

2008

ETUDE SUR LA CONSERVATION DE LA SEMENCE
EQUINE DANS UNE BOITE DE TRANSPORT JETABLE
EXPOSEE A DIFFERENTES TEMPERATURES
POSITIVES PENDANT 22 HEURES

THESE

Pour le

DOCTORAT VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le

.....

par

Yoann, Jean, François LE FOLL

Né le 31 janvier à Soissons 1983 (Aisne)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Mme Fabienne Constant

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Assesseur : Mme Hélène Combrisson

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, CLERC Bernard

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<p>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henry, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p>	<p>- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur</p> <p>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences*</p> <p>- DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p>
--	--

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Maître de conférences

<p>- UNITE DE MEDECINE M. PUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GRAUDET Aude, Praticien hospitalier Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)</p> <p>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS Mme Françoise ROUX, Maître de conférences contractuel</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY-PLUMIOEN Béangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel</p> <p>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel Mme HALOS Lénaig, Maître de conférences M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier</p> <p>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur M. GRANDJEAN Dominique, Professeur</p>
--	--

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences

<p>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences</p> <p>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES M. SANAA Moez, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAII ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences</p>
---	--

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

REMERCIEMENTS

A Monsieur _____, Madame Fabienne Constant et Madame Hélène Combrisson pour leur participation au jury.

A Madame Marianne Vidament et Madame Fabienne Constant pour avoir encadré ce travail.

A Madame Marianne Vidament, Monsieur Guy Duchamp, Monsieur Jean-Marie Yvon et toute l'équipe de la jumenterie de l'INRA-Nouzilly : merci pour votre accueil, le temps que vous m'avez consacré et ces deux mois riches en expériences   quines et humaines.

A ma famille pour leur soutien pendant ces six années d'études.

A mes amis pour les moments passés et à venir.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
<i>PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	11
1. La technique d'insémination artificielle	13
1.1. Généralités	13
1.2. Les différents modes de conservation	14
1.2.1. Définitions	14
1.2.2. Inconvénients de la conservation	14
2. Préparation de la semence	15
2.1. Caractéristiques du sperme	15
2.2. Dilution du sperme	16
2.2.1. Méthodes de dilution	16
2.2.2. Les dilueurs	17
2.3. Conservation de la semence	20
2.3.1. Température	20
2.3.2. Vitesse de refroidissement	21
3. Evaluation de la qualité de la semence réfrigérée	22
3.1. Conséquences de la conservation	22
3.2. Méthodes d'évaluation de la semence	23
3.2.1. Test de réactivité des membranes.....	24
3.2.2. Test de réactivité des acrosomes.....	24
<i>PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE</i>	25
1. Objectifs	27
2. Matériel et méthode	27
2.1. Procédures générales	27
2.1.1. Les étalons.....	27
2.1.2. Récolte.....	28
2.1.3. Préparation des doses	28
2.1.4. La réfrigération des doses.....	29
2.2. Expérimentation in vivo	32
2.2.1. Introduction.....	32
2.2.2. Suivi des juments	33
2.2.3. Attribution des lots	33

2.2.4.	<i>Insémination</i>	33
2.2.5.	<i>Synthèse sur les horaires et intervalles</i>	34
2.2.6.	<i>Diagnostic de gestation</i>	34
2.3.	Expérimentation in vitro	34
2.3.1.	<i>Introduction</i>	34
2.3.2.	<i>Protocole</i>	34
2.3.3.	<i>Mobilité</i>	35
2.3.4.	<i>Test de réactivité des membranes</i>	37
2.3.5.	<i>Test de réactivité acrosomique</i>	39
2.4.	Analyse statistique	43
3.	Résultats	44
3.1.	Expérimentation in vivo	44
3.2.	Expérimentation in vitro	45
3.2.1.	<i>Paramètres de mobilité</i>	45
3.2.2.	<i>Test de réactivité des membranes</i>	45
3.2.3.	<i>Test de réactivité des acrosomes</i>	46
3.3.	Vitesses de descente en température	50
	DISCUSSION	53
1.	Baisse de fertilité liée aux caractéristiques <i>in vitro</i> dans le lot Bas	55
2.	Synthèse sur la conservation entre 3°C et 16°C	57
3.	Pertinence de l'utilisation de la VCL et des PMS	58
4.	Validité de nos résultats	58
4.1.	Validité du lot témoin	58
4.2.	Problématique des ponettes utilisées plusieurs fois.	59
4.3.	Vitesse de descente en température	59
4.4.	Volume et quantité de spermatozoïdes	59
4.5.	Conditions d'oxygénation	60
4.6.	Conséquences liées à l'utilisation des boîtes de transport	60
4.7.	Performances du dilueur INRA96	60
4.8.	Résultats du test de réactivité des membranes (test HOS)	61
4.9.	Résultats du test de réaction acrosomique	61

CONCLUSION	63
ANNEXES	65
<i>Annexe 1</i>	67
<i>Caractéristiques séminales moyennes pendant le</i>	67
<i>protocole</i>	67
<i>Annexe 2</i>	71
<i>Caractéristiques séminales individuelles pendant</i>	71
<i>le protocole</i>	71
<i>Annexe 3</i>	75
<i>Données préalables sur les caractéristiques séminales</i>	75
<i>des étalons</i>	75
<i>Annexe 4</i>	79
<i>Fiche technique de l'OTLM</i>	79
BIBLIOGRAPHIE	83

TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques séminales de 222 étalons de sang des Haras Nationaux.....	15
Tableau 2 : Composition du Kenney (pour 1l).....	18
Tableau 3 : Composition de l'INRA96 (IMV, L'Aigle, France) pour 1l	18
Tableau 4 : Composition du Tyrode modifié (pour 0,1l)	19
Tableau 5 : Les différentes enceintes et leurs caractéristiques thermiques.....	29
Tableau 6 : Déroulement de la coloration PSA.....	39
Tableau 7 : Résultats de fertilité par cycle pour les trois températures de conservation testées	44
Tableau 8 : Mesures des paramètres de mobilité à quatre températures de conservation différentes.....	45
Tableau 9 : Résultats du test de réactivité des membranes (test HOS) pour quatre températures de conservation différentes.....	46
Tableau 10 : Résultats du test de réaction acrosomique dans le lot témoin pour quatre températures de conservation différentes.....	46
Tableau 11 : Résultats du test de réaction acrosomique dans le lot ionophore pour quatre températures de conservation différentes.....	47

FIGURES

Figure 1 : Photo des doses en place dans la boîte de transport	30
Figure 2 : Photo de la boîte de transport en cours de fermeture.....	30
Figure 3 : Schéma du principe de l'analyseur de mobilité de la semence.....	36
Figure 4 : Définition schématique des paramètres mesurés par l'analyseur de mobilité.....	36
Figure 5 : Description schématique des différentes catégories d'enroulement des spermatozoïdes suite au test HOS	38
Figure 6 : Photo sous microscope de spermatozoïdes ayant subi la coloration PSA.....	41
Figure 7 : Description des différentes parties du spermatozoïde après coloration PSA	41
Figure 8 : Diagramme du déroulement de l'expérimentation <i>in vitro</i>	42
Figure 9 : Graphique présentant les résultats du test de RA pour l'étalon MW233.	48
Figure 10 : Graphique présentant les résultats du test de RA pour l'étalon MW329.	48
Figure 11 : Graphique présentant les résultats du test de RA pour l'étalon MW420.	49
Figure 12 : Graphique présentant les résultats du test de RA pour l'étalon MW438.	49
Figure 13 : Graphique représentant les courbes de descente en température.....	51

INTRODUCTION

Autrefois, la seule technique de reproduction utilisée dans l'espèce équine était la monte naturelle. Aujourd'hui, il faut tenir compte :

- du milieu professionnel qui entoure l'activité équine, pour qui le cheval est synonyme de métiers (éleveurs, cavaliers, techniciens...),
- des enjeux économiques que l'élevage implique (le prix des saillies pouvant dépasser les 15 000 €, 2 à 3 années d'entretien sont nécessaires avant que l'animal puisse démontrer ses capacités et trouver un acquéreur...),
- de la dispersion des juments et des étalons chez les éleveurs sur tout le territoire national, ainsi qu'à l'étranger.

La semence des étalons à haute valeur génétique, due à leur valeur sportive ou à leur appartenance à certaines races menacées, doit pouvoir être diffusée aux éleveurs pendant la période de monte, qui s'étend de février à juillet. De plus, certains étalons poursuivent leur carrière sportive pendant la saison de monte. Par conséquent, la reproduction équine se caractérise par des mouvements importants d'animaux ou de semences. Il a donc été nécessaire de moderniser les techniques de reproduction en utilisant tout d'abord l'insémination artificielle en semence fraîche, puis en se tournant vers des méthodes de conservation plus longues (réfrigération, congélation) de la semence, de façon à laisser entière liberté de mouvement aux reproducteurs. A l'heure actuelle, pour les haras Nationaux, le transport de la semence non congelée se fait surtout à 4°C dans des véhicules équipés de systèmes de refroidissement actif. Des transports ponctuels sont cependant effectués grâce à des boîtes contenant un système de refroidissement passif, permettant de maintenir une température basse, sans passer en dessous de 0°C, en théorie. Ces boîtes présentent cependant l'inconvénient d'être sensibles à la température extérieure.

Les étalons sont très inégaux dans l'aptitude de leur semence à résister à la conservation. Aujourd'hui encore, la qualité d'un éjaculat est estimée le plus fréquemment par la mesure de la mobilité des spermatozoïdes. Toutefois, la corrélation qui existe entre ce critère et la fertilité reste insuffisante pour satisfaire à la fois les besoins de la recherche et les centres d'insémination.

L'objectif de ce travail est donc d'étudier **la qualité** du sperme conservé dans des boîtes de transport soumises à **différentes températures de stockage** au travers de deux expérimentations : l'une mesurant **la fertilité** des doses et l'autre étudiant différentes caractéristiques *in vitro* du sperme conservé (plus précises que la mobilité des spermatozoïdes) afin d'obtenir éventuellement une corrélation entre la fertilité et ces paramètres.

L'étude bibliographique expose essentiellement les aspects techniques de l'insémination artificielle (IA), les modalités de préparation et de conservation de la semence, ainsi que les différents tests utilisés pour juger de la qualité des spermatozoïdes.

L'étude expérimentale est divisée en 3 parties : la première présente les différents protocoles mis en place, la deuxième les résultats obtenus et la troisième les réflexions que nous ont inspirées ces résultats.

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La technique d'insémination artificielle

1.1. Généralités

La technique d'insémination artificielle (IA) présente de nombreux avantages par rapport à la monte naturelle :

- éviter le transport des animaux et diminuer le risque de contaminations inter-élevages,
- éviter de blesser l'étalon ou la jument pendant la saillie,
- augmenter le nombre de juments par étalon et ainsi obtenir un progrès génétique plus important,
- diffuser le potentiel génétique d'un étalon sur le plan international.

D'après l'annuaire de monte 2006 pour les étalons de selle français, 11 279 juments ont été mises à la reproduction grâce à l'IA (pour 19 452 saillies, soit 58% des saillies) dont :

- 2 212 (19,7%) en IA immédiate,
- 1 017 (9%) en IA réfrigérée sur place,
- 3 421 (30,3%) en IA réfrigérée transportée,
- 4 629 (41%) en IA congelée.

La diffusion de l'IA en France s'est heurtée à plusieurs problèmes. En effet, les étalons ne sont pas toujours disponibles, car la plupart continuent leur carrière sportive pendant la saison de monte. Les juments ne sont pas non plus toujours à proximité des étalons qui intéressent leurs propriétaires. Il a donc fallu trouver une solution pour différer l'utilisation de la semence de sa récolte. C'est ainsi que l'on a commencé à refroidir la semence d'étalon.

Cependant il existe un inconvénient majeur : les étalons possèdent une grande variabilité individuelle quant à l'aptitude de leur semence à être conservée. Deux solutions permettent de différer l'utilisation de la semence : la **réfrigération** et la **congélation**. Or, d'après les Haras Nationaux, seulement 40% des étalons de trait et 75% des étalons de sang seraient utilisables en sperme réfrigéré (<12h) tandis que 85% des étalons de sang seraient utilisables en sperme congelé [Vidament, 2005c].

La réfrigération évite certaines contraintes liées à la congélation (possession de cuves à azote, préparation des paillettes, chocs de congélation/décongélation), mais ce terme regroupe une grande diversité de techniques mises au point pour obtenir une conservation optimale des spermatozoïdes.

1.2. Les différents modes de conservation

1.2.1. *Définitions*

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

1.2.2. *Inconvénients de la conservation*

Certains étalons (dénommés « poor coolers ») subissent une baisse de leurs résultats de mobilité ou de fertilité suite à la conservation de leur semence, tandis que d'autres (dénommés « good coolers ») ne sont pas affectés [Brinsko et al., 2000a]. Ce phénomène est peut-être dû à des modifications des membranes regroupées sous le terme de « cold shock », mais sans relation avec les phénomènes ayant lieu au cours de la congélation : en temps normal, la bicouche phospholipidique que constitue la membrane cellulaire du spermatozoïde – comme celle de chaque cellule – est dite « fluide », c'est-à-dire que ses constituants (cholestérols, protéines) circulent librement au sein des phospholipides. Cependant, Parks et Lynch (1992) ont mesuré une température de transition de ces phospholipides à 20,7°C pour l'étalon, ce qui se traduit par une perte de fluidité et une désorganisation de la membrane aboutissant à la création de nouveaux pores. Ainsi, la perméabilité cellulaire est augmentée et le spermatozoïde ne peut plus maintenir son homéostasie d'où, à terme, la mort de la cellule. L'intensité de ce phénomène, commençant à 20°C est inversement corrélée à la température finale. Elle serait, de plus, dépendante de la vitesse de descente de température et de la capacité des spermatozoïdes à y résister. En effet, le refroidissement n'a pas les mêmes conséquences sur les gamètes d'un étalon à un autre.

Les techniques de conservation de la semence sont donc à étudier avec attention afin de trouver l'optimum, compte-tenu des capacités de résistance des spermatozoïdes équins. C'est ce que nous proposons d'étudier dans cet essai.

2. Préparation de la semence

2.1. Caractéristiques du sperme

Pour les étalons de sang (moyenne sur 222 étalons des Haras Nationaux), les caractéristiques du sperme sont regroupées dans le tableau 1 [Haras nationaux, 2004].

Tableau 1 : Caractéristiques séminales de 222 étalons de sang des Haras Nationaux

Volume (ml)	40,5 +/- 20,0
Concentration (10⁶ spermatozoïdes/ml)	155 +/- 71,0
Nombre total (10⁹ spermatozoïdes)	5,6 +/- 3,0
pH	7,35 + 0,20
% de spermatozoïdes vivants	76,2 +/- 9,8

Le plasma séminal, produit en grande partie par les glandes annexes (et les cellules de l'épididyme pour une faible part), est nécessaire à la capacitation et à la nutrition des spermatozoïdes, mais **ses implications sont nombreuses et complexes**.

En effet, Calvet et al. (1994) expliquent que des spermatozoïdes prélevés dans l'épididyme sont capables de féconder des ovocytes sans passage dans l'utérus et sans qu'il soit nécessaire d'induire une réaction acrosomique (RA), alors que des spermatozoïdes éjaculés n'acquiescent cette capacité qu'après avoir traversé le tractus génital femelle. Dans cette même étude, il est montré que la majorité des **protéines du plasma séminal** de cheval forment **un agrégat** autour du spermatozoïde.

Cet agrégat protéique empêcherait une capacitation trop précoce des spermatozoïdes, afin de préserver leurs moyens de défense jusqu'à l'ovocyte. De plus, le sperme constitue un élément étranger que l'utérus tente de rejeter par l'intermédiaire d'une **réaction inflammatoire** [Troedsson et al., 2001a]. On observe en effet un afflux de cellules polynucléaires neutrophiles en réponse à la présence des spermatozoïdes. Différentes études ont montré que les protéines du plasma séminal de mammifères limitent ce chimiotactisme, ainsi que la capacité d'adhésion des leucocytes vis-à-vis des spermatozoïdes [Troedsson et al., 2004 et 2001b].

Enfin, lors d'une insémination, ou a fortiori lors d'une saillie, une grande quantité de spermatozoïdes est déposée dans l'utérus. Or, sur cette impressionnante population (10⁶ à 10⁹ spermatozoïdes), peu (10² à 10³) arrivent finalement au site de fécondation qu'est la jonction

utéro-tubaire (JUT) [Ball, 2004]. Il est possible de constater une augmentation de la proportion de spermatozoïdes mobiles et normaux dans la zone de la JUT [Ball, 2004]. Celle-ci joue certainement un rôle important dans cette **sélection**, de même que dans la constitution d'un **réservoir de spermatozoïdes**, dans l'attente de l'arrivée de l'ovocyte. En effet, il se produirait une adhésion entre les cellules de l'oviducte et les gamètes. Ce phénomène empêcherait la fin de la capacitation des spermatozoïdes par le maintien d'un taux de calcium intracellulaire suffisamment bas, jusqu'au moment de la fécondation [Troedsson et al., 1998 ; Ball, 2004]. Le plasma séminal aurait une action néfaste sur cette adhésion. Mais ceci n'est pas gênant dans les conditions naturelles car, au fur et à mesure de l'ascension des gamètes, le plasma séminal est éliminé par l'utérus.

La survie des spermatozoïdes et le maintien de leur pouvoir fécondant dépendent de nombreux facteurs. La **dilution**, le **dilueur**, la quantité de **plasma séminal**, le **temps** et la **température** de conservation, la **stratégie d'insémination**, sont les principaux éléments à prendre en compte pour assurer une bonne fertilité lors de l'utilisation de la semence conservée.

2.2. 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, 1997a] et son pouvoir fécondant est en grande diminution. Ceci est dû à deux phénomènes d'importance égale :

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

Le plasma séminal est donc essentiel dans la physiologie de la reproduction, mais il devient gênant lorsqu'on essaie de modifier l'ordre des choses.

