



HAL
open science

Contribution à l'étude de la congélation du sperme équin : influence de la durée d'équilibration

Paola Sautejeau Rizzoni

► **To cite this version:**

Paola Sautejeau Rizzoni. Contribution à l'étude de la congélation du sperme équin : influence de la durée d'équilibration. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. dumas-04771026

HAL Id: dumas-04771026

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04771026v1>

Submitted on 7 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Oniris - École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation

ANNEE 2024 - Thèse n° 55

**CONTRIBUTION À L'ÉTUDE
DE LA CONGÉLATION DU SPERME ÉQUIN:
INFLUENCE DE LA DURÉE D'ÉQUILIBRATION**

THÈSE

pour le diplôme d'État de docteur vétérinaire
présentée et soutenue publiquement devant
l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes
le 18 septembre 2024

par

Paola SAUTEJEAU—RIZZONI

Sous la direction de Djemil BENCHARIF

Président du jury : Monsieur Thomas **FREOUR**
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres du jury : Monsieur Djemil **BENCHARIF**
Professeur de Reproduction à l'École Nationale Vétérinaire ONIRIS

Monsieur Yassine **MALLEM**
Professeur de Pharmacologie à l'École Nationale Vétérinaire ONIRIS

ONIRIS - VetAgroBio Nantes
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE
AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION
Site de la Chanterie - Route de Gachet
44307 Nantes Cédex 3



ANNEE 2024 - Thèse n° 55

**CONTRIBUTION À L'ÉTUDE
DE LA CONGÉLATION DU SPERME ÉQUIN:
INFLUENCE DE LA DURÉE D'ÉQUILIBRATION**

THÈSE

pour le diplôme d'État de docteur vétérinaire
présentée et soutenue publiquement devant
l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 18 septembre 2024

par

Paola SAUTEJEAU—RIZZONI

Sous la direction de Djemil BENCHARIF

Président du jury : Monsieur Thomas **FREOUR**
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres du jury : Monsieur Djemil **BENCHARIF**
Professeur de Reproduction à l'École Nationale Vétérinaire ONIRIS

Monsieur Yassine **MALLEM**
Professeur de Pharmacologie à l'École Nationale Vétérinaire ONIRIS

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénoms de l'auteur : SAUTEJEAU RIZZONI Paola
- Année de soutenance : 2024
- Titre de la thèse : Contribution à l'étude de la congélation du sperme équin : influence de la durée d'équilibration
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes.
- Ecole de soutenance : Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation Nantes Atlantique
- Nombre de pages : 136 p.

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment		
Responsable : Emmanuel JAFFRES – Adjointe : Frédérique NGUYEN		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Martine KAMMERER (Pr émérite) Marc GOGNY (Pr émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC)	Solenn GAVAUD (CERC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC) Emmanuel JAFFRES (MC)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Quentin PRUVOST (CEC)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	Charlotte MOCQUARD (PRAG) Aurore CALVEL (PRAG)
Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique		
Responsable : Raphaël GUATTEO – Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER		
Elevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ 5(Pr) Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr) Pauline MAISONNASSE (CERC)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr émérite) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Sofia STRUBBIA (MC)

Département DSC Sciences cliniques		
Responsable : Catherine IBISCH – Adjoint : Marion FUSELLIER		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MC Stagiaire)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC) Claire DEFOURMSTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	Sabrina VIEU (AERC) Maria Dolores SANCHEZ (AERC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (Pr) Catherine IBISCH (MC) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND (Pr)
Département GPA Génie des procédés alimentaires		
Responsable : Sébastien CURET-PLOQUIN – Adjointe : Vanessa JURY		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (Pr) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril Gaillard (PCEA)	
Département MSC Management, statistiques et communication		
Responsable : Samira ROUSSELIERE – Adjointe : Véronique CARIOU		
Mathématiques, statistiques, informatique	El Mostafa QANNARI (Pr émérite) Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr) Jean-Michel GALHARRET (MC stagiaire)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUR (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel, PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole, HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens. Cont. : Enseignant Contractuel

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Thomas FREOUR,

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

Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Djemil Bencharif,

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et pour m'avoir accompagné
et aidé pendant toute la réalisation de ce travail.

Pour votre disponibilité, votre investissement, et votre gentillesse.

Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Yassine Mallem,

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Pour avoir bien voulu porter un regard critique et un point de vue extérieur sur ce
manuscrit.

Hommages respectueux.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	7
TABLE DES MATIÈRES.....	11
LISTE DES FIGURES.....	15
LISTES DES TABLEAUX.....	16
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	17
INTRODUCTION.....	19

1ÈRE PARTIE

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA PRODUCTION ET LA CONGÉLATION DU SPERME CHEZ L'ÉTALON.....

21

1. PRODUCTION DE SPERME CHEZ L'ÉTALON.....

22

A. ANATOMIE DE L'APPAREIL GÉNITAL DE L'ÉTALON:.....

22

1. Enveloppes testiculaires

23

2. Les testicules.....

24

3. Voies spermatiques.....

25

Épididyme.....

25

Le cordon spermatique.....

25

Le conduit déférent.....

26

L'urètre.....

26

Pénis

26

Prépuce.....

27

4. Glandes accessoires.....

28

Les vésicules séminales

28

Les ampoules du canal déférent.....

29

La prostate

29

Les glandes bulbo-urétrales.....

29

B. LA SPERMATOGENÈSE.....

30

1. Définition.....

30

2. Mécanisme:.....

30

Spermatocytogénèse.....

31

Méiose.....

31

Spermiogénèse.....

32

3. Cellules de Sertoli.....

33

4. Cellules de Leydig:.....

34

5. Cellules myoïdes.....

35

6. Régulation endocrinienne.....

35

C. LE SPERMATOZOÏDE.....

37

1. Anatomie :

37

La membrane plasmique.....

38

La tête	39
La région cervicale.....	40
Pièce intermédiaire.....	41
Pièce principale et pièce terminale	42
2. Métabolisme du spermatozoïde.....	42
La glycolyse.....	43
Phosphorylations oxydatives.....	44
3. La maturation des spermatozoïdes.....	45
La capacitation	45
La réaction acrosomique.....	46
D. L'ÉJACULAT.....	46
1. Volume et concentration :.....	46
2. Composition.....	46
2. LA CONGÉLATION DU SPERME.....	48
A. POURQUOI CONGELER ?	48
1. Avantages :	48
2. Inconvénient.....	49
B. LE MÉCANISME DE CONGÉLATION.....	50
1. Conséquences sur la membrane plasmique :	51
2. Conséquence sur l'environnement intracellulaire.....	52
C. RÉCOLTE DU SPERME.....	55
1. Examen de l'étalon.....	55
Libido.....	55
Examen physique.....	55
Général.....	55
Pénis.....	56
Testicules	56
Analyses sanitaires.....	57
Examen échographique.....	57
2. Récolte de l'éjaculat.....	58
Préparation de l'étalon.....	58
Récolte à l'aide d'un vagin artificiel.....	59
Vagin artificiel fermé.....	59
Vagin artificiel ouvert.....	62
Autres méthodes de récolte.....	64
Récupération de l'éjaculat après saillie.....	64
Utilisation d'un préservatif.....	64
Récolte au sol.....	64
Stimulation manuelle.....	65
Méthodes pharmacologiques.....	65
Electro-éjaculation.....	67

D. MÉTHODE DE CONGÉLATION.....	67
1. Filtration et dilution du sperme.....	67
2. Evaluation de la qualité du sperme lors de la congélation.....	68
Aspect macroscopique.....	69
Volume	69
Concentration.....	69
Mobilité.....	70
Origine.....	70
Analyse de la mobilité.....	70
Morphologie.....	73
Cytométrie de flux et microscopie fluorescente.....	75
Analyse du protéome.....	76
3. Concentration du sperme.....	76
Centrifugation.....	77
Coussin de centrifugation.....	77
Centrifugation sur milieux colloïdaux.....	78
Filtration.....	78
4. Ajout du dilueur.....	79
Rôle cryoprotecteur.....	79
Antioxydant.....	82
Substances nutritive.....	83
Substances tampon.....	83
Antibiotiques.....	84
Autres molécules	84
Principaux milieux de congélation utilisés en espèce équine.....	85
5. Equilibration	86
6. Conditionnement.....	86
7. Congélation.....	87
8. Décongélation des paillettes	87

2ÈME PARTIE

ETUDE EXPÉRIMENTALE SUR L'IMPACT DE LA DURÉE D'ÉQUILIBRATION LORS DE LA CONGÉLATION DU SPERME D'ÉTALON.....89

1. EXPÉRIMENTATIONS.....	90
A. OBJECTIF.....	90
B.MATERIEL ET METHODE.....	91
1. Etalons étudiés	91
2. Récolte du sperme.....	92
Utilisation d'un vagin artificiel.....	92
Mannequin de monte.....	92
3. Congélation des paillettes	93
4. Décongélation des paillettes : préparation des échantillons.....	96
5. Analyse avec le système CASA	96

5. Analyse statistiques.....	97
C. RÉSULTATS.....	99
1. Mobilité :	99
2. Mobilité progressive.....	100
3. Autres paramètres.....	102
D. DISCUSSION.....	104
1. Échantillons.....	104
2. Paramètres de mobilité.....	104
CONCLUSION.....	107
BIBLIOGRAPHIE.....	109
ANNEXES.....	125
ANNEXE 1 : EVOLUTION DES TECHNIQUES DE REPRODUCTION DE 2014 À 2023.....	125
ANNEXE 2 : CLASSIFICATION DE LA QUALITÉ DES DOSES DE SPERME CONGELÉ.....	125

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de l'appareil reproducteur de l'étalon vu du côté latéral gauche	23
Figure 2 : Schéma des enveloppes des testicules, coupe transversale en vue caudale	24
Figure 3 : Schéma d'une coupe sagittale d'un testicule d'étalon montrant sa conformation intérieure et sa structure	25
Figure 4 : Schéma de la structure du pénis d'étalon et de ses attaches osseuses, vue latérale gauche	27
Figure 5 : Schéma présentant les glandes accessoires sexuelles de l'étalon (vue dorsale de la partie pelvienne de l'appareil reproducteur)	29
Figure 6 : Schéma synthétique des différentes étapes de la spermatogénèse	32
Figure 7 : Coupe d'un tube séminifère chez l'étalon avec les différentes cellules impliquées dans la spermatogénèse	33
Figure 8 : Coupe d'un tube séminifère avec une cellule de Sertoli chez les mammifères	34
Figure 9 : Schéma de la régulation de la fonction de reproduction chez l'étalon	36
Figure 10 : Anatomie du spermatozoïde	38
Figure 11 : Représentation de la tête du spermatozoïde normal (A) et après la réaction acrosomique (B)	41
Figure 12 : Schéma de la structure du flagelle de spermatozoïde équin	42
Figure 13 : Schéma de l'organisation d'un axonème chez un spermatozoïde d'Homme	43
Figure 14 : Schéma des conséquences de la baisse de température sur la membrane plasmique	52
Figure 15 : Altérations structurales et moléculaires lors de la cryopréservation du sperme de mammifère...	54
Figure 16 : Modèle de vagin artificiel NISHIKAWA	60
Figure 17 : Modèle Missouri (Equibreed).....	61
Figure 18 : Modèle Colorado utilisé à ONIRIS VetAgroBio.....	62
Figure 19 : Étapes simplifiées du processus de congélation du sperme d'étalon	68
Figure 20 : L'analyse de trajectoires par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur	74
Figure 21 : Méthode de filtration pour extraire le plasma séminal	79
Figure 22 : Mannequin de monte utilisé lors de nos prélèvements à Oniris VetAgroBio.....	96
Figure 23 : Photographie de la filtration sur gazes stériles utilisés à ONIRIS.....	96
Figure 24 : Photographie de la cuve de congélation remplie d'azote à ONIRIS.....	98
Figure 25 : Schéma résumant les étapes de notre protocole.....	101
Figure 26 : Boxplot de la mobilité totale en fonction du temps d'équilibration (2h, 4h ou 6h).....	102
Figure 28 : Evolution des techniques de reproduction de 2014 à 2023	128

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemple de molécules, posologies et voies d'administrations utilisées pour la collecte d'éjaculat.....	67
Tableau 2 : Composition chimique du dilueur INRA 96 ®	86
Tableau 3: Liste des étalons participants à l'étude.....	94
Tableau 4 : Tableau des moyennes et des p-values de la mobilité totale en fonction des durées d'équilibration.....	103
Tableau 5 : Tableau des moyennes et des p-values de la mobilité progressive en fonction des durées d'équilibration.....	104
Tableau 6 : Tableau des différentes moyennes en fonction des paramètres de mobilité ainsi que les p-values associées.....	105
Tableau 7 : Classification de la qualité des doses de sperme congelé	128

LISTE DES ABRÉVIATIONS

% : Pourcentage
µm : Micromètre
µm/s : Micromètre par seconde
µL : Microlitre
ABP : Androgen Binding Protein (Protéine de liaison aux androgènes)
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
AFP : Anti-Freeze Proteins (protéines antigel)
ALH : Amplitude Lateral Head (Amplitude latérale de la tête)
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ATP : Adénosyl TriPhosphate
BCF : Beat Cross Frequency
CASA : Computer-assisted Sperm Analysis (Analyse de sperme assisté par ordinateur)
DSO : Daily Sperm Output (Production journalière de sperme)
ELON : Élongation
FSH : Follicle Stimulating Hormone (Hormone de stimulation des follicules)
GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone (Hormone de libération des gonadotrophines)
HDL : High Density Lipoproteins (protéines de haute densité)
IA : Insémination Artificielle
IGF : Insulin-like Growth Factor (Facteur de croissance)
INSL3 : Insulin-Like Factor 3 (Somatomédine C)
Kg : Kilogramme
LDL : Low Density Lipoprotein (Lipoprotéine de basse densité)
LH : Luteinizing Hormone (Hormone lutéinisante)
LIN : Linearity (Linéarité)
Mg : Magnésium
MOT : Mobilité totale
mL : Millilitre
pH : Potentiel Hydrogène
PMOT : Mobilité progressive
PRP : Plasma Riche en Plaquette
ROS : Reactive Oxygen Species (Espèces réactives oxygénées)
Spz : Spermatozoïde
STR : Straightness (Rectitude)
TGF : Transforming Growth Factors (Facteur de croissance transformant)
VAP : Velocity Average Pathway (Vitesse progressive moyenne)
VCL : Velocity Curvilinear Line (Vitesse curvilinéaire)
VSL : Velocity Straight Line (Vitesse linéaire)
VT : Volume Total

INTRODUCTION

Développée au cours des années 1980, l'insémination artificielle (IA) est maintenant communément utilisée pour la reproduction équine.⁶⁴

Cette méthode qui regroupe les techniques d'insémination avec de la semence fraîche, réfrigérée ou congelée, confère de nombreux avantages. Par exemple, cela permet de diffuser la génétique des étalons, d'inséminer de nombreux juments dans des lieux plus ou moins éloignés géographiquement ou encore de diminuer les risques sanitaires.

Le pourcentage de poulains né d'une insémination artificielle en France, selon les statistiques annuelles des Haras Nationaux en 2015, était de 41%. Parmi les techniques utilisées, l'insémination en semence congelée a connu un essor passant de 0,2% des saillies en 1993 à 15,6% des saillies en 2023.¹⁷⁷

Mais malgré les progrès qu'ont connu les techniques de congélation et la qualité de la semence fraîche, il n'est pas possible de congeler avec succès tous les éjaculats.²⁶ En effet il y a une grande variabilité individuelle entre étalons, environ 20%² d'entre eux produisent du sperme qui ne peut pas être congelé à cause d'une faible mobilité et viabilité après congélation et décongélation. Ils sont qualifiés de "poor" freezers.⁶⁶

Pour minimiser cette variabilité entre étalon, des études ont été conduites visant à développer un protocole optimal de congélation. Comme le protocole de congélation joue un rôle important sur la viabilité des spermatozoïdes après décongélation, des améliorations conduisant à une meilleure survie cryogénique des spermatozoïdes permettent de congeler avec succès d'avantage d'éjaculats provenant d'un plus grand nombre d'étalons.¹

Il existe de nombreuses étapes lors du protocole de congélation et chacune d'entre elles est importante pour la conservation de la qualité du sperme post-décongélation. Les milieux de congélation utilisés sont aussi nombreux, avec des caractéristiques qui varient, et en constante recherche d'amélioration.¹ Notre étude ici porte sur une étape particulière, celle du refroidissement à 4°C dite d'équilibration juste avant la congélation. Cette étape permet au sperme de s'adapter à des températures plus faibles, au cryoprotecteur de traverser la membrane cellulaire, de permettre les mouvements d'eau en dehors du spermatozoïde et de réduire les dommages cellulaires.¹¹²

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

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

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

1^{ÈRE} PARTIE :

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA PRODUCTION ET LA CONGÉLATION DU SPERME CHEZ L'ÉTALON

Le but de cette première partie est de présenter les bases de l'anatomie et de la physiologie de la fonction de reproduction chez l'étalon pour pouvoir acquérir les éléments de base nécessaire pour notre étude expérimentale.

1. PRODUCTION DE SPERME CHEZ L'ÉTALON

A. ANATOMIE DE L'APPAREIL GÉNITAL DE L'ÉTALON:

L'appareil génital mâle est constitué de l'ensemble des organes chargés de la production du sperme de son transport et de son dépôt dans les voies génitales femelles.

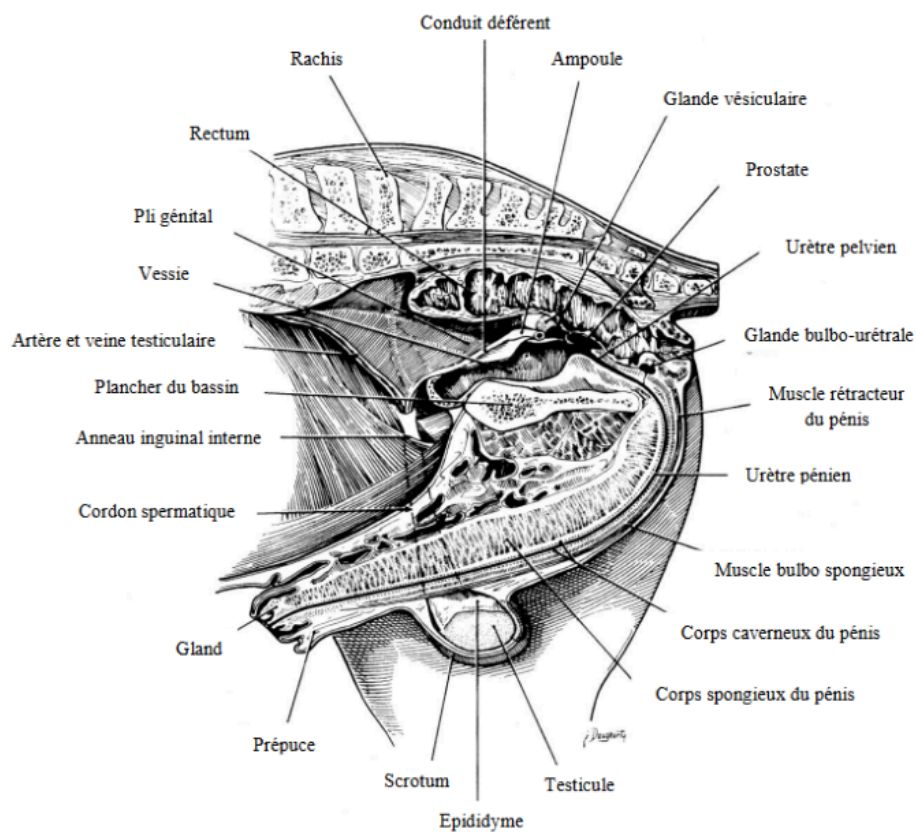


Figure 1 : Schéma de l'appareil reproducteur de l'étalon vu du côté latéral gauche ¹²⁶

1. Enveloppes testiculaires

Le scrotum (figure 1 et 2) enveloppe de tissu fibromusculaire, contient les gonades et assure un rôle de maintien et de protection.

Composé de deux compartiments il est séparé par un septum.⁹¹ Le scrotum est constitué de plusieurs couches : la peau, le dartos, le fascia spermatique associé au muscle crémaster et la tunique vaginale.

La peau, couche la plus externe, permet de protéger les testicules du milieu extérieur. Le fascia spermatique, tissu conjonctif lâche, protège contre les chocs et il est en continuité avec le muscle crémaster qui, lorsqu'il se contracte, permet une remontée volontaire du testicule. Le dartos est un tissu musculaire adhérent à la peau du scrotum, qui permet de rapprocher ou d'éloigner les testicules de l'abdomen et participe à leur thermorégulation.⁵⁰

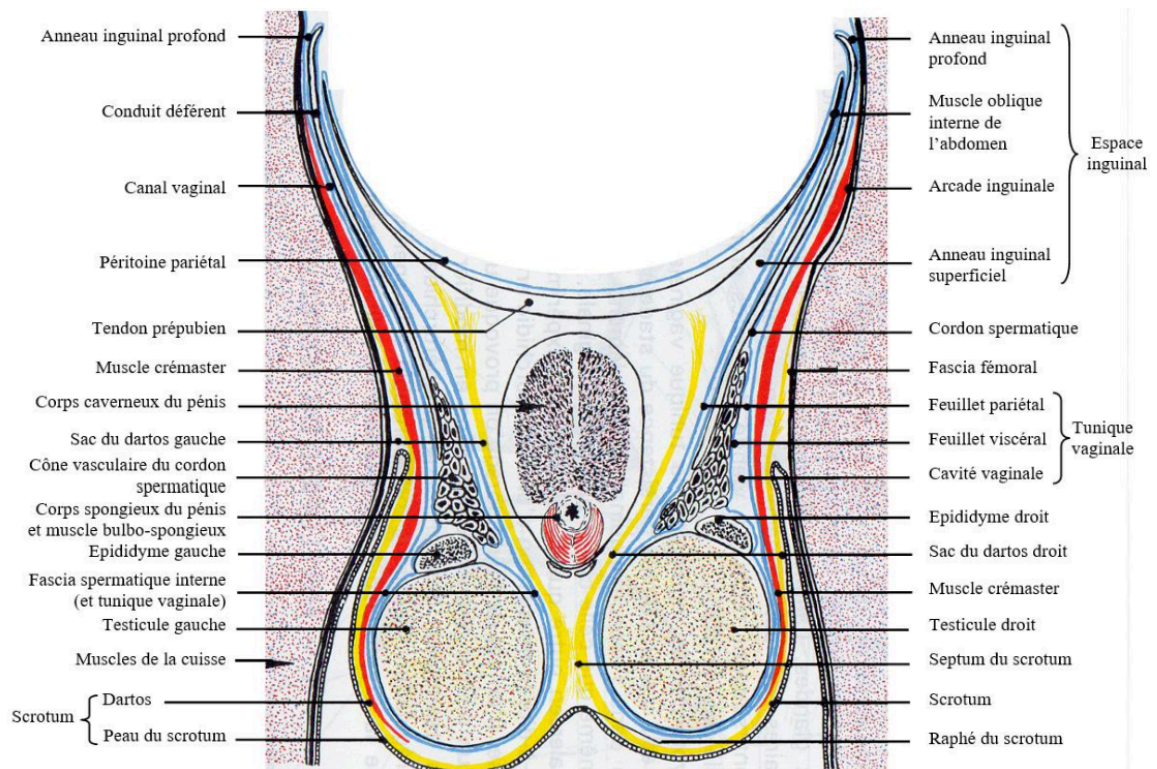


Figure 2 : Schéma des enveloppes des testicules, coupe transversale en vue caudale¹⁷

2. Les testicules

Les testicules sont des organes parenchymateux, de structure ovoïde, légèrement comprimés et contenus dans le scrotum (figure 1).⁹¹ Les testicules ont comme principale fonction la spermatogenèse (production de spermatozoïdes) et la stéroïdogénèse (production d'hormones stéroïdes).

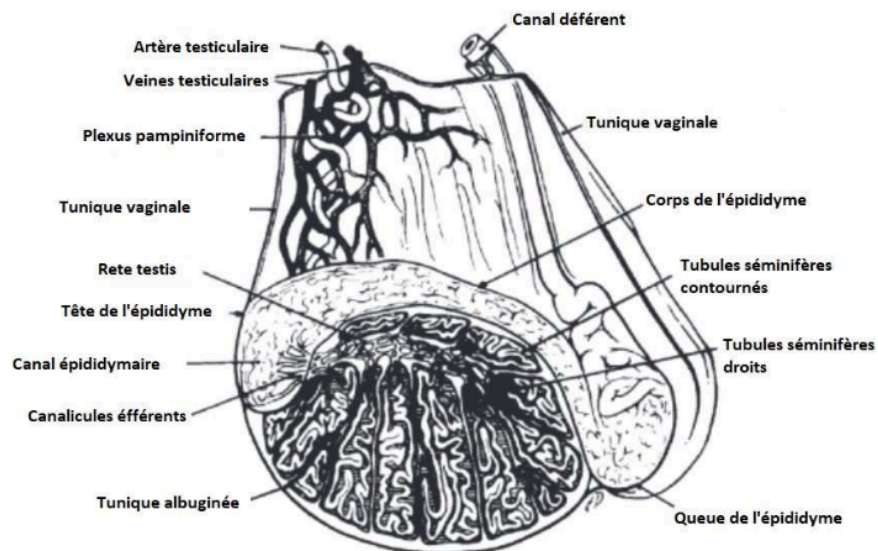


Figure 3 : Schéma d'une coupe sagittale d'un testicule d'étalon montrant sa conformation intérieure et sa structure¹²⁷

Ils descendent lors des 3 dernières semaines de gestation ou lors des 2 premières semaines de vie. Certaines fois, ils restent en position inguinale, dans ce cas l'étalon est dit cryptorchide.⁵⁰

Leur taille varie en fonction de l'âge, de la saison, de la race et aussi en fonction de la production journalière de sperme. Mais en moyenne un testicule d'étalon mesure 5 à 6,5 centimètre de hauteur, 9,5 à 11,5 centimètres de longueur et 4,5 à 6 centimètres d'épaisseur.¹⁵⁶

Les testicules sont recouverts par la tunique albuginée (Figure 3). C'est une membrane fibreuse, épaisse et élastique. Elle est creusée de canalicules dans lesquels circulent les vaisseaux, qui se prolonge en formant des septums qui divisent le parenchyme testiculaire en lobules. Les cloisons de ces lobules convergent vers un axe conjonctif épais : le mediastinum testis. Chez l'étalon, la tunique albuginée contient un muscle lisse permettant de réguler le tonus testiculaire et donc participe au transport du sperme.⁹¹ L'albuginée enveloppe aussi l'épididyme.

Le parenchyme testiculaire est composé de tubes séminifères et de tissu interstitiel. Les tubes séminifères sont le siège de la spermatogénèse et constituent 70% du parenchyme testiculaire. Ils sont dans un premier temps contournés puis deviennent droits (figure 2).

L'épithélium des tubes séminifères contournés est composé des cellules germinales, et des cellules de Sertoli unies les unes aux autres. Ensuite les tubes séminifères droits se raccordent dans leur portion terminale au *rete testis* qui constitue la première voie de l'excrétion du sperme.

Enfin le tissu interstitiel ou stroma entoure les tubules séminifères. Il contient les cellules de Leydig, des fibroblastes, des lymphocytes ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques.⁹¹

3. Voies spermatiques

Épididyme

L'épididyme assure un rôle de maturation des spermatozoïdes, nécessaire pour l'acquisition de leur pouvoir fécondant. C'est un organe allongé mesurant une douzaine de centimètres de longueur, accolé à la partie médiane du testicule (figure 3) où les spermatozoïdes circulent quand ils quittent le testicule.¹⁷

La tête de l'épididyme est attachée au pôle cranio-dorsal du testicule. Le corps de l'épididyme est libre et parcourt caudalement le côté dorso latéral du testicule.¹⁵⁷ Son épithélium produit des protéines et enzymes participant à la maturation et à la capacitation des spermatozoïdes. Enfin la queue de l'épididyme s'abouche au canal déférent et est attachée au testicule par le ligament propre et à la tunique vaginale par le ligament de la queue de l'épididyme. Son rôle est le stockage des spermatozoïdes matures.⁹¹

Le cordon spermatique

Le cordon spermatique est une structure contenant : l'artère, la veine spermatique, le muscle crémaster et le conduit déférent. La veine spermatique se divise en plexus pampiniform qui entoure l'artère et permet au sang de se refroidir lorsqu'il parcourt le testicule. Le muscle crémaster a lui aussi un rôle dans la thermorégulation du testicule en permettant de varier la distance du testicule.⁵⁰ Par exemple, par temps chaud, les testicules ont tendance à s'éloigner de la paroi abdominale et à augmenter les échanges par évaporation, et à l'inverse pour réduire les pertes de chaleur par temps froid à se rapprocher de la paroi abdominale.

