**Résumé du PFE :** Application des biotechnologies en reproduction équine

**Auteur : Aouane, Nedjma**

 **Résumé**

**Dans une démarche de préservation du patrimoine génétique du cheval Barbe et éventuellement d’amélioration de sa fertilité, le recours aux biotechnologies de la reproduction est indispensable. Notre travail comporte trois volets, dont les objectifs sont d’étudier la fertilité des étalons de la race Barbe et Pur Sang (Arabe et Anglais) de la jumenterie « Chaouchaoua » et leur potentiel reproducteur en suite prélever, analyser leurs semences et la congeler dans le but de contribuer à promouvoir le potentiel cryogénique du sperme de l’étalon Barbe et enfin d’améliorer les caractéristiques cinématiques après décongélation des spermatozoïdes épididymaires des étalons Barbe après abattage par l’ajout de la glutamine au dilueur de congélation INRA96®. Pour cela, nous avons pris pour sujet dans la 1ère étude 168 étalons ayant servi 1202 juments au total 1592 cycles au long de dix (10) saisons de montes consécutives (2003-2012). Une analyse multivariée (régression logistique) a été utilisée afin d’expliquer les paramètres de reproduction à savoir ; nombre de cycles exploités, nombre de juments gravides, taux de conception par cycle, taux de gestation fin de saison et taux de mortalité embryonnaire en fonction de la race, de l’âge de l’étalon et l’année de l’étude. Les résultats de l’analyse statistique ont montré que la race de l’étalon avait une influence significative sur le nombre de juments vides gravides (OR=1,72), et sur le taux de gestation fin de saison (OR=1,40) (meilleurs taux pour le Barbe par rapport aux Pur-Sang). Aussi, nous avons pu démontrer l’influence de l’âge de l’étalon sur le nombre de juments suitées gravides et sur le taux de gestation fin de saison (étalon >5 ans). L’existence d’une interaction significative entre la race de l’étalon et son âge sur le taux de conception par cycle ; chez la race Barbe, plus l’âge de l’étalon augmente plus le taux de conception par cycle augmente. Alors que chez le Pur-Sang le taux de conception par cycle diminue avec l’âge. L’année de l’étude a aussi montré un effet significatif sur le taux de conception par cycle et sur le nombre de juments suitées gravides. Par contre le nombre de cycles exploités et le taux de mortalité embryonnaire ne sont influencés ni par la race et l’âge de l’étalon, ni par l’année de l’étude. Dans la 2ème partie, 22 étalons (28 éjaculats) ont été prélevés et analysés. L’évaluation du comportement sexuel a montré une différence significative du délai d’obtention d’un saut entre les deux périodes d’étude ainsi que l’évaluation du spermogramme concernant le pourcentage des spermatozoides mobiles (p<0,05). Chez les équidés, l’évaluation du volume de la fraction sans gel (VSG) reste un très bon indicateur de la qualité spermatique en vue de la corrélation positive avec la concentration en spermatozoïdes. L’étude de la distribution des données de la concentration en spz a fait ressortir les élites dans les périodes d’études avec une concentration de 260x106 spz/ml et 50x106 spz/ml en 1ère période. Et les résultats des corrélations existantes entres les différents paramètres spermatiques ont montré des différences très significatives et corrélations positives entre la Mobilité Massale (MM) et la vitesse Initiale (VI), MM et % de spz Fléchant (spz F), VI et spz F, alors que le pourcentage des spz F et la concentration sont corrélés négativement (p=0,048).**

**Dans la 3ème partie qui concerne la récolte du sperme pur de 22 testicules des chevaux Barbe après abattage par la méthode de Flushing Rétrograde. Le sperme pur a été mélangé au dilueur de congélation INRA96®, le milieu de base (contrôle) est constitué du dilueur INRA96®+ 2,5% glycérol+ 2% JO (ou 4% de PJO) et les autres sont composés du milieu de base + les traitements de glutamine à différentes concentrations. Les paramètres cinématiques et l’intégrité membranaire ont été analysés par un système d’analyse informatique CASA (Computer Automated Sperm Analyzer) 48 h après décongélation. En conclusion, les résultats ont montré que le cheval Barbe, compte tenu de son âge et de ses performances reproductives, il peut être en compétition en fertilité par rapport aux Pur-Sang, sur le total des éjaculats prélevés, 44% ont été congelés, 36% ont été utilisés en IA fraiche et 20% ont été éliminés pour des raisons de faible mobilité et/ou concentration. Et enfin, la glutamine C25 et C50 ont amélioré significativement la VSL et VAP et que la glutamine C50 et C75 ont amélioré de manière significative la LIN et STR alors que les concentrations plus élevées en Glutamine (C75 et surtout C100) ont diminué significativement les paramètres de mouvement du spz (VCL, VAP, VSL, LIN et STR) ce qui confirme l’effet toxique de la glutamine à de fortes concentrations.**

**Mots-clés : Etalon, Barbe, performances de reproduction, Glutamine, sperme épididymaire, cryoconservation, mobilité, CASA**