En effet, il a été montré que, lorsqu'il est en trop grande concentration dans la semence conservée, il est néfaste pour les spermatozoïdes sans que nous connaissions à l'heure actuelle les raisons de cette toxicité. Plusieurs techniques ont alors été mises au point pour diminuer la concentration du plasma séminal lors de la conservation.

2.2.1. Méthodes de dilution

La première utilise un **vagin ouvert** pour ne récolter que la fraction riche de l'éjaculat. En effet, les 3 premiers jets de l'éjaculat contiennent 75% des spermatozoïdes [Brinsko et al., 2000a], car la majorité des productions des glandes annexes ne vient qu'ensuite. Cette pratique, couramment réalisée en Finlande, permet d'éliminer la quasi-totalité du « gel » (fraction gélatineuse de l'éjaculat, riche en acide citrique et en potassium, produite par les vésicules séminales). Les inconvénients de cette technique (l'habileté et le nombre de personnes nécessaires, ainsi qu'une petite réduction de la quantité de spermatozoïdes récoltés) l'ont cantonnée à une utilisation plus limitée en France.

Une autre approche consiste donc à **centrifuger** la semence, mais il a été montré qu'un retrait total du plasma séminal causait une baisse de la mobilité [Jasko et al., 1991] et qu'au moins 15% des spermatozoïdes étaient perdus au cours des manipulations. Brinsko et al.

(2000a) ont observé de plus que la centrifugation n'a été bénéfique que pour les étalons dits « poor coolers ». Les étalons dont la semence était peu affectée par la conservation (les « good coolers ») n'ont donc pas obtenu de meilleurs résultats après centrifugation de leur semence. En outre, des effets néfastes de la centrifugation sur la mobilité peuvent être mis en évidence, dépendant bien sûr de la vitesse de rotation et du temps de centrifugation, mais aussi de la présence ou non de dilueur avant centrifugation et du type de dilueur utilisé [Brinsko et al., 2000a].

Une autre méthode, plus usitée, consiste à **diluer de façon importante** l'éjaculat entier (5 à 20% selon Katila (1997a)). Certains étalons – à concentration faible en spermatozoïdes ou ne possédant pas assez de spermatozoïdes ayant une mobilité progressive (= PMS pour Progressive Motile Sperm) – ne peuvent néanmoins pas profiter de ces solutions, car elles engendreraient des doses d'insémination de trop grand volume avec une concentration en spermatozoïdes trop faible.

2.2.2. *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 à l'heure actuelle sont (tableaux 2 à 4) :

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

Tableau 2 : 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
Streptomycine	1,5g
Pénicilline	1,5 millions UI

Tableau 3 : Composition de l'INRA96 (IMV, L'Aigle, France) pour 1l

CaCl ₂	0,14g
KCl	0,4g
KH ₂ PO ₄	0,06g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2g
NaCl	1,25g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	0,118g
NaHCO ₃	0,35g
HEPES	4,76g
Glucose C ₆ H ₁₂ O ₆	13,21g
Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ H ₂ O	45,39g
Eau distillée stérile	q.s.p. 1 l
Pénicilline	50 000 UI
Gentamycine	50 mg
Puis	
Phosphocaséinate	27g/l

Tableau 4 : Composition du Tyrode modifié (pour 0,1l)

NaCl	0,42g
KCl	0,187g
NaHCO ₃	0,21g
Na ₂ HPO ₄	0,005g
Lactate de sodium 60%	0,310 l
CaCl ₂	0,029g
MgCl ₂	0,008g
HEPES	0,238g
Pyruvate de sodium	0,011g
BSA	0,6g
Eau distillée stérile	q.s.p. 0,1 l

KMT =
65% Kenney + 35% Tyrode modifié

Grâce à leurs composants, les dilueurs assurent aussi un contrôle de la multiplication bactérienne, une protection des membranes vis-à-vis des radicaux libres et un apport en substrats nutritifs [Katila, 1997a]. Leur osmolarité et leur pH doivent être proches de ceux du sperme, c'est-à-dire 300 mOsm/L avec un pH de 7,4 à 7,6. Pour la plupart des dilueurs, l'osmolarité se situe entre 280 et 450 mOsm/L avec un pH de 6,6 à 7,0 [Katila, 1997a]. Même si les mécanismes de protection des membranes restent encore obscurs, le fractionnement du lait par différentes méthodes (microfiltration, ultrafiltration, ...) a permis de les comprendre un peu plus. En effet, le principal inconvénient des substances telles que le lait, réside dans la complexité de leur composition. Ainsi, même si elles contiennent des éléments favorables à la conservation des spermatozoïdes, elles renferment aussi des composants toxiques, d'où l'intérêt d'en isoler les fractions les plus protectrices. Parmi celles-ci, le phosphocasinat natif (PPCN) et la β -lactoglobuline se sont révélés être les plus performants pour la conservation de la semence équine réfrigérée [Batellier et al., 1998 ; Batellier et al., 2001], d'où la création de l'INRA96. La formulation de ce dilueur a été établie non seulement sur la base des résultats de mobilité, mais aussi sur ceux de fertilité de la semence conservée.

2.3. Conservation de la semence

2.3.1. Température

Il n'est pas possible de garder les spermatozoïdes à la température du corps car il s'ensuivrait une mortalité cellulaire importante à cause d'une activité métabolique intense [Varner et al., 1988]. La durée de stockage de la semence peut être augmentée en ajoutant un dilueur approprié et en abaissant la température. Cependant, il est très difficile de définir une température optimale à partir des études réalisées car de nombreuses variations de protocole sont observées concernant le dilueur utilisé, les conditions d'aérobiose et la durée de réfrigération. Néanmoins, que ce soit dans un dilueur à base de lait ou dans du Kenney, il semble que la température optimale soit autour de 4-5°C pendant 24 heures de conservation [Palmer, 1984 ; Varner et al., 1988 ; Varner et al., 1989 ; Zidane et al., 1991]. En effet, il a été montré que dans le Kenney, la mobilité des spermatozoïdes après 24 heures n'était pas meilleure lorsque la température était inférieure (0-2°C) [Varner et al., 1989].

Lorsque le temps de conservation est plus court [Province et al., 1985] ou que la conservation est réalisée en aérobiose [Batellier et al., 1998 ; Batellier et al., 2001], la température optimale serait plutôt aux alentours de 10-15°C. L'hypothèse qui est faite permettant d'expliquer ce phénomène est la suivante : l'intense métabolisme des spermatozoïdes à 15°C, faisant intervenir la respiration cellulaire et donc le cycle de Krebs, nécessiterait un apport en oxygène. Ce mode de conservation serait alors une alternative pour les « poor coolers ».

En pratique, en accord avec la littérature, la semence équine est le plus souvent conservée à 4°C, en anaérobiose, pendant 24 heures (aux USA), bien que la majorité des doses soient utilisées dans les 12 heures en France. Cependant, la semence peut parfois être conservée plus longtemps : certains auteurs ont ainsi obtenu un taux de gestation de 75% après conservation avec des dilueurs à base de lait pendant 40-48 heures, de 77% au bout de 70 heures et de 57% au bout de 80 heures [Heiskanen et al., 1994a et b]. Chacun de ces articles présente cependant l'inconvénient de ne porter que sur un faible nombre de cycles.

Dans une autre étude considérant un nombre un peu plus conséquent de cycles (52), Batellier et al. (2001) obtiennent une fertilité de 48% au bout de 72H, dans de l'INRA 96.

2.3.2. *Vitesse de refroidissement*

Comme le montrent les étalons « poor coolers », la chute de température, bien que nécessaire à la conservation, n'est pas inoffensive. La première étude sur ce sujet [Douglas-Hamilton et al., 1984] a montré qu'en partant de 37°C, les vitesses de -1°C/min et -0,5°C/min altéraient la mobilité des spermatozoïdes. Ces constatations ont conduit les auteurs à créer l'Equitainer ND, boîte de transport de la semence, qui assure une vitesse de descente initiale de -0,3°C/min, sachant qu'elle ne peut ensuite que diminuer (cf. le paragraphe suivant). Des études plus récentes, menées avec un dilueur à base de lait [Kayser et al., 1992 ; Moran et al., 1992] ont montré que la descente idéale pour la mobilité des spermatozoïdes devait être rapide de 37°C à 20°C, puis lente (-0,05°C par minute) de 19-20°C jusqu'à 8°C, puis de nouveau rapide jusqu'à 4°C. Ceci est en accord avec les conclusions mentionnées précédemment sur la fluidité membranaire. Cependant, ces conditions sont difficiles à remplir sur le terrain.

En fait, les doses sont véhiculées dans des glacières électriques ou dans des réfrigérateurs embarqués dans les véhicules ou encore dans **des boîtes de transport** contenant un système de refroidissement passif – c'est-à-dire des packs remplis d'un liquide congelé – dont l'objectif est de maintenir la semence à des températures voisines de 4°C pendant un maximum de temps (environ 24h pour la plupart de ces dispositifs). Ceci implique une courbe de descente en température en forme d'exponentielle inversée car l'écart entre la température de la semence et celle du glass-pack diminue. Ainsi, la vitesse de descente varie au cours du **temps** mais aussi en fonction des **conditions environnementales** et du **volume** de semence stockée. L'Equitainer est la boîte la plus utilisée à l'heure actuelle grâce à ses performances mais elle présente l'inconvénient d'être coûteuse. Elle implique donc un investissement initial et un retour des boîtes après l'utilisation de leur contenu. Depuis quelques années, plusieurs sociétés ont mis au point et commercialisé des boîtes jetables moins coûteuses, mais est-ce au prix de leur efficacité ? Les études concernant ces systèmes de refroidissement passif sont diverses, chacune comparant une ou plusieurs de ces nouvelles boîtes à l'Equitainer en fonction des conditions de température extérieure [Nunes et al., 2007 ; Brinsko et al., 2000b ; Katila, 1997a]. Les résultats révèlent, pour la plupart, que les vitesses de descente sont rapides (jusqu'à 3,6°C/min) entre 37°C et 20°C, puis plus lentes jusqu'à 15°C (jusqu'à -0,3°C/min). La majorité des études montrent que l'Equitainer est la boîte dont la température intérieure est la plus indépendante de la température extérieure et ceci selon plusieurs paramètres : la **température minimale** atteinte, le **temps** passé à ce minimum, et bien sûr la **courbe de descente** de température. L'influence de toutes ces variations sur la mobilité après conservation de la semence est controversée [Brinsko et al., 2000b ; Katila et al., 1997b]. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à la fertilité des doses ainsi stockées alors qu'il est reconnu que la température et la durée de conservation sont des facteurs qui l'influencent.

3. Evaluation de la qualité de la semence réfrigérée

3.1. Conséquences de la conservation

Une fois la conservation assurée, il est utile de s'intéresser au nombre de spermatozoïdes nécessaires pour obtenir une gestation.

Dans ce domaine, les recommandations [Brinsko, 2006] diffèrent d'un pays à l'autre. Pour du sperme frais, il est à peu près établi qu'une dose de 100 millions de spermatozoïdes ayant une mobilité progressive (= PMS pour Progressive Motile Sperme) est un optimum, si la fertilité de l'étalon est bonne, le temps de conservation inférieur à 12h et le suivi des juments correctement mené. Sinon, il est possible d'obtenir une fertilité identique, mais avec des doses allant jusqu'à 500 millions de PMS. C'est-à-dire que la quantité de spermatozoïdes inséminés peut compenser partiellement une défaillance d'un de ces facteurs. Par contre, toujours selon le même auteur, une dose de 50 millions de PMS réduit dans tous les cas la fertilité. Sachant maintenant que pour de la semence réfrigérée – et non pas congelée – il y a une perte de 50% environ de la mobilité des spermatozoïdes, il est recommandé d'utiliser des doses d'au moins 200 millions de spermatozoïdes avant conservation [Brinsko, 2006].

Ces recommandations sont de plus modifiées par le type d'insémination. La méthode dite d'insémination en haut de corne, réalisée théoriquement au niveau de la jonction utéro-tubaire (JUT), paraît attrayante car elle permet d'obtenir les mêmes résultats qu'une IA classique mais avec des doses jusqu'à dix fois moindres [Morris et al., 2000]. Il est cependant nécessaire de soulever quelques questions [Vidament, 2005b] :

- avec du **sperme frais**, les résultats sont très variables et dépendent beaucoup de la fertilité de l'étalon et de l'intervalle entre l'insémination et l'ovulation (IA-OV). Cette technique s'appliquerait davantage à des étalons n'ayant pas une production de spermatozoïdes suffisante, sachant que les contraintes sont importantes par rapport au faible avantage procuré (confection des paillettes, suivi échographique intense ...),
- avec du **sperme congelé**, les résultats sont équivalents à ceux obtenus avec une IA classique pour des doses de 50 millions de PMS et un intervalle IA-OV inférieur à 6H. Si l'intervalle est plus long, il est nécessaire d'inséminer sous contrôle endoscopique afin de s'approcher au mieux de la JUT ou d'augmenter la quantité de spermatozoïdes.

Ces résultats sont concordants avec les constatations de Ball (2004) (cf. § 2.2.2.) car en inséminant au niveau de la JUT, les spermatozoïdes ont certes moins de chemin à parcourir, mais une plus grande proportion de plasma séminal y est déposée, ce qui pourrait avoir une incidence sur l'adhésion entre les spermatozoïdes et les cellules de l'oviducte.

Avant conservation, la dose de 200 millions de spermatozoïdes semble donc être efficace, mais le rythme des inséminations est aussi à prendre en compte. Vaut-il mieux inséminer cette dose en une fois ou en plusieurs fois ?

En ce qui concerne la semence réfrigérée à 5°C pendant 24H, Squires et al. (1998) ont montré qu'inséminer deux fois, à 24H d'intervalle, 1 milliard de spermatozoïdes, améliorerait la fertilité par rapport à la même dose (2 milliards de spermatozoïdes) inséminée en une seule

fois. Ceci peut être expliqué de la façon suivante : la sélection opérée au niveau de l’oviducte aboutissant à l’adhésion des spermatozoïdes les plus performants ne minore pas la fertilité avec de la semence fraîche, car le nombre de spermatozoïdes n’est pas un facteur limitant. Cependant, avec de la semence réfrigérée pour laquelle nous avons vu que la mobilité peut diminuer jusqu’à 50%, ré-inséminer, une fois la sélection opérée, permettrait d’augmenter le nombre de spermatozoïdes stockés [Levillain, 2005 ; Vidament et al., 2005a].

De plus, Sieme et al. (2003) ont montré que la fertilité de la semence réfrigérée est meilleure si on insémine entre 24H avant et 12H après l’ovulation, offrant une fenêtre plus étroite que son prédécesseur [Woods et al., 1990]. Ainsi, malgré une durée de vie théorique dans le tractus génital de la jument allant de 1 à 7 jours en fonction des étalons [Sieme et al., 2003], la fenêtre d’IA pour une fertilité optimale est beaucoup plus courte. Il est donc préférable de réaliser plusieurs IA à 24H ou 48H d’intervalle pour obtenir une bonne fertilité.

3.2. Méthodes d’évaluation de la semence

Une bonne fertilité est la concrétisation évidente d’une bonne conservation, mais il est intéressant d’essayer de prédire le pouvoir fécondant. Pour cela, il est possible de se baser sur les caractéristiques physiques de la semence en effectuant un spermogramme. Cependant, certains étalons ont une fertilité diminuée après conservation malgré un spermogramme satisfaisant voire excellent. Jasko et al. (1992a et b) et Kenney et al. (1971) ont montré qu’il était relativement facile d’évaluer **qualitativement** le sperme d’un étalon (sur différents critères tels que la mobilité, la concentration, les anormaux, etc.), mais qu’il était très difficile de prédire **quantitativement** sa fertilité. En effet, chacun des paramètres qualitatifs est plus ou moins corrélé à la fertilité d’un étalon.

D’après Clément (1995) les caractéristiques séminales qui sont plus souvent corrélées avec la fertilité sont :

- la concentration,
- le nombre total de spermatozoïdes,
- le pourcentage de spermatozoïdes mobiles à 0h,
- le pourcentage de spermatozoïdes normaux.

Ainsi, plusieurs tests ont été mis au point pour comprendre un peu plus précisément les discordances entre spermogramme et fertilité et estimer l’intégrité de certaines fonctions indispensables à un spermatozoïde.

3.2.1. *Test de réactivité des membranes*

L'intégrité de la membrane plasmique peut-être affectée par les méthodes de conservation, or elle est essentielle au métabolisme des gamètes – comme de toute cellule. Le test HOS (HypoOsmotic Swelling test) est ainsi utilisé pour la tester chez l'homme depuis les années 1970-80, et a été adapté à l'étalon [Nie et al., 2000]. Son principe est de placer les spermatozoïdes dans une solution hypo-osmotique par rapport au plasma séminal. Dans ces conditions, si la membrane plasmique est intacte, le spermatozoïde se comporte comme un osmomètre : les pores de la membrane permettent le passage des liquides vers l'intérieur de la cellule qui se met alors à gonfler, pour équilibrer les pressions osmotiques. Ce gonflement est visible au niveau du flagelle pour les spermatozoïdes car c'est la seule partie extensible. Au contraire, si la membrane plasmique est lésée, aucun gonflement ne sera visible.

3.2.2. *Test de réactivité des acrosomes*

L'intégrité fonctionnelle de la membrane plasmique ne fait pas tout : une série de changements complexes, incluant des modifications des lipides membranaires et la perméabilité au calcium, sont indispensables pour rendre le spermatozoïde capable de féconder un ovocyte. Ce processus – appelé capacitation – se concrétise par une mobilité accrue et une capacité à réaliser la réaction acrosomique (RA) [Meyers et al., 1995]. La RA commence par un accrochement à la zone pellucide (ZP) de l'ovocyte qui provoque un afflux massif de calcium à l'intérieur du spermatozoïde. Ceci induit la fusion, en de multiples points, de la membrane plasmique du spermatozoïde et de la membrane externe de l'acrosome. Il en résulte la formation de nombreuses vésicules qui se dispersent dans la ZP et y libèrent des enzymes qui en provoqueront l'hydrolyse [Gadella et al., 2001]. Il est possible de provoquer cette RA grâce à différentes molécules pour ensuite l'observer, par exemple par microscopie électronique (M.E.T.) [Varner et al., 2000]. La M.E.T. est la méthode de référence, mais elle est aussi chère et complexe. Elle peut être remplacée par un marquage fluorescent spécifique de la membrane externe de l'acrosome. Ainsi, les modifications de l'acrosome accompagnant la RA sont facilement visibles et par conséquent, on peut estimer le pourcentage de spermatozoïdes ayant réalisé la RA.

