et d'autres composés (Silva et al., 2016). (Olayemi et al., 2011) ont indiqué que la supplémentation en miel dans un diluant à base de jaune d'œuf maintenait la motilité des spermatozoïdes jusqu'à 6 h à 5 °C, et son effet dépendait de la proportion de miel par rapport au jaune d'œuf dans le dilueur .

Conclusion

Conclusion

Les résultats obtenus au cours de notre étude nous permettent d'affirmer que la semence équine des étalons arabe-barbe conserve sa motilité et sa longévité pendant au moins 2 heures, lorsqu'on supplémente le dilueur de cryoconservation par un miel d'euphorbe du Sahara Algérien, d'après nos résultats *in vitro*. Ces affirmations sont valables pour les conditions expérimentales utilisées.

Nos résultats ont montré, clairement que la supplémentation en miel d'euphorbe dans le dilueur de sperme d'étalon arabe-barbe (Kenney modifié), **MEKM 2 % et MEKM 3%** a permis d'améliorer la motilité et la longévité des spermatozoïdes en poste-décongélation, par rapport aux groupes témoins (0%) et aux autres concentrations **MEKM 1%, MEKM 4% et MEKM 5%**.

Compte tenu des données de la littérature, il est sans doute possible d'incorporer le miel à une concentration de 2,5 % pour améliorer la motilité, la longévité et d'autres caractéristiques de la semence des différentes espèces. Cela est sans doute dû à la composition du miel riche en sucres, antioxydants et autres substances favorable à la protection des spermatozoïdes contre le stress oxydatif, et la pauvreté du milieu en nutriments.

Perspectives et
Recommandations

Perspectives et Recommandations

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

- ❖ Augmenter l'effectif de travail (le nombre des étalons et des éjaculats utilisés pour chacun d'entre eux).

- ❖ Approfondir les examens utilisés (système CASA) et à élargir les paramètres d'évaluation de la semence pour l'obtention de résultats de plus en plus objectives et précises.

- ❖ Essayer d'inséminer des juments avec ces semences congelées pour savoir l'effet in vivo et calculé la fertilité.

- ❖ Tester d'autres types et d'autres doses de miel ainsi que de vérifier son effet avec d'autres dilueurs de congélation pour l'étalon.

- ❖ Nous espérant ainsi améliorer la clarté du milieu de cryoconservation pour une visualisation plus claire des spermatozoïdes permettant une évaluation optimale de la qualité du sperme congelé, le lait en poudre entier pourrait être remplacé par du lait écrémé ou semi écrémé.

Une comparaison de notre milieu de congélation avec autres milieux de congélation commercialisés pour mieux juger son effet sur les paramètres de sperme d'étalon.

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

- Aboagla EM, Terada T. 2003.** Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod*, 69:1245-1250.
- Al-Waili, NS 2004.** Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J. Med. Food*. 7: 210-222.
- Banday, M. N.; Lone, F. A.; Rasool, F.; Rather, H. A. and Rather, M. A, 2017.** Article: Does natural honey act as an alternative to antibiotics in the semen extender for cryopreservation of crossbred ram semen?
- Baronne R. 2001.** Chapitre II : Appareil génital mâle. In : Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie II. Vigot 83-250.
- Barrier-Battut I. 2013.** Collecte et traitement de la semence d'étalon. *Equ'idée*. Article 2-7
- Blanchard TL, et al. 2003.** Manual of equine reproduction. 2nd edition. Mosby
- Bustamante Filho IC, Pederlozzi CD, Sgaravatti AM, Gregory RM, Dutra Filho CS, Jobim MIM, Mattos RC. 2009.** Skim Milk-egg based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim Reprod*, 6:392-399.
- Catry, B; Van Duijkeren, E; Pomba, MC; Greko, C; Moreno, MA; Pyorala, S and Torneke, K 2010.** Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals, epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol. Infect.*, 138: 626-644.
- Chen CH, Weng M, Wu CH, Lin J. 2004.** Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evid Based Complement Altern Med*. 1(2): 175-185.
- Cochran JD, Amann RP, Froman DP, Pickett BW. 1984.** Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*; 22: 25-38.
- Daels P.F. 2003.** New technics of artificial insemination in the mare. In: *Belgian Equine Practitioners Society (Ed.), Proceedings de la 20^e journée d'étude de la Belgian Equine Practitioners Society*, Bruxelles.
- Day John G. et Stacey Glyn N. 2007.** Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Second Edition. Humana Press Inc. 365p.