**Abstract**

**In order to preserve the genetic heritage of the Barb horse and possibly improve its fertility, the use of reproductive biotechnology is essential. Our work consists of three parts, whose objectives are to study the fertility of the stallions of the Barb breed and Pur Sang (Arabizn and thoroughbred) of «Chaouchaoua» Sud farm and their reproductive potential subsequently collect, analyse their semen and freeze them in order to help promote the cryogenic potential of the semen of the Barbe stallion and improve the kinematic characteristics after thawing of the epididymidal sperm of the Barbe stallion after slaughter by adding Glutamine to INRA96® Freezing extender. For this we took as subject in the 1st study 168 stallions having served 1202 mares in total 1592 cycles over ten consecutive10 consecutive mating seasons (2003-2012) was evaluated. Multivariate analysis with logistic regression was used to analyze the reproductive parameters such as the number of cycles operated, number of pregnant mares, pregnancy rate per cycle, seasonal pregnancy rate, and embryonic mortality rate, and to determine the influence of breed, stallion’s age, and year of the study on reproduction. Statistical analysis showed that stallion breed was a significant influencing factor for the number of pregnant barren mares (Odds ratio [OR]=1.72; p=0.03; 95% confidence interval [CI]=1.05, 2.84) seasonal pregnancy rate (OR=1.40; p<0.001; 95% CI=1.29, 1.53). Additionally, the reproductive performance of the Barb stallion was superior to that of the Thoroughbred stallion. With regard to the significant influence of stallion’s age of >5 years on the number of pregnant foaling mares and seasonal pregnancy rate, significant interactions were observed between the stallion’s breed and age, and the pregnancy rate per cycle: in the Barb breed, the pregnancy rate per cycle increased with the age of the stallion, while in the Thoroughbred, it decreased with age. Moreover, a significant effect of the year of the study on the pregnancy rate per cycle and number of pregnant foaling mares was observed. In contrast, the number of cycles and embryonic mortality rate were not influenced by the breed and age of the stallion, or the year of the study. In the second part, 22 stallions (28 ejaculates) were collected and analyzed. The evaluation of sexual behaviour showed a significant difference in the time it took to jump between the two study periods, as well as the spermogram assessment of the percentage of mobile sperm (p<0.05). In equines, the evaluation of the volume of the gel-free fraction (VSG) remains a very good indicator of sperm quality for positive correlation with sperm concentration. The study of the distribution of spz concentration data highlighted the elites in the study periods with a concentration of 260x106 spz/ml and 50x106 spz/ml in the first period. And the results of the existing correlations between the different sperm parameters showed very significant differences and positive correlations between MM and VI, MM and spz F, VI and spz F, while the percentage of spz F and concentration are correlated negatively (p=0.048). In the 3rd part semen samples were collected from 22 testicles of slaughtered Barb stallions by retrograde flushing technique. Semen samples were aliquoted and diluted with the following extenders, (1) base medium (BM) (INRA96®+2.5%glycerol+2% egg yolk); (2) BM+25 mM Glutamine (C25); (3) BM+50 mM Glutamine (C50); (4) BM+75 mM Glutamine (C75) and (5) BM+100 mM Glutamine (C100). The assessment of Kinematic parameters was established after thawing by using SPA® spain CASA (Computer Automated Sperm Analyzer); and the membrane integrity was analyzed by HOST test. In Conclusion, the Algerian Barb horse attained a similar level of fertility compared with that of the Arabian Purebred and Thoroughbred stallions depending on its age and reproductive performance, of the total ejaculates collected, 44% were frozen, 36% were used in fresh AI and 20% were eliminated for reasons of low mobility and/or concentration and at low concentrations, the presence of glutamine (C25 and C50) improved significantly (p<0.05) the kinematics variables (VSL, VAP, LIN and STR). However, higher concentrations of glutamine (C75 and especially C100) significantly decreased the movement quality of thawed semen. These observations are showing a beneficial effect of glutamine at low concentrations and indicated a toxic effect at high concentrations, although, no differences were observed in terms of HOST integrity.**