Les tests décrits ci-dessus sont donc des moyens efficaces pour juger l'état de la semence après conservation, mais aucun n'est pour l'instant corrélé directement à la fertilité des étalons.

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

1. Objectifs

L'envoi de doses de semence par la poste ou par transporteur nécessite l'utilisation d'un container passif. L'Equitainer est un container passif très performant permettant d'envoyer un maximum de 8 doses au même endroit. Cependant, ce dispositif est très coûteux (360 euros environ), ce qui oblige un envoi retour pour le récupérer. Il existe différentes boîtes jetables d'un prix peu élevé (8 à 15 euros). Mais les performances thermiques de ces boîtes sont inférieures car elles dépendent de la température extérieure.

En France, pendant la saison de monte, la température extérieure peut être extrêmement contrastée (parfois de 0 à 20°C dans la même journée). Différentes études menées avec des boîtes jetables ont montré que des écarts de température élevés avec le dilueur de Kenney (très utilisé aux USA) ne semblaient pas préjudiciables à la mobilité des spermatozoïdes, même quand la température était proche de 0 à 1°C [Katila et al., 1997a ; Brinsko et al., 2000b]. Cependant, la fertilité n'a pas été mesurée dans ces conditions.

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier les caractéristiques et la fertilité de la semence conservée dans ce type de boîtes soumises à différentes températures (de 0 à 15°C). Cette étude a été réalisée en 2 parties : l'une *in vivo* pour l'étude de la fertilité et l'autre *in vitro* pour l'étude de la qualité des spermatozoïdes. Cette étude a été réalisée à la station expérimentale de l'INRA de Tours-Nouzilly, en juillet et août 2007.

2. Matériel et méthode

Quatre températures extérieures ont été testées dans cette étude, afin d'obtenir les températures suivantes dans la semence diluée et conservée dans une boîte de transport jetable:

- quelques heures <0°C puis à 2-3°C au bout des 22 heures → Lot **BAS**
- un minimum de 3°C puis à 7°C au bout des 22 heures → Lot **MOYEN**
- 10°C au bout des 22 heures → Lot **HAUT**
- 15°C au bout des 22 heures → Lot **TRES HAUT**

Le lot MOYEN a constitué un lot témoin puisque ses conditions de conservation étaient proches de celles obtenues à température fixe à 4°C, ce qui est la technique la plus couramment utilisée.

2.1. Procédures générales

2.1.1. Les étalons

Quatre poneys, choisis parmi les étalons expérimentaux de Nouzilly et dénommés MW329, MW233, MW438, MW420 ont été utilisés. Leur fertilité était connue grâce aux résultats d'IA en semence fraîche obtenus en 2006 et 2007. De plus leur spermogramme était

compatible avec une utilisation en sperme transporté pendant 12 heures selon les critères des Haras Nationaux :

- plus de 2,5 milliards de spermatozoïdes par éjaculat,
- plus de 60% de spermatozoïdes mobiles à la récolte (dilution dans le lait),
- puis 40% après 24 heures de conservation à 4°C,
- et 30% après 48 heures de conservation à 4°C, sauf pour MW329,
- proportion de spermatozoïdes anormaux inférieure à 60%,
- un critère a été ajouté : les étalons devaient présenter plus de 40% de spermatozoïdes mobiles après 24 heures de conservation dans l'INRA96 et plus de 30% après 48 heures.

Des spermogrammes ont été réalisés aux printemps 2006 et 2007. Les résultats sont présentés dans les tableaux 14 à 16 en annexe.

Afin que l'échantillon soit représentatif de la population des étalons, il n'y a pas eu de sélection visant à garder les étalons ayant les meilleurs spermogrammes.

2.1.2. Récolte

Les étalons ont été récoltés au moins trois fois de suite dans la semaine précédent leur utilisation pour vider leur réserve extra-gonadique de spermatozoïdes et ainsi avoir une qualité constante de la semence. Une fois le protocole commencé, ils étaient récoltés au moins deux fois par semaine. Pour que la concentration en spermatozoïdes ne diminue pas, les collectes n'étaient pas réalisées deux jours consécutifs pour un même étalon. Les étalons étaient donc collectés par groupe de deux, alternativement.

La récolte se faisait de préférence en début d'après-midi pour des raisons de commodité, sur un mannequin, en présence d'une ponette « boute-en-train » et à l'aide d'un vagin artificiel fermé de type Colorado.

2.1.3. Préparation des doses

Le dilueur utilisé était l'INRA96. Pour éviter des problèmes d'altération de ce milieu dans les flacons de 200 ml après ouverture, l'INRA96 était reconditionné par 5, 10, 20 ou 40 ml et congelé à -18°C pendant au moins 24 heures pour une bonne standardisation. Chaque jour de récolte, 10 ml d'INRA96 par dose à préparer étaient décongelés à température ambiante puis mis à 37°C dans un bain-marie.

Une fois récoltée, la semence était immédiatement filtrée sur de la gaze pour en retirer les impuretés et le « gel ». Le volume de l'éjaculat était ensuite évalué. La concentration de l'éjaculat était mesurée au spectrophotomètre, préalablement étalonné, sur un mélange de 0,1 ml de sperme dans 3,9 ml de formaldéhyde à 5% (ou de sérum physiologique). La mesure était effectuée deux fois de suite pour qu'on en fasse ensuite la moyenne. Le sperme était dilué afin d'obtenir des doses de 200 millions de spermatozoïdes dans un volume total de 10 ml. Deux gouttes de sperme dilué étaient observées au microscope (objectif 10), sur platine chauffante, afin d'en évaluer la mobilité.

Les doses étaient conditionnées dans des seringues standards de 20 ml (sans piston caoutchouc), préalablement placées dans une étuve à 37°C, et sans air, puis fermées par un bouchon.

2.1.4. La réfrigération des doses

Les seringues étaient ensuite placées par deux dans une boîte de transport Minitüb Neopor grise (Minitüb, revendu par Equi-land, Ecausseville, France) de la manière suivante avec 2 glass pack préalablement placés à -18°C pendant plus de 24 heures. Chaque boîte était individuellement emballée dans un carton. La boîte jetable Minitüb grise a été choisie car elle est présente sur le marché depuis plusieurs années. Nous avons ainsi pu constater sa qualité malgré sa relative simplicité par rapport à un Equitainer. De plus, elle n'a pas encore de concurrente sur le marché français. Les figures 1 et 2 ci-contre présentent des photos expliquant le dispositif et la mise en place des doses.

Puis les boîtes étaient placées dans les enceintes de conservation.

2.1.4.1. Les enceintes de conservation

Différentes enceintes ont été utilisées afin de soumettre les boîtes aux 4 températures. Les différentes enceintes sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Les différentes enceintes et leurs caractéristiques thermiques

Lot	BAS	MOYEN	HAUT	TRES HAUT
Type d'enceinte	Aqualytic ventilée	Aqualytic ventilée	Memmert étuve	Lekeux Etuve
Température à laquelle la boîte est mise	7°C	16-18°C	26-29°C	34-44°C
Température extérieure « schématique »	7°C	17°C	27°C	37°C
Température minimale de la semence atteinte en *	- 1 à 0°C 3 h	3 – 5,5°C 2 h 30	7 - 8,5°C 2 h 10	10,5 – 12,5°C 2 h
Température de la semence à 22h	2,3 - 3,3°C	6 - 8°C	9 – 10,8°C	14 - 16°C

* le moment de la température minimale est approximatif

Figure 1 : Photo des doses en place dans la boîte de transport



Figure 2 : Photo de la boîte de transport en cours de fermeture



Pour la première expérience, deux enceintes seulement étaient à notre disposition en permanence :

- 1 enceinte AQUALYTIC (étuve ventilée permettant des températures de +4°C à +40°C) utilisées pour les lots BAS et MOYEN et pouvant contenir quatre boîtes Minitüb (soit huit doses maximum),
- 1 étuve non ventilée Memmert utilisée pour le lot HAUT ne pouvant contenir qu'une boîte Minitüb (soit deux doses maximum et du même étalon).

Pour la deuxième expérience, deux enceintes supplémentaires étaient disponibles :

- 1 autre enceinte AQUALYTIC utilisée pour le lot MOYEN,
- 1 étuve non ventilée Lekeux utilisée pour le lot TRES HAUT.

Il a ainsi été possible de répartir l'éjaculat du jour simultanément dans les 4 lots, mais seulement pour cette deuxième expérience.

Ces contraintes de place dans les étuves au cours de la première expérience ont conditionné le nombre maximal de ponettes qu'il était possible d'inséminer en une journée. Ainsi, sachant que, dans un même lot, chaque éjaculat n'était utilisé que pour trois ponettes afin de minimiser un éventuel effet éjaculat lié aux variations de qualité de sperme, il était possible d'inséminer au maximum huit ponettes, avec des doses provenant de deux étalons, dans deux lots différents :

- 1 étalon fournissant deux doses dans le lot HAUT et 3 doses dans le lot MOYEN ou BAS en fonction du besoin du jour,
- le deuxième fournissant 3 doses dans le lot MOYEN ou BAS en fonction de ce qui avait été décidé pour l'autre étalon.

Dans les faits, il était plus fréquent de n'utiliser qu'un étalon par jour. Il est en effet préférable que toutes les IA concernant un étalon soient réalisées dans un laps de temps court afin que la semence soit la plus similaire possible d'un éjaculat à l'autre. De plus le nombre de ponettes prêtes à être inséminées ne permettait pas toujours d'utiliser deux étalons.

2.1.4.2. Suivi des températures

Surveillance de la température dans les étuves :

- Un thermomètre à mercure était placé systématiquement dans l'étuve Memmert ainsi qu'une sonde OTLM (définition ci-dessous) dépouillée régulièrement, étant donné le système de réglage de la température par une molette externe.
- L'AQUALYTIC, possédant une sonde interne avec thermostat (et affichage digital), avait une température plus constante et n'était donc pas surveillée systématiquement.
- L'étuve Lekeux (achat avant 1980) chauffait brutalement toutes les 2h, produisant alors un écart de 10 °C entre le minimum et le maximum. D'où la nécessité de bien surveiller la température de cette étuve et des doses conservées. Ainsi, étaient systématiquement présents dans cette enceinte :
 - o le thermomètre au mercure dans une bouteille de 1L remplie d'eau,
 - o l'OTLM.

Surveillance de la température des doses :

Par jour de récolte, un thermocouple était placé, pour un des lots et de façon aléatoire, dans une seringue d'eau si une place était disponible ou scotché contre une seringue de semence le cas échéant. La finesse du fil de cuivre reliant la sonde thermocouple à l'afficheur digital externe a permis de surveiller en temps réel la température à l'intérieur des doses sans modifier leur comportement. Les températures étaient relevées, au mieux, entre T0 et T4h pour visualiser le minimum, puis à l'ouverture de la boîte pour estimer la température en fin de conservation.

OTLM et dépouillement :

Une sonde OTLM est une sonde Tinytalk de la marque Gemini, dont les caractéristiques techniques sont en annexe. Une photo en annexe 4 (ainsi que sa fiche technique) permet de visualiser l'appareil. C'est en fait un petit circuit imprimé muni d'une batterie, d'un thermocouple (composant électronique dont la résistance varie en fonction de la température à laquelle il est soumis), et d'une mémoire, le tout dans une coque de protection. Il permet ainsi de mesurer la température ambiante (avec une période réglable, ici toutes les 10 minutes) et d'enregistrer sa valeur. Le modèle dont nous disposions permettait de conserver 16 000 mesures, soit plusieurs mois d'enregistrement avec la période que nous utilisions. Les mesures stockées étaient accessibles via un ordinateur, qui permet ensuite de traiter les données.

Il est aussi possible de relier ce Tinytalk à une sonde dont la taille nous a permis de l'insérer dans une seringue. Nous avons ainsi pu établir des courbes de descente en température, dont par exemple celles du paragraphe 3.2.2.

2.2. Expérimentation in vivo

2.2.1. Introduction

Au cours de cette expérimentation, nous nous sommes intéressés à la fertilité des doses des 4 étalons, conservées à 3 températures différentes (lots BAS, MOYEN et HAUT). Pour chaque étalon et chaque lot, 8 ponettes étaient inséminées une seule fois, avec un intervalle entre l'IA et l'ovulation (IA-OV) constant. Ce qui correspond à un schéma expérimental du type :

4 étalons X 8 cycles X 3 lots, soit un total de 96 cycles étudiés.

Un éjaculat du même étalon pouvait servir pour plusieurs ponettes le même jour, mais pas plus de 3 dans le même lot afin de minimiser l'influence éventuelle (positive ou négative) d'un des étalons au sein d'un lot.

Les récoltes concernant cette expérimentation se sont déroulées du 18/06/2007 au 25/07/2007.

2.2.2. *Suivi des juments*

Les cycles œstraux utilisés étaient des cycles naturels spontanés. L'IA devant être exécutée avant l'ovulation, un suivi gynécologique des ponettes a été réalisé par palpation et échographie transrectales régulières puis quotidiennes dès qu'un follicule avait atteint un diamètre de 28mm.

L'ovulation a été induite lorsqu'un follicule avait atteint 33mm de diamètre, par une injection intraveineuse de 15 mg de CEG (Crude Extract Gonadotrophine = extraits hypophysaires équin à effet LH) réalisée à 15h00. Ce traitement induit l'ovulation dans les 36 heures dans 80% des cas [Duchamp et al., 1987].

De plus, des signes de chaleur devaient être présents :

- utérus mou à la palpation transrectale,
- utérus hétérogène (aspect en roue de charrette ou en quartier d'orange) à l'échographie,
- éventuellement un col ouvert à la palpation transrectale (ou vaginale en cas de doute).

L'ovulation était contrôlée environ 18 heures après IA. Si elle n'avait pas eu lieu, le cycle était sorti du protocole, mais le suivi de la ponette continuait. Si elle ovulait dans les 48 heures et que la fécondation avait lieu, la ponette était éventuellement conservée pleine pour le renouvellement du troupeau.

2.2.3. *Attribution des lots*

Chaque jour, les ponettes susceptibles d'être inséminées le lendemain étaient attribuées à un étalon. Le nombre adéquat de doses était ainsi préparé en fonction des enceintes disponibles. Chaque ponette était ensuite inséminée avec une dose d'un lot donné, dans l'ordre de son inscription (phénomène aléatoire). Si une ponette avait ovulé le matin avant l'IA, elle était écartée du protocole.

En cas de double ovulation (phénomène rare chez la ponette), le cycle était écarté afin de ne pas augmenter artificiellement la fertilité du cycle.

2.2.4. *Insémination*

Avant chaque IA, la mobilité du sperme était contrôlée grâce à l'analyseur de mobilité IVOS (cf. §2.3.3.) afin d'éviter d'inséminer des ponettes avec de la semence ayant une mobilité nulle.

Par ponette, une seule IA était réalisée à 11h00, le lendemain de l'induction au CEG, afin d'avoir un intervalle IA-OV de 17 heures environ.

Les doses étaient sorties des boîtes de transport pour être placées dans une boîte polystyrène à température ambiante et transportées jusqu'au lieu d'insémination, situé à 100m du laboratoire.

Après lavage de la vulve, une insémination simple dans le corps de l'utérus, près du col, était effectuée à l'aide d'un cathéter standard IMV, stocké à température ambiante.

2.2.5. *Synthèse sur les horaires et intervalles*

Exemples d'horaires :

- J1 13h00 : Récolte et préparation des doses,
- J1 16h00 : Injection du CEG,
- J2 le matin avant les IA : échographies et vérification des follicules présents,
- J2 11h00 : IA,
- J3 04h00 : ovulation espérée 36h après l'injection du CEG,
- J3 dans la matinée : vérification des ovulations.

2.2.6. *Diagnostic de gestation*

Les diagnostics de gestation (DG) ont été réalisés par échographie entre treize et quinze jours après avoir constaté l'ovulation : la présence dans l'utérus d'une vésicule de quelques millimètres de diamètre étant le signe d'une gestation. Un DG négatif était systématiquement contrôlé deux jours plus tard et un DG positif était systématiquement confirmé vingt jours plus tard.

Les gestations non désirées étaient interrompues par une injection de 125 µg de cloprosténol (Estrumate ND, Schering Plough, Levallois-Perret, France) éventuellement associée à un écrasement manuel de la vésicule embryonnaire si la ponette était réutilisée dans le protocole, afin d'éviter une interaction entre le vestige de la vésicule et le sperme inséminé au cycle suivant.

2.3. *Expérimentation in vitro*

2.3.1. *Introduction*

Au cours de cette expérience, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques *in vitro* de 2 éjaculats des 4 étalons (conservés à 4 températures différentes : lots BAS, MOYEN, HAUT et TRES HAUT). Les éjaculats étaient divisés, comme l'indique la suite, de sorte à pouvoir faire à chaque fois tous les tests sur le même éjaculat. Le schéma expérimental était donc :

4 étalons X 2 éjaculats X 4 lots.

Les récoltes concernant cette expérimentation se sont déroulées du 13/08/2007 au 12/09/2007.

2.3.2. *Protocole*

Après 22 heures de conservation, les quatre boîtes étaient mises à température ambiante, puis le contenu des seringues réparti comme suit après homogénéisation en apportant un peu d'air :

- 8,5 mL dans un tube Corning, placé par la suite en incubation à 37°C,
- 2,5 mL conservés de nouveau 5 à 10 min dans les boîtes refermées et à température ambiante, sans avoir chassé l'air restant dans la seringue.