Références bibliographiques

- El-Nattat, WS; El-Sheshtawy, RI; El-Batawy, KA; Shahba, MI and El-Seadawy, IE 2016.** Preservability of buffalo bull semen in tris-citrate extender enriched with bee's honey. *J. Innov. Pharm. Biol. Sci.*, 3: 180-185.
- El-Sheshtawy RI, El-Nattat WS, Sabra HA, Ali AH. 2014.** Effect of honey solution on semen preservability of local breeds of cattle bulls. *Wld Appl Sci J.* 32(10): 2076-2078.
- Fakhrildin MB, Alsaadi RA. 2014.** Honey supplementation to semen freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. *J FAM Reprod Health*; 8(1): 27-31.
- Gil L, Mascaró F, Mur P, Gale I, Silvia A, Gonz'alez N, et al. 2010.** Freezing ram semen: the effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on post-thaw sperm motility. *Reprod Domest Anim.* 45: 91.
- Hanzen C. 2006.** « Propédeutique de l'appareil reproducteur mâle et examen du sperme des ruminants, équidés et porc ». Cours de reproduction, université de Liège, Belgique
- Jerez R, González N, Olaciregui M, LuñoV, de Blas I, Gil L. 2016.** Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. *Small Rumin Res*, 134:34-38.
- Jerez-Ebensperger R, Gil L, Gonzales N, De Blas I. 2015b.** The combined effect of use of honey, garlic (*Allium Sativum L.*) and skimmed milk as an extender for chilling sheep semen. *Cryo Lett*; 36(4): 243-251.
- Jerez-Ebenspergera RA, Luñoa V, Olacireguia M. 2015.** Gonz' aleza N, Blasb I de, Gila L. Effect of pasteurized egg yolk and rosemary honey supplementation on quality of cryopreserved ram semen. *Small Rum Res*; 130: 153-156.
- John Dascanio and Patrick McCue. 2014.** *Equine Reproductive Procedures*, First Edition. Edited by John Wiley & Sons, Inc. Published 2014 by John Wiley & Sons, Inc. 560p (p333).
- Kantor Z, Pitsi G, Thoen J. 1999.** Glass transition temperature of honey as a function of water content as determined by differential scanning calorimetry. *Agric Food Chem.* 47: 2327-2330.
- Katila T.1997.** Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology.* 48(7) 1217-27.
- Loomis P.R. 2006.** Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 22, 663-676.
- Manyi-Loh CE, Clarke AM, Ndip RN. 2011.** An overview of honey: therapeutic properties

Références bibliographiques

and contribution in nutrition and human health. *Afr J Microbiol Res.* 5: 844-852.

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

Mckinnon A.O., Squires E.L., Vaala W., Varner D.D. 1993. Equine Reproduction Second Edition. London, Wiley-Blackwell. (3288p).

Meryman HT. 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology.* 8:173-183.

Mohamed Mahmoud Moustafa kaniel, Ahmed Reda Mohamed, 2017. Elkhawagah Effect of honey supplementation on Egyptian buffalo semen.

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

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

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

Ogretmen F, Inanan BE. 2014. Evaluation of cryoprotective effect of Turkish pine honey on common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Cryo Lett.* 35(5): 427-437.

Olayemi FO, Adenigi DA, Oyeyemi MO. 2011. Evaluation of sperm motility and viability in honey included egg yolk based extenders. *Glob Vet*; 7 (1): 19-21.

Orsolich N, Basic I. Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. In: Singh VK, Govil JN, Arunachalam C, editors. 2007. Recent progress in medicinal plants. USA: Studium Press LLC, p. 55-113.

Ponthier J., Van Den Berghe F., Parrilla-Hernandez S., Hanzen C. et Deleuze S. 2014.

Congélation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives.

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

Salisbury GW, Van Demark NL, Lodge JR. 1978. Extenders and extension of unfrozen semen. In: Salisbury GW (Ed.). *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle.* San Francisco, CA: W.H. Freeman. pp. 442-493.

Références bibliographiques

Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016. Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem*, 196:309-323. Warriach HM,

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

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

Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. 1988. Effects of cooling rate and storage temperature on equine Spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*. 29 (5) 1043-54.

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

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

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

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

Zoheir, KMA; Harisa, GI; Abo-Salem, OM and Ahmad, SF. 2015. Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 28: 973-981