**Keywords: Barb, breeding performance, stallion, Glutamine, epididymal sperm, cryopreservation, motility and CASA.**

**ملخص**

**من أجل الحفاظ على التراث الوراثي لحصان بربري وربما تحسين خصوبته ، فإن استخدام التكنولوجيا الحيوية الإنجابية أمر ضروري .يتكون عملنا من ثلاثة أجزاء، تهدف إلى دراسة خصوبة الفحول من سلالة Barb) و Pur Sang (Arabian والأصيلة من مزرعة Sud Chaouchaoua وإمكانياتها الإنجابية فيما بعد ، وجمع وتحليل السائل المنوي وتجميده بالترتيب. للمساعدة في تعزيز القدرة المبردة للسائل المنوي لفحل باربي وتحسين الخصائص الحركية بعد إذابة الحيوانات المنوية البربخية لفحل بربري بعد الذبح عن طريق إضافة الجلوتامين إلى موسع التجميد INRA96®. لهذا أخذنا كموضوع في الدراسة الأولى تم تقييم 168 فحلًا خدم 1202 فرسًا في إجمالي 1592 دورة على مدى 10 مواسم تزاوج متتالية (2003-2012). تم استخدام التحليل متعدد المتغيرات مع الانحدار اللوجستي لتحليل المعلمات الإنجابية مثل عدد الدورات التي يتم تشغيلها ، وعدد الأفراس الحوامل ، ومعدل الحمل لكل دورة ، ومعدل الحمل الموسمي ، ومعدل الوفيات الجنينية ، ولتحديد تأثير السلالة ، وعمر الفحل ، وسنة الدراسة عن التكاثر. أظهر التحليل الإحصائي أن سلالة الفحل كانت عاملاً مؤثرًا مهمًا في عدد الأفراس القاحلة الحوامل (نسبة الأرجحية [OR] = 1.72 ؛ p = 0.03 ؛ 95٪ فاصل الثقة [CI] = 1.05 ، 2.84) معدل الحمل الموسمي (OR = 1.40 ؛ p <0.001 ؛ 95٪ CI = 1.29 ، 1.53). بالإضافة إلى ذلك ، كان الأداء التناسلي للفحل Barb متفوقًا على أداء الفحل الأصيل. فيما يتعلق بالتأثير الكبير لعمر الفحل> 5 سنوات على عدد الأفراس المهره الحامل ومعدل الحمل الموسمي ، لوحظت تفاعلات كبيرة بين سلالة الفحل وعمره ، ومعدل الحمل لكل دورة: في سلالة Barb ، الحمل زاد المعدل لكل دورة مع تقدم عمر الفحل ، بينما في الأصيل ، انخفض مع تقدم العمر. علاوة على ذلك ، لوحظ تأثير معنوي لسنة الدراسة على معدل الحمل لكل دورة وعدد الأفراس المهره الحامل. في المقابل ، لم يتأثر عدد الدورات ومعدل وفيات الجنين بسلالة الفحل وعمره ، أو سنة الدراسة. في الجزء الثاني ، تم جمع وتحليل 22 فحلًا (28 قذفًا). أظهر تقييم السلوك الجنسي اختلافًا معنويًا في الوقت المستغرق للقفز بين فترتي الدراسة ، وكذلك تقييم spermogram للنسبة المئوية للحيوانات المنوية المتنقلة (p <0.05). في الخيول ، يظل تقييم حجم الجزء الخالي من الهلام (VSG) مؤشرًا جيدًا جدًا لجودة الحيوانات المنوية من أجل الارتباط الإيجابي بتركيز الحيوانات المنوية. أظهرت دراسة توزيع بيانات تركيز spz النخب في فترات الدراسة بتركيز 260x106 spz / ml و 50 x106 spz / ml في الفترة الأولى. وأظهرت نتائج الارتباطات الموجودة بين معاملات الحيوانات المنوية المختلفة فروق ذات دلالة إحصائية وارتباطات موجبة بين MM و VI و MM و spz F و VI و spz F ، في حين أن النسبة المئوية spz F والتركيز مرتبطة سلبًا (p = 0.048) .في الجزء الثالث تم جمع عينات السائل المنوي من 22 خصية من الفحول الشائكة المذبوحة بتقنية الغسل الرجعي. تم تقطيع عينات السائل المنوي وتخفيفها باستخدام الممددات التالية ، (1) وسط قاعدي (BM) (INRA96® + 2.5٪ جلسرين + 2٪ صفار بيض) ؛ (2) BM + 25 ملي جلوتامين (C25) ؛ (3) BM + 50 ملي جلوتامين (C50) ؛ (4) BM + 75 ملي جلوتامين (C75) و (5) BM + 100 ملي جلوتامين (C100). تم وضع تقييم المعلمات الحركية بعد الذوبان باستخدام SPA® spain CASA (محلل الحيوانات المنوية الآلي بالكمبيوتر) ؛ وتم تحليل سلامة الغشاء عن طريق اختبار .HOSTفي الختام ، حقق الحصان البربر الجزائري مستوى خصوبة مشابهًا مقارنة بالفحول العربية الأصيلة والأصيلة اعتمادًا على عمره وأدائه التناسلي ، من إجمالي السائل المنوي الذي تم جمعه ، تم تجميد 4٪ ، واستخدم 36٪ في ذكاء اصطناعي جديد و تم التخلص من 22 ٪ لأسباب تتعلق بالحركة المنخفضة و / أو التركيز وبتركيزات منخفضة ، تحسن وجود الجلوتامين (C25 و C50) بشكل ملحوظ (p <0.05) المتغيرات الحركية (VSL و VAP و LIN و STR). ومع ذلك ، أدت التركيزات العالية من الجلوتامين (C75 وخاصة C100) إلى انخفاض كبير في جودة حركة السائل المنوي المذاب. تُظهر هذه الملاحظات تأثيرًا مفيدًا للجلوتامين بتركيزات منخفضة وتشير إلى تأثير سام بتركيزات عالية ، على الرغم من عدم وجود اختلافات فيما يتعلق بسلامة HOST.**

**الكلمات المفتاحية**

 **أداء التكاثر ، الفحل بربري ، الجلوتامين ، الحيوانات المنوية البربخية ، الحفظ التبريد ، القدرة على الحركة و , CASA**