Toutes les 2 minutes et dans un ordre aléatoire, une des seringues laissées à température ambiante était sortie de sa boîte pour en placer le contenu en incubation à 37°C pendant dix minutes dans un tube de 5 ml. Ensuite deux gouttes par tube étaient analysées par l'IVOS (cf. § 5.3.5.) pour évaluer la mobilité de l'échantillon. Une fois tous les lots traités, une nouvelle série de mesures était effectuée, dans les mêmes tubes laissés à 37°C.

Pendant ce temps, après les dix minutes d'incubation, le contenu des tubes Corning était réparti comme suit pour chaque lot :

- 2 tubes eppendorf remplis de 1 mL pour le test HOS (test de réactivité des membranes),
- 4 tubes de 5 mL remplis avec 1 mL pour la coloration PSA (test de réactivité acrosomique).

2.3.3. *Mobilité*

L'étude de la mobilité a été réalisée grâce à un analyseur automatique de semence, le système Hamilton-Thorne Motility Analyser, IVOS version 10 (figure 3). L'échantillon de 3 µL de sperme à analyser était placé sur une cellule de Makler mise à la température de 37°C puis recouvert d'une lamelle. Le tout était ensuite placé sur la platine chauffante de l'analyseur. L'analyseur comportait un microscope optique automatisé qui formait alors une image captée par une caméra et transmise à un ordinateur qui numérisait l'image. Les dimensions, déplacements et intensités lumineuses résultant des spermatozoïdes étaient analysés selon des critères définis par l'opérateur.

Les paramètres analysés que nous avons utilisés pour cette expérience étaient (figure 4) :

- VCL : vitesse instantanée sur trajectoire réelle,
- VSL : vitesse progressive : vitesse moyenne sur la trajectoire progressive,
- VAP : vitesse lissée, en µm/sec : cela correspond à la distance parcourue par la position moyenne de la tête du spermatozoïde calculée sur 5 positions consécutives par unité de temps définie par l'opérateur,
- STR (= rectitude) : rapport entre la vitesse progressive (VSL) et la vitesse lissée (VAP),
- ALH : amplitude latérale de la tête (en µm) : déplacement de la tête sur la trajectoire lissée,
- RAPID : c'est le pourcentage de spermatozoïdes ayant une vitesse lissée (VAP) supérieure à 30 µm/sec,
- PROG (=PMS) : pourcentage de spermatozoïdes progressifs, c'est-à-dire pourcentage de spermatozoïdes dont la VAP est supérieure à 30 µm/sec, et dont la trajectoire avait une rectitude (STR) supérieure à 80%.

Figure 3 : Schéma du principe de l'analyseur de mobilité de la semence

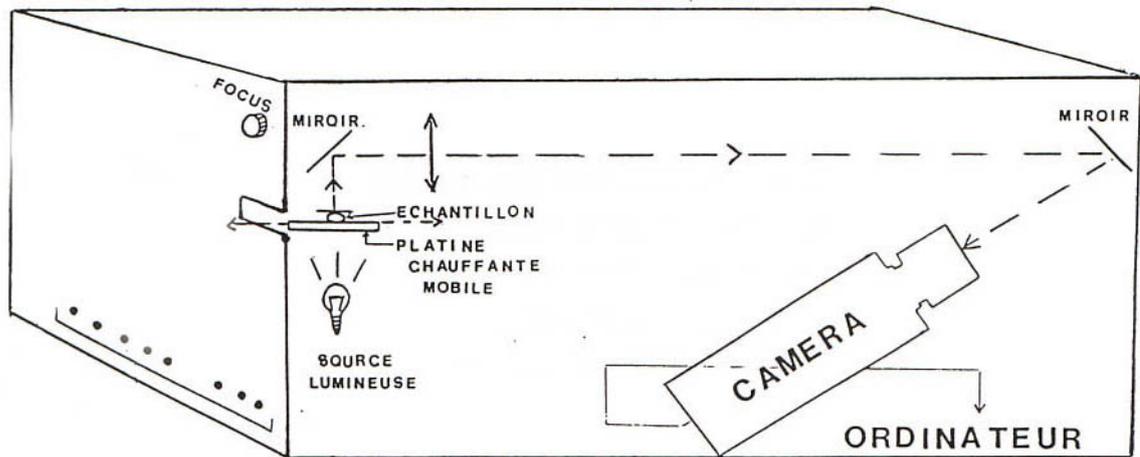
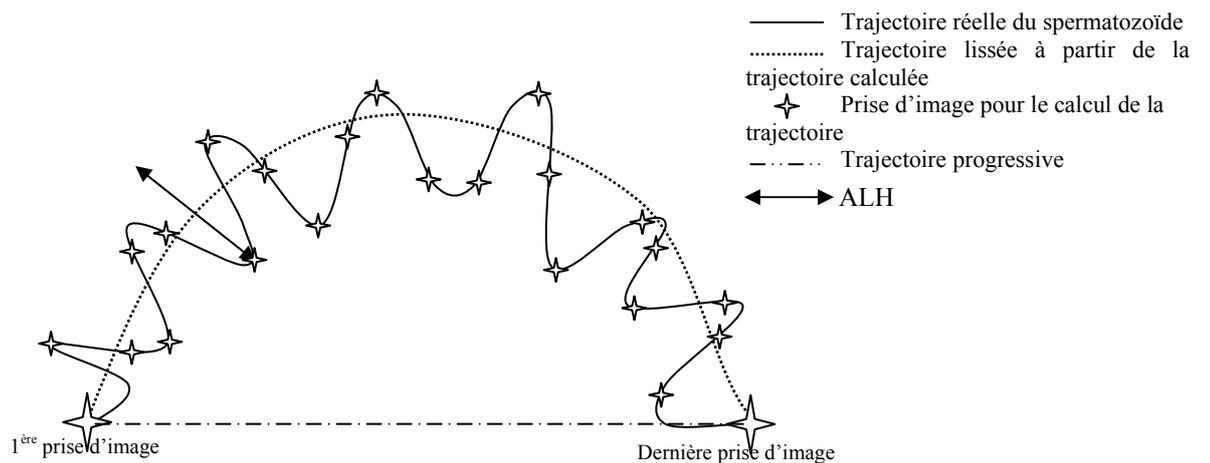


Figure 4 : Définition schématique des paramètres mesurés par l'analyseur de mobilité

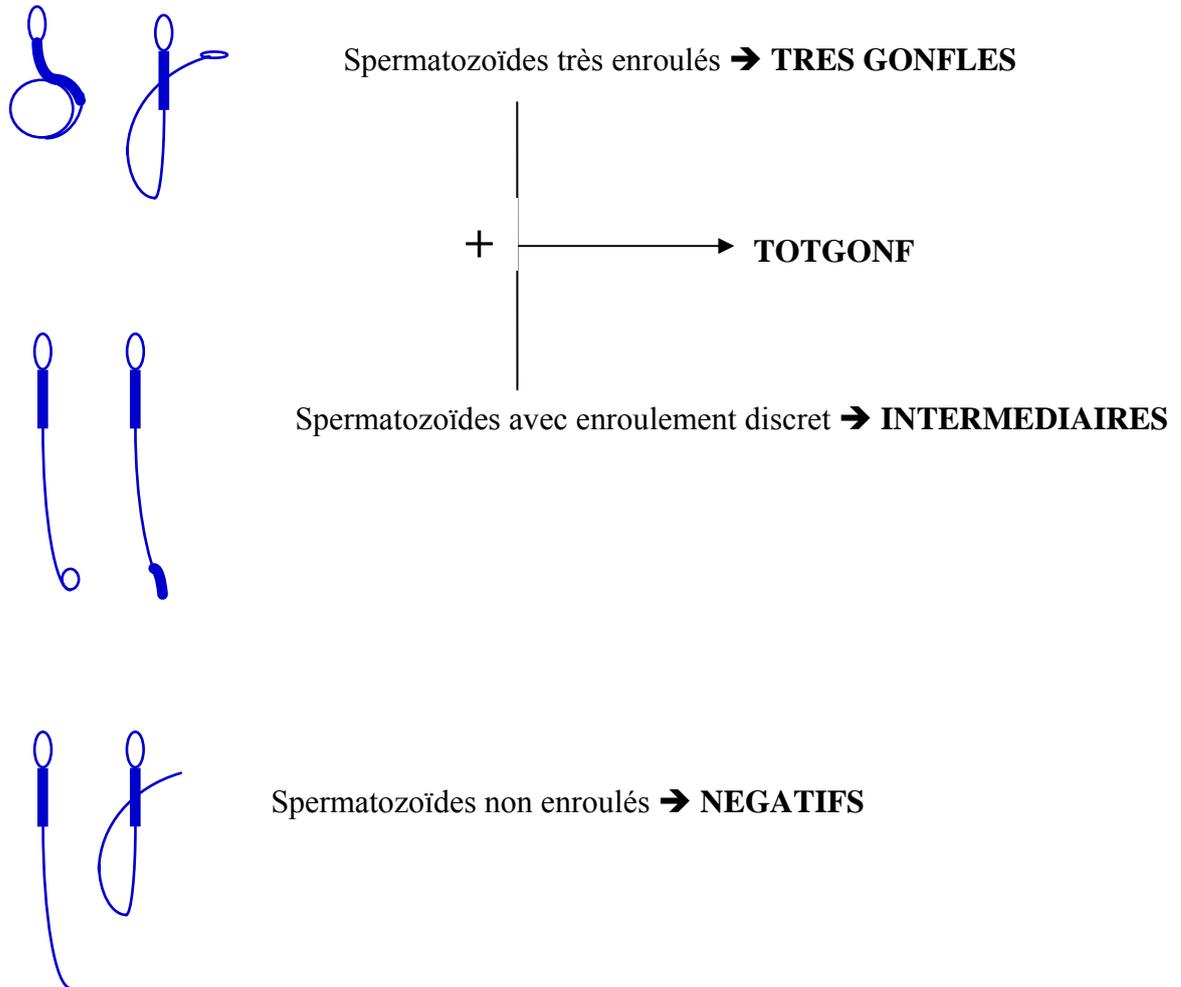


2.3.4. *Test de réactivité des membranes*

Les 2 tubes eppendorf étaient centrifugés à 600g pendant 5 min. Après aspiration du surnageant, le culot était homogénéisé dans 1 ml de Hanks'HEPES à 50 mOsm (HH50), puis incubé pendant 15 min à 37°C. Enfin, les tubes étaient mis à 4°C pendant trente minutes et les lames préparées : à chaque tube correspondait une lame. Deux gouttes du contenu de chaque tube étaient placées entre lame et lamelle puis la lamelle était immobilisée avec du vernis à ongle.

L'interprétation des lames a été faite selon la grille de comptage d'avril 2000, en utilisant 3 catégories : négatifs, intermédiaires, très gonflés. Une lame par tube eppendorf et cent spermatozoïdes par lame étaient comptés par deux personnes. Le comptage était effectué deux fois de suite par chaque personne, pour en faire la moyenne. Si une différence de plus de 10% était observée, le comptage était recommencé de la même façon et une moyenne sur les quatre mesures était effectuée. Les résultats des deux personnes ont été poolés pour donner le résultat par lot et par éjaculat. Les variables retenues étaient TRESGONF (pourcentage de spermatozoïdes très gonflés) et TOTGONF (pourcentage de spermatozoïdes très gonflés + pourcentage de spermatozoïdes intermédiaires) (figure 5).

Figure 5 : Description schématique des différentes catégories d'enroulement des spermatozoïdes suite au test HOS



2.3.5. Test de réactivité acrosomique

Deux des 4 tubes étaient incubés pendant 2 heures à 37°C avec 3,3 microlitres de ionophore (Calcimycine A23187 ref : C7522, Sigma, St Quentin Fallavier, France) 6µM. Les deux autres tubes étaient incubés de la même façon mais sans ionophore et servaient de lot témoin. Suivait la coloration PSA (PSA-FITC ref : L0770, Sigma, St Quentin Fallavier, France) décrite dans le tableau 6.

Tableau 6 : Déroulement de la coloration PSA

Lot témoin : 2 tubes	Lot ionophore : 2 tubes
1 ml/tube de la semence diluée dans l'INRA 96 : concentration 20M spermatozoïdes/ml	
	Ajout de 3,3 µL du ionophore A23187 6µM
Incubation au bain-marie (37°C) pendant 2 heures à l'obscurité	
Centrifugation à 600g pendant 5 minutes	
Resuspension du culot dans 0,5 mL de HH	
Fixation par ajout de 0,5 mL de paraformaldéhyde 2% dans HH	
Incubation 10 minutes à température ambiante	
Centrifugation à 600g pendant 5 minutes	
Resuspension du culot dans 0,5 mL de HH	
Perméabilisation par ajout de 0,5 mL d'éthanol absolu	
Incubation 30 minutes à 4°C	
Centrifugation à 600g pendant 5 minutes	
Resuspension du culot dans 0,5 mL de HH	
Coloration par ajout de 10 µL de PSA/FITC	
Incubation au moins 15 minutes à 4°C à l'obscurité	
Montage de 2 gouttes de 7 µL entre lame et lamelle lutées au vernis à ongle	
Lecture immédiate	

HH : Solution de Hanks'HEPES
 PSA : *Pisum Sativum* Agglutinin
 FITC : Fluorescein iso thiocyanate

Une lame par tube était colorée et cent spermatozoïdes par lame étaient comptés (figure 6). Sachant que pour chaque lot, des doublons étaient systématiquement réalisés, la moyenne des 2 mesures donnait la valeur pour le lot. Si une trop grande différence était observée entre les répétitions, le comptage était recommencé de la même façon, sur les mêmes lames (conservées à 4°C et à l'obscurité). La moyenne des quatre mesures donnait alors la valeur pour le lot.

Les spermatozoïdes ont été classés en 10 catégories (figure 7) :

- 1 : acrosome brillant, intact et homogène, avec un segment équatorial (SE) plus sombre,
- 2 : acrosome brillant, homogène, mais abîmé et avec un SE plus sombre,
- 3 : acrosome pâle, intact, parfois avec des pointillés en bordure et un SE plus brillant,
- 4 : acrosome pâle, intact, mais avec des pointillés et un SE plus brillant,
- 5 : acrosome pâle, abîmé, avec des pointillés et un SE plus brillant,
- 6 : acrosome et post-acrosome verts ou absents,
- 7 : acrosome nuageux avec post-acrosome marqué,
- 8 : acrosome pâle, sans SE et avec un post-acrosome marqué,

Il a été nécessaire de créer les catégories 9 et 10 pour un éjaculat du MW438 qui présentait, par ailleurs, d'excellents résultats en mobilité et pour le test HOS :

- 9 : acrosome brillant, intact et homogène, avec un segment SE plus sombre et un post-acrosome marqué,
- 10 : acrosome brillant, avec des pointillés, un segment équatorial (SE) plus sombre et un post-acrosome marqué.

Trois variables synthétiques ont été créées :

- **Intacts** : ces spermatozoïdes étaient considérés comme n'ayant pas subi de réaction acrosomique. Ils regroupaient les catégories 1, 2 et 9,
- **Réactés (RA)** : ces spermatozoïdes étaient considérés comme ayant subi la réaction acrosomique. Ils regroupaient les catégories 3, 4, 5, 8 et 10,
- **Différence de Réaction Acrosomique (DRA)** : c'est la différence entre le taux de spermatozoïdes ayant réagi après l'induction au ionophore et le taux de spermatozoïdes ayant réagi spontanément (sans induction au ionophore). Ainsi, $DRA = RA_i$ (lot ionophore) – RA_t (lot témoin).