Le conduit déférent

Le conduit déférent est en continuité avec l'épididyme et permet le transport des spermatozoïdes jusqu'à l'urètre. Il est situé en position abdominale puis ensuite passe dans le canal inguinal. A son extrémité distale il se dilate pour prendre la forme d'une ampoule permettant le stockage temporaire des spermatozoïdes. ⁵⁰

L'urètre

L'urètre est un canal permettant l'excrétion de l'urine provenant de la vessie, vers l'extérieur. Il permet aussi le transport des spermatozoïdes lors de l'éjaculation. ⁵⁰

Pénis

Le pénis est l'organe mâle permettant la copulation et la miction. Chez l'étalon, il est de type musculo-caverneux et est constitué de trois parties : la racine, le corps et le gland.

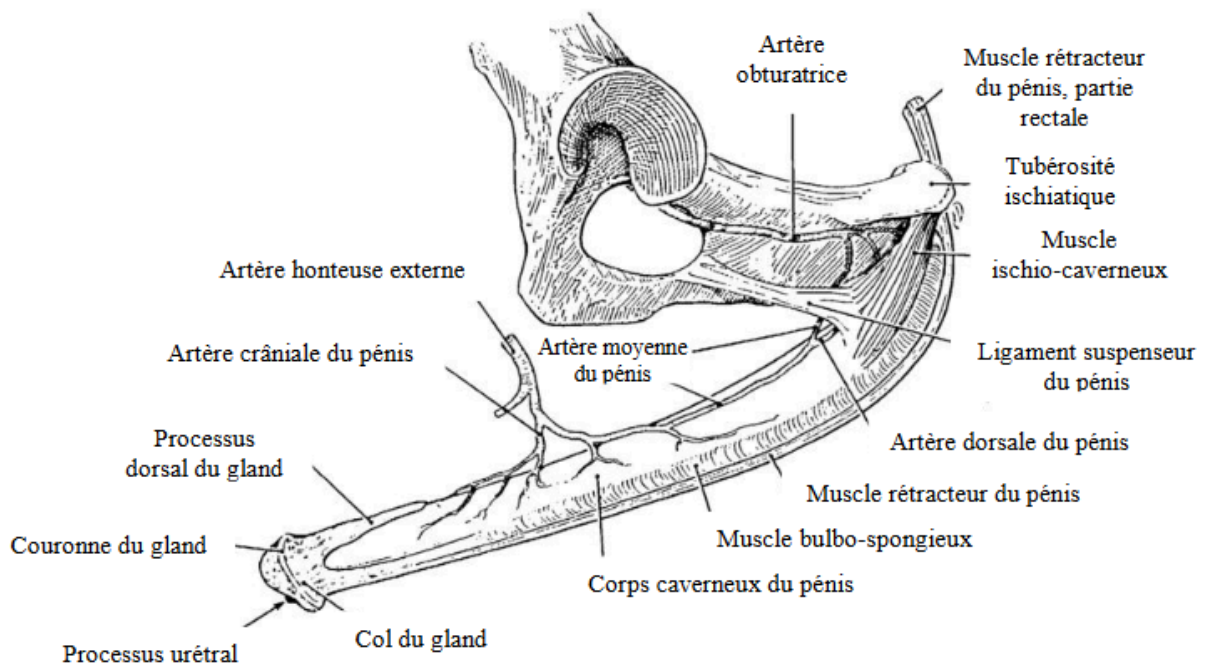


Figure 4 : Schéma de la structure du pénis d'étalon et de ses attaches osseuses, vue latérale gauche ⁶

La racine du pénis est épaisse et large. Elle est formée de deux muscles ischio-caverneux et du bulbe érectile. Les muscles prennent leur origine sur la face ventrale de l'arcade ischiatique et fusionnent distalement pour former le corps caverneux du pénis qui est la cavité érectile majeure du corps du pénis. Le bulbe prend son origine caudalement aux glandes bulbo-urétrales, et est en continuité avec le corps spongieux du pénis qui entoure l'uretère après avoir rejoint le corps caverneux. ¹

Le corps caverneux et le corps spongieux (figure 4) forment le tissu érectile du pénis et l'érection est provoquée par l'afflux de sang, provenant des branches des artères pudendales internes et externes et des artères obturatrices.

Enfin le gland du pénis est la partie terminale du pénis. Il est volumineux, surtout lors de l'érection. Cela est permis grâce à l'élasticité du stroma et de la peau du gland. Cet élargissement permet d'aider à l'éjaculation intra-utérine en bloquant le col de l'utérus. ²⁷

Prépuce

Le prépuce permet de protéger la partie libre du pénis lorsqu'il n'est pas en érection. Il est formé de deux replis, un externe et un interne qui s'effacent lorsque le pénis rentre en érection. Le replis externe forme l'orifice préputial et le repli interne forme l'anneau préputial. Lorsque le pénis rentre en érection l'orifice préputial est situé à la base du pénis et l'anneau préputial est représenté par un pli de peau à mi-longueur de la partie libre du pénis. ⁹¹

4. Glandes accessoires

Les glandes accessoires participent dans des proportions variables à la production du plasma séminal, la fraction liquide de l'éjaculat.

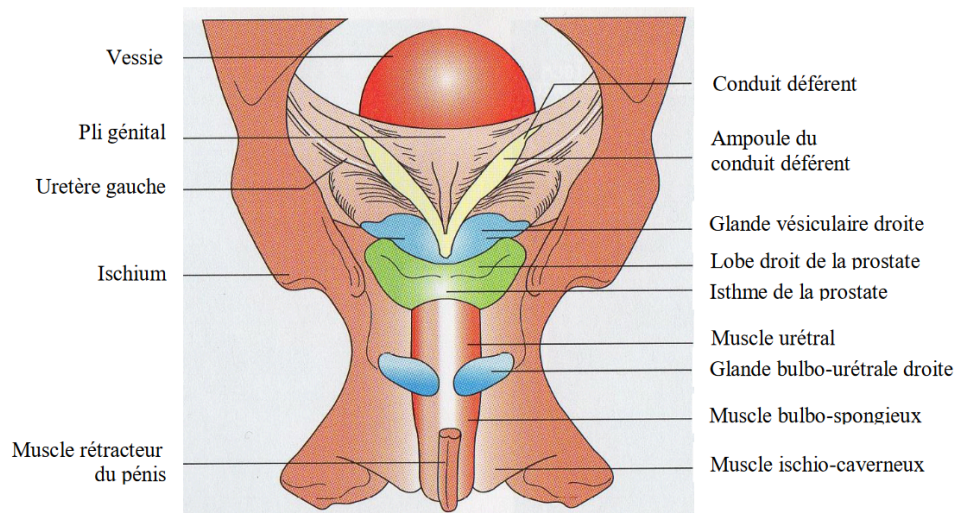


Figure 5 : Schéma présentant les glandes accessoires sexuelles de l'étalon (vue dorsale de la partie pelvienne de l'appareil reproducteur) ¹⁴²

Les glandes accessoires sexuelles chez l'étalon visibles sur les figures 1 et 5 sont : les vésicules séminales, ampoule du canal déférent, la prostate, et les glandes bulbo-urétrales.⁹¹

Les vésicules séminales

Les vésicules séminales sont des glandes triangulaires, tubulo-alvéolaires situées dorsalement et de part et d'autre du canal déférent (figure 5). Elles se terminent par un conduit éjaculateur, commun au conduit déférent. Ce conduit éjaculateur débouche ensuite dans l'urètre distalement à l'ampoule.⁵⁰

Leur taille varie en fonction de l'excitation sexuelle, elle mesure de 10 à 12 centimètres de long par 2 à 3 centimètre de diamètre en période de repos sexuel et peuvent faire jusqu'à 15 à 20 centimètre de long par 4 à 5 centimètres de diamètre lors d'excitation sexuelle.¹⁵⁷

Les ampoules du canal déférent

Les ampoules se situent sur la portion distale des canaux déférents, dorsalement à la vessie, entre les deux vésicules séminales (figure 5). Une ampoule mesure environ 15 cm de long et 2 cm de diamètre.¹⁵⁷ Ces glandes sont une dilatation de la paroi des canaux déférents, avec la présence de cryptes et de glandes sécrétrices. Elles ont une fonction glandulaire et jouent le rôle de stockage des spermatozoïdes.⁸³

La prostate

La prostate est une glande bilobée connectée par un isthme, située en partie caudale du pelvis.¹⁵⁷ Chez l'étalon mature chaque lobe mesure environ 4 à 6 cm de large et 2 à 4 cm de longueur.⁹¹ Elle se situe sur le col de la vessie dorsalement à l'urètre, et est formée d'un ensemble de canaux formant le sinus prostatique qui s'abouchent dans l'urètre pelvien.⁵⁰

Les glandes bulbo-urétrales

Les glandes bulbo-urétrales sont des glandes paires et situées caudalement à la prostate en se terminant à la surface dorsale de l'urètre (figure 3).⁵⁰ De forme ovale, elles mesurent environ 3 à 4 cm de long par 2 à 2,5 cm de large.¹⁵⁷

B. LA SPERMATOGENÈSE

Après avoir vu décrit l'anatomie de l'appareil génital de l'étalon, nous allons dans cette partie nous intéresser au processus de fabrication des spermatozoïdes : la spermatogenèse.

1. Définition

La spermatogenèse est un processus de divisions et de différenciation cellulaire au cours duquel les spermatozoïdes sont formés à partir d'une spermatogonie.¹⁰⁶

La spermatogenèse se déroule dans les tubules séminifères contournés des testicules (figure 2), qui constituent la majeure partie du volume testiculaire.⁷⁵ L'épithélium spermatogène situé dans ces tubules est constitué de l'ensemble des cellules dérivées des gamétocytes, cellules à l'origine des spermatogonies.¹⁰⁶ Il est aussi formé des cellules de Sertoli qui constituent l'épaisseur de la paroi des tubes séminifères.

Le stroma testiculaire quant à lui, contient les cellules de Leydig, des vaisseaux, des fibres nerveuses, des vaisseaux lymphatiques, des macrophages, des fibroblastes, des lymphocytes ainsi que du tissu conjonctif.¹⁷⁵

Chez l'étalon la spermatogenèse débute à la puberté, qui survient entre 15 et 21 mois d'âge et est longue (environ 50 jours). Elle est stable durant la plus grande partie de leur vie, de 4 à 20 ans environ, mais par la suite avec l'âge certains étalons développent une sénescence.⁵⁰ La production de spermatozoïdes s'effectue durant toute l'année mais de nombreux paramètres qualitatifs varient en fonction de la saison.⁹⁶

2. Mécanisme:

La spermatogenèse peut être divisée en 3 parties : la spermatocytogenèse, la méiose et la spermio-genèse.⁷⁶

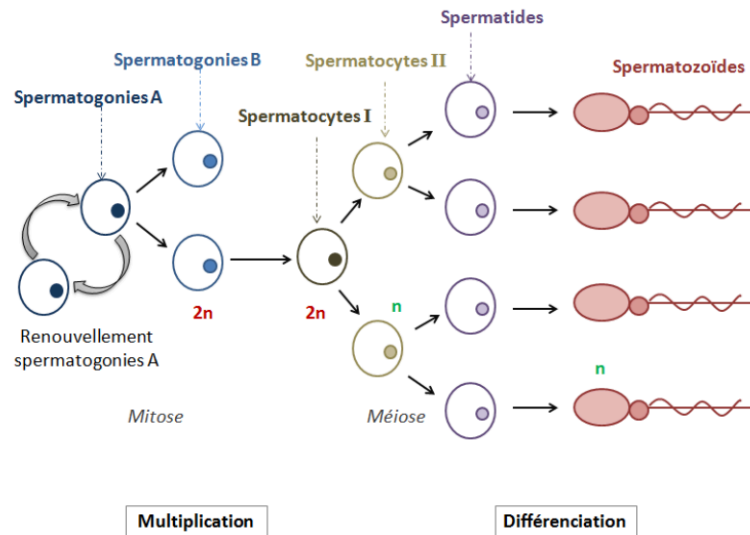


Figure 6 : Schéma synthétique des différentes étapes de la spermatogénèse ¹⁰⁶

Spermatocytogénèse

La spermatocytogénèse correspond à la production de spermatocytes à partir des spermatogonies (figure 6).⁹¹ Les spermatogonies, cellules souches, sont issues des gonocytes et sont localisées à la base des tubes séminifères chez l'adulte (figure 7).⁷⁶

Deux types de spermatogonies ont été mis en évidence. Le type "ad" à petit noyau foncé, correspond aux cellules souches de réserves. Et le type "ap" à gros noyau granuleux correspond aux spermatogonies de renouvellement.¹⁵⁷ Elles sont renouvelées par un phénomène de mitose, ce qui permet d'assurer leur production d'une manière continue. La spermatocytogénèse permet donc de continuer la lignée des cellules souches en produisant des spermatogonies de réserve et d'autres qui se divisent par la suite et se différencient en spermatozoïdes. En parallèle de cette production de spermatogonies il y a aussi un phénomène de dégénérescence cellulaire pour réduire leur nombre.⁷⁶

Avec cette division continue, la moyenne de production de spermatozoïdes lors de la saison de reproduction, est de 70 000 spermatozoïdes par seconde.⁶

Méiose

La méiose est le processus au cours duquel une cellule mère diploïde se divise en cellules filles haploïdes. Au cours de la méiose, les spermatocytes produisent des spermatides haploïdes (figure 6).⁷⁶

Spermiogénèse

La spermiogénèse, dernière étape, est la différenciation des spermatides en spermatozoïdes. Les spermatides produites lors de la deuxième division sont des cellules sphériques avec un nucléi non condensé. Elles se différencient ensuite en cellules avec une tête allongée contenant un nucléi condensé et un flagelle. ¹⁵⁷

Le flagelle est formé à partir des deux centrioles de la spermatide. Ces deux centrioles sont positionnées à 90° l'une par rapport à l'autre. Celle qui est la plus proche du noyau se différencie en pièce connective qui permet la jonction entre le noyau et le flagelle. ¹⁵⁷

La spermiogénèse n'implique pas de divisions cellulaires, la synthèse ADN est minimale et sûrement restreint à la seule réparation de l'ADN.

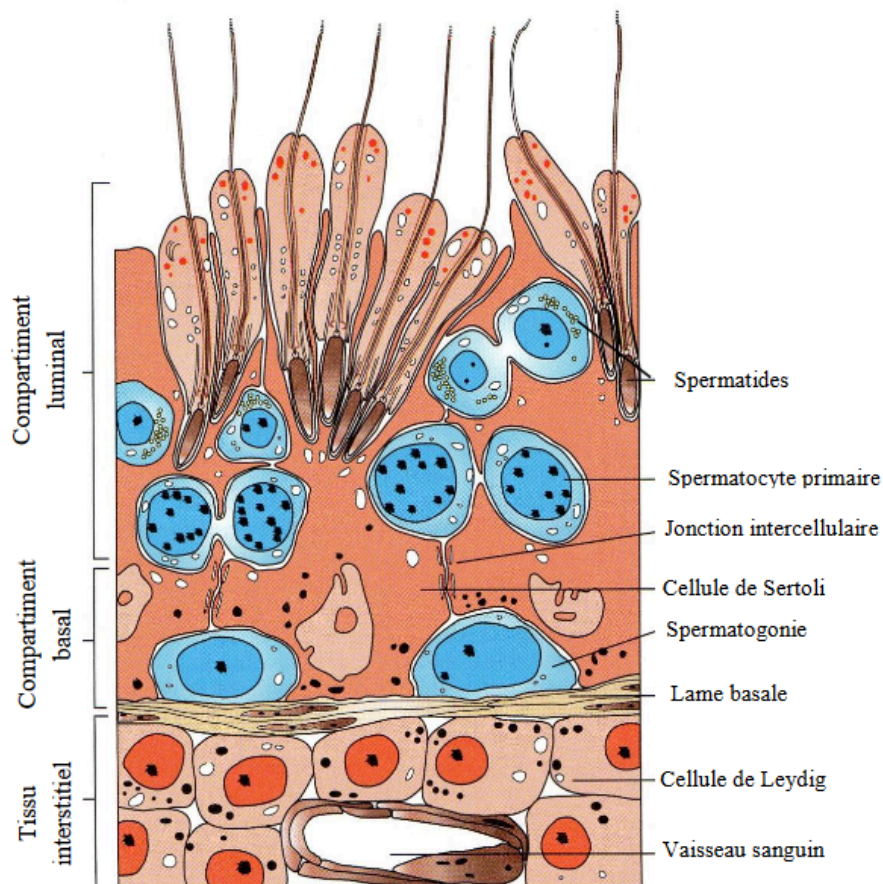


Figure 7 : Coupe d'un tube séminifère chez l'étalon avec les différentes cellules impliquées dans la spermatogénèse ¹⁴²

Elles produisent également d'autres protéines comme par exemple l'inhibine ou encore l'ABP (protéine de liaison à l'androgène).¹⁵⁴

Enfin ces cellules sont séparées par des jonctions serrées (figure 8), permettant la formation d'une barrière hémato-testiculaire. Cette barrière assure une séparation des cellules germinales en cours de formation du système immunitaire.

4. Cellules de Leydig:

Les cellules de Leydig sont des cellules polygonales qui constituent la composante majeure du tissu interstitiel. Leur importance relative dans le parenchyme testiculaire augmente avec l'âge de l'étalon.⁷³ Elles sont en contact étroit avec des vaisseaux veineux et lymphatiques qui assurent le passage des hormones dans la circulation générale. Elles jouxtent aussi les parties basales des tubes séminifères constitués des cellules de Sertoli.

Les cellules de Leydig sont la source principale d'androgènes.¹⁵⁴ Les androgènes ont un rôle majeur dans le maintien de la spermatogénèse. Ils diffusent dans les vaisseaux, les espaces interstitiels et les tubes séminifères. La testostérone est la plus commune des androgènes impliqués dans le maintien de la spermatogénèse. Ainsi les cellules de Leydig participent à la spermatogénèse en produisant des concentrations élevées de testostérone à proximité des tubes séminifères.⁷⁷

Cette synthèse de stéroïdes prend place dans deux compartiments cellulaires distincts : la membrane interne des mitochondries et la membrane microsomale du réticulum endoplasmique lisse. Chez les étalons, les cellules de Leydig ont un réticulum endoplasmique lisse abondant où le cholestérol est synthétisé et où la pregnenolone est rapidement métabolisée en testostérone.⁷⁷

Les cellules de Leydig permettent aussi la régulation de la spermatogénèse en influençant la production de certains facteurs de croissance comme les IGF (Insulin-like Growth Factor), l'inhibine, l'activine ou encore l'INSL3 (Insulin-Like Factor 3). IGF-1 joue un rôle dans la différenciation des spermatogonies et l'inhibine et l'activine sont des glycoprotéines de la famille de TGF (Transforming Growth Factors) qui ont un rôle possible dans la régulation et le maintien de la spermatogénèse.¹⁴⁵

5. Cellules myoïdes

Les cellules myoïdes sont les constituants cellulaire du tissu autour des tubes séminifères. Elles sont sous influence des facteurs de croissance testiculaire.

Ces cellules contiendraient des filaments d'actine et seraient impliquées dans les contractions rythmiques des tubes séminifères. Elles permettent donc l'intégrité structurale des tubules et pourraient participer dans les mouvements propulsifs des spermatozoïdes.⁷⁷

6. Régulation endocrinienne

La spermatogénèse et la stéroïdogénèse sont sous dépendance du système nerveux central et endocrinien.

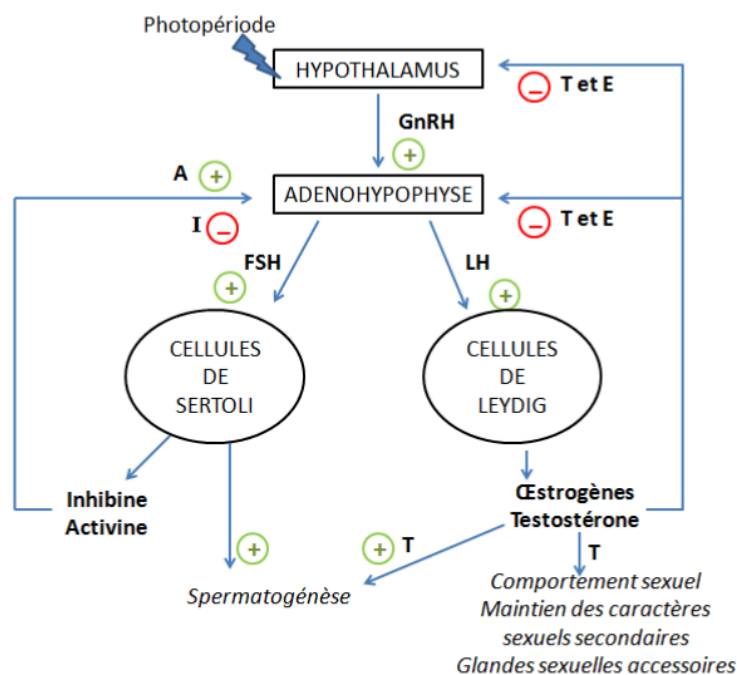


Figure 9 : Schéma de la régulation de la fonction de reproduction chez l'étalon¹⁰⁶

A: activine E: oestrogènes I: inhibine T: testostérone

Les hormones FSH et LH libérées par l'hypophyse sous contrôle de la GnRH permettent la spermatogénèse et la stéroïdogénèse. Plus précisément, l'hormone LH agit sur les cellules de Leydig et entraîne la synthèse de testostérone et d'oestrogènes.¹⁵⁷ Le niveau de testostérone

devient plus élevé au niveau des tubes séminifères que dans la circulation sanguine. Ce niveau élevé permet un bon déroulement de la spermatogenèse.⁶ La testostérone, à son tour, contrôle la sécrétion de la LH par rétro-inhibition au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire (figure 9). Les oestrogènes sont sécrétés en grande quantité, notamment le sulfate d'oestrone. Ce stéroïde serait impliqué localement dans la production et la maturation des spermatozoïdes.¹⁶⁷

La FSH agit sur l'épithélium séminal et les cellules de Sertoli, qui sécrètent par la suite de l'ABP (Androgen-binding protein), de l'inhibine et de l'activine.¹⁵⁷ L'inhibine diminue la sécrétion de FSH par rétro-contrôle négatif sur l'hypophyse et l'activine au contraire active cette sécrétion par rétro-contrôle positif en réponse à la GnRH.

L'ABP permet la fixation des androgènes issus des cellules de Leydig et leur circulation jusqu'aux récepteurs cytosoliques des cellules germinales.

Les deux hormones hypophysaires FSH et LH permettent, par leur action synergique et simultanée, l'intégrité structurale et fonctionnelle des tubes séminifères.¹⁵⁷

Les taux hormonaux de LH, de FSH, de testostérone et enfin d'oestrogènes sont plus élevés pendant le printemps et l'été, période pendant laquelle la photopériode est la plus importante.

L'âge est aussi un facteur de variation des taux de FSH et de LH. Ces taux sont faibles jusqu'à deux ans puis augmentent par la suite jusqu'à 13-20 ans.¹⁶⁷

C. LE SPERMATOZOÏDE

1. Anatomie :

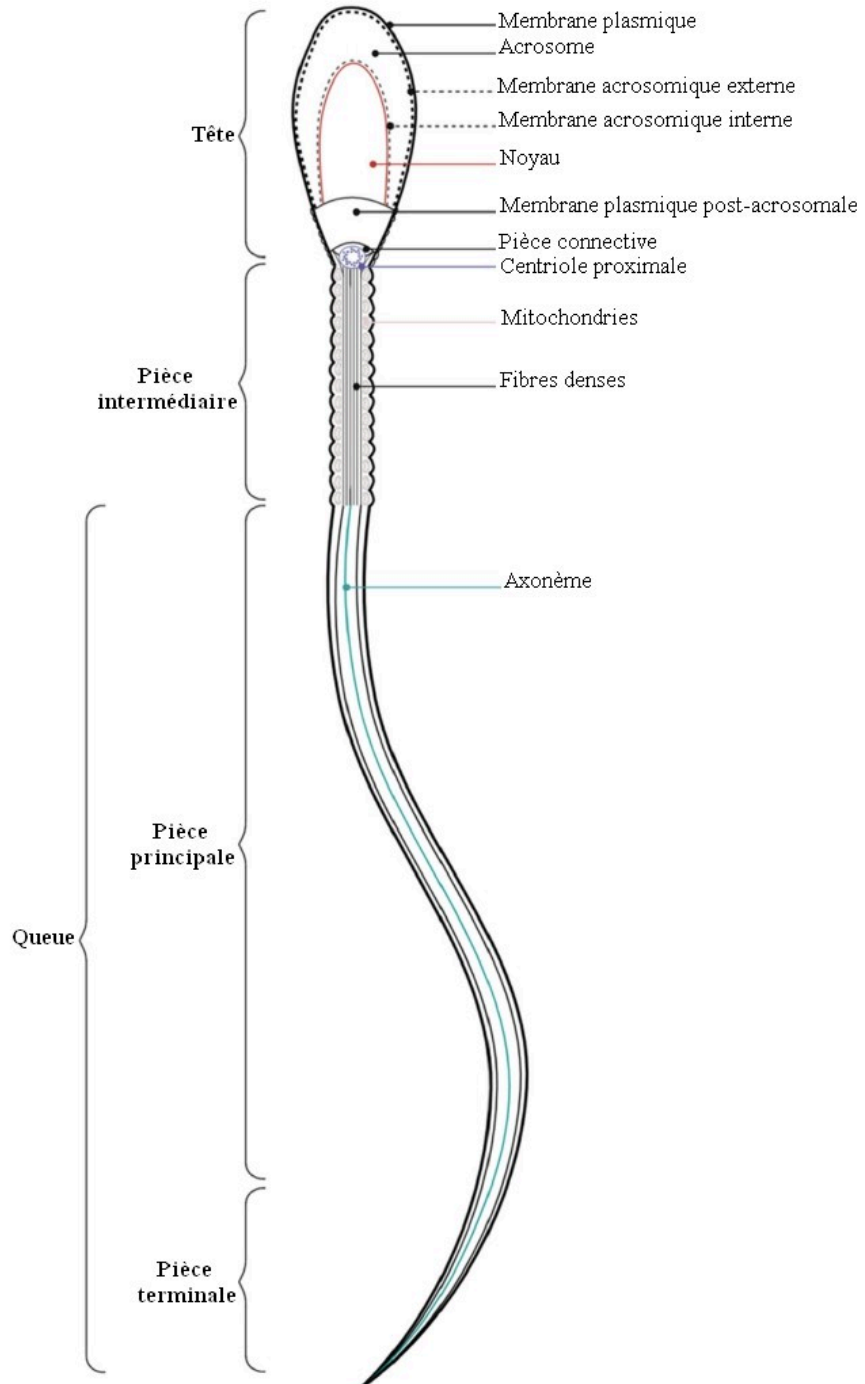


Figure 10 : Anatomie du spermatozoïde ¹²⁰

Le spermatozoïde est une cellule haploïde d'environ 61 à 86 μm avec un rôle précis, celui de féconder un ovocyte.¹⁶⁵ Cette cellule est hautement différenciée à la suite de la spermatogénèse et des modifications qui surviennent lors de la maturation épидидymaire et après éjaculation. Le spermatozoïde a une entité immunologique propre, une spécialisation de certains organites ainsi qu'un rapport noyau/cytoplasme très élevé.¹³¹

Il comporte deux grandes parties (figure 10) : la tête et le flagelle. La tête contient l'acrosome le noyau, et quelques éléments cytoplasmiques. Elle peut être divisée en plusieurs régions : la région acrosomale, le segment équatorial, la région post-acrosomale et l'anneau postérieur qui marque la démarcation avec le corps. Cette anneau postérieur est le point d'ancrage de la membrane plasmique à l'enveloppe nucléaire ce qui permet la séparation des éléments cytoplasmiques de la tête et du flagelle. Le flagelle contient la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. Toutes ces différentes parties du spermatozoïde sont entourées d'une membrane plasmique.¹⁶⁵

La membrane plasmique

La membrane plasmique, composant le plus externe, englobe la totalité du spermatozoïde (figure 10). Sa nature et sa fonctionnalité varient en fonction des régions. Mais, toutes ses fonctions n'ont pas encore été élucidées.

Sa structure de base comporte une bicouche lipidique et des protéines.¹⁰⁹

Dans la bicouche lipidique on retrouve en majorité des phospholipides et du cholestérol (avec un ratio de 0.36).¹⁰⁶ Chez les mammifères, la composition de la membrane plasmique est asymétrique, avec une proportion plus importante de phosphatidylcholine et de sphingomyéline sur la membrane externe et une proportion plus importante de phosphatidylsérine et phosphatidylethanolamine sur la membrane interne.²⁴ Les protéines enchâssées dans cette bicouche représentent 50% du poids moléculaire et peuvent être intrinsèques ou périphériques. Celles qui sont intrinsèques sont des canaux, des pores ou des récepteurs.

A la température corporelle, la membrane plasmique est fluide, permettant le mouvement de ses composants.¹⁰⁹ Cette fluidité dépend de la nature des phospholipides et du ratio de cholestérol. Plus le ratio en cholestérol est important, moins la fluidité est importante.

La configuration des phospholipides ainsi que la présence de cholestérol permet à la membrane de rester intègre, ce qui est nécessaire pour la fécondation. Mais il peut arriver, par exemple lors de la congélation, que cette structure soit altérée, et qu'elle subisse des dommages irréversibles.²⁹

La tête

La tête du spermatozoïde contient le nucleus avec son enveloppe, l'acrosome, espace pré-acrosomal et la membrane plasmique (figure 10).¹⁰⁶ Chez l'étalon la tête est plate et large avec une forme elliptique, et elle est plus épaisse en région postérieure qu'en région apicale.¹⁶⁵

Le nucléus est contenu dans une enveloppe nucléaire avec une double membrane et des pores hexagonaux dans la région cervicale. Il occupe la majorité de l'espace. Il contient le matériel génétique paternel sous forme de chromatine condensée, avec un volume qui approche seulement 5 à 10% du volume d'une cellule somatique.¹⁶⁵

Cette condensation est le résultat d'un changement de composition des protéines nucléaires qui survient lors de la spermatogénèse et lors du transit épидидymaire. En effet, le génome des spermatides code des protamines qui prédominent comme protéine nucléaire lors de la maturation dans l'épididyme des spermatozoïdes. Ces protamines sont riches en arginine et cystéine. Elles sont capables d'établir entre elles des ponts disulfures et permettent ainsi la compaction et la stabilisation de l'ADN.¹⁶⁵

L'acrosome est un organite formé lors de la spermiogénèse à partir des vésicules golgiennes. Il est épaissi et effilé dans sa partie rostrale.¹⁵⁸ Il est constitué d'une membrane divisée en deux parties : une interne qui est en apposition avec l'enveloppe nucléaire et une externe qui est située sous la membrane plasmique. Ces deux membranes convergent au niveau du segment équatorial.¹⁶⁵ Elles délimitent un compartiment hétérogène : la matrice acrosomale. Chez le spermatozoïde mature l'acrosome contient de nombreuses molécules actives dans la matrice mais aussi liées à la face interne de la membrane acrosomique. Parmi ces molécules on retrouve des glycolipides et des enzymes (hyaluronidase, pro-acrosine, acrosine et lipases). Ces dernières sont nécessaires lors de la fécondation, durant la réaction acrosomique, pour permettre l'adhésion et la pénétration de la zone pellucide. Durant cette phase la membrane externe fusionne avec la membrane plasmique ce qui crée des pores et des vésicules libérant ainsi le contenu acrosomique (figure 11).¹⁰⁶

Le compartiment cytosolique du spermatozoïde mature ne contient pas d'organites autres que l'acrosome. Il contient cependant des protéines du cytosquelette qui sont nécessaires pour sa fonction. Durant la spermiogénèse des changements au niveau du cytosquelette apparaissent ce qui permet l'allongement de la tête des spermatides.

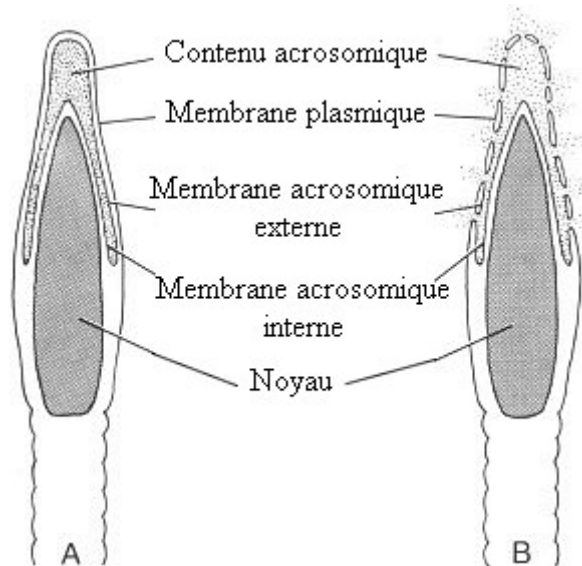


Figure 11 : Représentation de la tête du spermatozoïde normal (A) et après la réaction acrosomique (B) ⁹¹

La région cervicale

La région cervicale se situe entre la pièce intermédiaire et la tête. Elle permet la production et la stabilisation des composants structuraux du flagelle. On y retrouve une fossette d'implantation constituée d'un renforcement nommé capitulum, ainsi que des colonnes de fibres et d'une centriole distale et proximale. Le capitulum s'articule avec la tête au niveau de la fosse d'implantation, via des fins filaments. Les centrioles sont impliquées dans le développement de l'axonème. La centriole proximale est fixée au niveau de la fosse d'implantation et la centriole distale produit l'axonème lors du développement de la queue.¹⁶⁵

Cette région est déviée par rapport à l'axe central du spermatozoïde et est fragile.¹⁰⁶

Pièce intermédiaire

La pièce intermédiaire est caractérisée par la présence d'un axonème, de fibres denses ainsi que de mitochondries.

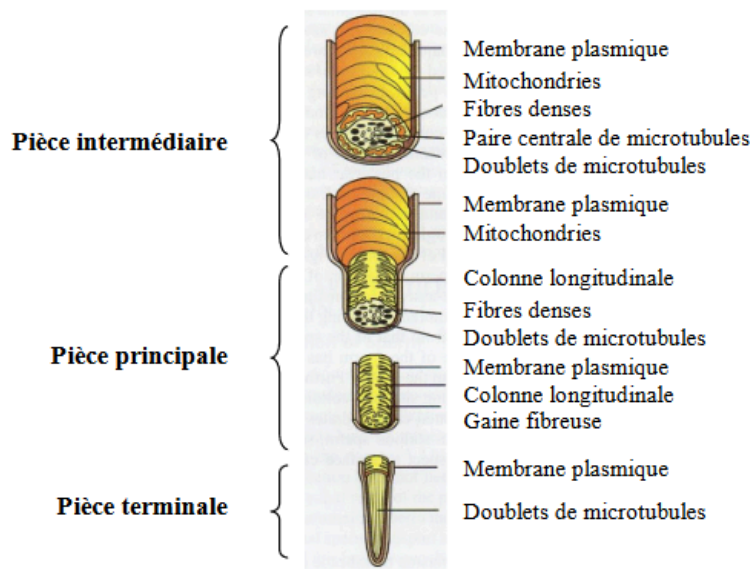


Figure 12 : Schéma de la structure du flagelle de spermatozoïde équin ¹⁴²

Ces mitochondries sont disposées sous forme d'une double spirale continue de la région cervicale à l'annulus et sont soutenues par 9 fibres denses. Cette spirale mitochondriale se situe à la périphérie de l'axonème.¹⁵⁸

L'axonème est un tube cylindrique composé de 9 paires de microtubules périphériques entourant une paire centrale de microtubules, qui sont connectés par des ponts (figure 12). Les microtubules sont composés de protéines de la famille des tubulines. Chaque paires de microtubules périphériques est composée d'une sous unité "A" cylindrique, composée de 13 protofilaments, ainsi que d'une sous unité "B" composée de 10 à 11 protofilaments. La sous unité A permet un point d'ancrage pour les bras externes et les bras internes de dynéine qui possèdent une activité ATPase. Ainsi ces bras de dynéines permettent de générer la force nécessaire pour un mouvement flagellaire à travers un cycle d'attachement et de détachement entre les deux sous unités A et B. Des filaments de nexines permettent de connecter les doublets de microtubules.

Les fibres denses en périphéries apportent un support structurel ainsi qu'une certaine élasticité lorsque le flagelle se courbe.

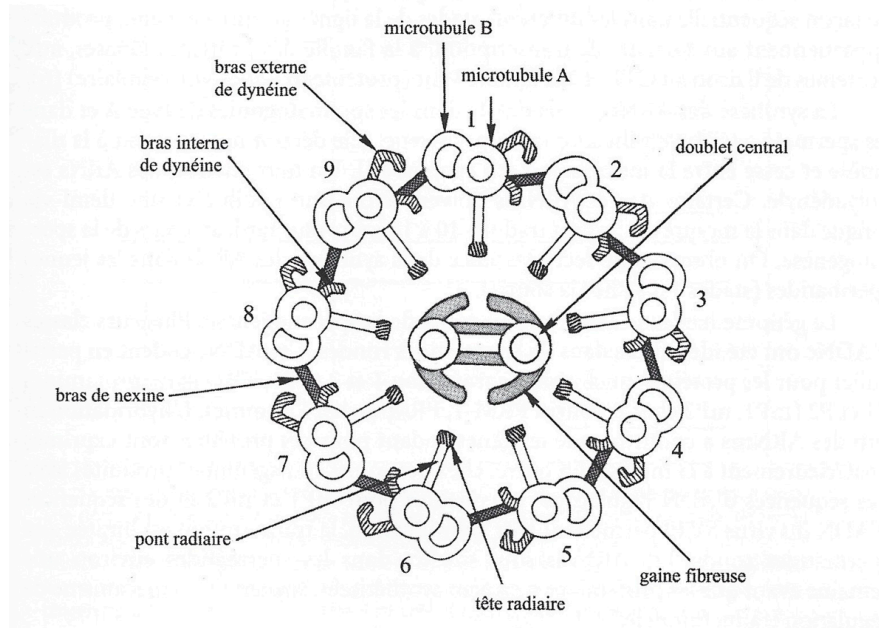


Figure 13 : Schéma de l'organisation d'un axonème chez un spermatozoïde d'Homme ¹⁵⁴

Pièce principale et pièce terminale

L'annulus, caractérisé par une forte adhérence de la membrane plasmique, marque le commencement de la pièce principale.

A ce niveau, la gaine mitochondriale est remplacée par une gaine fibreuse qui parcourt toute la longueur de la pièce principale jusqu'à la pièce terminale. Cette gaine est composée de deux colonnes longitudinales de fibres qui sont liées par une série d'anneaux fibreux. Cette gaine fibreuse permet d'apporter un support structural et de l'élasticité au flagelle mais a aussi un rôle de transmission pour de nombreux signaux cellulaires et d'événements métaboliques. ¹⁰⁶

2. Métabolisme du spermatozoïde

Dans l'espèce équine le site de dépôt du sperme, l'utérus, est distant du site de fécondation : l'oviducte. Les contractions utérines permettent de faciliter le déplacement des spermatozoïdes, mais ils doivent être mobiles pour pouvoir traverser l'utérus et la jonction utéro-tubaire ainsi que pour localiser l'ovule. Pour cela, les spermatozoïdes doivent être capables de générer de l'énergie sous forme d'ATP pour pouvoir assurer leur mobilité. ¹⁶⁵

En plus de leur mobilité, les spermatozoïdes subissent de nombreuses modifications à travers un processus appelé capacitation. Ce processus, leur permettant d'acquérir leur pouvoir fécondant, est très coûteux en énergie.⁶⁰

De plus cette cellule spécialisée est très compacte avec peu de cytoplasme et peu d'organites par rapport aux cellules somatiques. Le nucleus, lui aussi compact, atteint un état quasi cristallin lors de la spermatogénèse, ce qui est incompatible avec la transcription génique.⁶⁰ Une majorité du cytoplasme et des organites régulant le métabolisme dans les cellules somatiques (réticulum endoplasmique, ribosomes et appareil de golgi), sont aussi résorbées. En résultat, le spermatozoïde est dépourvu d'énergie intracellulaire sous forme de gouttelettes lipidiques ou encore de glycogène. Le spermatozoïde est donc dépendant de son environnement extracellulaire pour son approvisionnement d'énergie mais aussi pour son activité enzymatique.¹⁵⁸

Les deux principales voies métaboliques permettant la production d'ATP pour le spermatozoïde sont la glycolyse et la phosphorylation oxydative. Les phosphorylations oxydatives ont lieu dans les mitochondries de la pièce intermédiaire. Elles ont un meilleur rendement en termes d'ATP que la glycolyse. Les enzymes de la glycolyse sont localisées dans la pièce principale de la queue, en association avec la gaine fibreuse.

La glycolyse

La glycolyse est une voie métabolique qui convertit le glucose en pyruvate. Ce processus utilise les molécules de glucose, fructose ou encore mannitol comme substrat.¹⁶⁵

La glycolyse et la mobilité des spermatozoïdes a été beaucoup étudiée. Kasahara et Hinkle ont mis en évidence en 1977 les transporteurs de glucose GLUTs.¹⁶⁵ Cette famille complexe permet aux molécules de glucose, de large taille, de traverser la membrane plasmique. De nombreux GLUTs ont été identifiés avec des capacités différentes en fonction des hexoses (glucose, fructose, mannitol). Les transporteurs GLUT 1,2, 3, 5 ont été identifiés au niveau de la queue et de l'acrosome du spermatozoïde d'étalon tandis que GLUT 4 a été mis en évidence sans localisation particulière.

Cette localisation au niveau de l'acrosome, suggère que les processus glycolytiques sont impliqués dans la génération d'énergie pour les modifications membranaires que nécessite la capacitation et la réaction acrosomiale.

Lorsque le glucose rentre dans le spermatozoïde, il est phosphorylé en glucose-6-phosphate et peut entrer dans différentes voies métaboliques : la voie des pentoses phosphates, la synthèse de glycogène ou la glycolyse. Le produit de cette dernière réaction, le pyruvate, est ensuite oxydé en acétyl CoA, si il rentre dans le cycle de Krebs, mais peut aussi être réduit en lactate en conditions aérobies.¹²⁵ Le lactate peut ensuite être oxydé dans les mitochondries et produire de nouveau du lactate.

L'importance de la glycolyse pour la production d'ATP impliquée dans la motilité, la capacitation ou encore la réaction acrosomique n'a pas été complètement élucidée.¹⁶⁵ Mais chez l'étalon contrairement à d'autres mammifères les phosphorylation oxydative sont nécessaires pour l'apport d'ATP.

Phosphorylations oxydatives

Une étude de Gibb a permis de montrer que la mobilité des spermatozoïdes d'étalons dépend quasiment entièrement des phosphorylations oxydatives pour la génération d'ATP. En effet lors de l'utilisation d'inhibiteurs de mitochondries, les spermatozoïdes perdent en vitesse et la concentration d'ATP chute.⁵⁹

Les mitochondries sont des organites semi-autonomes essentiels pour la production d'ATP à travers ces phosphorylations oxydatives (OXPHOS). C'est une voie métabolique dans laquelle l'oxygène réagit avec des coenzymes réduits via une série de réactions d'oxydoréduction successives catalysées par des complexes protéiques hautement structurés, numérotés de I à IV ainsi que des cofacteurs (cytochrome C et coenzyme Q).¹⁰¹

Situé dans la membrane interne mitochondriale cet agencement de protéines est appelé chaîne de transport d'électrons.¹²⁵ Cette chaîne de transport d'électrons transfère des électrons à l'oxygène, qui est réduit en H₂O, et l'énergie qui est générée à travers ce processus est l'ATP. Le spermatozoïde de l'étalon est donc une cellule fortement dépendante de l'ATP généré par cette chaîne de transport d'électrons.

Cette cascade métabolique est une source d'espèce réactive à l'oxygène (ROS). En effet, une partie de l'O₂ (2%) réduit dans cette chaîne de transport d'électron forme des superoxydes.⁶³ Ces superoxydes induisent la peroxydation des lipides dans la membrane plasmique. Leur peroxydation entraîne un dysfonctionnement de certaines enzymes métaboliques, ce qui augmente la perméabilité membranaire et peut conduire à une altération du spermatozoïde.

Dans une étude de Baumber, il a été montré que les spermatozoïdes non viables ou de mauvaise qualité généraient plus de ROS.¹⁶

Mais les spermatozoïdes avec un métabolisme rapide chez des étalons hautement fertiles ont un niveau de phosphorylation oxydative plus élevé et ont donc ainsi des niveaux de ROS et de peroxydation lipidique plus élevés.¹⁶⁵

Pour contrer ces potentiels dommages provoqués par les ROS, le spermatozoïde de l'étalon a aussi une défense, les catalases qui sont en grande quantité par comparaison aux autres espèces.¹⁵

Donc, malgré le fait que le stress oxydatif entraîne des dommages sur les spermatozoïdes équins, sur un temps court avec la forte activité mitochondriale, il y a une corrélation positive entre les ROS, la peroxydation des lipides et la fertilité. Mais sur un temps plus long lorsqu'on souhaite les réfrigérer ou les congeler il y a une corrélation négative car la génération prolongée des ROS entraîne des dommages oxydatifs irréversibles en impactant l'intégrité de l'ADN et la fonctionnalité du spermatozoïde.¹⁶⁵

3. La maturation des spermatozoïdes

Lors de leur libération et de leur transit dans l'oviducte, les spermatozoïdes subissent des modifications de leurs lipides membranaires. La membrane plasmique perd ainsi sa symétrie et une zone de fusion se forme, ainsi qu'une externalisation des récepteurs de la liaison avec la zone pellucide. Tout au long du trajet dans l'oviducte, les spermatozoïdes interagissent avec le liquide présent dans l'appareil reproducteur de la jument ainsi qu'avec les cellules épithéliales.¹³⁹

La capacitation

A la sortie de l'épididyme les spermatozoïdes sont matures mais incapable de féconder un ovocyte. C'est l'étape de capacitation qui est nécessaire pour acquérir le pouvoir fécondant, c'est à dire la capacité à se lier à la zone pellucide, pénétrer le cumulus de l'ovocyte, provoquer la réaction acrosomique et enfin fusionner avec l'ovocyte.

Cette étape se produit dans les voies génitales de la jument ou in vitro dans certains cas d'insémination artificielle.

Lors de cette étape, des protéines membranaires et cytosoliques subissent des phosphorylations et le cholestérol membranaire est éliminé, ce qui augmente la fluidité membranaire et donc facilite sa fusion avec l'acrosome (figure 11).¹⁴²

La réaction acrosomique

La réaction acrosomique a lieu à proximité de la zone pellucide dans les voies génitales de la jument. Elle a lieu après la capacitation. Lors de ce processus, les enzymes contenues dans l'acrosome sont libérées à travers les pores de la membrane des spermatozoïdes ce qui permet la pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde.¹⁴²

D. L'ÉJACULAT

Après avoir étudié la spermatogénèse et les particularités du spermatozoïde nous allons nous intéresser à l'éjaculat et donc au milieu dans lequel le spermatozoïde est expulsé.

1. Volume et concentration :

Le volume moyen d'un éjaculat est de 60-70 ml avec des valeurs qui peuvent varier de 20 à 250ml.¹⁵⁷ Ce volume n'est pas fixe et peut être modifié en fonction des variations individuelles, de l'importance de la phase de la stimulation sexuelle, des variations saisonnières et de la fréquence des éjaculats.

Le volume total et le nombre total de spermatozoïdes diminuent lorsqu'il y a plusieurs éjaculats. Ils diminuent de moitié entre le premier et le deuxième éjaculat car la majeure partie du gel, sécrétion aqueuse issue des sécrétions des vésicules séminales, est éliminée lors du premier.

La concentration en spermatozoïdes est inversement proportionnelle au volume de l'éjaculat. Elle varie de 20 à 600 millions de spermatozoïdes/ml avec une moyenne de 120 à 180 millions/ml.¹⁵⁷

2. Composition

L'éjaculat est composé de spermatozoïdes et de plasma séminal. Chez l'étalon, le processus de l'éjaculation est composé de 5 à 8 fractions spermatiques qui varient en composition.⁹² Environ 70% des spermatozoïdes sont présents dans les 3 premiers jets.

Le fluide bulbo-urétrale est le premier à être sécrété correspondant au pré-sperme. Ensuite les sécrétions de l'ampoule et les sécrétions prostatiques sont éjectées. Et enfin les sécrétions de la glande vésiculaire sont libérées lorsque l'activité de la prostate cesse.⁷⁸

Le plasma séminal produit par les testicules, l'épididyme et les glandes accessoires, représente jusqu'à 98% du volume de l'éjaculat.¹⁵⁹ Ce liquide est un milieu de transport pour les spermatozoïdes et il permet leur nutrition temporairement. Il peut être produit en grande quantité par certains étalons, notamment dans la partie latente de l'éjaculat.

Sa composition exacte n'est pas encore totalement connue. Les résultats d'études ont montré que le plasma séminal permettait la protection des spermatozoïdes dans le tractus génital de la femelle et l'élimination des spermatozoïdes non viables de l'utérus. En effet, certaines protéines présentes dans le plasma séminal protègent sélectivement les spermatozoïdes vivants en empêchant leur liaison avec des polynucléaires neutrophiles.

Ce plasma a aussi un rôle de "médiateur" sur la réponse inflammatoire post-insémination ou post-accouplement.¹⁶³ Lorsque les spermatozoïdes passent dans le tractus reproducteur de la jument, ils déclenchent une réponse inflammatoire. Chez la plupart des juments cette réponse est physiologique mais chez certaines juments sensibles cette réponse inflammatoire est prolongée. Elle devient alors pathologique et provoque une endométrite post-insémination. Le plasma séminal permettrait de réguler cette réponse inflammatoire.¹⁶¹

Le plasma séminal est aussi une source d'énergie, d'antioxydants, d'enzymes et de minéraux. Par exemple, le calcium et le phosphore présents dans le plasma séminal maintiennent l'intégrité fonctionnelle du spermatozoïde et le calcium a un effet positif sur la mobilité des spermatozoïdes.¹⁵³ D'autres métaux sont retrouvés comme par exemple le zinc, le sélénium et le fer. Le Zinc serait impliqué dans la capacitation et la réaction acrosomique, et, avec d'autres métaux comme le fer, le manganèse, le nickel, et le cuivre, ils sont les principaux cofacteurs de la famille des superoxydes dismutases, qui sont les enzymes anti-oxydantes les plus abondantes du plasma séminal chez les mammifères.⁸¹⁻¹²²

2. LA CONGÉLATION DU SPERME

Dans cette partie nous allons décrire la méthode de congélation du sperme équin, de sa récolte à son conditionnement, puis nous allons nous intéresser aux paramètres permettant d'évaluer la qualité du sperme après décongélation.

A. POURQUOI CONGELER ?

1. Avantages :

La congélation du sperme présente de nombreux avantages.

- L'avantage de production :

L'insémination artificielle (IA) permet d'avoir un plus grand nombre de choix d'étalon et donc de choisir l'étalon avec la génétique désirée.²⁸

Elle permet une utilisation efficace des étalons. En effet, l'éjaculat d'un étalon en saillie naturelle est déposé dans une seule jument contre de nombreuses lors d'utilisation de sperme congelé ou de sperme frais en IA. L'étalon peut ainsi se reproduire avec plus de juments qu'il ne peut le faire en monte naturelle.¹⁶⁰

La barrière de distance peut être franchie puisque les semences congelées d'étalons peuvent saillir des juments à de grandes distances et ainsi éviter le transport des étalons avec tous les risques associés. De plus cela représente un avantage économique certain, car le coût du transport du sperme est moins élevé que celui du transport de la jument ou de l'étalon.²⁸

La barrière du temps peut elle aussi être franchie car les semences congelées peuvent être conservées après la mort d'un étalon. Ainsi ce maintien de souches génétiques dans le temps permet la sauvegarde de certaines races (comme le Barbe en Afrique du nord, ou les anciennes souches de pur-sang arabe au moyen Orient, les chevaux de trait etc.)¹⁶⁰

Et enfin la qualité du sperme peut aussi être analysée avant son envoi, ce qui permet d'avoir une semence de bonne qualité.²⁸

- Avantages pour la gestion des écuries :

En effet lors d'utilisation de l'insémination artificielle le mouvement des étalons mais aussi des juments est réduit, ce qui permet un gain de temps. En plus de cela, les risques d'accidents pour les juments, les étalons ainsi que le personnel sont diminués.²⁸

- Avantage médical :

L'insémination artificielle permet aussi de provoquer moins de stress pour la jument et permet de diminuer le risque de transmission de maladies contagieuses ou vénériennes car il n'y a pas de contact direct.²⁸ De plus le sperme est souvent dilué avec des dilueurs contenant des antibiotiques ce qui permettrait de diminuer le risque de transmission de germes ou le développement d'endométrites surtout chez les juments sensibles aux infections utérines.¹⁶⁰

Lorsque des étalons ne sont plus capables d'assurer la monte naturelle pour des raisons médicales, le prélèvement peut s'effectuer par des traitements pharmacologiques.

Et enfin lorsqu'un étalon doit être euthanasié il est possible de récupérer du sperme dans la queue de l'épididyme. Mais la fertilité de ce sperme n'est pas la meilleure.

2. Inconvénient

La congélation a cependant certains inconvénients. Le principal est la diminution du taux de fertilité. Certains éjaculats d'étalon ne supportent pas la congélation.²⁸ En effet, malgré une bonne qualité de sperme frais, environ 20% des éjaculats équins ne peuvent pas être congelé.¹⁶⁶

Ensuite la congélation nécessite une expertise supplémentaire, pour la collecte du sperme, pour son évaluation mais aussi pour l'insémination des juments.²⁸

Pour l'insémination des juments, du fait de la durée de vie raccourcie après décongélation des spermatozoïdes, il est nécessaire d'échographier plus souvent les juments.³⁹ Cela engendre des coûts et des risques supplémentaires. A ces dépenses s'ajoutent aussi celles des dilueurs, mais qui restent faibles, celles des équipements nécessaires et les frais de transport du sperme.

Une obligation réglementaire concernant la production et l'expédition de sperme congelé est aussi nécessaire; en effet certains vétérinaires doivent obtenir le certificat d'aptitude aux

fonctions de chef de centre d'insémination artificielle équine, délivré par le Ministère de l'Agriculture.¹⁷⁶

B. LE MÉCANISME DE CONGÉLATION

La congélation des spermatozoïdes a pour but de réduire un maximum leur métabolisme cellulaire afin d'augmenter leur durée de conservation. La diminution de température impacte les différents éléments constitutifs du spermatozoïde. Mais ce choc thermique peut provoquer des altérations. En effet, cela peut entraîner la dénaturation de certaines protéines et une cristallisation intracellulaire qui peut provoquer des lésions des organites ou même altérer la membrane plasmique du spermatozoïde.⁷¹

Cela provoque aussi des changements d'osmolarité qui entraînent la formation d'un milieu extracellulaire hyperosmotique pendant la congélation et donc une déshydratation cellulaire, et une immersion des spermatozoïdes dans un milieu extracellulaire hypotonique lors de la décongélation qui conduit à une réhydratation et une augmentation du volume des spermatozoïdes par diffusion passive d'eau.¹⁷²⁻¹³⁰ Cette déshydratation intracellulaire provoque la dénaturation de certaines protéines et l'accumulation de composés toxiques.²⁸

1. Conséquences sur la membrane plasmique :

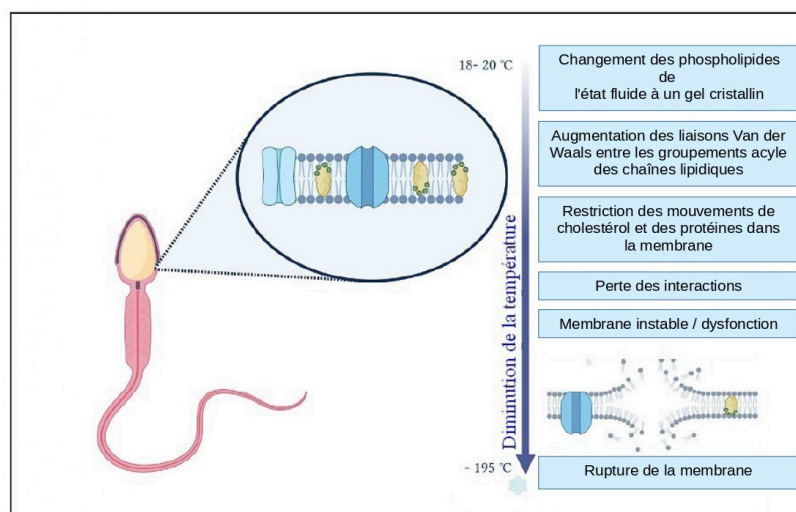


Figure 14 : Schéma des conséquences de la baisse de température sur la membrane plasmique ³⁴

Avec les différents mécanismes impliqués lors de la congélation, c'est la membrane plasmique qui est principalement impactée. Le choc de température lors de la congélation et décongélation entraîne des altérations de la bicouche lipidique et des protéines. Lorsque la température baisse, la configuration des phospholipides est modifiée. Cette modification est permise par leur mouvement au sein de la bicouche et l'adhésion aux protéines. Cela fragilise la membrane qui devient plus rigide lors de la conversions d'un état liquide à un état de gel cristallin, elle devient donc plus perméable. ⁴⁰

La composition de la membrane plasmique influe la sensibilité au choc du froid. Lors de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme la teneur en cholestérol de la membrane plasmique diminue, ce qui entraîne une sensibilité plus importante au froid des spermatozoïdes éjaculés. ¹¹⁴

À une température d'environ 20°C il y a une transition avec une perte des liaisons hydrogènes des phospholipides entraînant une augmentation des liaisons de Van Der Waals entre la chaîne lipidique et les groupements acyl, ce qui rend la membrane plus compacte (figure 9).³⁷ Avec ces différentes liaisons les protéines sont modifiés et des zones avec des lipides plus fluides se forment aboutissant à une membrane instable et dysfonctionnelle. ⁷

Cela altère aussi la fonctionnalité de la NADPH oxydase présente dans la membrane de la tête du spermatozoïde entraînant la formation de ROS, qui déstabilisent la membrane plasmique.¹¹⁵ La microarchitecture de la membrane est modifiée et certaines protéines altérées notamment celles nécessaires pour la mobilité du spermatozoïde (pompes ioniques dépendantes à l'ATP ou encore les canaux ioniques.) En parallèle des peroxydations lipidiques produisent des sous-produits qui par réaction en chaîne entraîne la formation de ROS supplémentaires. Ces ROS peuvent activer une cascade apoptotique, une baisse de potentiel membranaire mitochondrial qui entraîne des cassures de l'ADN et enfin la mort cellulaire.³⁴

Le stress osmotique peut aussi activer du stress oxydatif et donc ce mécanisme de peroxydation lipidique.⁴⁵ Lors de la congélation, le spermatozoïde est soumis à un environnement hyperosmotique puis, lors de la décongélation, à un environnement hypoosmotique. Par conséquent des altérations apparaissent en raison de ces deux sources de stress osmotique.¹²⁴

Les différences de susceptibilité à la peroxydation lipidique des spermatozoïdes lors de la congélation sont un facteur pouvant expliquer la variation de résistance à la congélation entre éjaculats et entre étalon. Il a été montré que la proportion de phospholipides dans la membrane plasmique varie d'un étalon à l'autre et la répartition de différents types de phospholipide est responsable des bons ou moins bon étalons pour la congélation.²⁹

La vitesse de refroidissement est aussi un paramètre important à prendre en compte. En effet les altérations ne seront pas les mêmes. À des vitesses de refroidissement lentes, la formation de glace extracellulaire est plus importante, ce qui entraîne une déshydratation des spermatozoïdes et donc des lésions dues à une augmentation de la concentration de solutés intracellulaires. Et à des vitesses de refroidissement élevées, les spermatozoïdes n'ont pas assez de temps pour se déshydrater, ce qui augmente le taux de formation de glace intracellulaire néfaste.¹¹⁹ Il est donc nécessaire de contrôler la courbe de baisse de température pour minimiser les dommages.