Figure 6 : Photo sous microscope de spermatozoïdes ayant subi la coloration PSA

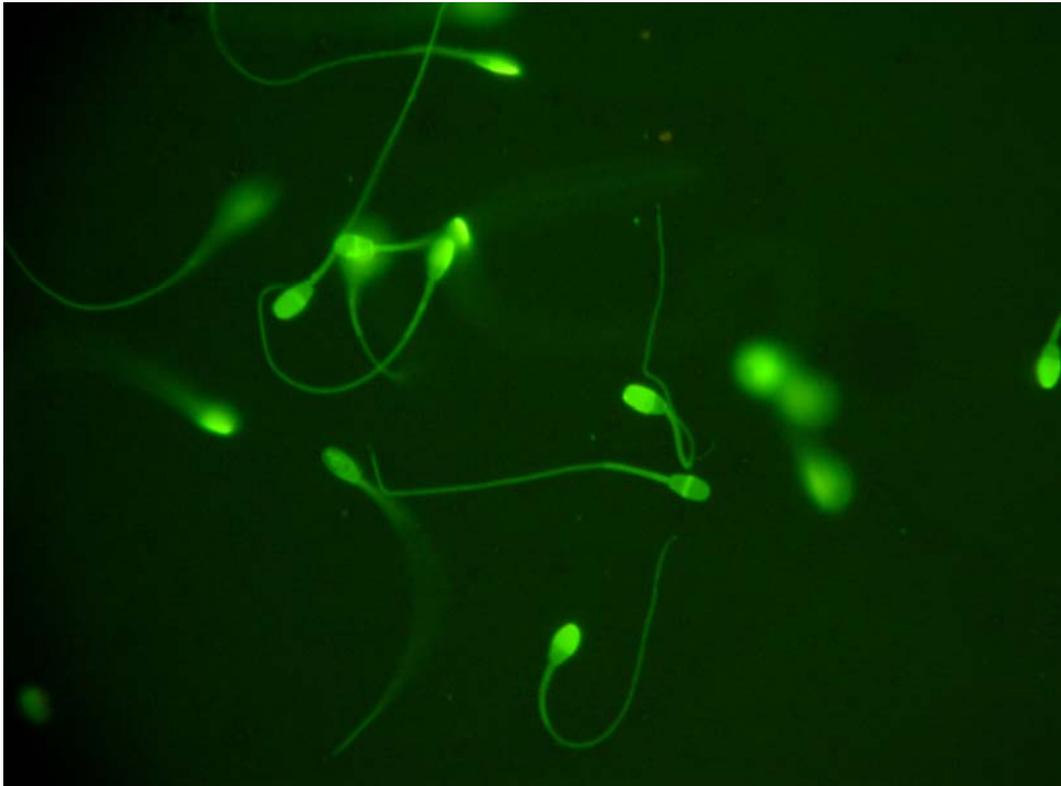


Figure 7 : Description des différentes parties du spermatozoïde après coloration PSA

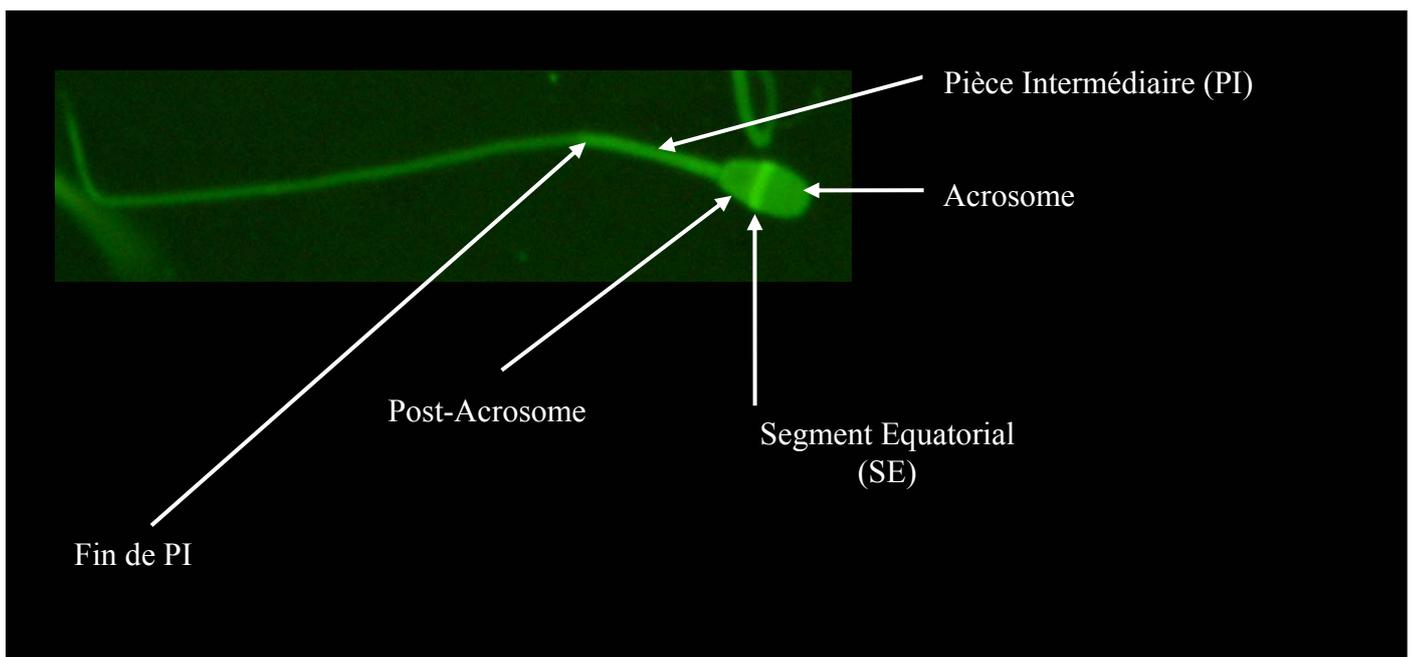
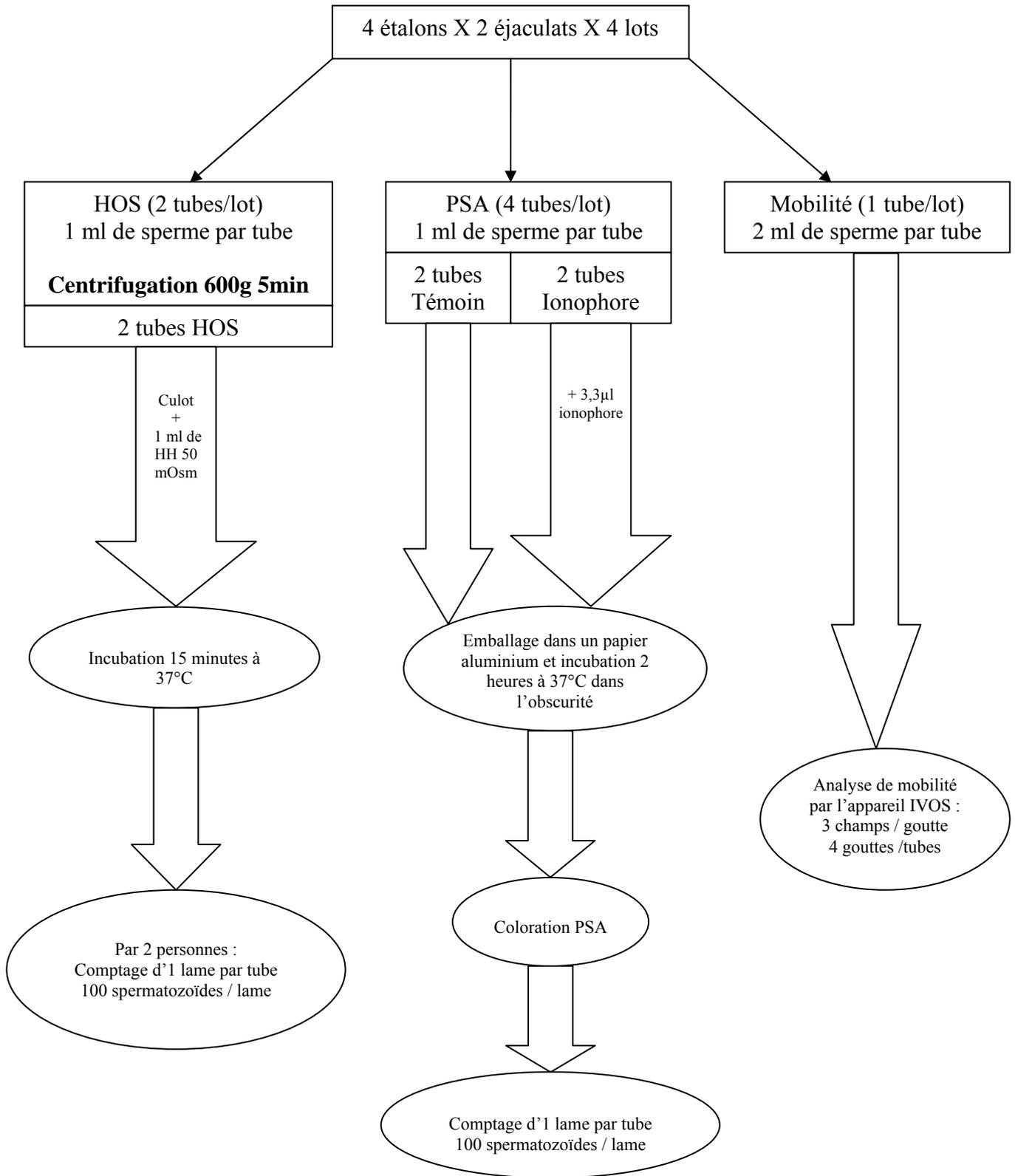


Figure 8 : Diagramme du déroulement de l'expérimentation *in vitro*



2.4. Analyse statistique

Les comparaisons du taux de gestation (fertilité par cycle) ont été faites avec une analyse pour données catégorielles en prenant en compte l'effet lot, l'effet étalon et l'interaction étalon x lot (Proc catmod, SAS). Si l'interaction était non significative, le modèle était considéré comme valide. Le logiciel a calculé l'estimation pondérée de la fertilité moyenne sur toutes les données et ensuite la contribution de chaque lot et de chaque étalon ainsi que la signification statistique associée.

Les comparaisons de moyennes pour les caractéristiques du sperme (mobilité, HOS et acrosome) ont été réalisées avec une ANOVA prenant en compte l'effet lot, l'effet étalon, et l'effet éjaculat dans étalon puisque le modèle comportait plusieurs éjaculats par étalon. Ensuite les moyennes ont été comparées entre elles par le test de Student-Newman-Keuls (Proc glm, SAS, USA).

3. Résultats

3.1. Expérimentation in vivo

Les caractéristiques de la semence des étalons à la récolte et après 24h de conservation sont présentées en annexes 1 et 2.

Le tableau 7 présente la fertilité obtenue avec les 3 températures de conservation testées, pour chacun des 4 étalons utilisés. Tous les résultats sont exprimés en terme de fertilité par cycle.

Tableau 7 : Résultats de fertilité par cycle pour les trois températures de conservation testées

Étalons	Lot BAS	Lot MOYEN	Lot HAUT	TOTAL
MW420	2/8 (25%)	1/8 (13%)	2/8 (25%)	5/24 ^a (21%)
MW233	2/8 (25%)	6/8 (75%)	4/8 (50%)	12/24 ^B (50%)
MW329	1/8 (13%)	5/8 (63%)	6/8 (75%)	12/24 ^B (50%)
MW438	3/8 (38%)	5/8 (63%)	4/8 (75%)	12/24 ^B (50%)
TOTAL	8/32 ^b (25%)	17/32 ^a (53%)	16/32 ^a (50%)	

a, b : les valeurs d'une même ligne portant des lettres différentes sont significativement différentes, P<0,05

α , β : les valeurs d'une même colonne portant des lettres différentes sont significativement différentes de la moyenne globale, P<0,01

La fertilité était significativement plus basse dans le lot Bas : elle était divisée par 2 par rapport aux 2 autres lots (P<0,05). L'analyse a également montré que l'étalon MW420 était significativement moins fertile que les autres (P<0,01).

3.2. Expérimentation in vitro

3.2.1. Paramètres de mobilité

Le tableau 8 présente les paramètres de mobilité (moyenne +/- écart-type) mesurés après conservation de la semence des 4 étalons à 4 températures différentes (lots Bas, Moyen Haut, Très Haut)

Tableau 8 : Mesures des paramètres de mobilité à quatre températures de conservation différentes

	BAS	MOYEN	HAUT	TRES HAUT	Ecart-type moyenne d'après ANOVA (pooled SEM)	P
% de spz rapides (seuil rapides 30 µm/sec) (= RAPID)	78 ^b	81 ^{ab}	84 ^a	82 ^a	1,2	0,04
% de spz progressifs (PROG = PMS)	38	41	43	41	1,3	NS (0,16)
Vitesse VAP (µm/sec)	90	88	83	84	2	NS (0,1)
Vitesse VSL (µm/sec)	67	66	63	63	1,5	NS (0,35)
Vitesse VCL (µm/sec)	199 ^a	190 ^{ab}	180 ^b	183 ^b	3	0,007
Déplacement latéral de la tête (ALH)	8,5 ^a	7,9 ^b	7,6 ^b	7,7 ^b	0,11	0,008
Rectitude (STR)	74	75	76	75	0,7	NS (0,51)

a, b : les valeurs d'une même ligne portant des lettres différentes en exposé sont différentes significativement, P<0,05

Le pourcentage moyen de spermatozoïdes rapides (RAPID) était significativement inférieur dans le lot Bas comparé à celui des lots Haut et Très Haut (P<0,05). La vitesse instantanée moyenne sur trajectoire réelle (VCL) du lot Bas était significativement plus élevée que celles des lots Haut et Très Haut (P<0,01). Enfin, la moyenne du déplacement de la tête (ALH) du lot Bas était plus élevée que celle constatée dans les 3 autres lots (P<0,01). Aucune différence entre les lots n'a été observée pour les autres paramètres mesurés.

3.2.2. Test de réactivité des membranes

Le tableau 9 présente les résultats du test de réactivité des membranes (moyenne de pourcentage de spermatozoïdes) obtenus après conservation de la semence de 4 étalons à 4 températures différentes (lots Bas, Moyen, Haut, Très Haut).

Tableau 9 : Résultats du test de réactivité des membranes (test HOS) pour quatre températures de conservation différentes

	Bas	Moyen	Haut	Très Haut	Ecart-type moyenne d'après ANOVA (pooled SEM)	P
TRESGONF (%)	29	31	31	33	2	NS (0,51)
TOTGONF (%)	37	40	41	43	1,5	NS (0,13)

La variable TRESGONF correspond aux spermatozoïdes présentant un enroulement important suite au test.

La variable TOTGONF regroupe les spermatozoïdes présentant un enroulement et ceux présentant un enroulement intermédiaire suite au test.

Aucune différence significative n'a été observée entre les différents lots.

3.2.3. *Test de réactivité des acrosomes*

3.2.3.1. Analyse des données des tubes témoins

Le tableau 10 présente les résultats de réaction acrosomique (moyenne de pourcentage de spermatozoïdes) obtenus dans les tubes témoins après conservation de la semence de 4 étalons à 4 températures différentes (lots Bas, Moyen, Haut, Très Haut).

Tableau 10 : Résultats du test de réaction acrosomique dans le lot témoin pour quatre températures de conservation différentes

	Bas (l)	Moyen (n)	Haut (x)	Très Haut (t)	Ecart-type moyenne d'après ANOVA (pooled SEM)	P
Intacts	65 ^b	77 ^a	78 ^a	80 ^a	1,8	0,004
RA	22 ^a	16 ^b	14 ^b	13 ^b	2	0,02
Desorg (autres)	12 ^a	7 ^b	8 ^b	8 ^b	0,8	0,02

a, b : les valeurs d'une même ligne portant des lettres différentes en exposé sont différentes significativement, P<0,05

La variable Intacts regroupait les spermatozoïdes n'ayant pas subi de réaction acrosomique, c'est-à-dire ceux appartenant aux catégories 1, 2 et 9.

La variable RA regroupait les spermatozoïdes ayant subi une réaction acrosomique, c'est-à-dire ceux appartenant aux catégories 3, 4, 5, 8 et 10,

La variable Désorg regroupait les spermatozoïdes ne pouvant être classés dans les variables précédentes, c'est-à-dire ceux appartenant aux catégories 6 et 7.

Le pourcentage des spermatozoïdes intacts du lot Bas était inférieur à celui des autres lots (P<0,05) tandis que le pourcentage de spermatozoïdes ayant réagi de façon spontanée et le pourcentage de spermatozoïdes désorganisés étaient plus élevés dans le lot Bas (P<0,05).

3.2.3.2. Analyse des données des tubes Ionophore

Le tableau 11 présente les résultats de réaction acrosomique (moyenne de pourcentage de spermatozoïdes) obtenus dans les tubes additionnés de ionophore après conservation de la semence de 4 étalons à 4 températures différentes (lots Bas, Moyen, Haut, Très Haut).

Tableau 11 : Résultats du test de réaction acrosomique dans le lot ionophore pour quatre températures de conservation différentes

	Bas (l)	Moyen (n)	Haut (x)	Très Haut (t)	Ecart-type moyenne d'après ANOVA (pooled SEM)	p
Inta2	13	15	12	13	1,3	NS (0,60)
RA2	75 ^b	76 ^b	81 ^a	81 ^a	1,7	0,03
Desorg (autres)	12 ^a	9 ^{ab}	7 ^{ab}	6 ^b	1,4	0,04

a, b : les valeurs d'une même ligne portant des lettres différentes en exposé sont différentes significativement, P<0,05

Après induction de la réaction acrosomique par un ionophore, le pourcentage de spermatozoïdes ayant réagi dans les lots Bas et Moyen était significativement inférieur à celui des lots Haut et Très Haut (P<0,05) et le pourcentage de spermatozoïdes désorganisés dans le lot Bas était plus élevé que celui du lot Très Haut.

3.2.3.3. Analyse de la différence de réaction acrosomique (DRA)

La différence entre le pourcentage de spermatozoïdes ayant réagi après l'induction au ionophore et le pourcentage de spermatozoïdes ayant réagi spontanément (DRA) était respectivement pour les lots Bas, Moyen, Haut et Très Haut de : 53%, 60%, 68% et 69%. La DRA du lot Bas était significativement inférieure à celle des lots Haut et Très Haut (P<0,05).

3.2.3.4. Résultats par étalon

Les Figures 9 à 12 (ci-dessous) présentent les résultats de chaque étalon au test de RA, en pourcentage de spermatozoïdes, classés par catégorie. Ceci permet de visualiser les tendances globales exposées ci-dessus, mais au niveau de chaque individu.

Figure 9 : Graphique présentant les résultats du test de RA pour l'étalon MW233.

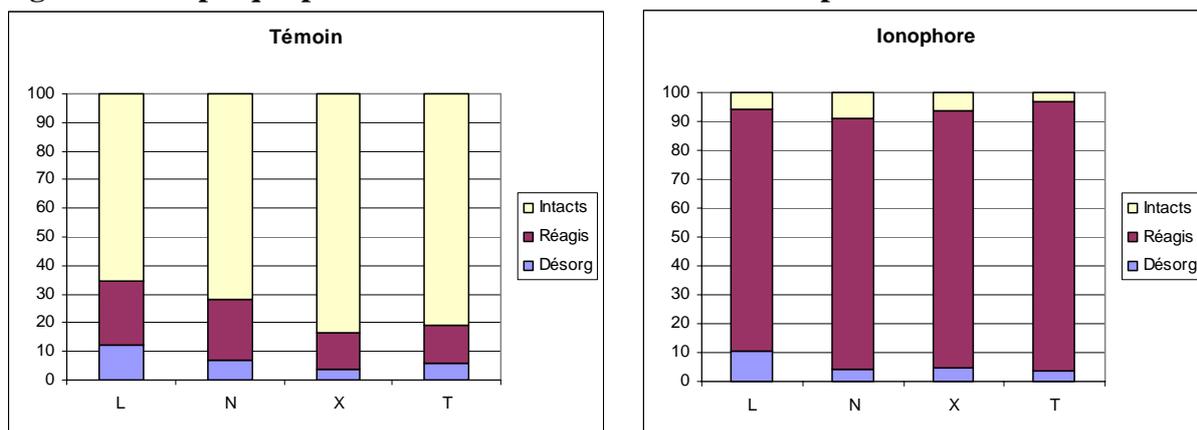


Figure 10 : Graphique présentant les résultats du test de RA pour l'étalon MW329.