2. Conséquence sur l'environnement intracellulaire

Le cytosquelette du spermatozoïde est une autre structure intracellulaire qui peut être lésée lors du processus de congélation. En effet, la modification de volume provoquée par les changements osmotiques lors de la congélation et décongélation entraîne des lésions du cytosquelette. L'hypertonie entraîne une dépolymérisation et une réorganisation des filaments d'actine. Ces lésions altèrent la stabilité du cytosquelette du spermatozoïde le rendant plus fragile.¹¹³

La cryoconservation expose les spermatozoïdes au stress induit par les basses températures et les déséquilibres osmotiques.¹⁴⁹ L'exposition des biomolécules à des températures basses peut entraîner des changements de leur conformation qui sont parfois irréversibles.

Lors de la congélation, il y a aussi la formation de glace extracellulaire qui entraîne une augmentation de la concentration en soluté dans la fraction non gelée. Cela provoque une sortie d'eau hors du spermatozoïde pour maintenir l'équilibre et donc la déshydratation des cellules. Cela provoque un stress osmotique et si le spermatozoïde se contracte ou se dilate au-delà de sa limite de tolérance osmotique il peut entrer en apoptose.¹⁰⁸⁻²¹ Lorsque la vitesse de refroidissement est rapide, les spermatozoïdes n'ont pas le temps de perdre beaucoup d'eau et donc la teneur en eau intracellulaire reste importante, ce qui entraîne la formation de glace intracellulaire qui risque de léser les composants du spermatozoïde notamment la membrane plasmique.¹⁰³

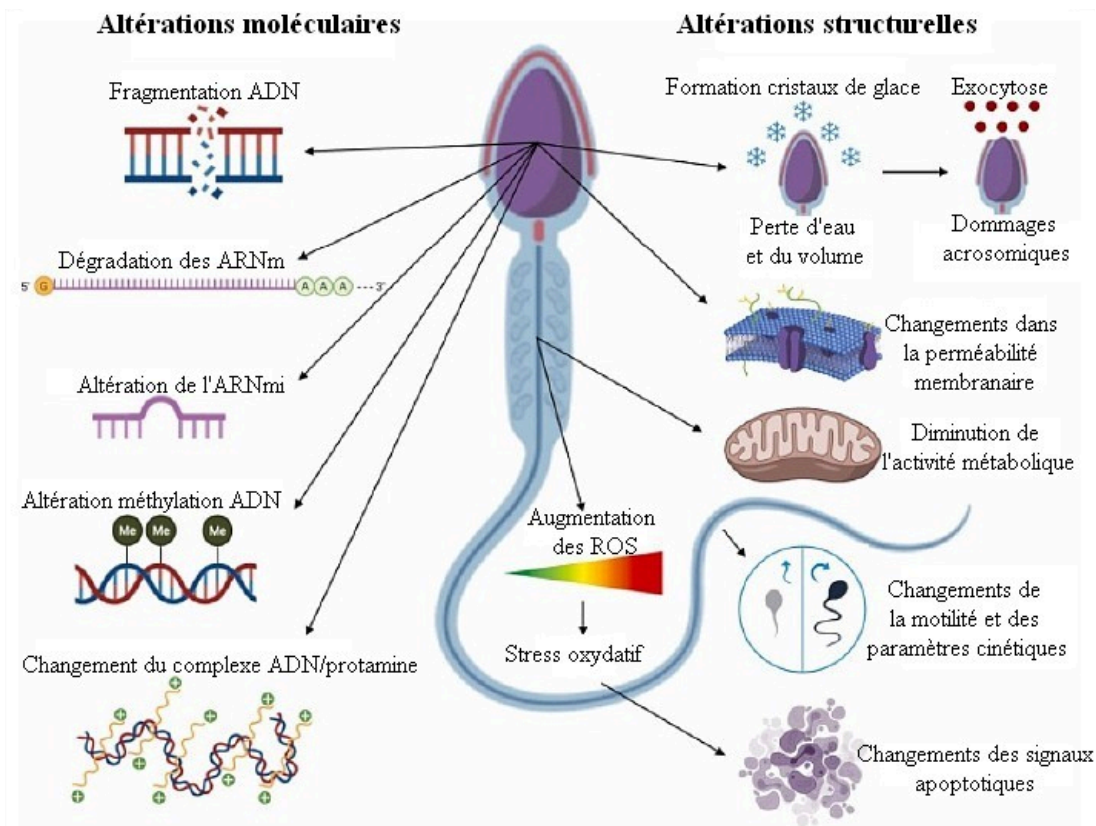


Figure 15 : Altérations structurales et moléculaires lors de la cryopréservation du sperme de mammifère. Le processus de congélation/décongélation altère l'intégrité de la membrane plasmique, de l'acrosome, de la mobilité, activité métabolique et mitochondriale et augmente la production de ROS. Cela augmente aussi la fragmentation de l'ADN et peut affecter la méthylation de l'ADN, dégrade les ARNm, micro ARN et induit des altérations dans l'intégrité de la structure nucléoprotéique)¹⁷¹

De plus, la congélation entraîne l'accumulation de ROS dommageables pour le spermatozoïde. La cryotolérance de ces cellules est liée en partie à l'étendue et la production de ROS dans les mitochondries.¹⁷²

La diminution de température, le stress oxydatif avec la production de ROS et le stress mécanique lors de la contraction du spermatozoïde peuvent aussi entraîner une altération de l'intégrité de la double hélice d'ADN.⁸⁵

Chez certaines espèces il a été suggéré aussi que le processus de congélation et décongélation provoque des altérations significatives de la structure nucléoprotéique (composée de protamine 1 et 2 ainsi que d'histones) de la tête des spermatozoïdes par un mécanisme de rupture des ponts disulfures entre résidus de cystéines au sein de l'ADN.⁵⁴

Un autre élément important est l'impact sur les ARN messagers. En effet la congélation peut modifier le contenu des ARN messagers et ainsi altérer leur fonction alors qu'ils jouent un rôle important lors des premières étapes du développement embryonnaire.¹⁵⁰

De plus des études ont montré des facteurs épigénétiques impliqués dans l'expression génique, c'est à dire les ARN non codants, la méthylation de l'ADN ou encore le remodelage de la chromatine et les modifications des histones, peuvent aussi être modifiés par la congélation et la décongélation.^{164, 174} Chez l'étalon par exemple, la méthylation de l'ADN est plus élevée après cryoconservation que dans le sperme frais.¹² Ces facteurs épigénétiques sont essentiels pour le développement embryonnaire juste avant l'implantation.²⁰ Le taux plus bas de fertilité avec du sperme congelé peut donc être en partie expliqué par la méthylation de la cytosine plus étendue.¹²

C. RÉCOLTE DU SPERME

1. Examen de l'étalon

L'examen de l'étalon est réalisé au préalable de la récolte du sperme.

Libido

Il est assez difficile d'estimer la libido d'un étalon de manière objective, en dehors des conditions naturelles lorsqu'il est en liberté. En effet, en liberté l'étalon et la jument interagissent longtemps ensemble. Lors de la récolte, il est estimé que l'érection doit être atteinte dans les 5 à 10 minutes après la présentation de la jument. L'éjaculation doit ensuite avoir lieu après 6 à 8 coups de rein en moyenne.¹³¹ Sous contrôle de la testostérone, la libido peut être plus faible lors de pathologies dégénératives testiculaires ou lors de certaines pathologies tumorales du testicule induisant des déséquilibres hormonaux.¹⁰⁶ Et enfin si l'étalon n'est pas encore pubère il y aura aussi un manque de libido.

Donc si la libido est faible ou absente, il faut s'assurer que l'étalon est pubère, effectuer un examen des testicules et analyser le profil hormonal pour s'assurer qu'il n'y a pas d'anomalie.¹³¹ La douleur lors de pathologies ostéo-articulaires, le stress ou l'agressivité lors de la récolte de sperme sont aussi des facteurs qui peuvent entraîner une diminution ou une perte de libido.¹⁰⁶

Examen physique

Général

Avant une récolte de sperme, l'état général de l'étalon doit être examiné pour vérifier s'il est en bonne santé. L'examen clinique ne doit pas présenter d'anomalie particulière et sa note d'état corporelle doit être correcte.¹³¹ Il est nécessaire de porter une attention sur le système musculo-squelettique. En effet, lorsque l'étalon effectue l'acte de monte, cela provoque des contraintes au niveau de certaines articulations. Il doit donc être capable de se déplacer normalement, d'avoir une extension totale des articulations notamment des membres postérieurs ainsi qu'être exempt de douleur dorsale.⁶⁹ En cas d'ataxie, de raideurs ou de douleur, ses capacités à saillir en toute sécurité sont limitées ou même absentes.²⁸

Pénis

Le pénis de l'étalon doit être examiné. Il doit pouvoir s'extérioriser et rentrer dans le fourreau librement. Pour extérioriser le pénis lors de l'examen, l'examineur pourra mettre l'étalon en présence d'une jument ou bien utiliser une tranquillisation avec de l'Acépromazine ou des Alpha-2-agonistes. L'utilisation d'une tranquillisation permet à l'examineur d'effectuer ses observations en toute sécurité, mais il existe des effets secondaires et notamment un risque de paraphimosis chez certains étalons, c'est-à-dire une perte de motricité du pénis et son prolapsus permanent.²⁸

Une fois le pénis extériorisé, il doit être lavé à l'eau claire pour pouvoir détecter des lésions. Son inspection et sa palpation permettent ensuite de détecter d'éventuelles anomalies comme par exemple des tumeurs ou des ulcères.²⁸ Si les lésions du pénis provoquent de la douleur elles peuvent compromettre la saillie. Cela peut aussi nuire à la qualité du sperme s'il est contaminé par des cellules sanguines ou inflammatoires. La fosse urétrale doit aussi systématiquement être examinée car l'accumulation du smegma peut provoquer la création de calculs de la fosse urétrale qui peuvent provoquer de la douleur.¹³¹

Testicules

Il est nécessaire dans un premier temps de palper les testicules afin de vérifier qu'ils sont présents dans les bourses. L'anamnèse est aussi à prendre en compte pour avoir l'historique des pathologies pouvant impliquer une castration unilatérale. Si aucune pathologies n'est rapportée et qu'un testicule est manquant l'étalon est alors considéré comme cryptorchide ce qui l'interdit de reproduction car il y a une composante héréditaire à cette anomalie.¹³¹

La consistance des testicules doit être ferme et régulière. Si elle est diminuée, cela peut être dû à une pathologie inflammatoire ou dégénérative. Si au contraire elle est augmentée et que le volume est diminué une pathologie dégénérative à un stade avancée doit être envisagée.¹³¹

Lors de la palpation la température élevée du testicule peut être un signe d'une pathologie inflammatoire comme par exemple une orchite ou une épидидymite.

Le testicule ne doit pas présenter d'adhérences aux enveloppes testiculaires, il doit être libre dans la bourse.

Il est aussi possible de palper la queue de l'épididyme en arrière du testicule. C'est une zone ovoïde de 1,5 à 2 cm de diamètre et de consistance plus molle que le testicule. Cette palpation permet de repérer l'axe du testicule, si celui-ci se trouve dévié cela peut évoquer une torsion testiculaire avec d'autres symptômes associés. ¹³¹

La taille des testicules est ensuite mesurée à l'aide d'un compas qui inclut les enveloppes testiculaires. Pour un cheval de taille moyenne, les testicules mesurent environ 5 à 6 cm de large et de haut, et 8 à 10 cm de long. ²⁸ Une fois la taille obtenue, il est possible d'obtenir le volume testiculaire en utilisant la formule suivante :

Volume testiculaire (VT en ml) = 0.5233 x largeur x longueur x épaisseur (en cm) Ce volume testiculaire est corrélé à la production journalière de spermatozoïdes (DSO). Cette DSO donne une information sur les capacités reproductives de l'étalon. ^{28,80}

Il est estimé qu'un gramme de testicule produit environ 15 à 20.106 spermatozoïdes par jour. ²⁸ Avec le volume testiculaire obtenu la DSO se calcule avec cette formule :

$$\text{DSO (Daily Sperm Output) (x109)} = (0.024 \times \text{VT}) - (0.76 \text{ à } 1.26)$$

La dernière constante dépend de la saison et de facteurs individuels à l'étalon. ²⁸

Analyses sanitaires

Pour qu'un étalon puisse être approuvé comme reproducteur, il doit être indemne de maladies vénériennes. Un dépistage est donc réalisé pour certaines maladies qui varient en fonction des pays. Par exemple en Europe et dans certains stud-book le test de la métrite contagieuse équine (*Taylorella equigenitalis*) est réalisé à l'aide d'écouvillons dans le fourreau, la fosse urétrale et l'urètre. Il est aussi possible de réaliser le test de l'anémie infectieuse équine avec un test de Coggins et un test pour l'artérite virale équine avec une séroneutralisation. Le dépistage de ces maladies est obligatoire pour pouvoir exporter du sperme d'étalon en Europe. ¹³¹ La vaccination contre la Grippe Equine et la Rhinopneumonie est obligatoire pour que l'étalon soit agréé.

Examen échographique

L'examen échographique permet d'investiguer le contenu des testicules mais aussi les organes internes du tractus génital par une échographie transrectale. Ce test peut être réalisé si une anomalie est détectée lors de la palpation des testicules.

En échographie le testicule est homogène et a une échogénicité élevée (supérieure à celle du foie). La veine centro-testiculaire au centre du testicule, apparaît anéchogène et mesure moins de 3 mm de diamètre. ¹³¹

L'échographie permet de mesurer la circonférence des testicules de façon précise, sans inclure les enveloppes, ce qui permet d'estimer le volume du testicule et donc la production quotidienne (DSO) plus précisément. ⁶⁸

De plus, cet examen des testicules permet de repérer des pathologies. Certaines pathologies même bénignes peuvent avoir des répercussions sur la spermatogenèse en modifiant la thermorégulation testiculaire par exemple, et donc avec potentiellement des répercussions irréversibles. Avec cette technique on peut notamment repérer une augmentation de liquide entre les feuillets de la vaginale, la présence d'intestin ou toute autre structures dans la bourse etc. ¹³¹

L'utilisation de l'échographie Doppler permet d'apporter des informations supplémentaires, avec l'évaluation du flux sanguin arrivant au testicule. La réduction du flux sanguin dans le testicule peut provoquer des dommages ischémiques dans les tubes séminifères et impacter la qualité de la production de sperme. ^{121,93}

L'échographie transrectale est aussi utilisée associée à la palpation, pour déterminer la taille, la consistance, la structure interne ainsi que les liquides contenues dans les glandes accessoires. ¹⁷⁰

2. Récolte de l'éjaculat

Préparation de l'étalon

Avant de prélever un étalon, il est nécessaire de nettoyer le pénis. Lorsque l'étalon rentre en érection et extériorise son pénis en présence d'une jument en chaleur, le gland du pénis, la fosse et les diverticules urétraux ainsi que le corps du pénis sont rincés à l'eau tiède puis séchés avec une serviette jetable. ⁶⁹

Récolte à l'aide d'un vagin artificiel

Vagin artificiel fermé

Une fois l'étape de nettoyage terminée, de nombreuses techniques et procédures existent pour récolter l'éjaculat. Il est possible de prélever l'étalon à l'aide d'un vagin artificiel, c'est une technique largement répandue. Elle est relativement simple, la grande majorité des étalons l'accepte dès le premier essai.¹⁵⁷

Il en existe plusieurs types. Parmi les plus utilisés en routine on retrouve le Colorado, Nishikawa et le Missouri.⁹⁴

Le Nishikawa a été développé au Japon. Il est plus petit que les modèles qui étaient utilisés avant (Cambridge, Milovanov). C'est un boîtier en aluminium avec un revêtement en caoutchouc amovible (figure 11). Un coussin en forme de donut peut être utilisé en l'insérant sur l'extrémité distale pour augmenter la pression sur le gland de l'étalon.⁹⁴



Figure 16 : Modèle de vagin artificiel NISHIKAWA¹⁴⁴

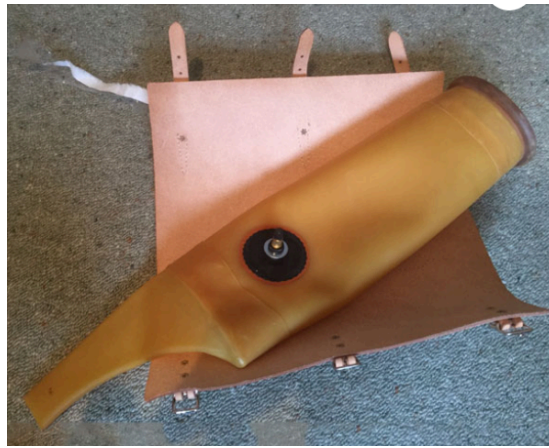


Figure 17 : *Modèle Missouri (Equibreed)*

Le modèle Missouri (Figure 17) est plus long et permet d'avoir le gland pénien qui pénètre au-delà de la partie chauffée de la doublure, ce qui réduit le risque de dommages thermique aux spermatozoïdes. Il possède des doublures intérieures et extérieures scellées et est donc étanche avec une pression qui peut être ajustée. La stimulation du gland peut aussi être améliorée en appliquant une pression manuelle sur la partie conique lorsque le pénis est inséré dans le vagin. Ce vagin artificiel est facilement manipulable par l'opérateur de par sa légèreté et sa flexibilité.⁹⁴

Enfin l'autre type de vagin artificiel fréquemment utilisé est le modèle Colorado. Il est constitué d'un boîtier extérieur rigide (métal ou plastique) et d'un revêtement en caoutchouc amovible (figure 12). Il est plus grand et lourd en raison du volume d'eau qu'il retient. Ce volume d'eau important permet de maintenir la chaleur plus longtemps mais rend sa manipulation plus difficile. Son montage est aussi plus long que les autres vagins ce qui demande du temps supplémentaire. De plus l'éjaculat passe le long de la partie chauffée du vagin ce qui peut entraîner des dommages thermiques sur les spermatozoïdes si la température de la doublure est trop élevée.⁹⁴



Figure 18 : Modèle Colorado utilisé à ONIRIS VetAgroBio

Une maintenance du vagin artificiel est nécessaire pour garantir qu'aucune substance spermicide soit introduite et pour empêcher la transmission de maladies infectieuses. Entre chaque utilisation, le vagin doit donc être nettoyé avec un savon ne laissant pas de résidus. Si le vagin artificiel n'est pas utilisé sur du plus long terme, il doit être saupoudré de talc et congelé, ce qui permet de limiter l'oxydation et maintenir la longévité du caoutchouc.⁹⁴

La préparation du vagin artificiel doit être adéquate pour pouvoir récupérer le sperme dans de bonnes conditions. Tous les composants qui entrent en contact avec l'éjaculat doivent être non spermicide.

Pour faciliter l'introduction du pénis un lubrifiant doit être appliqué à l'intérieur du vagin artificiel. Le gel lubrifiant utilisé doit être soluble dans l'eau et non spermicide. En effet les lubrifiants à base de pétrole et bactéricides sont à éviter pour leur risque de toxicité sur les spermatozoïdes. Ils provoquent un changement de pH ou de pression osmotique et peuvent avoir un impact sur la mobilité des spermatozoïdes.⁸⁹ Quel que soit le type de lubrifiant, il doit être utilisé en quantité minimale. Un gant propre est utilisé pour appliquer ce lubrifiant sur la surface interne du vagin artificiel.

La température de la surface de contact est importante pour l'éjaculation et l'impact sur la qualité du sperme. La température optimale se situe entre 45°C et 50°C.⁹⁴ Une étude a montré que les étalons répondaient mieux à des températures avoisinant les 50°C, mais au-delà 43°C les spermatozoïdes peuvent être endommagés.⁶⁸ Il est donc nécessaire de trouver un compromis. De plus, certains étalons peuvent être aussi très pointilleux sur la température, c'est donc un paramètre très important à maîtriser.⁹⁴ Pour avoir une température avoisinant les 43°C il faut remplir le vagin artificiel avec de l'eau à 50-55°C.

Des variations existent entre les types de vagins artificiels, par exemple, le modèle du Colorado nécessite une température plus élevée pour réchauffer ses deux revêtements de caoutchouc et atteindre une température interne correcte comparé aux modèles Nishikawa et Missouri. Pour prolonger la rétention de chaleur, le sur remplissage est utilisé et l'excès d'eau est retiré juste avant la collecte. Toute eau renversée à la surface du vagin artificiel doit aussi être retirée avant l'introduction du pénis de l'étalon pour éviter tout risque de dommage sur les spermatozoïdes.⁹⁴

Le vagin artificiel doit être correctement positionné pour simuler la posture et le positionnement du vagin de la jument. Pour collecter l'éjaculat en routine il est nécessaire d'avoir une jument en chaleur ou bien un mannequin de monte. Lorsque l'étalon monte, son pénis est dévié vers le côté où se trouve le manipulateur. Le pré-sperme est expulsé et le pénis est placé dans le vagin. Il doit être placé horizontalement et doit être fermement maintenu dans cette position. Cette technique simule au mieux la position de la jument en chaleur. Il est rarement nécessaire d'effectuer des mouvements avec le vagin artificiel pour provoquer l'éjaculation.⁹⁴ En effet lorsque la jument est en chaleur elle maintient sa position et ne réalise pas de mouvements pour provoquer l'éjaculation. Certains étalons saisissent la crinière ou l'encolure de la jument ou bien sur le mannequin en cuir pour se stabiliser.⁹⁴ De nombreux étalons sont sensibles aux variations, même légères, de la technique de collecte.

Une fois que l'étalon éjacule, il faut éviter de retirer rapidement le vagin artificiel. En effet, le gland étant dilaté il y a un risque de blessure ou bien de déversement du contenu du vagin artificiel.¹⁵⁷ Une fois retiré, l'eau est retirée et l'extrémité distale du vagin est abaissée pour que le sperme s'écoule dans le tube de collecte. Après obtention de l'éjaculat ce dernier doit immédiatement être amené au laboratoire.⁹⁴

Vagin artificiel ouvert

Pour cette technique un vagin artificiel de type Colorado est souvent utilisé. Il possède une ouverture au niveau du gland qui permet de l'extérioriser partiellement lors de l'éjaculation. Il n'y a pas de tube collecteur mais un entonnoir et un récipient stérile changé à chaque émission.

Cette technique est utilisée pour le prélèvement de sperme et plus particulièrement de la fraction spermatique avec un minimum de contamination par le milieu avec l'utilisation d'un

réceptacle stérile.^{31,160} L'indication majeure de cette technique est aussi le fractionnement de l'éjaculat pour analyser le processus d'éjaculation, la toxicité du plasma séminal, l'étude de l'origine de certains contaminants ainsi que le diagnostic de certains troubles éjaculatoires.^{157,67}

Un mannequin a été élaboré en 1999 permettant de collecter automatiquement les différentes fractions de l'éjaculat.⁹⁰ Ce mannequin est équipé d'un vagin artificiel ouvert qui déverse à l'aide d'entonnoirs détachables les fractions de l'éjaculat dans des cuvettes différentes contrôlées par un micro-ordinateur. Ce dernier permet de aussi régler la pression et la température du vagin artificiel ainsi que le volume maximal à prélever dans chaque cuvette.⁹⁰ La qualité du sperme obtenue est similaire aux techniques traditionnelles mais la contamination bactérienne est plus faible avec cette méthode et la concentration en spermatozoïdes plus élevée.

L'obtention d'un éjaculat complet avec une seule monte et une stimulation sexuelle minimale de l'étalon est l'objectif du praticien pour optimiser l'éjaculat obtenu avec un volume relativement faible et une concentration de spermatozoïdes élevée.⁹²

Le volume de l'éjaculat est affecté par le nombre de stimulations sexuelles avant l'éjaculation mais pas la production totale de spermatozoïdes.¹⁴⁸

Dans une étude rétrospective une relation entre le nombre de monte nécessaire pour l'éjaculation et certains paramètres du sperme : volume, concentration et mobilité progressive après 24 heures de stockage à 5°C, a été démontrée. Une augmentation du nombre de montes entraînerait une augmentation du volume séminal et la production d'une quantité importante de gel qui rend la manipulation délicate par la suite. Cela entraîne aussi une diminution de la concentration de spermatozoïdes et une diminution de la mobilité progressive. Pour diminuer la quantité de liquide séminal collecté une technique vise à évacuer les sécrétions des glandes bulbo-urétrale c'est-à-dire le pré-sperme. Pour se faire le praticien dévie le pénis de l'étalon pendant un court instant lorsque le pré-sperme est émis.¹⁴⁸ Il est nécessaire de changer le manchon et réceptacle entre chaque collecte pour diminuer la quantité de contaminants et de pré-sperme dans le sperme collecté.⁹²

Cette technique est intéressante car elle permet d'éviter le contact direct avec une jument. La fabrication d'un mannequin est relativement facile et cela permet de pallier tous les autres problèmes de manipulation de la jument.

Les étalons sont peu rétifs à ce genre de technique dès lors qu'ils sont habitués au vagin artificiel.¹⁵⁷ Leur entraînement pour le mannequin de monte consiste à les habituer à développer toute la séquence de comportement sexuel en présence d'une femelle placée en face ou parallèlement au mannequin. Une fois qu'ils sont habitués, la jument peut être retirée.³²

Autres méthodes de récolte

Récupération de l'éjaculat après saillie

C'est la technique la plus ancienne. La récupération du sperme se fait à l'intérieur de l'utérus ou du vagin à l'aide d'une éponge placée dans le vagin avant la saillie.¹¹⁵ D'un point de vue sanitaire cette technique entraîne des risques infectieux et n'est donc plus utilisée en pratique. Mais dans des situations spécifiques, lors d'évaluations de sperme de manière rapide lorsque la récolte n'est pas possible elle peut s'avérer utile. C'est le cas par exemple pour des chevaux miniatures ou en liberté. On l'utilise aussi lorsque l'on souhaite évaluer l'effet de l'endomètre sur le sperme, le sperme est alors récupéré à l'aide d'une pipette stérile fixée sur une seringue placée dans l'utérus.¹⁵⁷

Utilisation d'un préservatif

Des préservatifs sont disponibles pour les étalons. Mais ils sont généralement insatisfaisants de part la contamination du sperme éjaculé sur l'extérieur du pénis de l'étalon. Comme alternative à ces préservatifs, des manchons en plastique souple sont disponibles. La position du manchon est maintenue sur le pénis et permet une meilleure sensibilité pour l'étalon. Le sperme s'écoule dans les doigts du manchon ce qui permet une réduction de la contamination du pénis.⁹⁴

Récolte au sol

Cette technique est utilisée lorsque des étalons ont une incapacité physique à monter sur le mannequin. Cela peut être dû par exemple à des problèmes ostéo-articulaires ou suite à des chirurgies par exemple. Dans ce cas, on utilise un vagin artificiel sans la monte. On insère le pénis

de l'étalon dans le vagin artificiel, de préférence celui de type Missouri, souple et léger il permet d'exercer une pression sur le gland, en le gardant debout.

La présence d'une jument en chaleur ou d'un stimulus auditif et/ou olfactif permet de le stimuler. Comme vu précédemment la température du vagin doit être assez élevée aux alentours de 50°C, et lubrifié. Une pression doit être exercée sur la base du pénis et sur le gland. Il est nécessaire de faire environ 5 à 6 mouvements de va et vient pour obtenir l'éjaculation. Cette technique peut avec certains étalons ne nécessiter qu'un seul praticien en toute sécurité et fonctionne bien lors du premier essai (varie de 30 à 66,7%).⁵⁵ McDonnelle et Love ont rapporté des caractéristiques d'éjaculat similaire qu'avec les techniques traditionnelles sur mannequin de monte.¹⁰⁴ On note cependant un pourcentage d'éjaculats incomplets de l'ordre de 8%.¹⁴³

Stimulation manuelle

Cette technique est semblable à la récolte au sol. Elle est utilisée pour des chevaux ne pouvant monter sur le mannequin et pour des chevaux de petite taille. Un sac plastique est placé sur le pénis de l'étalon et l'éjaculat est obtenu par friction le long de la région ventrale du pénis en maintenant une pression sur le gland.³⁸ Il n'y a pas de différence des caractéristiques principales du sperme entre cette technique et celle utilisant un vagin artificiel et le temps nécessaire pour l'apprentissage semble être le même aussi.¹⁰⁴

Méthodes pharmacologiques

L'éjaculation induite pharmacologiquement est une méthode utilisée pour la collecte d'éjaculat lorsque les méthodes traditionnelles ne peuvent pas être mises en place. Par exemple, lorsque l'étalon ne peut réaliser l'acte physique d'accouplement, ou lorsqu'il présente un problème d'érection et d'éjaculation (paralysie du pénis, problème osseux etc.)^{82, 157}

De nombreux protocoles pharmacologiques existent. En général ces protocoles utilisent des antidépresseurs tricycliques, des agonistes alpha-2-adrénergiques ou des agents à effet tonique sur le muscle lisse, individuellement ou en combinaison. Les taux d'éjaculation sont différents d'une étude à une autre, mais la combinaison d'imipramine (antidépresseur, inhibiteur non sélectif de la recapture de la monoamine) et de xylazine (alpha-2-agoniste) semble être le plus efficace pour

induire l'éjaculation. Si ce protocole ne fonctionne pas, il est indiqué d'utiliser la combinaison d'imipramine, de détomidine (alpha-2-agoniste) et d'ocytocine (neuropeptide).

Il est nécessaire de réaliser cette technique dans un environnement calme comme un box pour de meilleurs résultats. ^{82,30}

Le protocole le plus fiable et couramment utilisé consiste à l'administration orale de 3 mg/kg d'imipramine hydrochloride suivie d'une injection intraveineuse de 0,7 mg/kg de xylazine deux heures plus tard. Avec cette méthode le taux de succès varie selon les études mais avoisine les 68%.

Le volume de l'éjaculat obtenu est plus faible, la concentration en spermatozoïdes augmenté mais le nombre total de spermatozoïdes ainsi que le pH restent similaires aux éjaculats obtenus naturellement. ¹⁰⁵

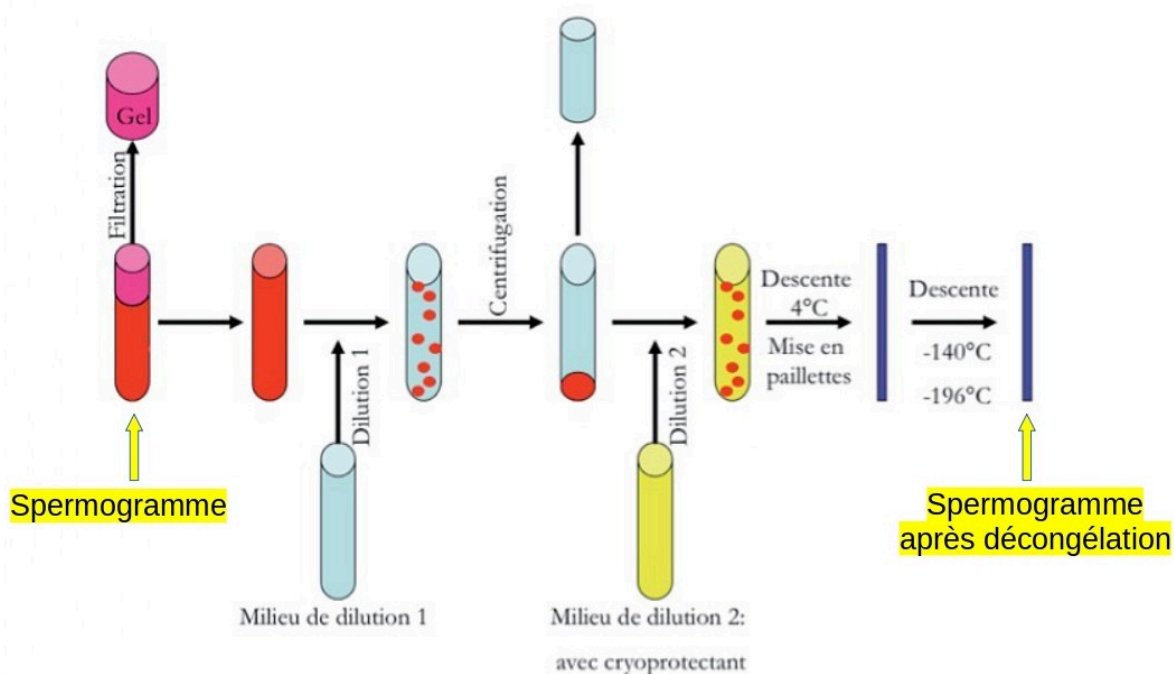
Tableau 1 : Exemple de molécules, posologies et voies d'administrations utilisées pour la collecte d'éjaculat.⁸²

Molécules	Posologie et voie d'administration	Taux d'éjaculation
Imipramine seule	50 à 1000 mg IV	11 %
Xylazine seule	0,7mg/kg par voie IV	17-27 %
Imipramine + Xylazine	2 mg/kg + 0,3 mg/kg IV 3mg/kg PO + 0,7 mg/kg IV	33-71 % 68 %
Détomidine + Ocytocine + Imipramine	0,02 mg/kg IV + 20 UI IV + 3mg/kg PO	8,3-29 %

L'électro-éjaculation est une technique non recommandée en routine. Elle est réalisée sous anesthésie générale chez les étalons en dernier recours ou chez les étalons sauvages.^{58,152}

D. MÉTHODE DE CONGÉLATION

Dans cette partie nous allons voir les différentes étapes de la congélation du sperme d'étalon, après sa récolte.



*Figure 19 : Étapes simplifiées du processus de congélation du sperme d'étalon*¹³¹

1. Filtration et dilution du sperme

Une fois le sperme récolté, il doit être rapidement transporté au laboratoire. Son exposition à la lumière doit être limitée et il est nécessaire d'éviter un éventuel choc thermique. Si la semence n'a pas été filtrée lors de la collecte, elle est rapidement filtrée à travers une gaze stérile, pour

éliminer la fraction de gel du sperme produite par les glandes annexes ainsi que les squames présentes sur la peau du pénis de l'étalon ou tout autres débris éventuels récupérées dans le tube de prélèvement. Le retrait de ce gel peut aussi être fait par aspiration à la seringue. Ces méthodes entraînent cependant une perte de spermatozoïdes.¹³¹

La concentration multipliée par le volume permet d'obtenir le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat.

Plusieurs méthodes existent pour l'obtenir. En routine les laboratoires utilisent des appareils basés sur la spectrophotométrie ou bien des hémocytomètres.²⁸

Ensuite la portion sans gel doit être diluée avec un diluant à base de lait écrémé ou de caséine. La dilution doit être de 1:1 de ratio, ou bien, lorsqu'on travaille avec du sperme très concentré, un ratio de 2:1 pour réduire les dommages lors de la prochaine étape de concentration du sperme. Pour un éjaculat normalement concentré, le taux de dilution est de $\frac{1}{4}$ de sperme pour $\frac{3}{4}$ de dilueur, sans jamais dépasser les 2,5 milliards de spermatozoïdes par pot. Le dilueur doit être à une température de 37°C avant d'être ajouté au sperme pour éviter un choc thermique.⁵

Sur le marché, il existe de nombreux milieux. Ils apportent les nutriments nécessaires pour le métabolisme des spermatozoïdes, permettent le maintien d'un pH correct et contrôlent l'osmolarité; ils protègent également ainsi que protègent la membrane plasmique contre le choc thermique et les dommages du stress oxydatif. L'ajout d'antibiotiques dans ces derniers joue un rôle de prévention contre la croissance bactérienne. Nous verrons par la suite plus en détail ces propriétés.⁵

2. Evaluation de la qualité du sperme lors de la congélation

La plupart du temps la diminution de la fertilité des spermatozoïdes après décongélation reste inexplicite, malgré des caractéristiques spermatiques acceptables et conventionnelles. Une évaluation et un certain nombre de tests de laboratoire supplémentaires sur le sperme sont recommandés.¹⁰

Aspect macroscopique

Une première évaluation de la couleur et de l'apparence du sperme frais est nécessaire. En effet avant tout traitement le sperme doit être gris ou blanc et la turbidité de l'éjaculat peut donner une estimation de sa concentration.²⁸

Un éjaculat concentré semble plus épais et d'apparence crémeuse tandis qu'un éjaculat de faible concentration sera plus gris et translucide.

Si il y a certaines anomalies comme la présence d'urine ou de sang alors le sperme sera respectivement jaunâtre ou rosé.

Volume

Pour connaître la quantité de spermatozoïdes dans l'éjaculat il est nécessaire de mesurer son volume ainsi que sa concentration. Le volume de l'éjaculat est divisé en deux parties, la partie avec le gel et la partie sans gel. Elles peuvent être séparées via un système de filtration. Ensuite, en routine, chaque fraction est introduite dans un cylindre gradué qui permet d'approximer le volume. Une autre méthode permet d'obtenir le volume à partir du poids.

L'équipement utilisé doit être systématiquement stérilisé et chauffé à 37°C s'il rentre en contact avec le sperme pour éviter un choc thermique ou une contamination du sperme et donc son altération. La mesure du volume doit être réalisée rapidement pour mettre directement le sperme dans le dilueur le plus vite possible.²⁸

Concentration

Connaître la concentration en spermatozoïde de la partie sans gel de l'éjaculat est important lorsqu'on veut déterminer l'aptitude à la reproduction d'un étalon mais aussi lorsqu'on veut préparer le sperme pour une insémination artificielle.

Mobilité

Origine

Lorsque les spermatozoïdes sont relâchés dans les tubes séminifères, ils ne sont pas mobiles. Ils sont propulsés, par des contractions péristaltiques, dans la *rete testis* puis dans les conduits efférents et ensuite dans l'épididyme. C'est lors du passage dans l'épididyme que le spermatozoïde mature et acquiert sa mobilité. ^{28,72}

Analyse de la mobilité

La mobilité des spermatozoïdes est facilement identifiable et est importante car elle reflète certains aspects essentiels du métabolisme des spermatozoïdes. Elle ne doit pas être étudiée seule mais elle permet d'obtenir une estimation de la qualité de l'éjaculat.

Il existe plusieurs types de mobilité. La mobilité totale regroupant tous les types ainsi que la mobilité progressive sont les paramètres qu'on retrouve le plus souvent. La mobilité progressive regroupe les spermatozoïdes se déplaçant activement en ligne droite vers l'avant.

Cette mobilité peut également être décrite comme oscillante, circulaire ou en serpentine. La vitesse des spermatozoïdes peut également être évaluée. ⁷⁹

La mobilité doit être évaluée rapidement après le prélèvement. Différentes techniques existent : subjective ou objective. ¹³⁵ De la même manière que pour l'évaluation du volume tout le matériel qui rentre en contact avec le sperme doit être chauffé à 37°C pour éviter sa dégradation. Il peut être difficile d'évaluer la motilité avec la semence fraîche non diluée. En effet, lorsque la concentration en spermatozoïdes est élevée, il est difficile d'évaluer chaque spermatozoïde et la motilité peut être sous-estimée avec l'agglutination de spermatozoïdes ou leur adhérence au contenant. ⁵¹ Mais savoir analyser la mobilité avec de fortes concentrations peut être utile lorsqu'on travaille sur du sperme congelé qui est à de fortes concentrations. ¹⁰⁶ Si l'on veut être plus précis pour cette analyse on peut diluer le sperme à des concentrations de 25 à 50 millions de spermatozoïdes/ml. Le milieu utilisé doit être là encore chauffé à 37°C avant de rentrer en contact avec le sperme. ²⁸

- Méthode subjective

Pour évaluer la mobilité de manière subjective, une goutte de sperme est déposée sur une lame et recouverte d'une lamelle. L'échantillon doit être maintenu à 37°C par une platine chauffante par exemple. Idéalement la lame est observée au microscope à contraste de phase avec l'objectif 200x.⁵¹ La lecture de la lame s'effectue proche du centre de la lamelle en évitant les bordures en contact avec l'air. Quatre à six champs sont ainsi examinés et une moyenne est faite de ces champs pour chaque paramètre.¹⁰⁶

L'évaluation de la mobilité doit inclure la mobilité totale, la mobilité progressive et la vitesse (graduée sur une échelle de 0 à 4).²⁸ La précision de cette méthode nécessite de l'expérience et peut être améliorée en utilisant plusieurs observateurs.¹⁰⁶

- Méthode objective

Pour supprimer les biais de la méthode subjective on peut utiliser d'autres méthodes. Parmi ces méthodes on peut citer la photomicrographie en accélérée, la spectrophotométrie et plus largement utilisé, l'analyseur CASA (Computer-assisted Sperm Analysis). Ce dernier permet d'évaluer rapidement un grand nombre de spermatozoïdes avec des mesures objectives et quantitatives.¹³⁶ Développé et utilisé dans un premier temps en médecine humaine, il a été étendu aux animaux de production dans les années 2000. L'appareil est composé d'un système optique interne avec un microscope et d'une lumière intermittente. Il comprend aussi une plaque chauffante, ainsi qu'une caméra associée à un analyseur d'image.

Les échantillons de sperme sont déposés dans des cellules de Leja puis disposés sur la plaque chauffante. L'analyse des images successives est ensuite réalisée par l'analyseur.

Les données fournies avec cette technique CASA sont les suivantes :

- Le nombre de cellules comptées
- La concentration
- Les vitesses de déplacement ($\mu\text{m/s}$) :

- ❖ Vitesse progressive moyenne = VAP (Velocity Average Pathway) : il s'agit de la vitesse de trajectoire moyenne (vitesse de la trajectoire lissée entre n positions par intervalle de n temps)
 - ❖ Vitesse linéaire = VSL (Velocity Straight Line) : il s'agit de la vitesse moyenne des déplacements linéaires (vitesse de la trajectoire entre deux positions entre n intervalle de temps)
 - ❖ Vitesse curvilinéaire = VCL (Velocity Curvilinear Line) : il s'agit de la vitesse moyenne des déplacements curvilignes (vitesse de la trajectoire dans un intervalle de temps défini)
- La mobilité individuelle et le pourcentage de mobilité :
 - ❖ Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (MOT : Total Spermatozoal Motility) : il s'agit de la proportion de spermatozoïdes dont la VAP est supérieure à 10-15 mm/s
 - ❖ Le pourcentage de mobilité progressive (PMOT : Progressive Motility) : il s'agit de la proportion de spermatozoïdes dont la VAP est supérieure à 10-15 mm/s, avec une rectitude du mouvement égale à 100%
 - ❖ Le pourcentage de spermatozoïdes fléchants : il s'agit de la proportion de
 - spermatozoïdes rapides avec une rectitude de mouvement supérieure à 80%
 - La vivacité :
 - ❖ ALH : amplitude des mouvements latéraux de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement, $\mu\text{m/s}$.
 - ❖ BCF : fréquence de battement de la tête, Hz.
 - ❖ ELON : l'élongation, rapport entre la longueur minimale et la longueur maximale tête-queue, %
 - Le comportement du spermatozoïde :
 - ❖ Sa rectitude : $(\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}) * 100$ exprimée en pourcentage
 - ❖ Sa linéarité : $(\text{LN} = \text{VSL}/\text{VCL}) * 100$ exprimée en pourcentage
 - ❖ Les oscillations (WOB : wobble, $\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL}) * 100$ exprimée en pourcentage

L'inconvénient à la généralisation de ces techniques est le coût des analyseurs, très onéreux.²⁸

Ces systèmes d'analyse informatisés permettent de s'affranchir de la subjectivité de l'œil de l'examineur et fournissent également des informations supplémentaires, que la simple analyse microscopique ne permet pas d'obtenir. En revanche, la comparaison des résultats obtenus par cette méthode n'est pas possible entre les différents laboratoires, en raison du manque de standardisation du matériel d'analyse et des réglages des machines.⁶¹

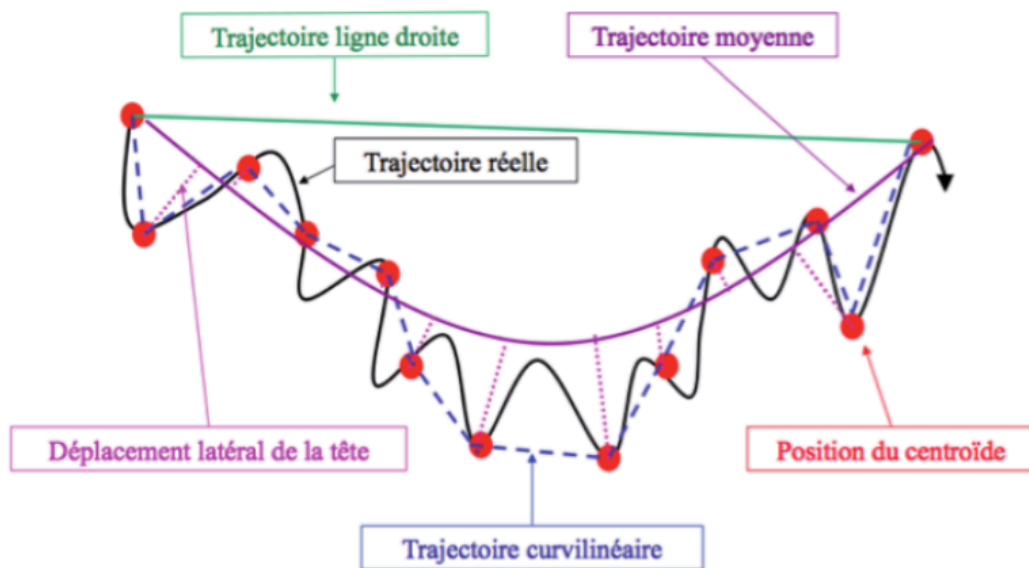


Figure 20 : L'analyse de trajectoires par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur¹³¹

L'évaluation de la mobilité a quelques limites mais elle est facilement réalisable. Une valeur seuil minimale a été retenue dans de nombreux laboratoires, il est nécessaire d'avoir une mobilité progressive minimale de 30%.⁷⁹

Morphologie

L'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes est un des paramètres importants pour l'évaluation du potentiel de fertilité des étalons.²⁸ De nombreuses classifications et critères ont été utilisés pour décrire les défauts morphologiques des spermatozoïdes. Certains critères sont basés

sur le rôle présumé des altérations dans l'accomplissement de la fertilisation. En effet, certains défauts jouent un rôle majeur alors que d'autres sont de faible importance. D'autres critères sont basés sur l'origine des défauts lors de la spermatogenèse ou lors du passage des spermatozoïdes dans les glandes accessoires. Dans ce cas, ils sont appelés respectivement défaut primaire ou secondaire. Un même spermatozoïde peut avoir plusieurs défauts et il peut donc être difficile de juger l'anomalie la plus délétère à la fécondation. La fécondation nécessite qu'une quantité de spermatozoïdes atteignent le site de fertilisation, se lie et pénètre dans l'ovocyte et à la fin forme un zygote puis se développe en blastula et fœtus. Ces étapes sont accomplies respectivement par la pièce intermédiaire, la pièce principale, la membrane plasmique, l'acrosome puis le noyau.²⁸ De nombreux tests biochimiques sont disponibles pour évaluer le statut fonctionnel de ces organites. Mais ces tests nécessitent un appareillage plus sophistiqué. Cela implique une contrainte de temps, de laboratoire et de coût qui ne permet pas leur utilisation en pratique courante vétérinaire.

D'autres techniques plus simples et économiques sont utilisées en pratique. Étant donné que la structure reflète probablement la fonction, la normalité ainsi que l'intégrité structurale des organites des spermatozoïdes, des études morphologiques sont réalisées. Par exemple on peut utiliser la microscopie avec contraste de phase avec soit des préparations de sperme frais non colorées, soit utiliser la microscopie en champs clair après coloration de frottis de sperme.²⁸ Une variété de défauts structuraux du noyau ainsi que des composants du flagelle peuvent être facilement identifiés en utilisant un microscope à contraste de phase. De la même manière l'intégrité structurale de la membrane plasmique au niveau de la tête du spermatozoïde peut être évaluée par des tests de colorations à l'éosine en utilisant des champs clairs de microscope.⁴⁴

Pour évaluer l'intégrité de la membrane du spermatozoïde il existe un test simple de coloration à l'éosine et nigrosine. L'éosine traverse les membranes des spermatozoïdes morts et ne colore donc pas les spermatozoïdes vivants. Ce test peut être utilisé facilement en pratique en évitant l'utilisation d'autres techniques plus coûteuses.²⁸

D'autres techniques de coloration existent comme par exemple les méthodes Spermac ou Diff Quick. Ces colorations permettent d'évaluer la morphologie des spermatozoïdes avec le moins de modifications et fournissent plus de détails sur les parties de la cellule notamment de l'acrosome. La méthode Spermac utilise différents colorants comme le rose Bengale, le rouge neutre, le pyronine Y, d'orange G, de vert janus et enfin de vert brillant FCF.^{53,138} Tandis que la coloration Diff Quick utilise l'éosine et le bleu de méthylène.

La cytométrie de flux est une technique utilisée pour mesurer et analyser les caractéristiques physiques et chimiques des spermatozoïdes. Cela permet de passer rapidement un grand nombre de cellules individuelles devant un faisceau laser, et d'obtenir des informations détaillées sur chaque cellule ou particule. Le faisceau laser permet d'exciter des fluorochromes, marqueurs spécifiques des spermatozoïdes, qui émettent ainsi de la lumière à une longueur d'onde connue. La lumière émise est ensuite observée au microscope à fluorescence ou enregistré par cytométrie de flux. Des analyses multiparamétriques sont possibles en utilisant différents fluorochromes et cela pourrait améliorer l'évaluation du sperme. A la différence de la cytométrie de flux, la microscopie à fluorescence classique est manuelle ce qui limite le nombre de paramètres évalués.

La cytométrie en flux utilise un cytomètre en flux associé à un microscope et une caméra ce qui permet d'observer la morphologie d'un spermatozoïde à la fois. Certains CASA possèdent aussi cette technologie ce qui permet d'analyser la mobilité, la morphologie et certains paramètres fonctionnels.⁴⁹

Pour évaluer la viabilité du spermatozoïde certains kits utilisent les fluorochromes SYBR et l'iodure de propidium (PI) qui se lient à l'ADN. Ces fluorochromes sont utilisés chez plusieurs espèces domestiques. SYBR colore le noyau en vert de toutes les cellules et l'iodure de propidium ne pénètre que dans les spermatozoïdes présentant une membrane lésée. Les spermatozoïdes morts présentent ainsi une fluorescence rouge et les vivants une fluorescence verte.⁵⁷

Le fluorochrome calcein violet, plus récent, permet aussi de tester l'intégrité de la membrane spermatique, et donc la viabilité du spermatozoïde.⁴⁸

L'évaluation de l'intégrité de la membrane acrosomique est aussi essentielle. Pour cela des lectines sont utilisées pour évaluer l'état de l'acrosome (*Arachis hypogea*, *Pisum sativum*).¹³⁴ Pour vérifier son intégrité la sonde acrosomale LysoTracker Green DND-26 existe, elle se lie au lysosomes.¹⁵⁵

La cytométrie de flux permet aussi d'évaluer la viabilité des spermatozoïdes par l'évaluation de l'apoptose. La production de ROS ainsi que la peroxydation lipidique sont aussi évaluées par cette méthode ce qui est important au vu de l'association entre activité mitochondriale et fertilité. Pour évaluer le potentiel mitochondrial on peut utiliser le JC-1 composé fluorescent qui se lie spécifiquement aux mitochondries.⁶²

Une des méthodes permettant d'évaluer l'intégrité de la chromatine est le SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay). Ce test a été introduit par Evenson en 1980 et permet d'analyser la chromatine nucléaire en utilisant la cytométrie de flux, avec comme paramètre le fluorochrome métachromatique, l'acridine orange.⁵²

Les dispositifs de cytométrie de flux sont faciles à utiliser et disponibles dans les laboratoires de routines mais peu en pratique vétérinaire courante.⁴⁹

Analyse du protéome

Pour évaluer la qualité du sperme frais et décongelé des marqueurs protéiques intracellulaires et des tests sont utilisés.

Par exemple, la concentration en proAKAP4, principale protéine structurelle de la gaine fibreuse des spermatozoïdes, est mesurée.⁴³ Cette concentration a été corrélée avec la qualité des spermatozoïdes post décongélation.

Une autre analyse récente a montré des différences entre le protéome des spermatozoïdes de bonne ou de mauvaise qualité. Cette évaluation du protéome serait donc intéressante pour la suite pour évaluer la capacité de congélation d'un éjaculat.⁵⁶

Pour résumer, la mobilité progressive et le nombre de spermatozoïdes progressifs par dose sont des facteurs directement liés à la fertilité observée.^{87,166} La viabilité des spermatozoïdes est indirectement associée à la mobilité

progressive mais d'autres données comme la morphologie ou celles obtenues avec la cytométrie de flux ou encore avec les colorations permettent de comprendre l'origine des altérations et pourront donc fournir des informations supplémentaires. Des études essaient de développer des tests pour prédire la qualité post-décongélation.⁴⁹

3. Concentration du sperme

Le plasma séminal est en majorité produit par les glandes accessoires et expulsé en fractions lors de l'éjaculation.⁵ C'est un milieu de transport pour les spermatozoïdes qui les protègent dans le tractus génital femelle et qui agit comme médiateur de la réponse inflammatoire post insémination.^{163,161}

Lors du stockage des spermatozoïdes et notamment de leur congélation, il a été démontré que le plasma séminal était délétère.⁷⁰ La plupart des protocoles l'enlèvent complètement ou en partie avant de refroidir le sperme. Cependant au vue de son rôle important dans le tractus génital de la femelle, l'absence de plasma séminal entraîne une diminution de la mobilité des spermatozoïdes lors de leur stockage.¹³ Il est donc nécessaire d'éviter les protocoles éliminant la totalité de ce plasma. Il est conseillé de conserver après centrifugation 5% à 20% du plasma séminal.⁹²

Centrifugation

Lorsque l'on souhaite congeler le sperme, on enlève la majorité du volume du plasma séminal, permettant ainsi une meilleure conservation et une concentration du sperme.^{98,7} La centrifugation est la technique la plus communément utilisée.⁵ Mais certaines études montrent que la centrifugation peut causer des dommages aux spermatozoïdes. En effet, la force et la durée de la centrifugation pour le retrait du plasma séminal affecteraient négativement la mobilité, l'intégrité et le pourcentage de sperme récupéré avec succès. Pour retirer le plasma séminal communément le sperme dilué est placé dans un tube conique de 50 ml et placé dans la centrifugeuse. Une force de centrifugation élevée cause de fortes adhésions du pellet, ce qui est dommageable au spermatozoïde alors qu'une force de centrifugation faible ne permet pas de récupérer tous les spermatozoïdes.⁵ Dans une étude Dell'aqua et *al.* ont montré que la meilleure combinaison entre force et temps pour une meilleure récupération et le moins de dommages des spermatozoïdes, est de 600 g pendant 10 min.⁴¹

Immédiatement après la centrifugation le surnageant est retiré à l'aide d'un cathéter ou bien d'une seringue et le culot est remis en suspension dans un dilueur de congélation.