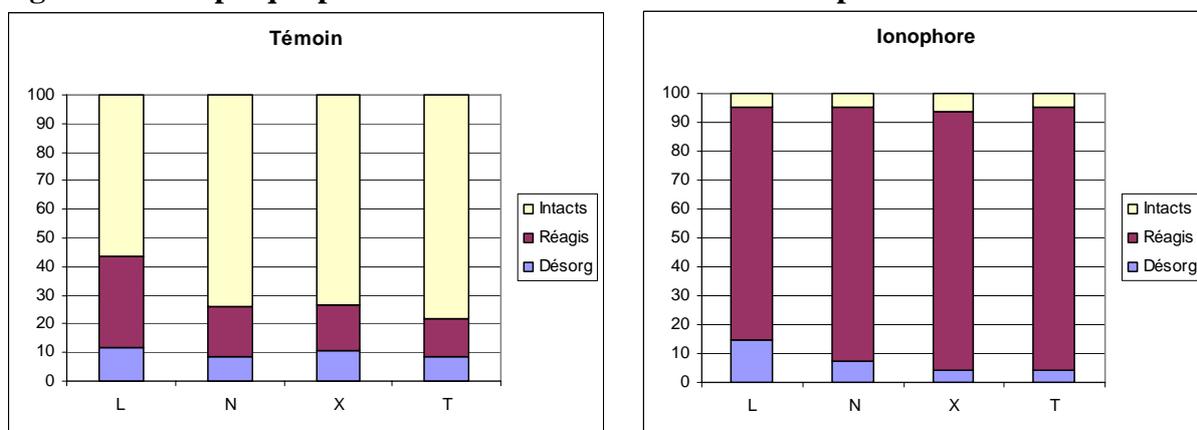


Figure 11 : Graphique présentant les résultats du test de RA pour l'étalon MW420.

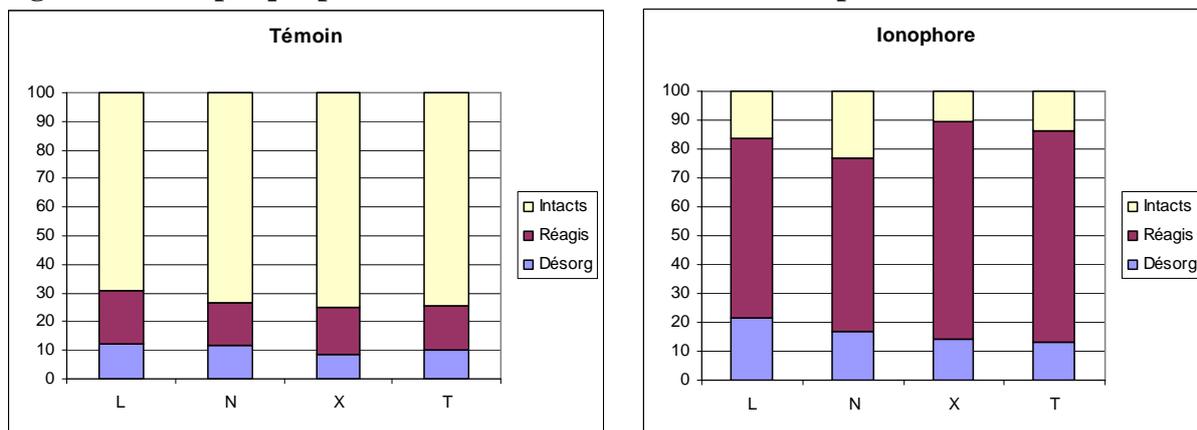
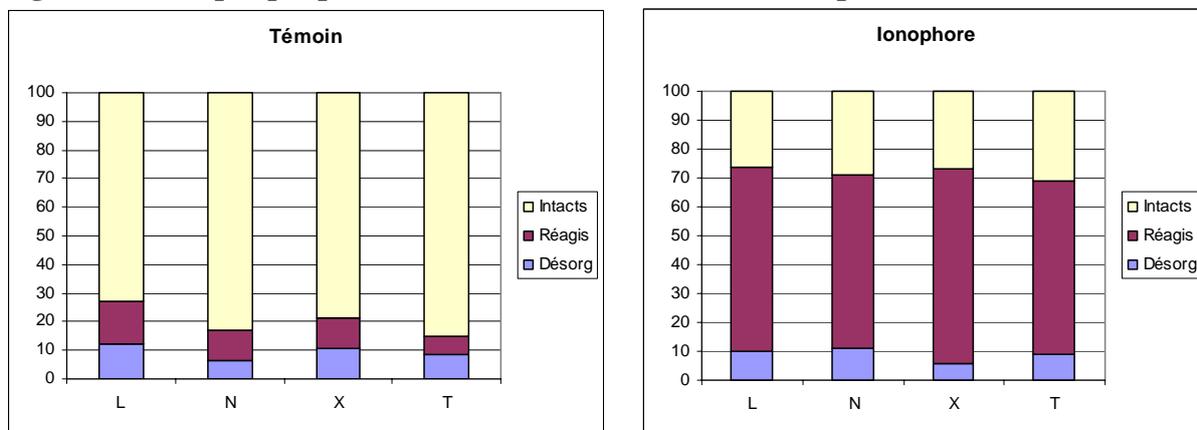


Figure 12 : Graphique présentant les résultats du test de RA pour l'étalon MW438.

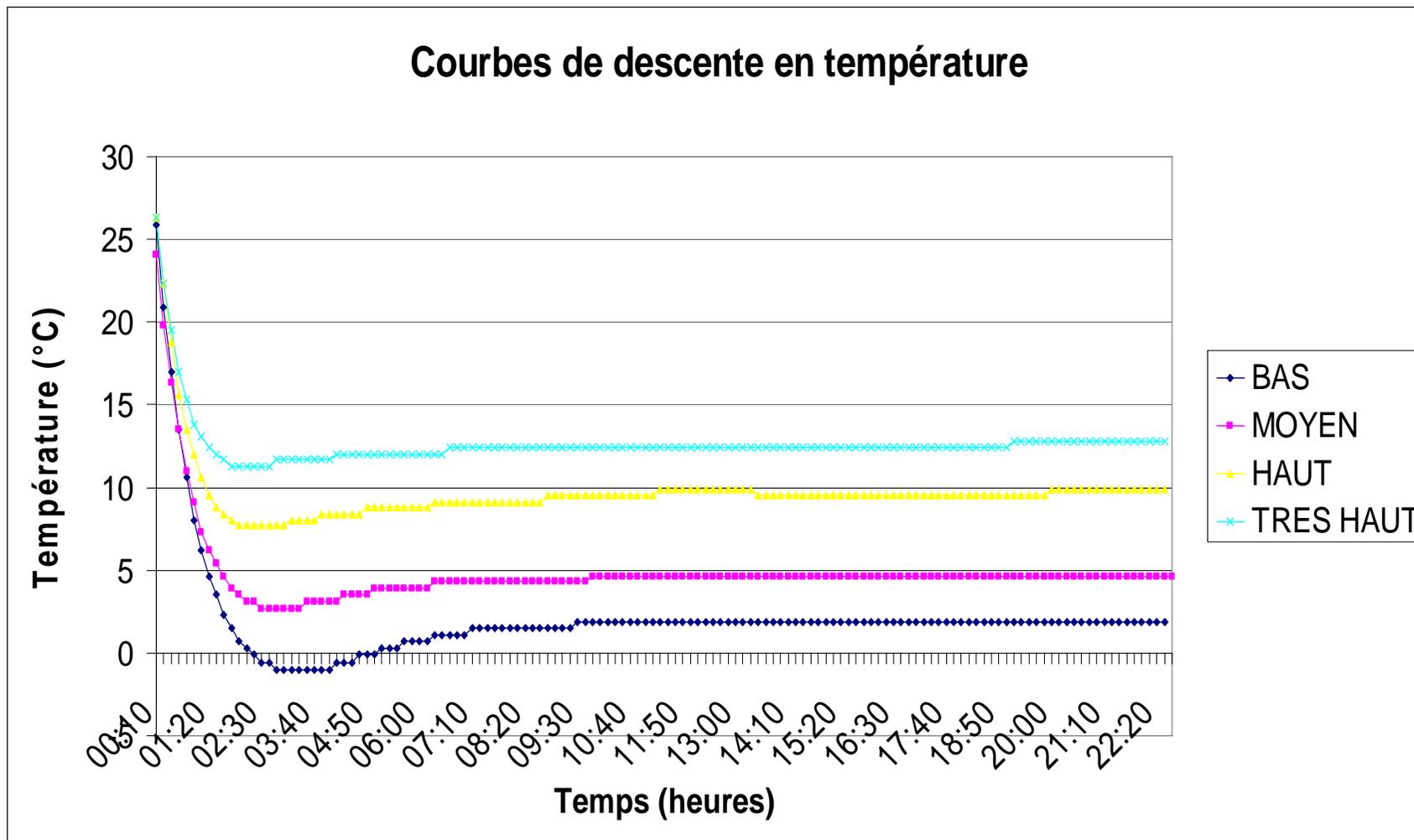


3.3. Vitesses de descente en température

Les vitesses de descente en température ont été calculées à partir des enregistrements de l'OTLM (figure 13). Nous obtenons pour chaque lot :

- BAS : -0,19°C/min,
- MOYEN : -0,15°C/min,
- HAUT : -0,19°C/min,
- TRES HAUT : -0,18°C/min.

Figure 13 : Graphique représentant les courbes de descente en température
(une graduation = 10 minutes)



DISCUSSION

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier les caractéristiques et la fertilité de la semence conservée dans des boîtes de transport jetables soumises à différentes températures (de 7°C à 44°C) afin d'obtenir des températures de conservation pour la semence allant de -1°C à 16°C. Cette étude a été réalisée en 2 parties : l'une *in vivo* avec mesure de la fertilité et l'autre *in vitro* pour l'étude de la qualité des spermatozoïdes.

1. Baisse de fertilité liée aux caractéristiques *in vitro* dans le lot Bas

Dans la **première expérimentation**, nous avons comparé la fertilité de la semence d'étalon à celle obtenue dans le lot témoin (lot Moyen), pour lequel la température de conservation était comprise entre 3°C et 8°C. Nous avons ainsi montré que la fertilité de la semence conservée 22 heures dans l'INRA96 était divisée par deux pour une température de conservation entre -1°C et 3°C et n'était pas modifiée pour les températures les plus hautes (jusqu'à 16°C).

Dans la littérature, pour une durée de conservation de 24 heures, de bons résultats de fertilité ont été obtenus pour des températures allant de 5°C à 20°C [Province et al., 1985 ; Francl et al., 1987 ; Varner et al., 1989 ; Squires et al., 1988]. Pour notre lot Bas, la température descendait parfois en dessous de 0°C, ce qui nous rapprochait de la congélation. Or, nos conditions opératoires (volume, dilueur, concentration...) n'étaient pas du tout celles recommandées pour la congélation de la semence à -196°C. Nous aurions donc pu nous attendre à obtenir une fertilité encore plus faible que celle obtenue. Ceci peut être dû :

- à la courte période pendant laquelle les spermatozoïdes étaient en-dessous de 0°C,
- aux performances de notre dilueur (aspect développé plus loin).

Ces résultats étant rarement rapportés, d'autres études sont nécessaires pour pouvoir conclure.

Dans la **deuxième expérimentation**, nous avons comparé plusieurs caractéristiques de la semence par rapport aux résultats de référence du lot témoin (lot Moyen), conservé 22 heures dans l'INRA96 entre 3°C et 8°C. Nous analyserons d'abord les résultats de mobilité, puis ceux du test de réaction acrosomique. Ceci nous permettra de mettre en évidence les relations entre ces paramètres et les résultats de fertilité du lot Bas exposés ci-dessus.

Paramètres de mobilité

Dans les études sur la mobilité les principaux paramètres mesurés sont : le pourcentage de spermatozoïdes mobiles totaux, le PMS (= PROG dans nos résultats) et la VCL [Province et al., 1985 ; Francl et al., 1987 ; Varner et al. ; 1988 ; Moran et al., 1992 ; Magistrini et al., 1992 ; Katila et al., 1997b ; Brinsko et al., 2000b]. Les caractéristiques les plus discriminantes semblent être le PMS et la VCL, le pourcentage de mobiles totaux ne montrant que rarement de signification statistique. Le PMS et la VCL semblent corrélés négativement.

Dans notre étude, la deuxième expérience n'a montré **aucune différence significative pour le PMS** entre les différents lots. Ceci correspond aux résultats obtenus par la plupart des auteurs [Brinsko et al., 2000b ; Katila et al., 1997b]. Brinsko (2000b) en déduit alors que les températures de stockage proches de 0°C mais positives, ne seraient pas si délétères qu'on le pense pour les spermatozoïdes d'étalon. Cependant, une autre étude a montré une influence de

la température de conservation de la semence pendant 24 heures sur les PMS, avec les valeurs les plus faibles pour les températures les plus basses (22%, 32%, 40% et 40%, respectivement pour des températures de conservation de 0°C, 2°C, 4°C et 6°C) [Moran et al., 1992]. Ces résultats discordants sont certainement dus au paramètre mesuré (aspect développé plus loin). C'est pour cette raison que nous avons examiné d'autres paramètres de mobilité.

Nous avons pu montrer que les spermatozoïdes du **lot Bas** ont des mouvements particuliers : ils bougent davantage la tête (ALH augmentée) mais conservent la même vitesse lissée (VAP) que dans les autres lots. Ce qui signifie qu'ils parcourent plus de distance dans le même temps. La vitesse instantanée (VCL) du lot Bas est en effet augmentée par rapport aux autres lots. Nous pouvons interpréter ceci comme un mouvement **plus désordonné**, donc **moins efficace**.

Nous avons aussi montré que le pourcentage de spermatozoïdes rapides était plus faible dans le lot Bas que dans les autres lots.

Test de réaction acrosomique (RA)

Les résultats au test de réaction acrosomique ont révélé un pourcentage de spermatozoïdes ayant subi une RA spontanée plus élevé pour le lot Bas que pour les autres lots. Inversement, la DRA (différence entre le pourcentage de spermatozoïdes ayant réagi après l'induction au ionophore et le pourcentage de spermatozoïdes ayant réagi spontanément) était inférieure dans le lot Bas par rapport aux lots Haut et Très Haut (il n'y avait pas de différence significative entre les lots Bas et Moyen). Cette observation est appuyée par Simpson et White (1986). En effet, ils ont montré que les spermatozoïdes de béliers refroidis en dessous de 10°C (même lentement) subissent une entrée importante de calcium. Or, un des événements-clés de la capacitation est cet afflux de calcium qui va conditionner ensuite la RA. C'est certainement pour cette raison que le nombre de RA spontanées dans le lot Bas est augmenté. De même, ceci peut expliquer que les dilueurs à base de lait soient moins performants que ceux à base de protéines de lait purifiées car ils contiennent beaucoup plus de calcium. Nous pouvons en déduire que la conservation à des températures basses a tendance à déclencher prématurément la RA, en particulier sur les spermatozoïdes capables de la réaliser. Au moment de l'induction au ionophore, il reste alors beaucoup moins de spermatozoïdes disponibles pour effectuer leur RA. On peut supposer qu'il en est de même dans le tractus génital femelle et que le nombre de spermatozoïdes capables de féconder un ovocyte serait grandement diminué, étant donné le rôle de la RA dans la fécondation. La qualité de l'éjaculat ainsi conservé est donc diminuée.

Conclusion sur la baisse de fertilité des spermatozoïdes du lot Bas :

Ainsi, tous les paramètres que nous venons d'exposer vont dans le sens d'une altération de la qualité des spermatozoïdes conservés entre -1°C et 3°C (lot Bas) :

- un mouvement désorganisé caractérisé par une vitesse anormalement rapide et un mouvement de la tête trop ample,
- un pourcentage de spermatozoïdes rapides diminué,
- une altération dans le déroulement de la RA,
- associés à une baisse de fertilité.

Sans pouvoir donner de corrélation entre ces paramètres, les caractéristiques mesurées *in vitro* apparaissent effectivement en relation avec la fertilité. Parmi ces caractéristiques, le pourcentage de spermatozoïdes intacts dans les tubes Témoins du test de réaction acrosomique est un des critères les plus discriminants. Ainsi, la coloration PSA seule (sans l'incubation au ionophore) permettrait d'évaluer la qualité de la semence grâce à la visualisation des acrosomes après la conservation. Bien que la méthode de coloration soit très

robuste, ce n'est peut-être pas une technique facile à mettre en œuvre en routine car elle est longue et nécessite un microscope à fluorescence.

Il est cependant nécessaire de prendre des précautions d'interprétation. En effet, pour savoir s'il est réellement possible de prédire la qualité d'un éjaculat à partir du test de RA, il faut s'assurer que ces résultats soient répétables pour chaque individu et pas seulement sur un groupe d'éjaculats. Dans cette perspective, il serait intéressant d'exploiter la différence significative dans les résultats de fertilité remarquée pour l'étalon MW420 au cours de l'analyse statistique et d'essayer de voir si une relation apparaît entre la fertilité de ses éjaculats et les résultats au test de réactivité acrosomique correspondants.

2. Synthèse sur la conservation entre 3°C et 16°C

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence entre la fertilité des doses conservées 22 heures (dans l'INRA96) entre 3°C et 8°C (lot Moyen) et celle des doses conservées entre 7°C et 11°C (lot Haut). Plusieurs études concernant la fertilité de la semence équine réfrigérée sont en accord avec ces résultats. En effet, les fertilités étaient équivalentes pour des températures de conservation de 4°C (en anaérobie) ou de 15°C (en aérobie) pendant 24 heures pour Batellier et al. (2001), ou pendant 72 heures pour Levillain (2005). De plus, Varner et al. (1989) ont obtenu des résultats similaires avec du Kenney comme dilueur.

Nous n'avons pas évalué la fertilité dans le lot Très Haut. Cependant, puisque les paramètres mesurés pour ce lot (PMS, VCL, RAP, pourcentage de RA du lot témoin, pourcentage de DRA) n'étaient statistiquement pas différents de ceux des lots Moyen et Haut, nous pouvons avancer l'hypothèse que la fertilité du lot Très Haut doit être équivalente à celle de ces deux lots.

Il serait intéressant de déterminer s'il existe un optimum entre 3°C et 16°C pour la conservation de la semence. Bien qu'il y ait peu de différence entre ces 3 lots, le lot Haut apparaît optimal par rapport aux lots Moyen et Très Haut si on considère les variables RAP, PMS, VCL et ALH. Cette observation, à prendre avec précaution, peut nous laisser supposer que la température idéale pour la conservation du sperme équin serait située autour de 9°C (celle du lot Haut). Des études complémentaires permettant de préciser ce point seraient nécessaires.

Conclusion sur la conservation entre 3°C et 16°C :

Finalement, nous pouvons conclure que le sperme équin pourrait supporter une large gamme de températures de conservation (entre 3°C et 16°C), pendant 22 heures, dans l'INRA96, un optimum pourrait être situé autour de 9°C. Il faut néanmoins éviter des températures négatives ou proches de 0°C. Ces conclusions rejoignent celles de Brinsko et al. (2000b).

3. Pertinence de l'utilisation de la VCL et des PMS

Les résultats que nous avons obtenus pour les paramètres de mobilité et leur relation avec la fertilité du lot Bas soulèvent des questions sur :

- la corrélation entre la fertilité (critère absolu de la qualité des spermatozoïdes) et la VCL,
- la signification statistique des PMS.

Nos résultats (lot Bas en particulier) montrent que, contrairement à une idée reçue, la vitesse des spermatozoïdes n'est pas forcément un critère à relier positivement à leur qualité. Une vitesse élevée ne signifie donc pas systématiquement une bonne qualité des spermatozoïdes, mais peut aussi être le témoin d'un mouvement désordonné.

Le PMS est parfois identique entre les lots dans différentes études sur la température de conservation des spermatozoïdes [Katila et al., 1997b ; Brinsko et al., 2000b]. Ce paramètre est un des seuls reflets de la qualité des spermatozoïdes, en l'absence d'analyse de la fertilité *in vivo*. Cependant, nos résultats permettent d'affirmer que, bien que le **PMS** ne soit pas forcément affecté par des températures basses, la **fertilité** est cependant diminuée, de moitié dans notre cas. Les PMS n'est donc pas un critère très discriminant pour juger de la qualité des spermatozoïdes, par rapport à la VCL, ou le pourcentage de spermatozoïdes ayant subi la réaction acrosomique par exemple.

4. Validité de nos résultats

4.1. Validité du lot témoin

Pour le lot témoin (lot Moyen) conservé entre 3°C et 7°C, nous avons obtenu une fertilité de 53%, ce qui correspond aux résultats obtenus dans les études menées précédemment sur la fertilité de doses conservées autour de 4°C [Batellier et al., 2001 ; Batellier et al., 1998 ; Vidament et al., 2005a ; Squires et al., 1988]. Rosen (2007) a utilisé pour sa thèse de doctorat vétérinaire certains des étalons de notre étude. Avec ces étalons, elle a obtenu une fertilité de 25% après conservation des doses pendant 24 heures à 4°C. Mais il faut noter que l'intervalle entre l'insémination et l'ovulation (IA-OV) était long (44 heures). Pour son second lot, les doses étaient conservées 48 heures à 4°C, mais mises en place avec un intervalle IA-OV de 20 heures, ce qui était certainement plus proche de notre étude. La fertilité qu'elle a obtenue dans ce cas avec les étalons que nous avons utilisés était alors de 58%. Ces différents résultats valident l'utilisation du lot Moyen comme témoin.

4.2. Problématique des ponettes utilisées plusieurs fois.

Afin d'obtenir 96 cycles, nous avons utilisé 126 ponettes différentes. Sur ces 96 cycles, 22 provenaient de ponettes dont un cycle avait déjà été comptabilisé. Vingt-deux ponettes ont donc été utilisées 2 fois dans notre protocole. Cette année, trente gestations étaient nécessaires au centre de Nouzilly pour le renouvellement du troupeau. Ainsi, les ponettes gestantes, mais dont la génétique n'intéressait pas le centre, recevaient une injection de 125 µg de cloprosténol (EstrumateND) et étaient ré-inséminées le cycle suivant. Les ponettes non-gestantes étaient de même réutilisées, d'où le risque de créer un biais si on considère qu'il était possible de réattribuer au même lot des ponettes supposées moins fertiles. Il aurait alors fallu placer systématiquement ces ponettes dans un lot différent, ce qui introduisait une contrainte supplémentaire. Cependant, le hasard entre les rotations des températures et celui de la date de croissance folliculaire rendant ce phénomène hautement improbable, il a été décidé d'affecter ces cycles comme les autres, c'est-à-dire au hasard des jours. On peut préciser qu'a posteriori, il a été obtenu une fertilité excellente en sperme congelé avec les ponettes qui n'étaient pas gestantes suite à notre protocole, confirmant l'absence de biais de ce point de vue-là [Pillet et al., 2008].

4.3. Vitesse de descente en température

Kayser et al. (1992) préconisent des descentes en température très lentes (-0,05°C/min) de 20°C à 5°C, mais d'autres auteurs ont obtenu de bons résultats avec des descentes rapides de 37°C à 19°C, lentes (-0,2°C/min) de 19°C à 8°C, puis de nouveau rapides jusqu'à la température finale de stockage [Varner, 1988 ; Katila, 1997a]. C'est en effet entre 19°C et 8°C que les spermatozoïdes équins sont les plus sensibles aux changements de température. Ceci conduit à une descente moyenne inférieure ou égale à -0,3°C/min pour une conservation optimale, sur les critères mesurés *in vitro*. D'après les courbes et les vitesses de descente moyennes calculées dans notre expérience, la vitesse globale la plus rapide était de -0,25°C/min. Nous nous sommes donc placés pour ce critère dans de bonnes conditions.

4.4. Volume et quantité de spermatozoïdes

Concernant le volume de semence et la quantité de spermatozoïdes utilisés, plusieurs différences sont à noter dans notre étude par rapport aux études habituellement publiées. Nous avons, en effet, utilisé des doses de petit volume (10ml) par rapport à d'autres études (40 à 100 ml) [Katila et al., 1997b, Nunes et al., 2007]. Ceci implique une plus faible inertie thermique. La dose de 200.10⁶ spermatozoïdes par IA était aussi assez faible par rapport aux 500.10⁶ à 650.10⁶ couramment utilisés dans les autres études et sur le terrain [Brinsko, 2006]. De même l'intervalle IA-OV était assez long (17 heures) par rapport aux recommandations (souvent non précisé dans les publications). Nous souhaitons nous placer dans des conditions extrêmes afin d'accentuer les différences entre lots et ainsi éviter de passer à côté d'une différence qui n'aurait pas été significative dans des conditions proches des conditions optimales pour la conservation de la semence.

4.5. Conditions d'oxygénation

Nous pouvons comparer les résultats obtenus dans le lot Haut (50%) avec ceux de l'étude de Batellier et al. (2001) dans laquelle ils ont obtenu un taux de fertilité de 54% après 24 heures de conservation dans l'INRA96 mais en aérobie, en voulant vérifier l'hypothèse que le métabolisme du spermatozoïde à 15°C nécessitait de l'oxygène. Cependant, nos résultats étant très similaires à ceux de cette étude avec un dilueur et un temps de conservation identiques mais en anaérobie, il est légitime de se demander si les conditions d'oxygénation ont une réelle importance.

4.6. Conséquences liées à l'utilisation des boîtes de transport

Il est important de remarquer que toutes les études avec lesquelles nous comparons nos résultats ont été menées à température **constante**, c'est-à-dire que la semence était directement placée aux températures de stockage indiquées et ce pendant toute la durée de la conservation. Néanmoins, une expérience a mesuré la fertilité de la semence d'étalon conservée dans des boîtes de transport **jetables** donc avec une température de conservation **non constante** [Nunes et al., 2007]. Ce détail a son importance car il implique une descente de température différente (certainement plus progressive) et nous avons vu que cela influençait la survie des spermatozoïdes. Cet auteur a obtenu des taux de fertilité de 69% au bout de 24 heures et 48 heures de conservation (respectivement 18/26 cycles et 9/13 cycles). Cependant, la comparaison avec notre étude s'arrête là car :

- les boîtes de transport étaient beaucoup plus isolées que les nôtres (sûrement à cause du climat brésilien) et donc imposaient des descentes beaucoup plus lentes,
- l'auteur n'a utilisé que deux étalons différents, ce qui autorise un doute sur la représentativité de l'échantillon,
- et bien que nous sachions que la semence subissait un passage à 2°C, nous n'avons aucune idée des températures auxquelles étaient soumises ces boîtes de transport.

Enfin, on peut remarquer que malgré l'apparente simplicité de notre boîte, elle a réussi à tamponner les grosses variations de température de l'étuve Lekeux utilisée pour le lot Très Haut. En effet, les variations de température observées à l'intérieur des boîtes n'étaient que de 0,7°C à 1,5°C, malgré des variations brutales d'une dizaine de degrés pour la température ambiante.

4.7. Performances du dilueur INRA96

Plusieurs études comparatives montrent que l'INRA96 est un dilueur très performant :

- Webb et al. (2006) ont ainsi comparé la mobilité dans l'INRA96 avec le Kenney (dilueur de référence pour la réfrigération du sperme de cheval) et le VMD-Z (dilueur mis au point par le haras du Z, mais dont la composition est inconnue). Il a montré que l'INRA96 et le VMD-Z étaient équivalents, mais tous les deux supérieurs au Kenney, dans différentes situations (semence conservée 24, 48 ou 72 heures, dans des boîtes de transport, avec ou sans plasma séminal).

- Pillet et al. (2008) ont montré que la fertilité de la semence congelée dans l'INRA96 (additionné de jaune d'œuf et de glycérol) était de 71% tandis que celle dans l'INRA82 (milieu de référence pour la congélation du sperme équin contenant aussi du jaune d'œuf et du glycérol) n'était que de 40%.

Ainsi, l'INRA96 est plus performant que les dilueurs de référence actuels, aussi bien pour la réfrigération que pour la congélation du sperme équin, ce qui peut aussi expliquer que la fertilité du lot Bas ne soit pas nulle.

4.8. Résultats du test de réactivité des membranes (test HOS)

Pour réaliser ce test, le laboratoire de l'INRA de Nouzilly a l'habitude de travailler avec une solution de sels de Hanks (additionnée de HEPES) hypo-osmotique. Le pouvoir osmotique de cette solution étant presque uniquement lié au NaCl, il suffit d'en retirer le sel pour obtenir une solution hypo-osmotique (par rapport au plasma séminal), à 50 mOsm/l, osmolarité de la solution que nous avons utilisée. La technique à utiliser pour réaliser ce test n'est pas standardisée, chacun faisant un peu à sa manière. Ainsi, Nie et al. (2001) après avoir comparé plusieurs solutions de différentes osmolarités, ont préconisé une incubation de 60 minutes dans une solution de sucrose à 100 mOsm/l. D'autre part, Neild et al. (1999) ont préféré une solution de lactose à 50 mOsm/l.

Après 22 heures de conservation, nous obtenons 40% de spermatozoïdes réagissant au test de réactivité des membranes, mais sans différence significative entre lots. D'autre part, Barrier-Battut (communication personnelle), avec un mode opératoire similaire, a obtenu 63% de spermatozoïdes ayant réagi à la **récolte** (moyenne sur 22 étalons fertiles). On constate donc que la conservation de 22 heures fait chuter le taux de réaction à ce test de manière importante, sans qu'il soit possible de déceler une influence significative de la température de stockage sur ce paramètre. Cependant, nous pouvons remarquer une petite tendance non significative à l'augmentation du nombre de réactions avec la température.

4.9. Résultats du test de réaction acrosomique

La technique utilisée pour marquer les acrosomes exploite les propriétés de fluorescence d'un colorant naturel, la PSA. La méthode est celle décrite par Varner et al. (1987b). Cependant, Varner et al. (2000) considèrent qu'elle ne constitue pas une technique de référence, contrairement à la MET (Microscopie Electronique à Transmission) car :

- les spermatozoïdes de certains étalons ne fixent pas la PSA (faux négatifs),
- il arrive de confondre des spermatozoïdes dont l'acrosome est « desquamé » avec des spermatozoïdes ayant subi une RA (faux positifs), ce qui est aussi une caractéristique individuelle des étalons.

Il est cependant possible d'éviter ces erreurs d'interprétation en utilisant un lot témoin du même éjaculat, sans ionophore, ce que nous avons fait.

Dans une étude de Battut (données personnelles, moyenne des résultats à la **récolte** de la semence de 22 étalons fertiles diluée dans du lait), le taux de spermatozoïdes intacts (tubes

Témoin) était de 90%, le taux de spermatozoïdes ayant subi la RA (tubes Ionophore) était de 74% et la DRA était de 67%. Dans notre étude, **après 22 heures de conservation**, les valeurs de ces paramètres étaient très peu modifiées pour des températures de conservation entre 8°C et 15°C. Ils étaient en effet respectivement de 79%, 81% et 68%. Le taux de spermatozoïdes intacts dans le lot témoin était le plus affecté par la conservation. Cependant, lorsque la température de conservation diminuait, tous ces paramètres diminuaient de façon conséquente. Ils étaient alors respectivement de 65%, 75% et 53% pour le lot Bas. Une fois de plus, c'est le taux de spermatozoïdes intacts dans le lot témoin qui était le plus affecté. De même, Bayle (2006), qui a utilisé du sperme de 4 étalons fertiles conservé 72 heures dans l'INRA96, a obtenu les résultats suivants : 55% de spermatozoïdes intacts (lot Témoin), 78% de spermatozoïdes ayant subi la RA (lot Ionophore) et 52% de DRA. Ces valeurs sont très similaires à celles que nous avons obtenues à des températures inférieures (celles du lot Bas) mais pour un temps de conservation beaucoup plus court (divisé par 3).

La réponse à ce test semble donc plutôt être modifiée par les températures basses que par la durée de stockage, contrairement au test HOS.

CONCLUSION

Les différents résultats obtenus au cours de cette étude nous permettent d'affirmer que le spermatozoïde équin conserve son pouvoir fécondant pendant au moins 24 heures, lorsqu'il est maintenu dans une gamme assez large de température (entre 3°C et 10°C), qui pourrait s'étendre à 17°C d'après nos résultats *in vitro*. Ces affirmations sont valables pour les conditions expérimentales utilisées : dilution élevée, dans l'INRA96, en anaérobie. Compte tenu des données de la littérature, il est sans doute possible d'étendre cet éventail de températures jusqu'à 20°C, en prenant garde à ne pas dépasser 24 heures de conservation.

En pratique, il est donc possible d'utiliser des boîtes jetables pour conserver et transporter les doses de semence pour des inséminations en réfrigéré, pendant au moins 24 heures. Il faut juste veiller à ce que la température à l'intérieur de la boîte n'approche pas trop de 0°C.

ANNEXES

Annexe 1
Caractéristiques séminales moyennes pendant le
protocole

Tableau présentant les caractéristiques séminales moyennes obtenues pendant le protocole

	Moyenne	Mini	Maxi	Ecart-type
Nombre de récoltes	11,25	10	13	1,5
Concentration spz dans l'éjaculat (10^6 /ml)	147	70	234	41
Volume éjaculat (ml)	48	27	105	15
Nombre total de spz dans l'éjaculat (10^9)	6,2	3,2	13,6	2,4
Mobilité récolte (microscope) (%)	91	80	95	4,8
% de semence dans les doses d'IA	20	9,4	40	7,3

Annexe 2

**Caractéristiques séminales individuelles pendant
le protocole**

Tableau présentant les caractéristiques séminales individuelles obtenues pendant le protocole

	MW420	MW233	MW329	MW438
Période et nombre de récoltes	06/07 au 25/07 n= 12	26/06 au 25/07 n = 13	18/06 au 06/07 n = 10	19/06 au 07/07 n = 10
Concentration spz dans l'éjaculat (10^6 /ml)	129 ± 27,3	182 ± 30,4	109 ± 31,7	162 ± 31,1
Volume éjaculat (ml)	66 ± 15,6	43 ± 7,7	46 ± 9,9	38 ± 7,5
Nombre total de spz dans l'éjaculat (10^9)	7 ± 2,8	7,2 ± 2,3	4,2 ± 0,9	6 ± 1,3
Mobilité récolte (microscope) (%)	83 ± 4,1	89 ± 3,9	93 ± 2,6	94 ± 2,4
% de semence dans les doses d'IA	24 ± 6,3	15 ± 3,1	25 ± 8,6	15 ± 4,4

Annexe 3
Données préalables sur les caractéristiques séminales
des étalons

Tableau présentant les caractéristiques séminales obtenues sur spermogramme en 2006

	MW233	MW329	MW438
Date spermogramme	Mai 06 Nouzilly	Fev 06 Nouzilly	Fev 06 Nouzilly
Concentration éjaculat (10 ⁶ /ml)	340	141	185
Volume éjaculat (ml)	34	47	34
Nombre total spz dans l'éjaculat (10 ⁹)	8,95	6,09	6,25
% spz vivants			
% spz mobiles à 0 h dans lait *	82	90	90
% spz mobiles à 24 h dans le lai 4°Ct *	79	68	80
% spz mobiles à 48 h dans le lait 4°C *	60	23	69
% spz mobiles à 72 h dans INRA 96 4°C *	75,58	64,25	81
% spz progressifs après 72 h à 4°C dans INRA 96 *	45,17	31,17	47
% têtes anormales	1,98	3,02	2,01
% têtes seules	5,71	2,37	1,35
% flagelles anormaux	1,54	0,86	0,67
% pièces intermédiaires anormales	16,7	14,87	16,37
% pièces principales anormales	7,69	1,29	0,45
% anormaux totaux	36,04	28,66	27,35