Coussin de centrifugation

D'autres protocoles de centrifugation utilisant des milieux coussins sont utilisés en pratique. Cette méthode permet de maximiser la récupération des spermatozoïdes et en limitant leurs altérations par diminution de leur compaction.²⁵⁻⁸⁴ Des forces de centrifugations plus élevées avec un liquide amortisseur au fond du tube de centrifugation sont utilisées. Plusieurs produits commerciaux sont disponibles comme par exemple l'Eqcellsire, le Cushion Fluid et le Red

Cushion.⁹² Ces nouveaux protocoles permettent d'augmenter jusqu'à 90% le pourcentage de spermatozoïdes récupérés sans provoquer de lésions du spermatozoïdes.¹⁶⁸

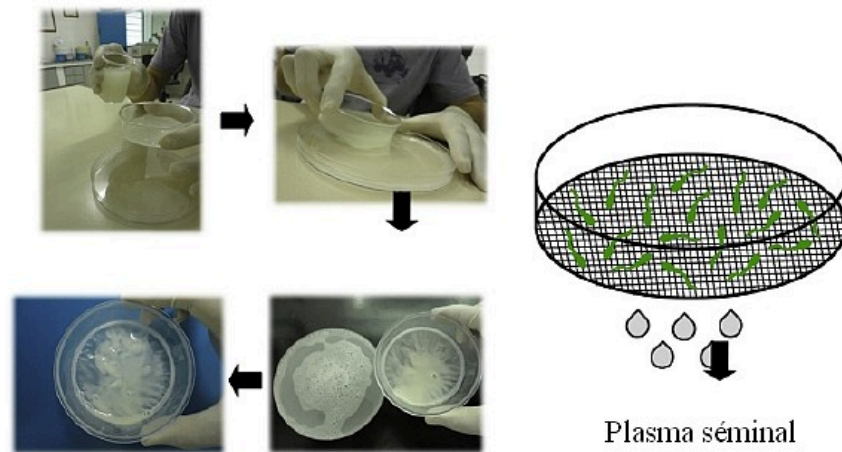
Pour retirer le plasma séminal en utilisant un coussin de centrifugation le principe reste le même, le sperme doit être dilué avec un ratio de 1:1 et placé dans un tube conique de 50 mL puis un à 5 mL d'amortisseur est placé au fond du tube à l'aide d'un cathéter couplé à une seringue. Ensuite la centrifugation est lancée à 1000 g pendant 20 minutes.²⁵ Après la centrifugation, le surnageant est soigneusement retiré par aspiration et le liquide amortisseur est lui aussi retiré à l'aide d'un cathéter. Enfin le culot est remis en suspension dans le milieu de congélation.⁴⁶

Centrifugation sur milieux colloïdaux

La centrifugation sur milieux colloïdaux est une étape qui peut être ajoutée lors du processus de congélation. Cette technique permet de séparer les spermatozoïdes anormaux, les débris cellulaires ainsi que les bactéries. Cela permet d'améliorer la qualité du sperme après décongélation en sélectionnant seulement les spermatozoïdes considérés comme normaux. Cette méthode peut donc être utilisée pour les étalons ayant une mauvaise qualité de sperme frais mais elle nécessite plus de temps et entraîne de grandes pertes en spermatozoïdes, la production de paillettes par éjaculat sera donc plus faible.⁴⁷

Filtration

Comme alternative de la centrifugation, le sperme peut être filtré à travers une membrane hydrophile synthétique qui retient le sperme et permet uniquement le retrait du plasma séminal.³ Le sperme est ensuite dilué dans le milieu de notre choix.⁴ Ce processus dure 5 à 10 minutes et le même filtre peut être réutilisé plusieurs fois pour le même étalon sans affecter la qualité du sperme.⁵



*Figure 21 : Méthode de filtration pour extraire le plasma séminal*⁵

4. Ajout du dilueur

Après la centrifugation du sperme, la semence est diluée avec un milieu de congélation afin d'obtenir une concentration de 100 millions de spermatozoïdes par mL.

Les milieux de congélation utilisés ont de nombreux rôles. En effet, ils vont permettre l'augmentation du volume inséminé et sont composés de substances qui vont permettre de neutraliser le pH (effet tampon), de neutraliser certains toxiques produits par le métabolisme des spermatozoïdes, de les protéger contre le choc thermique, de maintenir un équilibre osmotique, de limiter la prolifération bactérienne, et enfin de fournir de l'énergie. Ils vont aussi avoir un rôle cryoprotecteur grâce à certains composés qui vont permettre de limiter la formation de glace intra et extracellulaire.⁵

De nombreux dilueurs existent sur le marché. Parmi les plus utilisés on retrouve le Lactose EDTA (Animal Reproduction Systems, Chino, CA), INRA Freeze (IMV) ou encore le BotuCrio (Botupharma).⁵

Rôle cryoprotecteur

Lors de la congélation, comme vu précédemment, le spermatozoïde est exposé à un stress qui entraîne des dommages cellulaires compromettant la fonction des spermatozoïdes. Le milieu

utilisé doit donc contenir des agents cryoprotecteurs permettant de minimiser les dommages liés à la cryoconservation des structures intracellulaires et des biomolécules. Il est nécessaire de faire attention à sa concentration car à des concentrations élevées, ils deviennent toxiques pour les spermatozoïdes.¹⁴⁹

Ces agents cryoprotecteurs peuvent être divisés en différentes catégories : pénétrants ou non pénétrants et intracellulaires ou extracellulaires.¹⁴⁹⁻⁵ Les agents cryoprotecteurs intracellulaires sont capables de se lier à l'eau et ont des propriétés colligatives c'est-à-dire qu'ils ne dépendent que de la concentration en soluté sans dépendre de la nature du soluté et permettent un abaissement du point de congélation. Tandis que les agents extracellulaires ont un effet osmotique permettant de créer un environnement hypertonique et d'induire un mouvement d'eau hors des cellules et donc de limiter la formation de cristaux de glace intracellulaire, cela limitant les altérations.⁵

Les non pénétrants permettent de protéger les spermatozoïdes lors de la congélation sans pénétrer à l'intérieur de la cellule. Parmi les exemple de cryoprotecteurs non pénétrants on retrouve le jaune d'oeuf, le lait et certains sucres.

Cette catégorie d'agent peut être divisée en molécules osmotiquement actives comme les disaccharides (saccharose et tréhalose), en composés osmotiquement inactifs comprenant des polysaccharides (amidon d'hydroxyéthylène et maltodextrine) ainsi qu'en protéines (albumine et polyvinylpyrrolidone). Les sucres agissent en modifiant la pression osmotique. Ils entraînent ainsi une déshydratation cellulaire en augmentant l'osmolarité du milieu, et déshydratent les cellules, réduisant la formation potentielle de glace intracellulaire.¹¹⁸ De plus, ils permettent de fournir une source d'énergie pour les spermatozoïdes et fournissent aussi une protection de la membrane plasmique par interaction directe avec la membrane cellulaire.⁵

Le jaune d'oeuf fournit un autre type de cryoprotection. Il est composé de 50% d'eau, 32% de lipides, 16% de protéines, 1% de carbohydrates et 1% de cendres. Les lipides du jaune d'œuf sont entièrement inclus dans des lipoprotéines, réparties dans chacune des fractions du jaune d'œuf : Les lipoprotéines de haute densité (HDL) représentées par la lipovitelline sont contenues dans les granules et les protéines de basse densité (LDL), représentant 60% de la matière sèche du jaune d'oeuf, sont contenues dans le plasma.⁸

Le jaune d'oeuf a souvent été utilisé en raison de la présence des LDL.¹ Ces LDL sont des particules sphériques mesurant qui possèdent un noyau composé de triglycérides, de cholestérol et

d'esters de cholestérol. Ce noyau est entouré d'une monocouche d'apoprotéines et de phospholipides, qui contient également du cholestérolipoprotéines.¹²⁹

Ils possèdent des propriétés cryoprotectrices. En effet ils peuvent se lier à la membrane plasmique lors de la congélation et former un film protecteur stabilisant la bicouche lipidique.²³ Lors de la chute de température, la structure des LDL est modifiée, ils libèreraient des triglycérides, des phospholipides et des apoprotéines. Les protéines se fixent aux spermatozoïdes, et les phospholipides formeraient le film protecteur en surface de leur membrane plasmique. Les LDL et les phospholipides de la membrane plasmique échangeraient aussi des acides gras.

Il a aussi été montré que les LDL du jaune d'oeuf protègent les membranes plasmiques des spermatozoïdes en séquestrant les protéines SP du plasma séminal, empêchant ainsi l'efflux de cholestérol et de phospholipides de la membrane plasmique qui provoquent la capacitation ce qui est indésirable lors de la congélation.^{22,97}

Le jaune d'oeuf semblerait induire un changement transitoire de la composition en phospholipide pour prévenir la rupture de la membrane plasmique des spermatozoïde, risque important lors de la congélation. La concentration du jaune d'oeuf utilisée est souvent de 20%.⁵

Mais il existe certains inconvénients à l'utilisation du jaune d'oeuf notamment son origine animal avec un risque potentiel de contamination bactérienne. De plus le jaune d'oeuf interfère avec l'observation microscopique et les dosages biochimiques car il contient des granules. Enfin sa composition est complexe et peu varier entre les lots. Les chercheurs ont donc travaillé à isoler les LDL du jaune d'oeuf.

Moussa et *al.* ont mis au point une méthode d'extraction des LDL qui a permis de remplacer le jaune d'oeuf, pour les espèces bovine et canine.¹¹¹

Des dilueurs sans jaune d'oeuf à base de LDL ont été développés chez de nombreuses espèces. La viabilité des spermatozoïdes est similaire voir supérieure avec ces diluants.

Dans l'espèce équine des milieux à base de fractions de plasma de jaune d'oeuf pour remplacer le jaune d'oeuf ont été étudiés. Ces travaux ont abouti à un nouveau milieu de congélation : l'INRA-Freeze R par Pillet et *al.* Le remplacement du jaune d'oeuf entier par le plasma permet de standardiser la composition des milieux de dilution et de s'affranchir de certains composants du jaune d'oeuf aux effets délétères sur les spermatozoïdes.¹²⁹

Pour remplacer les LDL apporté par les jaunes d'oeufs qui entraînent des contaminations bactériennes, des chercheurs les ont remplacés par des liposomes, qui ne contiennent pas d'agents bactériens. L'effet protecteur des liposomes est permis par leur efficacité à modifier la conformation et la perméabilité de la membrane plasmique pour l'eau et les agents perméables.

86,107

Le glycérol est le cryoprotecteur couramment utilisé.¹¹⁸ C'est un agent pénétrant qui peut traverser les membranes cellulaires par diffusion passive, et moduler la déshydratation cellulaire lors des transitions de phases membranaires induites par la congélation. Ces agents perméants sont généralement de petites molécules non ioniques. Le méthylformamide et le diméthylformamide sont aussi utilisés.⁵ Osmotiquement inactifs ces agents pénétrants sont répartis de la même manière dans les compartiments intracellulaire et extracellulaire. Mais leur ajout impose un stress osmotique aux cellules car l'eau se déplace plus rapidement à travers la membrane cellulaire que les agent cryoprotecteurs perméants.

Ce déséquilibre osmotique initial provoque un rétrécissement des cellules suivi d'un influx d'eau et d'agents cryoprotecteurs jusqu'à ce qu'un équilibre de ce dernier à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule soit atteint.¹⁴⁹ Un autre effet néfaste du glycérol est son action directe sur la membrane plasmique. Cet agent se lie aux têtes des phospholipides réduisant ainsi la fluidité membranaire. Selon certains auteurs^{5,2} le méthylformamide causerait moins de dommages aux spermatozoïdes du fait de son poids moléculaire et de sa viscosité plus faible. Chez des étalons ayant un sperme avec une mauvaise conservation cryogénique, il améliorerait la fertilité des spermatozoïdes.

Il serait intéressant de combiner les cryoprotecteurs pour obtenir une meilleure protection. Par exemple, le BotuCrio cité au-dessus est régulièrement utilisé, il contient une association de méthylformamide et de glycérol.⁵

Antioxydant

Le stress oxydatif affecte aussi la viabilité des spermatozoïdes. De ce fait l'ajout d'antioxydants aux milieux de congélation a été testé et permet d'améliorer leur viabilité.³³ Parmi les antioxydants le Manganèse (III) porphyrine tetrakis (acide benzoïque 4-69) (MnTBAP), une métalloporphyrine synthétique qui pénètre facilement les membranes cellulaires, a été testé et apparaît efficace en permettant une meilleure mobilité des spermatozoïdes, une meilleure intégrité de la membrane plasmique et un potentiel de membrane mitochondriale plus élevé.³³⁻¹⁶² La

glutathion a aussi été testé et permet une amélioration de la mobilité progressive et de la proportion d'acrosomes intacts.⁹

Les antioxydants peuvent aussi être ajoutés après la décongélation. Treulen et *al.* ont rapporté une mobilité et une viabilité des spermatozoïdes plus élevée lorsque le MnTBAP était rajouté lors de cette phase de décongélation.¹⁶²

Le resvératrol est une autre substance aux propriétés anti-oxydantes. C'est un polyphénol non flavonoïde. Les spermatozoïdes d'étalon congelés en présence de cette molécule ont une mobilité progressive accrue, une intégrité de la membrane plasmique et un potentiel de membrane mitochondriale plus important ainsi qu'une diminution de l'altération de l'ADN.¹¹⁷

Substances nutritive

Les milieux de dilution sont complétés en substance nutritives pour couvrir les besoins énergétiques des spermatozoïdes. Les sucres sont les principales substances ajoutées. En effet, ils sont valorisés par les spermatozoïdes via la voie de la glycolyse.¹⁵¹

Le glucose, le fructose et le sorbitol sont des sucres naturellement présents dans le plasma séminal de l'étalon. Substrats énergétiques, ils permettent aussi une protection contre les effets délétères de la congélation, comme vu précédemment ils se comportent comme agents cryoprotecteurs non pénétrants. En reproduction équine, le glucose et le fructose ont été le plus fréquemment utilisés dans les milieux de congélation.^{157,127}

Substances tampon

Les milieux de congélation pour diluer le sperme doivent permettre le maintien d'un pH et d'une osmolarité adéquats pour la survie des spermatozoïdes.

Les spermatozoïdes produisent des sous-produits comme de l'acide lactique réduisant ainsi le pH du milieu extracellulaire, ce qui peut altérer les spermatozoïdes.

Le pH le plus favorable à la mobilité des spermatozoïdes est compris entre 6,6 et 7,2, avec un optimum situé entre 6,7 à 6,9. En dessous de 6,5 les spermatozoïdes sont immobiles.

L'ajout de substances tampon dans les milieux de congélation est nécessaire pour limiter les variations de pH au cours du stockage de la semence. Le citrate de sodium, le bicarbonate de

sodium et l'Hepes (acide 4-(2-hydroxyéthyl)- 1-pipérazine éthane sulfonique) sont les principaux tampons utilisés dans les dilueurs.¹⁵⁷

La pression osmotique du sperme est comprise entre 280 et 340 mOsm. Elle varie en fonction de la concentration de l'éjaculat en électrolytes. Lors de la congélation un milieu hyper-osmotique est recherché mais lorsque le sperme est dilué avant la congélation un milieu isotonique est nécessaire. Lorsque les variations de pression osmotique sont importantes, cela engendre des altérations membranaires entraînant une perte du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Les sucres, en plus de leurs autres avantages, permettent d'ajuster l'osmolarité du milieu.^{35,130}

Antibiotiques

Les milieux de congélations contiennent pour la plupart des antibiotiques. En effet l'éjaculat est forcément contaminé par des bactéries issues du prépuce ou de la partie distale de l'urètre.

La manipulation du sperme lors de la congélation du sperme constitue aussi un facteur de risque supplémentaire de contamination bactérienne. La composition des dilueurs à base de lait ou de jaune d'oeuf peuvent aussi présenter un risque.

Cette contamination entraîne une compétition avec les spermatozoïdes pour les nutriments mais aussi une production de métabolites nuisibles aux spermatozoïdes. Cela peut aussi augmenter le risque d'endométrite chez les juments inséminées.

L'emploi d'antibiotiques ne doit pas endommager les spermatozoïdes, les concentrations doivent donc être testées dans chaque milieu utilisé.

En Europe les antibiotiques les plus utilisés sont la pénicilline et la gentamicine à des doses recommandées de 100 mg/L et 50 mg/L respectivement.^{157,106}

Autres molécules

Le choc de température et le choc osmotique de la congélation provoquent une altération de l'ADN. Des études de congélation avec des suppléments de protéines antigels (AFP) ont été testées. Les AFP ont la capacité d'empêcher la formation de cristaux de glace en protégeant ainsi

les spermatozoïdes.¹³⁷ De bons résultats ont été trouvés chez le mouton et les bovins mais, du fait de leur difficulté et de leur coût de production, ils ne sont pas utilisés en pratique.^{173,132}

Une autre méthode a émergé récemment avec l'ajout de plasma enrichi en plaquettes (PRP) au milieu de congélation. Le PRP est un concentré de plaquettes et de facteurs de croissance dans le plasma obtenu avec le sang autologue. La concentration en plaquettes est trois à sept fois supérieure à la concentration physiologique. Ce composé testé pour les humains et les ovins a une action inhibante des dommages induits par les ROS, permettant de maintenir une viabilité des spermatozoïdes.⁶⁵

De nombreux milieux de congélation sont utilisés sans procédure standardisée. Mais les protocoles sur la manière d'utiliser et d'ajouter des cryoprotecteurs et d'autres molécules sont des compromis entre leurs effets bénéfiques et potentiellement néfastes.

Principaux milieux de congélation utilisés en espèce équine

Les principaux milieux de dilution de la semence utilisés dans l'espèce équine sont soit des préparations commerciales, soit des milieux à préparer. Le choix du milieu employé dépend du type de conservation souhaitée du sperme (congélation ou réfrigération), du coût et de considérations pratiques (milieu prêts à l'emploi ou à préparer).

Tableau 2 : Composition chimique du dilueur INRA 96 ®¹²⁹

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

Les principaux milieux de congélation employés pour le sperme d'étalon sont l'INRA 82-Hépès® additionné de jaune d'œuf, de glycérol et d'antibiotiques, l'INRA 96® également additionné de jaune d'œuf et de glycérol, le milieu lactose-EDTA, le KENNEY® modifié, le BOTUCRIO® et enfin le milieu INRA-Freeze®. Les deux derniers sont directement prêts à l'emploi.^{11,129} Ce dilueur est commercialisé prêt à l'emploi, et contient déjà des antibiotiques et un antifongique. Sa composition est chimiquement définie, et il contient une concentration en micelles de caséines deux fois supérieure à celle du milieu INRA 82®. De plus ces caséines sont présentes sous leur forme native dans le milieu INRA 96®, représentée par une fraction purifiée de caséines : la phosphocaséine native.¹²⁸

5. Equilibration

La semence diluée est ensuite placée à + 4°C pendant 1 heure 20 minutes en moyenne. Cette étape d'équilibration permet de laisser incuber le sperme avec le milieu de congélation avant d'effectuer la congélation.

Cela permet de stabiliser l'équilibre osmotique entre le milieu extracellulaire et intracellulaire et permet la pénétration du glycérol à l'intérieur des spermatozoïdes.^{131,28}

6. Conditionnement

Après l'élimination du plasma séminal et l'ajout de dilueur, le sperme doit être conditionné pour son stockage après congélation. Pour cela des paillettes en plastique de 0,5 mL sont utilisées ou plus rarement de 0,25 ml (utilisées notamment pour le stockage du sperme de taureau). Le sperme est aspiré soit manuellement soit à l'aide d'un équipement automatisé coûteux.

Pour que le sperme ne sorte pas des paillettes, elles sont scellées avec de la poudre de polyvinyle alcool, des billes métalliques ou bien par soudure à ultrasons. Avant cette manipulation il faut s'assurer que la paillette contienne une bulle d'air pour permettre l'expansion du liquide lors de la congélation et ainsi éviter son explosion.⁵

Dans une étude de Dias Maziero et *al*, les spermatozoïdes stockés dans des paillettes de 0,5 mL présentaient une meilleure qualité post décongélation que ceux stockés dans des paillettes de 0,25 mL. L'intégrité membranaire restait la même.¹⁰³ D'autres études sur des espèces différentes ont montré des résultats similaires.^{100,116} Selon Maxwell et *al*, le rapport surface/volume qui est

réduit dans les paillettes de 0,5 mL entraînerait un ralentissement de la congélation ce qui réduirait les lésions liées à la cryoconservation.¹³⁴ Cependant des résultats différents peuvent être retrouvés dans d'autres études mais les paramètres de congélation varient d'une étude à l'autre.¹⁰²

7. Congélation

Un processus de refroidissement à 5°C peut démarrer lorsque les paillettes sont préparées. Le temps nécessaire pour atteindre 5°C est différent selon les milieux de congélations. Ensuite la période de maintien au frais avant la congélation, appelée période d'équilibration, varie en fonction des fabricants et des laboratoires.

Pour le refroidissement il a été montré qu'un refroidissement trop lent déshydrate les spermatozoïdes et un refroidissement trop rapide peut provoquer la formation de glace intracellulaire, mais en pratique c'est un taux de refroidissement lent qui est utilisé.^{169,140}

Pour la congélation, deux techniques sont disponibles. La première est l'utilisation d'un congélateur simple avec un support flottant sur de l'azote liquide et l'autre est un congélateur programmable. Elles ne présentent pas de différence en termes d'efficacité.⁵

Le taux de refroidissement optimal chez l'étalon pour passer de 4°C à -80°C est de 60°C/min. Avec un congélateur non programmable à 4 cm au-dessus de l'azote liquide ce taux de congélation a été atteint.^{102,42}

8. Décongélation des paillettes

L'étape de décongélation des paillettes est une phase importante pour la survie des spermatozoïdes. Cette étape varie en fonction de la méthode de congélation, notamment de la vitesse de congélation.

Les paillettes sont sorties d'une cuve d'azote et immédiatement plongées dans un bain-marie à +37°C pendant 30 secondes. Ensuite elles sont essuyées et la semence est vidée dans un tube. Un contrôle de la qualité est effectué au microscope.

La dose est ensuite aspirée dans un cathéter d'insémination et rapidement utilisée.²⁸

2^{ÈME} PARTIE :

**ETUDE EXPÉRIMENTALE SUR L'IMPACT DE LA
DURÉE D'ÉQUILIBRATION LORS DE LA
CONGÉLATION DU SPERME D'ÉTALON**

1. EXPÉRIMENTATIONS

A. OBJECTIF

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

Par exemple, chez le taureau, même s'il n'y a pas de consensus sur la meilleure période d'équilibration, il semblerait qu'une augmentation de cette dernière à 4h améliore la qualité du sperme en post-décongélation.¹⁴⁶ De même pour le sperme de buffle certaines études montrent des résultats positifs pour l'allongement de la période d'équilibration malgré des résultats contradictoires.¹⁴⁷ Chez le bélier ainsi que chez le chien, des études ont montré que l'augmentation de la période d'équilibration améliorerait aussi la qualité du sperme après décongélation, possiblement en réduisant l'efflux de cholestérol membranaire et en permettant une meilleure préparation au choc thermique.¹²³⁻¹⁹

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

Dans cette étude, nous avons donc cherché à étudier différents temps d'équilibration chez l'étalon dans un milieu de congélation. Nous avons étudié 2, 4 et 6 heures d'équilibration en utilisant le milieu de congélation commercial INRA FREEZE ®. Pour caractériser la qualité du sperme après décongélation nous avons utilisé le système CASA (analyse de sperme assistée par ordinateur) ce qui nous a permis d'obtenir les paramètres cinétiques du sperme en post-décongélation.

B.MATERIEL ET METHODE

1. Etalons étudiés

Au cours de l'année d'étude 2023-2024, 8 étalons ont été prélevés à la station de monte d'ONIRIS VetAgroSup à Nantes. Ces étalons, de races différentes, sont âgés entre 3 et 16 ans (tableau 3).

Parmi eux, trois étalons n'ont pas pu être inclus dans l'étude. En effet, malgré l'entraînement, deux d'entre eux n'ont pas réussi à monter sur le mannequin de monte, et un autre s'est révélé infertile.

Chacun d'entre eux est resté dans la structure au moins 15 jours.

Tableau 3: Liste des étalons participants à l'étude. Dans un souci d'anonymat, la référence de l'étalon est utilisée à la place de son nom.

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

2. Récolte du sperme

Utilisation d'un vagin artificiel

Nous avons réalisé la récolte du sperme des étalons à l'aide d'un vagin artificiel. Cela nous a permis l'obtention d'un éjaculat représentatif dans des conditions de sécurité pour le praticien et l'étalon. Le vagin artificiel utilisé est de type Colorado. Pour les jeunes étalons que nous avons inclus dans l'étude, avec peu d'entraînement et qui nécessitent plusieurs montes avant d'éjaculer, ce vagin a un avantage car il permet de retenir la chaleur plus longtemps.⁹⁴

Nous avons réalisé entre chaque étalon un nettoyage du vagin et nous utilisons systématiquement une capote en plastique jetable.

Un des désavantages de ce type de vagin est que le sperme traverse une portion du vagin en contact avec l'eau chaude avant d'arriver dans le réceptacle. Cela peut entraîner des altérations des spermatozoïdes si la température est trop élevée.⁹⁴ La température de l'eau introduite dans le vagin avant les prélèvements oscillait entre 45 et 50 °C en fonction des préférences des étalons.

Mannequin de monte

Certains étalons inclus dans l'étude connaissaient déjà le mannequin de monte. D'autres ont nécessité un entraînement au préalable. Pour ce faire, une jument en chaleur a été placée devant le mannequin, ou parallèlement au mannequin si cela ne suffisait pas.

Les collectes de sperme ont été réalisées durant les années 2023 et 2024 après deux purges au minimum.

Avant de prélever à l'aide du vagin artificiel, la verge de l'étalon est nettoyée à l'aide d'eau tiède puis, séchée avec un papier absorbant.

Ce nettoyage n'a pas pu être systématiquement réalisé notamment chez les jeunes étalons, car le risque était trop important.

Une fois prélevé, l'éjaculat est directement mis au bain marie à 37°C.



Figure 22 : Mannequin de monte utilisé lors de nos prélèvements à Oniris VetAgroBio

3. Congélation des paillettes

- Après prélèvement de l'éjaculat, ce dernier est directement filtré à travers des gazes stériles. Le matériel est préalablement chauffé à 37°C.



Figure 23 : Photographie de la filtration sur gazes stériles utilisés à ONIRIS

- Ensuite le volume de l'éjaculat est mesuré à l'aide d'une pipette graduée.
- Le même manipulateur, le Dr Bencharif, réalise aussi un premier examen de la semence. La mobilité massale et la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat sont alors analysées à l'aide d'un microscope à platine chauffante au grossissement x100. L'évaluation de la mobilité massale étant un examen subjectif, il a été réalisé par le même opérateur pour tous les échantillons.
- Un échantillon de sperme est aussi analysé à l'aide du système CASA pour obtenir la concentration et la mobilité de l'échantillon.
- Cette première batterie d'examens nous a permis d'inclure ou d'exclure les prélèvements dans notre étude.
- Le sperme est dilué avec un dilueur de centrifugation INRA 96 ® préalablement placé au bain-marie à + 37°C. Le taux de dilution est de ¼ de sperme pour ¾ de dilueur environ en ne dépassant pas une concentration de 2 milliards de spermatozoïdes par tube.
- Le plasma séminal est ensuite retiré par centrifugation. Cette dernière est effectuée à température ambiante pendant 10 minutes à 600 x g, puis le surnageant est retiré.
- Après la centrifugation une deuxième dilution est réalisée. Cette dilution est réalisée avec de l'INRA FREEZE ® et permet d'obtenir une concentration finale de 100 millions de spermatozoïdes par mL. Ce milieu est préalablement réchauffé au bain-marie à + 37°C et mis à température ambiante au cours de la centrifugation pour éviter un choc thermique.
- Une fois cette étape finie, une deuxième analyse à l'aide du CASA est effectuée.

- Le tube de sperme dilué est placé à +4°C dans une enceinte de réfrigération, ainsi que le matériel nécessaire à la mise en paillette. Les paillettes de 0,5 mL sont préalablement identifiées. Ce sont des paillettes Cassou. L'une des extrémités est obstruée par deux tampons de coton entre lesquels se trouve de la poudre d'alcool polyvinylique, et l'autre extrémité est fermée en la trempant dans de la poudre d'alcool polyvinylique après les avoir remplies de sperme.
- Les paillettes sont donc ensuite remplies manuellement 2h, 4h et 6h après réfrigération puis placées sur la rampe de congélation. Nous avons, en fonction de la quantité de sperme, réalisée entre 3 et 4 paillettes par lot.
- Pour la congélation, juste après avoir été remplies, les paillettes sont placées pendant 10 minutes à 4 cm au-dessus du niveau d'azote liquide dans un récipient ce qui permet leur congélation. Enfin, elles sont plongées dans un gobelet d'azote lui-même placé dans la cuve de stockage remplie d'azote.



Figure 24 : Photographie de la cuve de congélation remplie d'azote à ONIRIS

4. Décongélation des paillettes : préparation des échantillons

- Pour la décongélation d'un éjaculat, 2 paillettes de chaque lot (2h, 4h et 6h) sont sorties de la cuve d'azote liquide au hasard, à la pince, et rapidement plongées dans un bain-marie à + 37°C pendant 30 secondes.
- Les paillettes sont ensuite essuyées avec du papier absorbant et chaque paire de chaque lot est ensuite coupée à l'aide de ciseaux et le contenu est vidé dans un tube préalablement rempli de milieu de dilution INRA 96 ® ne contenant pas de glycérol. 400 µL de sperme de chaque paillette est dilué au quart dans l'INRA 96® puis ré-homogénéisé délicatement. Ainsi 3 solutions de sperme dilué (une par lot) à une concentration de 25 millions de spermatozoïdes/mL sont obtenues par éjaculat avant l'analyse des paramètres cinétiques.
- Enfin les tubes sont placés à l'étuve à 37°C pendant 10 minutes puis analysés avec le système CASA.

5. Analyse avec le système CASA

L'appareil utilisé est l'analyseur d'images IVOS II® (Hamilton Thorne, USA). Les lames Leja® et l'appareil sont préalablement chauffés à 37° avant les mesures.

La lame Leja® est ensuite chargée de chaque solution puis placée sur la plaque chauffante de l'appareil.

Le logiciel de mesure de l'appareil effectue une mise au point sur les spermatozoïdes au grossissement x 200 puis enfin 10 champs de la lame sont aléatoirement balayés.

Les paramètres que nous étudierons avant la congélation et après la décongélation, grâce à l'analyseur d'images CASA seront : le pourcentage de mobilité, le pourcentage de mobilité progressive, la VAP, la VSP, la VCL, l'ALH, la BCF, la linéarité et l'élongation.

Nous avons utilisé le système CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) qui permet une évaluation plus objective du sperme.

5. Analyse statistiques

Pour comparer les effets des différentes durées d'équilibration sur les paramètres de mobilité, nous avons utilisé une Analyse de la Variance (ANOVA). L'ANOVA est une méthode statistique qui permet de tester si les moyennes des différents paramètres mesurés sont significativement différentes entre les trois durées d'équilibration.

En effectuant l'ANOVA, nous obtenons une statistique de test appelée F, qui mesure le rapport entre la variance entre les lots et la variance au sein des lots. À partir de cette statistique, une p-value est calculée.

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

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

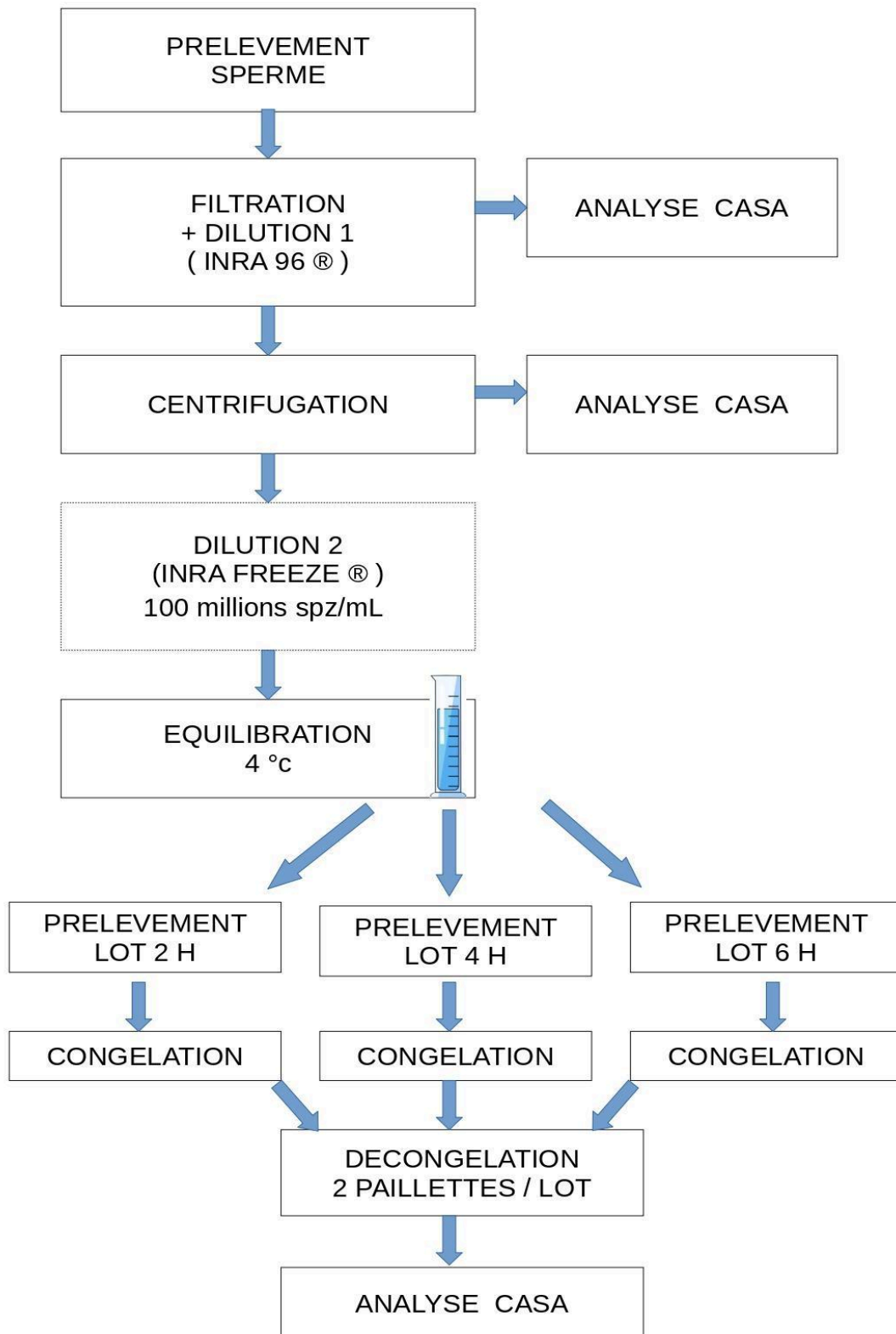


Figure 25 : Schéma résumant les étapes de notre protocole

C. RÉSULTATS

23 éjaculats ont été retenus pour notre expérimentation. Une ANOVA à un facteur a été utilisée pour analyser les résultats de la mobilité générale des spermatozoïdes, de la mobilité progressive, de la vitesse curvilinéaire (VCL), de la vitesse rectilinéaire (VSL), de la linéarité (LIN) et de la rectitude (STR).

1. Mobilité :

Les moyennes des pourcentages de spermatozoïdes mobiles en fonction de la durée d'équilibration sont représentées dans le tableau 5.

Nous remarquons que plus le temps d'équilibration des spermatozoïdes à +4°C est lent plus la mobilité post-décongélation est élevée.

La représentation du boxplot de ces moyennes est illustrée dans la figure 24.

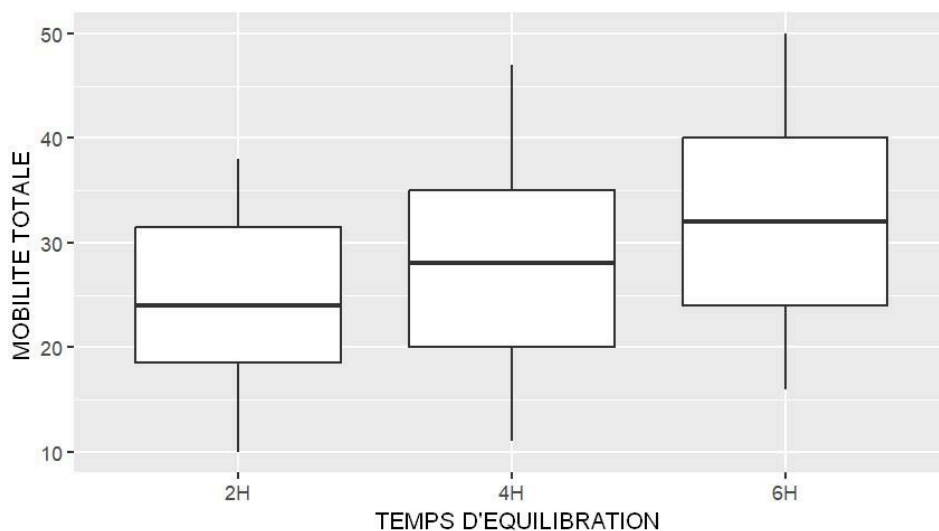


Figure 26 : Boxplot de la mobilité totale en fonction du temps d'équilibration (2h, 4h ou 6h)

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

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

Tableau 4 : Tableau des moyennes et des p-values de la mobilité totale en fonction des durées d'équilibration

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

2. Mobilité progressive

Les moyennes des pourcentages des spermatozoïdes progressifs en fonction de la durée d'équilibration sont représentées dans le tableau 6.

Nous remarquons à l'aide de la figure 29 que plus le temps d'équilibration des spermatozoïdes à +4°C est augmenté, plus le pourcentage des spermatozoïdes progressifs post-décongélation est important.

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

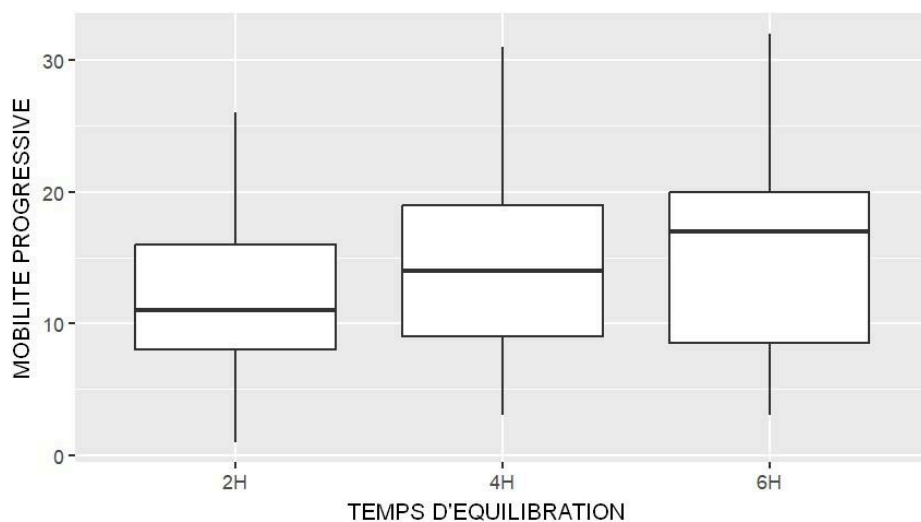


Figure 27 : *Boxplot de la mobilité progressive en fonction du temps d'équilibration (2h, 4h ou 6h)*

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

Tableau 5 : *Tableau des moyennes et des p-values de la mobilité progressive en fonction des durées d'équilibration*

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

3. Autres paramètres

Tableau 6 : Tableau des différentes moyennes en fonction des paramètres de mobilité ainsi que les p-values associées

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

Quelle que soit la durée d'équilibration, les tests statistiques nous indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents paramètres cinétiques (ELONG, LIN, STR, BCF, VAP, VCL, VSL, ALH).

On voit de manière clairement significative que pour les paramètres de mobilité et de mobilité progressive, qui restent les paramètres reconnus comme étant déterminants dans les critères décisionnels de l'insémination artificielle, la durée optimale d'équilibration est de six heures.

D. DISCUSSION

1. Échantillons

Nous avons pu étudier 23 éjaculats provenant de 5 étalons différents afin que notre analyse statistique soit significative. Nous avons écarté plusieurs éjaculats et plusieurs étalons avant même de congeler car ils présentaient une très faible mobilité, non compatible avec la congélation. D'autres étalons ne sont pas restés assez longtemps au centre pour effectuer une purge et plusieurs prélèvements. Nous avons donc écarté les étalons ayant été prélevés une seule fois ou deux fois pour que nos statistiques soient significatives.

Les étalons ont été prélevés régulièrement une fois par jour ou tous les deux jours pendant certaines périodes et ont été purgés. Malgré cela, certains étalons ont gardé une semence de mauvaise qualité. Nous avons aussi fait le choix de garder toutes les données dans notre analyse statistique, y compris les échantillons avec une mobilité inférieure à 35% après décongélation pour avoir un nombre de répétitions exploitables. Mais dans les centres de reproduction les paillettes avec des résultats de mobilité faible sont retirées.¹¹⁰ Cela peut nous laisser espérer qu'avec plus d'échantillons et avec une semence de meilleure qualité, les résultats soient plus satisfaisants.

Nous avons utilisé des appareils fiables et précis, ce qui nous a permis d'avoir une bonne répétabilité pour les paramètres cinétiques. Pour l'analyse des paramètres cinétiques nous avons utilisé l'appareil IVOS équipé du logiciel IMSI-STRICTTM imaging analysis software de Hamilton Thorne II. Nous avons respecté les consignes du constructeur et respecté la dilution pour avoir le moins d'erreur possible notamment avec les spermatozoïdes morts. En effet, lorsque la dilution est trop faible les spermatozoïdes vivants peuvent percuter les morts et ainsi créer un mouvement ce qui peut fausser les résultats. Nous avons pour cela respecté les consignes du constructeurs

2. Paramètres de mobilité

Dans notre étude nous avons utilisé la mobilité des spermatozoïdes comme critère principal pour évaluer la qualité du sperme de l'étalon. Cette technique a été utilisée de manière similaire par d'autres auteurs.^{95,18} En effet, les spermatozoïdes doivent être transportés vers l'oviducte pour rencontrer et pénétrer l'ovocyte. Le pourcentage de spermatozoïdes ayant une mobilité totale et progressive suffisante peut indiquer une bonne fertilité du sperme.

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

Nous n'avons pas étudié des durées d'équilibration de plus de six heures pour des raisons pratiques. Mais il serait peut-être intéressant de travailler sur une durée d'équilibration plus importante comme cela a été fait dans d'autres espèces.^{123,147}

Ces observations peuvent laisser penser qu'un contact prolongé des cryoprotecteurs (glycérol) et des stabilisateurs membranaires (jaune d'œuf) avec le sperme d'étalon avant la congélation, permettrait aux spermatozoïdes de mieux se préparer au choc thermique qu'ils subissent lors de la congélation/décongélation. Des échanges entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire permettraient une réorganisation de la structure membranaire des spermatozoïdes.

Même s'il n'y a pas de réel consensus sur le temps d'équilibrage, chez d'autres espèces comme chez le taureau de nombreux auteurs ont montré que ce temps était essentiel pour l'adaptation de la membrane plasmique des spermatozoïdes à de nouvelles conditions.^{141,14,88} Les milieux de congélations chez cette espèce semblent aussi jouer un rôle important dans la durée d'équilibration, avec un optimum qui varie en fonction du milieu et de sa composition.¹² Par exemple, les dilueurs contenant des composants lipidiques, pourraient interagir plus efficacement avec les membranes avec des temps d'équilibration prolongés ou une température d'incubation plus élevée. Ici notre étude serait donc spécifique du milieu de congélation INRA FREEZE®.¹⁴¹

En ce qui concerne les autres paramètres de mobilité étudiés, une étude dissocie deux groupes de population de spermatozoïdes, les rapides et linéaires, comme bons indicateurs de la qualité de l'éjaculat et les lents et non linéaires, qui sont des marqueurs d'une mauvaise qualité chez de nombreuses espèces.⁹⁹ Mais chez l'étalon il semblerait selon Quintero-moreno *et al.* que ce soit une sous population de lente et linéaire qui soit preuve de meilleure fertilité.¹³³ Une autre étude de Barrier Battut *et al.* a montré une corrélation entre les spermatozoïdes progressifs et rapides et la fertilité.¹⁸ Dans notre étude, seules la mobilité totale et la mobilité progressive sont significatives. Les autres paramètres ne sont pas significatifs et nous ne pouvons donc pas tirer de conclusion.¹⁴¹

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

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

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

CONCLUSION

Depuis quelques années, de nombreux progrès ont été réalisés en reproduction dans l'espèce équine. Mais la congélation reste une problématique, et un protocole optimal est recherché pour améliorer la fertilité en post-décongélation en vue d'une insémination.

Notre étude s'est ainsi attachée à démontrer que l'augmentation de la durée d'équilibration de 2h à 6h dans le dilueur INRA FREEZE ® directement permettait de perfectionner la méthode de congélation en améliorant certains paramètres de mobilité des spermatozoïdes. Pour cela nous avons testé différents paramètres de mobilité grâce à l'analyseur d'image CASA.

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

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

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

BIBLIOGRAPHIE

-A-

1. **AL-KASS Z , MORRELL JM.** Freezing Stallion Semen—What Do We Need to Focus on for the Future ? *Vet. Sci.* 11, 65 (2024)
2. **ALVARENGA MA, PAPA FO, LANDIM-ALVARENGA FC, MEDEIROS AS.** Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Anim Reprod. Sci.* 89, 105–113 (2005)
3. **ALVARENGA MA, MELO-OÑA C, MAGALHAES L, PAPA FO.** A new method to concentrate equine sperm. *Anim Reprod Sci* 121, 186–187 (2010)
4. **ALVARENGA MA, PAPA FO, CARMO MT, KIEVITSBOSCH T, MANOELA M. CHAVES C, RAMIREZ NETO C,** Methods of Concentrating Stallion Semen. *J. Equine Vet. Sci.* 32, 424–429 (2012)
5. **ALVARENGA MA, PAPA FO, RAMIRES NETO C.** Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 32, 521–530 (2016)
6. **AMANN RP.** A review of anatomy and physiology of the stallion. *J. Equine Vet. Sci.* 1, 83–105 (1981)
7. **AMANN RP, PICKETT BW.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7, 145–173 (1987)
8. **ANTON M, MARTINET V, DALGALARRONDO M, BEAUMAL V, DAVID-BRIAND E, RABESONA H.** Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.* 83, 175–183 (2003)
9. **ARRUDA DE OLIVEIRA R, ANTONIAZZI WOLF C, ANTÔNIO DE OLIVEIRA VIU A, LÚCIA GAMBARINI A.** Addition of Glutathione to an Extender for Frozen Equine Semen, *Journal of Equine Veterinary Science*, Volume 33, Issue 12, Pages 1148-1152, ISSN 0737-0806 (2013)
10. **ATROSHCHENKO MM, ARKHANGELSKAYA E, ISAEV DA, STAVITSKY SB, ZAITSEV AM, KALASCHNIKOV VV, LEONOV S, OSIPOV AN.** Reproductive Characteristics of Thawed Stallion Sperm. *Anim. Open Access J. MDPI* 9, 1099 (2019)
11. **AURICH C.** Recent advances in cooled-semen technology. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 268–275 (2008)
12. **AURICH C, SCHREINER B, ILLE N, ALVARENGA M, SCARLET D.** Cytosine methylation of sperm DNA in horse semen after cryopreservation. *Theriogenology* 86, 1347–1352 (2016)
13. **AZIZ D, ENBERGS H.** Effect of Seminal Plasma Removal on Cell Membrane, Acrosomal Integrity and Mitochondrial Activity of Cooled Stallion Semen. *J. Adv. Vet. Res.* Vol. 2, 148–152 (2012)

-B-

14. **BAILEY JL, BILODEAU JF, CORMIER N.** Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* 21, 1–7 (2000)
15. **BALL BA, GRAVANCE CG, MEDINA V, BAUMBER J, LIU IKM.** Catalase activity in equine semen. *Am. J. Vet. Res.* 61, 1026–1030 (2000)
16. **BALL BA, VO AT, BAUMBER J.** Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 62, 508–515 (2001)
17. **BARONE R.** Appareil Génital Mâle. Anatomie Comparée Des Mammifères Domestiques. Tome 4. Splanchnologie II. Troisième Édition. 896 Pages, Vigot-Frèr., Paris, (2001)
18. **BARRIER BATTUT A, KEMPFER N, LEMASSON L, CHEVRIER S.** Camugli, Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry, *Theriogenology*, Volume 97, Pages 186-200, (2017)
19. **BELALA R, BRIAND-AMIRAT L, VINCIGUERRA L, TAINTURIER D, KAIDI R, THORIN C, MICHAUD S, ANTON M, BENCHARIF D.** Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. *Res Vet Sci.* Jun;106:66-73. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.03.010. (2016)
20. **BENCHAI B M, AJINA M, LORNAGE J, NIVELEAU A, DURAND P, GUÉRIN JF.** Quantitation by image analysis of global DNA methylation in human spermatozoa and its prognostic value in in vitro fertilization: a preliminary study. *Fertil. Steril.* 80, 947–953 (2003)
21. **BENSON JD, WOODS EJ, WALTERS EM, CRITSER JK.** The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* 78, 1682–1699 (2012)
22. **BERGERON A, CRÊTE MH., BRINDLE Y, MANJUNATH P.** Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.* 70, 708–717 (2004)
23. **BERGERON A, MANJUNATH P.** New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* ;73(10):1338-44 (2006)
24. **BEVERS EM, COMFURIUS P, DEKKERS DWC, ZWAAL RFA.** Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1439, 317–330 (1999)
25. **BLISS SB, VOGEL JL, HAYDEN SS, TEAGUE SR, BRINSKO SP, LOVE CC, BLANCHARD TL, VARNER DD.** The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology* 77, 1232–1239 (2012)

26. **BLOTTNER S, WARNKE C, TUCHSCHERER A, HEINEN V, TORNER H.** Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 75–88 (2001)
27. **BOYD JS.** Rooney's Guide to the Dissection of the Horse. *Can. Vet. J.* 19, 106 (1978)
28. **BRINSKO S.P., BLANCHARD T.L., VARNER D.D., SCHUMACHER J., LOVE C.C., HINRICHS K., HARTMAN D.L.:** Manual of Equine Reproduction. Troisième édition. 325 pages, Mosby., Maryland Heights (Missouri, USA), (2011)

-C-

29. **CABRERA T., RAMIRES-NETO C, BELAZ KRA, FREITAS-DELL'AQUA CP, ZAMPIERI D, EBERLIN MN, TATA A, ALVARENGA MA, SOUZA FF,** Influence of spermatozoal lipidomic profile on the cryoresistance of frozen spermatozoa from stallions. *Theriogenology* 108, 161–166 (2018)
30. **CAVALERO TMS, PAPA FO, SCHMITH RA, SCHEEREN VFC, CANUTO LEF, GOBATO MLM, RODRIGUES LT, FREITAS-DELL'AQUA CP** Protocols using detomidine and oxytocin induce ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology* 140, 93–98 (2019)
31. **CLÉMENT F, VIDAMENT M, GUÉRIN B.** Microbial Contamination of Stallion Semen. *Biol. Reprod.* 52, 779–786 (1995)
32. **CONBOY HS.** Training the novice stallion for artificial breeding. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 8, 101–109 (1992)
33. **CONTRERAS MJ, TREULEN F, ARIAS ME, SILVA M, FUENTES F, CABRERA P, FELMER R.** Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 55, 229–239 (2020)
34. **CONTRERAS MJ, ARIAS ME, FUENTES F, MUÑOZ E, BERNECIC N, FAIR S, FELMER R.** Cellular and Molecular Consequences of Stallion Sperm Cryopreservation: Recent Approaches to Improve Sperm Survival. *J. Equine Vet. Sci.* 126, 104499 (2023)
35. **CRESPILHO AM, SPIZZIRI BE, MEYERS M, GRAHAM JK.** The Effect of Cholesterol Addition, Buffer, and pH on Equine Sperm Stored at 5°C. *J. Equine Vet. Sci.* 33, 663–666 (2013)
36. **CROCKETT EC., GRAHAM JK, BRUEMMER JE, SQUIRES EL.** Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: Preliminary results. *Theriogenology* 55, 793–803 (2001)

37. **CROWE JH, CARPENTER JF, CROWE LM, ANCHORDOGUY TJ.** Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27, 219–231 (1990)
38. **CRUMP J.** Stallion ejaculation induced by manual stimulation of the penis. *Theriogenology* 31, 341–346 (1989)

-D-

39. **DAELS PF.** New technics of artificial insemination in the mare | IVIS.
<https://www.ivis.org/library/beps/beps-annual-study-days-brussels-2003/new-technics-of-artificial-insemination-mare> .In: BEPS - Annual Study Days - Brussels, 2003 by Belgian Equine Practitioners Society NOV 15, (2003)
40. **DE LEEUW FE, CHEN HC, COLENBRANDER B, VERKLEIJ AJ.** Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27, 171–183 (1990)
41. **DELL'AQUA JUNIOR JA, PAPA FO, ALVARENGA M, FABIOLA Z.** Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 324–325, 3 December (2001)
42. **DEVIREDDY RV, SWANLUND DJ, OLIN T, VINCENTE W, TROEDSSON MHT, BISCHOF JC, ROBERTS KP.** Cryopreservation of equine sperm: Optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biology of reproduction*, 66(1), 222-231 (2002)
43. **DORDAS-PERPINYÀ M, YANEZ-ORTIZ I, SERGEANT N, MEVEL V, BRUYAS JF, CATALÁN J, DELEHEDDE M, BRIAND-AMIRAT L, MIRÓ J .** ProAKAP4 Concentration Is Related to Sperm Motility and Motile Sperm Subpopulations in Frozen-Thawed Horse Semen. *Anim. Open Access J. MDPI* 12, 3417 (2022)
44. **DOTT HM, FOSTER GC.** A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'live/dead' stain. *Reproduction* 29, 443–445 (1972)
45. **DUTTA S, MAJZOUB A, AGARWAL A.** Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab J. Urol.* 17, 87–97 (2019)

-E-

46. **ECOT P, DECUADRO-HANSEN G, DELHOMME G, VIDAMENT M.** Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 245–248 (2005)
47. **EDMOND AJ.** Effect of density gradient centrifugation on quality and recovery of equine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 318 (2008)

48. **EGYPTIEN S, DEWALS B, ECTORS F, BRUTINEL F, PONTHER J, DELEUZE S.** Validation of Calcein Violet as a New Marker of Semen Membrane Integrity in Domestic Animals. Anim. Open Access J. MDPI 13, 1874 (2023)
49. **EGYPTIEN S, DELEUZE S, LEDECK J, PONTHER J.** Sperm Quality Assessment in Stallions: How to Choose Relevant Assays to Answer Clinical Questions. Animals 13, 3123 (2023)
50. **ENGLAND, G.** Fertility and Obstetrics in the Horse. Wiley ,Blackwell Publishing, 307p, (2008)
51. **ESTRADA A, SAMPER JC.** Evaluation of Raw Semen. Saunders Elsevier, St Louis, (2007)
52. **EVENSON DP., DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED MR.** Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science 210, 1131–1133 (1980)

-F-

53. **FARIAS LB, DA CUNHA BARRETO-VIANNA AR, DE MELLO MD, DOS SANTOS AL, DA FONTE RAMOS C, FONTOURA P.** Comparison of Diff-Quick and Spermac Staining Methods for Sperm Morphology Evaluation. J. Reprod. Infertil. 24, 166–170 (2023)
54. **FLORES E, RAMIÓ-LLUCH L, BUCCI D, FERNÁNDEZ-NOVELL JM, PEÑA A, RODRÍGUEZ-GIL JE.** Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. Theriogenology 76, 1450–1464 (2011)
55. **FORNEYBD, MCDONNELL SM.** How to Collect Semen from Stallions While They Are Standing on the Ground (1999)

-G-

56. **GAITSKELL-PHILLIPS G, MARTÍN-CANO FE, ORTIZ-RODRÍGUEZ JM, SILVA-RODRÍGUEZ A, GIL MC, ORTEGA-FERRUSOLA C, PEÑA FJ.** Differences in the proteome of stallion spermatozoa explain stallion-to-stallion variability in sperm quality post-thaw†. Biol. Reprod. 104, 1097–1113 (2021)
57. **GARNER DL, JOHNSON LA, YUE ST, ROTH BL, HAUGLAND RP.** Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. J. Androl. 15, 620–629 (1994)
58. **GEHLEN H, KLUG E, BADER H.** Partial erection disorder in an eleven year old warmblood stallion - Use of electroejaculation for assessment of testicular function. Pferdeheilkunde 15, 341–344 (1999)
59. **GIBB Z, LAMBOURNE SR, AITKEN RJ.** The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. Biol. Reprod. 91, 77 (2014)
60. **GIBB Z, AITKEN RJ.** The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. BioMed Res. Int. 2016, 1–8 (2016)

61. **GRAVANCE C, CHAMPION Z, CASEY P.** Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology* 49, 1219–1230. (1998)
62. **GRAVANCE CG, GARNER DL, BAUMBER J, BALL BA.** Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology* 53, 1691–1703 (2000)

-H-

63. **HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC.** *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, (2015)
64. **HARAS NATIONAUX,** *Insémination artificielle équine, Cinquième édition.* 258 pages, Institut français du cheval et de l'équitation (2014)
65. **HERNÁNDEZ-CORREDOR L, BAEZ G, BUSTAMANTE J.** Effect of the incorporation of plasma rich of platelets on the spermatozoa physiology of ram semen. *J. Dairy Vet. Anim. Res.* 9, 34–38 (2020)
66. **HIDALGO M, ORTIZ I, DORADO J, MORRELL JM, GOSÁLVEZ J, CONSUEGRA C, DIAZ-JIMENEZ M, PEREIRA B, CRESPO F.** Stallion sperm selection prior to freezing using a modified colloid swim-up procedure without centrifugation. *Anim. Reprod. Sci.* 185, 83–88 (2017)
67. **HILDEN L, HYYPPÄ S, KANGASNIEMI A.** Freezability and fertility results with uncentrifuged stallion semen. *Acta Vet. Scand.* 35, 377–382 (1994)
68. **HILLMAN RB, OLAR TT, SQUIRES EL, PICKETT BW.** Temperature of the artificial vagina and its effect on seminal quality and behavioral characteristics of stallions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177, 720–722 (1980)
69. **HURTGEN JP.** Evaluation of the Stallion for Breeding Soundness. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 8, 149–165 (1992)

-J-

70. **JASKO DJ, HATHAWAY JA, SCHALTENBRAND VL, SIMPER WD, SQUIRES EL.** Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37, 1241–1252 (1992)
71. **JOHN MORRIS G, ACTON E, MURRAY BJ, FONSECA F.** Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology* 64, 71–80 (2012)
72. **JOHNSON L, AMANN RP, PIKETT BW.** Scanning electron microscopy of the epithelium and spermatozoa in the equine excurrent duct system. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1428–1434 (1978)