* dans ce tableau les spermatozoïdes sont considérés mobiles lorsqu'ils ont une vitesse supérieure à 30µm/s

Tableau présentant les caractéristiques séminales obtenues pendant la période d'insémination en 2006

	MW233	MW329	MW438
Nombre de récoltes	10	8	9
Concentration spz dans l'éjaculat (10 ⁶ /ml)	145,8	142,6	149,3
Volume éjaculat (ml)	49,4	33,5	33,3
Nombre total de spz dans l'éjaculat (10 ⁹)	7 075	4 659	4 827

Tableau présentant les caractéristiques séminales obtenues sur spermogramme en 2007

	MW233	MW329	MW438	MW420
Dates : 25 avril au 25 juin 2007 (N : nb récoltes)	N >= 20	N > 20	N = 20	N = 9
Concentration éjaculat (10 ⁶ /ml)	201	150	251	209
Volume éjaculat (ml)	44	41	30	60
Nombre total spz dans l'éjaculat (10 ⁹)	8.95	5.91	7.7	12.9
% spz vivants				
% spz mobiles à 0 h dans lait				
% spz mobiles à 24 h dans le lait 4°C*	84 (1)	50 (1)	83 (1)	58 (2)
% spz mobiles à 48 h dans le lait 4°C *	64 (1)	25 (2)	81 (2)	43 (2)
% spz mobiles à 24 h dans INRA96 4°Ct *	84 (1)	90 (1)	90 (1)	75 (2)
% spz mobiles à 48 h dans INRA96 4°C *	83 (1)	84 (2)	90 (2)	65 (2)
% spz mobiles à 72 h dans INRA 96 4°C *		82 (1)	75 (1)	
% spz progressifs après 72 h à 4°C dans INRA 96 *		54 (1)	43 (1)	

* dans ce tableau les spermatozoïdes sont considérés mobiles lorsqu'ils ont une vitesse supérieure à 30µm/s (nb éjac mesurés)

Annexe 4
Fiche technique de l'OTLM

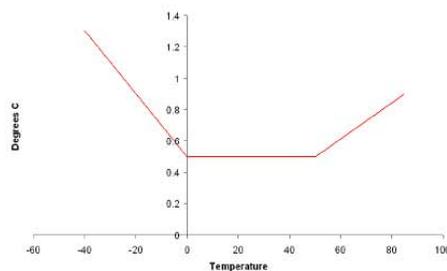


Features

Total Reading Capacity	16,000 readings
Memory type	Non Volatile
Delayed Start	Relative / Absolute (up to 45 days)
Stop Options	When full After n Readings Never (overwrite oldest data)
Reading Types	Actual, Min, Max
Logging Interval	1 sec to 10 days
Offload	While stopped or when logging in minutes mode
Alarms	2 fully programmable; latchable

Reading Specification

Reading Range	-40°C to +85°C (-40°F to +185°F)
Sensor Type	10K NTC Thermistor (Internally mounted)
Response Time	25 mins to 90% FSD in moving air
Reading Resolution	0.05°C or better
Accuracy	



Physical Specification

IP Rating	IP54 (splash-proof)
Operational Range*	-40°C to +85°C (-40°F to +185°F)
Case Dimensions	
Diameter	34mm / 1.34"
Height	54mm / 2.13"
Weight	30g / 1.06oz

*The Operational Range indicates the physical limits to which the unit can be exposed, not the reading range over which it will record.

Notes

Battery Type	SAFT LS14250 or LST14250; Tekcell SBAA02P
The logger will operate with other 1/2AA 3.6V Lithium (Li-SOCl ₂) batteries but performance cannot be guaranteed.	
Replacement Interval	Annually
Before replacing the battery the data logger must be stopped.	
Data stored on the logger will be retained after a battery is replaced.	
If used at low temperatures the data logger should be allowed to warm to room temperature before it is opened to avoid condensation forming inside the unit.	

Calibration

This unit is configured to meet Gemini's quoted specification during its manufacture.

We recommend that the calibration of this unit should be checked annually against a calibrated reference meter.

A UKAS traceable certificate of calibration can be supplied for an additional charge either at the point of purchase, or if the unit is returned for a service calibration.

Approvals

This equipment complies with part 15 of the FCC rules. Operation is subject to the following two conditions: (1) this device may not cause any harmful interference, and (2) the device must accept any interference received, including interference that may cause undesired operation.

Gemini Data Loggers (UK) Ltd. operates a Quality Management System which conforms to BS EN ISO 9001:2000. The scope of the system covers the manufacture, design and supply of data loggers and their associated software, accessories and services.



Required and Related Products

To use this data logger you will also require one of the following pieces of software:

SWCD-0040: Tinytag Explorer software or
SW-1500: Easyview Light software or
SW-0500: Easyview Pro software

and a

CAB-0005: Tinytag Transit/Talk PC Serial Download Cable or
CAB-0005-USB: Tinytag Transit/Talk USB Download Cable

Further related products:

SER-9510: Talk Service Kit

BIBLIOGRAPHIE

- AURICH C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* **89** (1-4) 65-75. Review.
- BALL B.A. (2004) Hysteroscopy and low-dose insemination techniques in the horse. *Recent Adv. in Equ. Reprod.* (IVIS A0216.1204)
- BATELLIER F, MAGISTRINI M, FAUQUANT J, PALMER E. (1997) Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology.* **48** (3) 391-410.
- BATELLIER F, DUCHAMP G, VIDAMENT M, ARNAUD G, PALMER E, MAGISTRINI M. (1998) Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 degrees C under aerobic conditions. *Theriogenology.* **50** (2) 229-36.
- BATELLIER F. ET AL. (2001) Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci.* **68** (3-4) 181-90.
- BAYLE J.C. (2006). *Essai d'optimisation de la conservation de la semence équine par réfrigération : étude comparative de deux durées de stockage : 48 et 72h.* Thèse de Doctorat Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, n°80, 86 pages.
- BRINSKO SP, CROCKETT EC, SQUIRES EL. (2000a) Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology.* **54** (1) 129-36.
- BRINSKO SP, ROWAN KR, VARNER DD, BLANCHARD TL. (2000b) Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. *Theriogenology.* **53** (8) 1641-55.
- BRINSKO SP. (2006) Insemination doses : how low can we go? *Theriogenology.* **66** (3) 543-50. Review.
- CALVETE JJ, NESSAU S, MANN K, SANZ L, SIEME H, KLUG E, TÖPFER-PETERSEN E. (1994) Isolation and biochemical characterisation of stallion seminal-plasma proteins. *Reprod. Dom. Anim.* **29** : 411-426
- CLEMENT F. (1995) *Etude d'une population d'étalons infertiles : apport au diagnostic et à l'étiologie de l'infertilité.* Thèse Ing. Agro., ENSAR. Montpellier, France
- CLEMENT F, LADONNET Y, MAGISTRINI M. (2001). Sperm morphology and fertility. *Anim. Reprod. Sc.* **68** : 315-365.
- DOUGLAS-HAMILTON DH, OSOL R, OSOL G, DRISCOLL D, NOBLE H. (1984) A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology.* **22** (3) 291-304
- DUCHAMP, G., BOUR, B., COMBARNOUS, Y., PALMER, E. (1987) Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J. Reprod. Fertil.* **35** (Suppl.), 221-228.
- FRANCL AT, AMANN RP, SQUIRES EL, PICKETT BW. (1987) Mobility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20°C. *Theriogenology.* **27** : 517-525

GADELLA BM, RATHI R, BROUWERS JFHM, STOUT TAE, COLENBRANDER B. (2001) Capacitation and the acrosome reaction in equine sperme. *Anim. Reprod. Sc.* **68** : 249-265.

HARAS NATIONAUX, COLLECTIF (2004) Insémination artificielle, Guide pratique. 3^{ème} édition. Ed. Les Haras Nationaux, Le Pin au haras, 321 pages.

HEISKANEN ML, HUHTINEN M, PIRHONEN A, MAENPAA PH. (1994a) Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for 70 or 80 hours. *Theriogenology*. **42** (6) 1043-51.

HEISKANEN ML, HUHTINEN M, PIRHONEN A, MAENPAA PH. (1994b) Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. *Acta. Vet. Scand.* **35** (3) 257-62.

JASKO DJ, MORAN DM, FARLIN ME, SQUIRES EL. (1991) Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*. **35** (5) 1059-1067.

JASKO DJ, LITTLE TV, LEIN DH, FOOTE RH. (1992a) Comparaison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **200** (7) 979-85.

JASKO DJ. (1992b) Evaluation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am. Eq. Pract.* **8** (1) 129-48. Review.

KATILA T. (1997a) Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*. **48** (7) 1217-27.

KATILA T, COMBES GB, VARNER DD, BLANCHARD TL. (1997b) Comparaison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology*. **48** (7) 1085-92.

KAYSER JP, AMANN RP, SHIDELER RK, SQUIRES EL, JASKO DJ, PICKETT BW. (1992) Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. **38** (4) 601-14.

KENNEY RM, KINGSTON RS, RAJAMANNON AH, RAMBERG CF JR. (1971) Stallion semen characteristics for predicting fertility. *Proceedings of the 17th Ann. Con. Am. Assoc. Equine Practitioners* – Chicago, 53-67.

LEIPOLD SD, GRAHAM JK, SQUIRES EL, MCCUE PM, BRINSKO SP, VANDERWALL DK. (1998) Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology*. **49** (8) 1537-43.

LEVILLAIN N. (2005) *Essai d'optimisation de la conservation de la semence équine par réfrigération : étude comparative de deux protocoles de réfrigération à 15°C et 5°C*. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, n°82, 53 pages.

- LOVE CC. ET AL. (2003) Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*. **60** (6) 1127-38.
- LOVE CC, BRINSKO SP, RIGBY SL, THOMPSON JA, BLANCHARD TL, VARNER DD. (2005) Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*. **63** (6) 1584-91.
- MAGISTRINI M, COUTY I, PALMER E. (1992) Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival. *Acta. Vet. Scand. Suppl.* **88** : 97-110.
- MEYERS SA, OVERSTREET JW, LIU IKM, DROBNIS EZ. (1995) Capacitation in vitro of stallion spermatozoa : comparaison of Progesterone-Induced Acrosome Reaction in fertile and subfertile males. *J. Androl.* **16** (1) 47-54.
- MORAN DM, JASKO DJ, SQUIRES EL, AMANN RP. (1992) Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*. **38** (6) 999-1012.
- MORRIS LH, HUNTER RH, ALLEN WR. (2000) Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *J. Reprod. Fertil.* **118** (1) 95-100.
- NEILD D, CHAVES G, FLORES M, MORA N, BECONI M, AGÜERO A. (1999) Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*. **51** : 721-727.
- NIE GJ, WENZEL JGW. (2001) Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*. **55** : 1005-1018.
- NUNES, D.B. ET AL. (2007) Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.022
- PADILLA AW, FOOTE RH. (1991) Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. *J. Anim. Sci.* **69** (8) 3308-13
- PALMER E. (1984) Factors affecting stallion semen survival and fertility. *Proceeding of 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Urbana-Champaign II, Vol.3 : 377
- PARKS JE, LYNCH DV. (1992) Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. **29** : 255-266
- PILLET E. ET AL. (2008) Le milieu INRA96[®] supplémenté de jaune d'œuf et de glycérol améliore la fertilité en Insémination Artificielle de semence Congelée. *Journée de la Recherche Equine*, Paris 34^{ème} journée d'étude

- PROVINCE CA, SUIRES EL, PICKETT BW, AMANN RP. (1985) Cooling rate, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*. **23** (6) 925-932.
- RIGBY SL, BRINSKO SP, COCHRAN M, BLANCHARD TL, LOVE CC, VARNER DD. (2001) Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Anim. Reprod. Sci.* **68** (3-4) 171-80.
- SIEME H, SCHÄFER T, STOUT TAE, KLUG E, WABERSKI D. (2003) The effect of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*. **60** : 1153-1164.
- SHORE MD, MACPHERSON ML, COMBES GB, VARNER DD, BLANCHARD TL. (1998) Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. *Theriogenology*. **50** (5) 693-8.
- SIMPSON A.M., WHITE I.G. (1986) Effect of cold shock and cooling rate on calcium uptake of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **12** : 131-143.
- SQUIRES EL, BRUBAKER JK, MCCUE PM, PUCKETT BW. (1998) Effect of number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*. **49** : 743-749.
- TROEDSSON MH, LIU IK, CRABO BG. (1998) Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology*. **50** (5) 807-18.
- TROEDSSON MH, LOSET K, ALGHAMDI AM, DAHMS B, CRABO BG. (2001a) Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim. Reprod. Sci.* **68** (3-4) 273-8.
- TROEDSSON MH, ROZEBOOM KJ, ROCHA-CHAVEZ G, CRABO BG. (2001b) *The chemotactic properties of porcine seminal components toward neutrophils in vitro*. *J. Anim. Sci.* **79** : 996-1002.
- TROEDSSON MH, ALGHAMDI AS, FOSTER DN. (2004) Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen into inflamed uteri. *Reproduction*. **127** : 593-600.
- VARNER DD, BLANCHARD TL, LOVE CL, GARCIA MC, KENNEY RM. (1987a) Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*. **28** (5) 707-723.
- VARNER DD, WARD CR, STOREY BT, KENNEY RM. (1987b) Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* **48** : 1383-1389.
- 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.
- VARNER DD, BLANCHARD TL, MEYERS PJ, MEYERS SA. (1989) Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20 degrees C. *Theriogenology*. **32** (4) 515-25.

VARNER DD, BLANCHARD TL, BRINSKO SP, LOVE CC, TAYLOR TS, JOHNSON L. (2000) Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. *Anim. Repro. Sci.* **60-61** : 493-509.

VARNER DD. ET AL. (2002) Induction of the acrosome reaction in stallion spermatozoa : Effects of incubation temperature, incubation time, and ionophore concentration. *Theriogenology.* **58** : 303-306.

VIDAMENT M. ET AL. (2005a) Fertilité du sperme d'étalon conservé de 24 à 72 h dans l'INRA96® : stratégie d'insémination et température de conservation. *31^{ème} Journée de la recherche équine*, Paris : 93-103

VIDAMENT M. (2005b). Savoir bien acheter et bien utiliser le sperme congelé équin : quelques informations sur l'utilisation des petites doses et de l'IA profonde. *Texte complet et fiche technique mis en ligne sur le site des Haras Nationaux à l'adresse :*
<http://www.haras-nationaux.fr/portail/index.php?id=3508&MP=2766-2640>

VIDAMENT M. (2005c) French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Repro. Sci.* **89** : 115-136.

WEBB G, HUMES R. (2006) A comparaison of the ability of three commercially available diluents to maintain the motility of cooled-stored stallion semen. *Anim. Repro. Sci.* **94** : 135-137.

WOODS J, BERGFELT DR, GINTHER OJ. (1990) Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. *Equ. Vet J.* **22** (6) 410-5.

ZIDANE N, VAILLANCOURT D, GUAY P, BIGRAS-POULIN M. (1991) Fertility of fresh equine semen preserved for up to 48 hours. *J. of Repro. and Fert.* **44** (Suppl) : 644

ETUDE SUR LA CONSERVATION DE LA SEMENCE EQUINE DANS UNE BOITE DE TRANSPORT JETABLE EXPOSEE A DIFFERENTES TEMPERATURES POSITIVES PENDANT 22 HEURES

Yoann LE FOLL

RESUMÉ :

Il est nécessaire de refroidir la semence équine pour la conserver suffisamment longtemps lors de son transport. La congélation n'est cependant pas la seule solution si la durée de conservation se situe entre 24 et 48 heures. Les boîtes de transport jetables sont essentiellement utilisées en France pour des courtes durées, d'où leur apparence rudimentaire par rapport à des boîtes réutilisables. Leur sensibilité aux températures externes les rend peut-être inefficaces pour la conservation de la semence équine en réfrigéré. Cette expérience menée sur 96 cycles et 4 étalons, avec le dilueur INRA96, montre qu'il est possible d'utiliser des boîtes jetables pour conserver et transporter les doses de semence pour des inséminations en réfrigéré, pendant au moins 24 heures, à condition de veiller à ce que la température à l'intérieur de la boîte n'approche pas trop de 0°C.

MOTS-CLÉS :

REFRIGERATION, CONSERVATION DU SPERME, INSEMINATION, SEMENCE EQUINE, QUALITE DU SPERME, EQUIDES, CHEVAL.

JURY :

Président : Pr

Directeur : Dr Fabienne constant, Maître de conférences

Assesseur : Pr Hélène Combrisson

M. Yoann LE FOLL
58 rue de Maubrun
02290 Ambleny

STUDY ON EQUINE SEMEN PRESERVATION IN A REUSABLE CONTAINER EXPOSED TO DIFFERENT POSITIVE TEMPERATURES DURING 22 HOURS

Yoann LE FOLL

SUMMARY:

It is necessary to cool the equine semen in order to preserve it for a sufficient time during its transport. However freezing is not the only answer if the preserving time stands between 24 and 48 hours. The single-use transport containers are used in France mainly for a short time: that's why they look so rudimentary in comparison with reusable containers. Maybe their sensitivity to exterior temperatures makes them ineffective for the preserving of cooled equine semen. This experiment, which has been conducted on 96 cycles and 4 stallions with the diluent INRA96, shows that it's possible to use single-use containers to preserve and transport the doses of semen for cooled insemination during at least 24 hours, providing that the temperature inside the container doesn't come too close to 0°C.

KEY-WORDS:

COOLING, SPERM PRESERVATION, INSEMINATION, EQUINE SEMEN, SPERM QUALITY, EQUINE, HORSE.

JURY:

Président : Pr

Directeur : Dr Fabienne constant, Maître de conférences

Assesseur : Pr Hélène Combrisson

M. Yoann LE FOLL
58 rue de Maubrun
02290 Ambleny

LE FOLL Y. ETUDE SUR LA CONSERVATION DE LA SEMENCE EQUINE DANS UNE BOITE DE TRANSPORT JETABLE
EXPOSEE A DIFFERENTES TEMPERATURES POSITIVES PENDANT 22 HEURES 2008