73. **JOHNSON L, NEAVES WB.** Age-Related Changes in the Leydig Cell Population, Seminiferous Tubules, and Sperm Production in Stallions¹. *Biol. Reprod.* 24, 703–712 (1981)
74. **JOHNSON L.** A new approach to quantification of Sertoli cells that avoids problems associated with the irregular nuclear surface. *Anat Rec.* Mar;214(3):231-7 (1986)
75. **JOHNSON L.** Efficiency of spermatogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 32, 385–422 (1995)
76. **JOHNSON L, BLANCHARD TL, VARNER DD, SCRUTCHFIELD WL.** Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology* 48, 1199–1216 (1997)
77. **JOHNSON L.** CHAPTER 5 - Spermatogenesis. in *Reproduction in Domestic Animals* (Fourth Edition) (ed. Cupps, P. T.) 173–219 Academic Press, San Diego (1991)

-K-

78. **KARESKOSKI M, KATILA T.** Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 249–256 (2008)
79. **KATILA T.** In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review. *Acta Vet. Scand.* 42, 199–217 (2001)
80. **KAVAK A, LUNDEHEIM N, AIDNIK M, EINARSSON S.** Testicular Measurements and Daily Sperm Output of Tori and Estonian Breed Stallions. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 167–169 (2003)
81. **KERNS K, SHARIF M, ZIGO M, XU W, HAMILTON LE, SUTOVSKY M, ELLERSIECK M, DROBNIS EZ, BOVIN N, OKO R, MILLER D, SUTOVSKY P.** Sperm Cohort-Specific Zinc Signature Acquisition and Capacitation-Induced Zinc Flux Regulate Sperm-Oviduct and Sperm-Zona Pellucida Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2121 (2020)
82. **KHANAM A, SWELUM AA, KHAN FA.** Pharmacologically Induced Ex Copula Ejaculation in Horses and Donkeys. *Front. Vet. Sci.* 8, 669423 (2021)
83. **KNOBBE M, LEVINE D, HABECKER P, GETMAN L, BEECH J, TURNER R.** Prostatic Masses in Geldings: Two Cases. *J. Equine Vet. Sci.* 32, 628–633 (2012)
84. **KNOP K, HOFFMANN N, RATH D, SIEME H.** Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 294–297 (2005)
85. **KOPEIKA J, THORNHILL A, KHALAF Y.** The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum. Reprod. Update* 21, 209–227 (2015)

86. **KUMAR P, SAINI M, KUMAR D, BALHARA AK, YADAV SP, SINGH P, YADAV PS.** Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 159, 38–45 (2015)

-L-

87. **LEIPOLD SD, GRAHAM JK, SQUIRES EL, MCCUE PM, BRINSKO SP, VANDERWALL DK.** Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology* 49, 1537–1543 (1998)
88. **LEITE TG, FILHO V, ARRUDA R, ANDRADE A, EMERICK L, ZAFFALON FG, MARTINS J, ANDRADE V.** Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 120, 31–38 (2010)
89. **LIMONE LE, SHAUGHNESSY DW, GÓMEZ-IBÁÑEZ S, MCDONNELL S, BEDFORD-GUAUS S.** The effect of artificial vagina lubricants on stallion sperm motion measures and semen pH during cooled storage. *Theriogenology* 58, 333–336 (2002)
90. **LINDEBERG H, KARJALAINEN H, KOSKINEN E, KATILA T.** Quality of stallion semen obtained by a new semen collection phantom (Equidame) versus a Missouri artificial vagina. *Theriogenology* 51, 1157–1173 (1999)
91. **LITTLE TV, HOLYOAK GR.** Reproductive anatomy and physiology of the stallion. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 8, 1–29 (1992)
92. **LOOMIS PR.** Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 22, 663–676 (2006)
93. **LOVE CC.** Ultrasonographic Evaluation of the Testis, Epididymis, And Spermatic Cord of the Stallion. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 8, 167–182 (1992)
94. **LOVE CC.** Semen Collection Techniques. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 8, 111–128 (1992)
95. **LOVE CC, NOBLE JK, STANDRIDGE SA, BEARDEN CT, BLANCHARD TL, VARNER DD, CAVINDER CA.** The relationship between sperm quality in cool-shipped semen and embryo recovery rate in horses. *Theriogenology* 84, 1587-1593.e4 (2015)

-M-

96. **MAGISTRINI M, CHANTELOUBE P, PALMER E.** Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 35, 127–133 (1987)

97. **MANJUNATH P, NAUC V, BERGERON A, MÉNARD M.** Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.* 67, 1250–1258 (2002)
98. **MARTIN JC, KLUG E, GÜNZEL AR.** Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47–51 (1979)
99. **MARTÍNEZ-PASTOR F, TIZADO EJ, GARDE JJ, ANEL L, DE PAZ P.** Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 75, 783–795 (2011)
100. **MAXWELL WM, LANDERS AJ, EVANS G.** Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology* 43, 1201–1210 (1995)
101. **MAZAT J.-P, RANSAC S.** Le complexe bc-1 de la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne selon l'hypothèse du cycle Q de Mitchell: La preuve par une approche stochastique ? *médecine/sciences* 26, 1079–1086 (2010)
102. **MAZIERO RD, GUASTI PN, MONTEIRO GA, AVANZI BR, HARTWIG FP, LISBOA FP, MARTIN I, PAPA FO,** Evaluation of Sperm Kinetics and Plasma Membrane Integrity of Frozen Equine Semen in Different Storage Volumes and Freezing Conditions. *J. Equine Vet. Sci.* 33, 165–168 (2013)
103. **MAZUR P.** kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol.* Nov;47(2):347-69 (1963)
- 104; **MCDONNELL SM, LOVE CC.** Manual stimulation collection of semen from stallions: Training time, sexual behavior and semen. *Theriogenology* 33, Issue 6,1201–1210 (1990)
105. **MCDONNELL, SM., ODIAN MJ.** Imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology* 41, 1005–1010 (1994)
106. **MCKINNON AO, SQUIRES E L, VAALA WE, VARNER DD.** *Equine Reproduction.* 2nd Edition ISBN: 978-0-470-96187-2, Wiley-Blackwell ,3296 pages, (2011)
107. **MEDINA-LEÓNA A, DOMÍNGUEZ-MANCERAA B, CAZALEZ-PENINO B N, CERVANTES-ACOSTAA P, JÁCOME-SOSAA E, ROMERO-SALASA D, BARRIENTOS-MORALES M.** Cryopreservation of horse semen with a liposome and trehalose added extender. *Austral J. Vet. Sci.* 51, 119–123 (2019)
108. **MERYMAN, HT.** Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion (Paris)* 47, 935–945 (2007)
109. **MOCÉ E, BLANCH E, TOMÁS C, GRAHAM J.** Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 57–66 (2010)

110. **MORENO D., BENCHARIF D., AMIRAT-BRIAND L., DESTRUMELLE S., ANTON M., BARRIERE P., TAINTURIER D.**: Freezing stallion semen : trial of an extender made with low density lipoproteins (LDL) from chicken egg yolk ,*J. Equine Vet. Sci.*, 32, 499 (2012)
111. **MOUSSA M, MARINET V, TRIMECHE A, TAINTURIER D, ANTON M.** Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57, 1695–1706 (2002)
112. **MUIÑO R, FERNÁNDEZ M, PEÑA, A.** Post-thaw Survival and Longevity of Bull Spermatozoa Frozen with an Egg Yolk-based or Two Egg Yolk-free Extenders after an Equilibration Period of 18 h. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 305–311 (2007)

-N-

113. **NARESH S.** Effect of cooling (4 °C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosine phosphorylation in buffalo spermatozoa. *Cryobiology* 72, 7–13 (2016)
114. **NEUHAUSER S, BOLLWEIN H, SIUDA M, HANDLER J.** Effects of Different Freezing Protocols on Motility, Viability, Mitochondrial Membrane Potential, Intracellular Calcium Level, and DNA Integrity of Cryopreserved Equine Epididymal Sperm. *J. Equine Vet. Sci.* 82, 102801 (2019)
115. **NISHIKAWA Y.** Studies on Reproduction in Horses: Singularity and Artificial Control in Reproductive Phenomena. (Japan Racing Association) (1959)
116. **NÖTHLING JO, SHUTTLEWORTH R.** The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology* 63, 1469–1480 (2005)
117. **NOURI H, SHOJAEIAN K, SAMADIAN F, LEE S, KOHRAM H, LEE JI.** Using Resveratrol and Epigallocatechin-3-Gallate to Improve Cryopreservation of Stallion Spermatozoa With Low Quality, *Journal of Equine Veterinary Science*, Volume 70, Pages 18-25, (2018)

-O-

118. **OLDENHOF H, GOJOWSKY M, WANG S, HENKE S, YU C, ROHN K, WOLKERS WF, SIEME H.** Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. *Biol. Reprod.* 88, 68 (2013)
119. **OLDENHOF H, BIGALK J, HETTEL C, DE OLIVEIRA BARROS L, SYDYKOV B, BAJCSY ÁC, SIEME H, WOLKERS WF.** Stallion Sperm Cryopreservation Using Various Permeating Agents: Interplay Between Concentration and Cooling Rate. *Biopreservation Biobanking* 15, 422–431 (2017)

120. **ORSOLINI MF, MEYERS SA, DINI P.** An Update on Semen Physiology, Technologies, and Selection Techniques for the Advancement of In Vitro Equine Embryo Production: Section I. *Anim. Open Access J. MDPI* 11, 3248 (2021)
121. **ORTEGA-FERRUSOLA C, GÓMEZ-ARRONES V, MARTÍN-CANO FE, GIL MC, PEÑA FJ, GAITSKELL-PHILLIPS G, DA SILVA-ÁLVAREZ E.** Advances in the ultrasound diagnosis in equine reproductive medicine: New approaches. *Reprod. Domest. Anim.* 57, 34–44 (2022)

-P-

122. **PAPAS M, CATALÁN J, FERNANDEZ-FUERTES B, ARROYO L, BASSOLS A, MIRÓ J, YESTE M.** Specific Activity of Superoxide Dismutase in Stallion Seminal Plasma Is Related to Sperm Cryotolerance. *Antioxid. Basel Switz.* 8, 539 (2019)
123. **PAUL RKR, BALAGANUR K, KUMAR D, SINGH R.** Pre-freezing equilibration for 22 h improves post-thaw sperm functions in cryopreserved ram semen by reducing cholesterol efflux. *Cryobiology* 96, 76–84 (2020)
124. **PEÑA FJ, GARCÍA BM, SAMPER JC, APARICIO IM, TAPIA JA, FERRUSOLA CO.** Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology* 76, 1177–1186 (2011)
125. **PEÑA FJ, ORTIZ-RODRÍGUEZ JM, GAITSKELL-PHILLIPS GL, GIL MC, ORTEGA-FERRUSOLA C, MARTÍN-CANO FE.** An integrated overview on the regulation of sperm metabolism (glycolysis-Krebs cycle-oxidative phosphorylation). *Anim. Reprod. Sci.* 246, 106805 (2022)
126. **PICKETT BW, VOSS JL, SQUIRES EL, AMANN RP.** Management of the Stallion for Maximum Reproductive Efficiency Collectible; Very Good Pamphlet | Robinson Street Books, IOBA. (1981)
127. **PICKETT BW, AMANN RP.** Extension and storage of stallion spermatozoa: A review. *J. Equine Vet. Sci.* 7, 289–302 (1987)
128. **PILLET E., BATELLIER F., DUCHAMP G., FURSTOSS V., LE VERN Y., KERBOEUF D., VIDAMENT M., MAGISTRINI M.** Freezing stallion semen in INRA96® -based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Sci. Technol.* 88, 257–265 (2008)
129. **PILLET E.** Mise au point d'un milieu pour la cryopréservation de la semence équine et mécanismes de cryoprotection impliqués. Th. Univ.: Rennes 316p.(2009)
130. **POMMER AC, RUTLLANT J, MEYERS SA.** The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology* 58, 1373–1384 (2002)

131. **PONTHIER J, VAN DEN BERGHE F, PARRILA-HERNANDEZ S, HANZEN C, DELEUZE S.** Congélation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives Ann. Médecine Vétérinaire, 158, 57-72 (2014)
132. **PRATHALINGAM NS, HOLT WV, REVELL SG, MIRCZUK S, FLECK RA, WATSON PF** Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. Theriogenology 66, 1894–1900 (2006)

-Q-

133. **QUINTERO-MORENO A, MIRÓ J, TERESA RIGAU A, RODRÍGUEZ-GIL JE.** Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. Theriogenology 59, 1973–1990 (2003)

-R-

134. **RAJABI-TOUSTANI R, AKTER QS, ALMADALY EA, HOSHINO Y, ADACHI H, MUKOUJIMA K, MURASE T .** Methodological improvement of fluorescein isothiocyanate peanut agglutinin (FITC-PNA) acrosomal integrity staining for frozen-thawed Japanese Black bull spermatozoa. J. Vet. Med. Sci. 81, 694–702 (2019)
135. **RICKETTS SW.** Evaluation of stallion semen. Equine Vet. Educ. 5, 232–237 (1993).
136. **RIJSSELAERE T, VAN SOOM A, TANGHE S, CORYN M, MAES D, DE KRUIF A.** New Techniques for the Assessment of Canine Semen Quality: A Review. Theriogenology, Theriogenology 64, 706–719, (2005)
137. **ROBLES V, VALCARCE DG, RIESCO MF.** The Use of Antifreeze Proteins in the Cryopreservation of Gametes and Embryos. Biomolecules 9, 181 (2019)
138. **RUNCAN EE, POZOR MA, ZAMBRANO GL, BENSON S, MACPHERSON ML.** Use of two conventional staining methods to assess the acrosomal status of stallion spermatozoa. Equine Vet. J. 46, 503–506 (2014)

-S-

139. **SAINT-DIZIER M, MAHÉ C, REYNAUD K, TSIKIS G, MERMILLOD P, DRUART X.** Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. Mol. Cell. Endocrinol. 516, 110956 (2020)
140. **SALAZAR JL JR, TEAGUE SR, LOVE CC, BRINSKO SP, BLANCHARD TL, VARNER DD.** Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. Theriogenology 76, 409–418 (2011)

141. **SALMAN A, FERNÁNDEZ-ALEGRE E, FRANCISCO-VÁZQUEZ R, GÓMEZ-MARTÍN R, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ A, AREÁN-DABLANCA H, DOMÍNGUEZ JC, GONZÁLEZ-MONTAÑA JR, CAAMAÑO JN, MARTÍNEZ-PASTOR F.** Extension of the equilibration period up to 24 h maintains the post-thawing quality of Holstein bull semen frozen with OPTIXcell®. *Anim. Reprod. Sci.* 250, 107209 (2023)
142. **SAMPER JC.** Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Seconde Édition. 310 Pages, Saunders., St Louis (Missouri, USA), (2009)
143. **SCHUMACHER J, RIDDELL MG.** Collection of stallion semen without a mount. *Theriogenology* 26, 245–250 (1986)
144. **SCHUMACHER J, MOLL H.D.** Collection of Semen | IVIS In Manual of equine diagnostic procedures, Teton NewMedia (2011)
145. **SHAKEEL M, YOON M.** Functions of somatic cells for spermatogenesis in stallions. *J. Anim. Sci. Technol.* 64, 654–670 (2022).
146. **SHAH SA, ANDRABI SM, QURESHI IZ.** Effect of equilibration times, freezing, and thawing rates on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrology*. Sep;4(5):972-6. doi: 10.1111/andr.12214. Epub 2016 May 6. PMID: 27153390. (2016)
147. **SHAHVERDI A, RASTEGARNIA A, REZAEI TOPRAGGALEH T.** Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell J.* 16, 279–288 (2014)
148. **SIEME H, ECHE A, KLUG E.** Effect of frequency and interval of semen collection on seminal parameters and fertility of stallions. *Theriogenology* 58, 313–316 (2002)
149. **SIEME H, OLDENHOF H, WOLKERS WF.** Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim. Reprod. Sci.* 169, 2–5 (2016)
150. **STOECKIUS M, GRÜN D, RAJEWSKY N.** Paternal RNA contributions in the *Caenorhabditis elegans* zygote. *EMBO J.* 33, 1740–1750 (2014)
151. **STOREY BT.** Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 427–437 (1AD) (2008)
152. **STOVER, J, SEAGER SWJ, DOLENSEK EP, DOHERTY J, WILDT DF, PLATZ CC.** Electroejaculation and semen evaluation of the Przewalski horse (*Equus przewalski*). *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Zoo Vet. Seattle Oct 3–9, 1981, 144–145 (1981)*
- T-**
153. **TALLURI TR, MAL G, RAVI SK.** Biochemical components of seminal plasma and their correlation to the fresh seminal characteristics in Marwari stallions and Poitou jacks. *Vet. World* 10, 214–220 (2017)

154. **THIBAUT C ; LEVASSEUR MC.** La Reproduction Chez Les Mammifères et l'homme Editions Quae, 928 pages (2001)
155. **THOMAS CA, GARNER DL, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE.** Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 56, 991–998 (1997)
156. **THOMPSON DL, PICKETT BW. SQUIRES EL, AMANN RP.** Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 13–17 (1979)
157. **TIBARY.A, BAKKOURY M.** Reproduction Équine TOME II : L'étalon. 554 pages Actes Editions, Rabat (Maroc), (2005)
158. **TIBARY A., BAKKOURY M., ANOUASSI A., OURAGH L., SGHIRI A.** Reproduction équine - Tome III : biotechnologies appliquées. 532 pages, Actes Editions, Rabat (Maroc), (2005)
159. **TIRPÁK F, HALO M JR, TOKÁROVÁ K, BINKOWSKI LJ, VAŠÍČEK J, SVORADOVÁ A, BŁASZCZYK-ALTMAN M, KOVÁČIK A, TVRDÁ E, CHRENEK P, LUKÁČ N, MASSÁNYI P.** Composition of Stallion Seminal Plasma and Its Impact on Oxidative Stress Markers and Spermatozoa Quality. *Life* 11, (2021)
160. **TISCHNER M, KOSINIAK K.** Bacteriological contamination of stallion semen collected by “open” artificial vaginas. *Vlaams Diergeneesk Tijdschr* 55 90–94 (1986)
161. **TROEDSSON MH, LEE CS, FRANKLIN RD, CRABO BG.** The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 341–349 (2000)
162. **TREULEN F, AGUILA L, ARIAS ME, JOFRÉ I, FELMER R.** Impact of post-thaw supplementation of semen extender with antioxidants on the quality and function variables of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 201, 71–83 (2019)
163. **TROEDSSON MH, DESVOUSGES A, ALGHAMDI AS, DAHMS B, DOW CA, HAYNA J, VALESCO R, COLLAHAN PT, MACPHERSON ML, POZOR M, BUHI WC.** Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 171–186 (2005)

-U-

164. **URREGO R, RODRIGUEZ-OSORIO N, NIEMANN H.** Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics.* Jun;9(6):803-15. doi: 10.4161/epi.28711. (2014)

-V-

165. **VARNER DD, GIBB Z, AITKEN RJ.** Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. *Equine Vet. J.* 47, 16–24 (2015)
166. **VIDAMENT M.** French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 115–136 (2005)
167. **VIDAMENT, M.** Endocrinologie de l'étalon. *INRAE Productions Animales*, 12(5), 345–347 (1999)

-W-

168. **WAITE JA, LOVE CC, BRINSKO SP, TEAGUE SR, SALAZAR JL JR, MANCILL SS, VARNER DD.** Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology* 70, 704–714 (2008)
169. **WATSON PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 871–891 (1995)
170. **WEBER JA, WOODS GL.** Transrectal Ultrasonography for the Evaluation of Stallion Accessory Sex Glands. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 8, 183–190 (1992)

-Y-

171. **YÁNEZ-ORTIZ I, CATALÁN J, RODRÍGUEZ-GIL JE, MIRÓ J, YESTE M.** Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 246, 106904 (2022)
172. **YESTE M.** Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. Jan 1;85(1):47-64. (2016)

-Z-

173. **ZANDIYEH S, SHAHVERDI A, EBRAHIMI B, SABBAGHIAN M.** A novel approach for human sperm cryopreservation with AFPIII. *Reprod. Biol.* 20, 169–174 (2020)
174. **ZENG C, PENG W, DING L, HE L, ZHANG Y, FANG D, TANG K,** A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation, *Cryobiology*, Volume 69, Issue 1, Pages 119-127 (2014)
175. **ZHOU R, WU J, LIU B, JIANG Y, CHEN W, LI J, HE Q, HE Z.** The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 76, 2681–2695 (2019)

Références électroniques :

176. **EMO, A.** Certificat d'aptitude aux fonctions de chef de centre. L'institut français du cheval et de l'équitation [en ligne]. Disponible sur internet URL : <https://www.ifce.fr/ifce/formations-et-metiers/notre-offre-de-formation/formation-en-reproduction-equine/certificat-daptitude-aux-fonctions-de-chef-de-centre/> (Dernière consultation le : 05/06/2024)
177. **IFCE** (Institut Français du Cheval et de l'Équitation) Techniques de reproduction - Synthèse. L'institut français du cheval et de l'équitation [en ligne]. Disponible sur internet URL : https://statscartes.ifce.fr/elevage-et-production/techniques-de-reproduction/synthse_d34 (Dernière consultation le : 20/08/2024)

ANNEXES

ANNEXE 1 : EVOLUTION DES TECHNIQUES DE REPRODUCTION DE 2014 À 2023

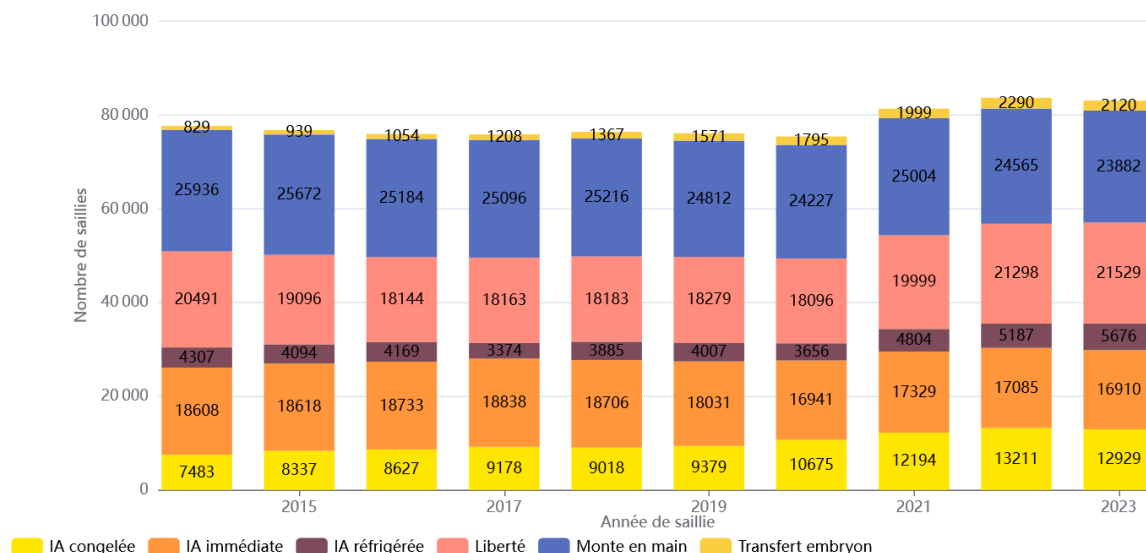


Figure 28 : Evolution des techniques de reproduction de 2014 à 2023 ¹⁷⁷

ANNEXE 2 : CLASSIFICATION DE LA QUALITÉ DES DOSES DE SPERME CONGELÉ

Tableau 7 : Classification de la qualité des doses de sperme congelé ⁽¹⁶⁶⁾

Critère	Indice	Définition
Nombre de spermatozoïdes pour la saison	A***	> 3 x 750 x 10 ⁶ soit 2,25 x 10 ⁹ spermatozoïdes pour 3 cycles
	A**	> 2 x 750 x 10 ⁶ soit 2,25 x 10 ⁹ spermatozoïdes pour 2 cycles
	A*	> 1 x 750 x 10 ⁶ dans 2 paillettes pour un cycle
	B	autres offres ou non spécifié
% de mobilité rapide en décongélation	A	> 35 %
	B	< 35 % ou non spécifié
% de glycérol dans la paillette	A	< 4 %
	B	> 4 % ou non spécifié

Un indice, représenté par une lettre, est attribué à chacun des trois critères : l'offre A***AA représente la qualité idéale alors que l'offre BBB est la moins bonne.

Etude présentée à l'ECAR 2024 (Zurich)

Effect of different equilibration time in freezing process on post-thaw mobility parameters in equine spermatozoa

Paola SAUTEJEAU-RIZZONI, Hamed FARNIA, Jean-Michel GALHARRET, Morgane LE-GUIRIEC, Djemil BENCHARIF

Theriogenology Unit, ONIRIS, National College of Veterinary Medicine Food Science and Engineering Nantes, France

Artificial insemination using frozen semen is widely practiced within the equine industry. Despite the superior quality typically seen in fresh equine semen, around 20% of ejaculates suffer damage during the freezing process, leading to significant declines in sperm quality. Consequently, numerous studies dedicated to refining techniques to enhance fertility rates using frozen semen. One adjustable factor is the equilibration period, which refers to the time semen spends at a certain temperature before cryopreservation. For stallion semen, a standard equilibration period of approximately 2 hours at 4°C is customary. However, research suggested that extending the equilibration period before freezing might result in improved semen quality after thawing, as seen in other species. Hence, our research aimed to assess the impact of preserving semen at 4°C for varying durations (2, 4, or 6 hours) following dilution before freezing, and its subsequent effect on the quality of the semen after thawing. To achieve this, we collected 10 ejaculates from five healthy stallions. The spermatozoa were separated from the seminal plasma via centrifugation in INRA® 96 medium. After removal of the supernatant, the pellet is mixed with INRA FREEZE® solution at a concentration of 100 million spermatozoa per milliliter. Subsequently, the semen was frozen in 0.5 ml straws after being kept at the designated temperature (Equilibration period) for either 2, 4, or 6 hours post-cooling. Post-thawed motility and progressive motility were assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). Our results indicate that an equilibration period of 6 hours led to higher percentages of motile spermatozoa after thawing (average of 36.3% $P < 0,05$), compared to equilibration periods of 4 hours (average of 33.9%) and 2 hours (average of 28.3%). Additionally, samples frozen 2 hours after cooling exhibited lower percentages of progressively motile spermatozoa (average of 15.1% $P < 0,05$) compared to samples frozen 4 hours (average 18,8%) and 6 hours (average 20,6 %) after cooling, which showed no significant difference. In summary, based on our initial findings, we suggest that semen should be maintained at 4°C for 4 to 6 hours before undergoing the freezing process.

Paola SAUTEJEAU RIZZONI

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA CONGÉLATION DU SPERME ÉQUIN : INFLUENCE DE LA DURÉE D'ÉQUILIBRATION.

Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 18 septembre 2024

L'insémination artificielle, avec du sperme congelé, est couramment utilisée en reproduction équine. Cependant, environ 20% des éjaculats ne peuvent pas être congelés. De nombreuses études visent donc à améliorer les techniques de congélation. Un facteur ajustable est la période d'équilibration, correspondant au temps pendant lequel le sperme est maintenu à 4°C avant la congélation. Pour le sperme d'étalon, une équilibration d'environ 2 heures à 4 °C est couramment utilisée. Mais, chez d'autres espèces, certaines recherches ont montré que prolonger cette période permettait d'améliorer la qualité du sperme. Ainsi, notre étude vise à évaluer l'impact de différentes durées d'équilibration (2, 4 ou 6 heures) sur la qualité du sperme après décongélation.

Pour cela, nous avons collecté 23 éjaculats provenant de cinq étalons. Après centrifugation les spermatozoïdes ont été dilués dans le milieu INRA FREEZE® à une concentration de 100 millions de spermatozoïdes par mL. Ensuite après avoir été maintenu pendant 2, 4 ou 6h à 4°C le sperme a été congelé dans des paillettes de 0,5 ml.

Les paramètres de mobilité ont été évalués à l'aide de l'analyse assistée par ordinateur. Ainsi une durée d'équilibration de 6h conduit à des pourcentages plus élevés de spermatozoïdes mobiles après décongélation (31,8 % ; $P < 0,05$) par rapport à une période de 4 heures (27,7%) et de 2 heures (23,9 %), et la mobilité progressive est moins bonne pour une période d'équilibration de 2h (12% ; $P < 0,05$) comparé aux durées d'équilibration de 6h (16%) et de 4h (14,6%).

Pour conclure, nous suggérons avec nos premiers résultats que le sperme soit maintenu à 4 °C pendant 4 à 6 heures avant la congélation.

MOTS CLÉS :

-EQUIDE - ETALON - SPERME - REPRODUCTION - EQUILIBRATION - CONGELATION -
CONSERVATION DU SPERME

DATE DE SOUTENANCE : 18 septembre 2024