

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1

Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et des Organismes



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Biologie et Physiologie de la Reproduction

Thème

**Facteurs influençant la congélation de la semence chez l'étalon**

Soutenu le 09 /09 /2020

Présenté par : Daoud Abderrezak

Devant le Jury :

<i>M. LARBI DOUKARA K.</i>	<i>MCB</i>	<i>U. Blida 1</i>	<i>Président</i>
<i>Me. BAAZIZI R.</i>	<i>MCA</i>	<i>ENSV Alger</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M. KAIDI R.</i>	<i>Professeur</i>	<i>ISV-U. Blida 1</i>	<i>Co-promoteur</i>
<i>Me. MIMOUNE N.</i>	<i>MCA</i>	<i>ENSV Alger</i>	<i>Promotrice</i>

**Résumé :**

L'objectif de ce travail était de décrire les facteurs limitant la congélation de la semence équine tout en rapportant les perspectives dans ce domaine. Généralement, la semence d'étalon peut être utilisée directement à l'état frais après la récolte pour une insémination immédiate, ou être conservée sous forme réfrigérée ou congelée pour une insémination ultérieure. La cryoconservation du sperme implique le stockage du sperme à des températures inférieures à zéro. Cela a permis de diffuser la génétique de nos meilleurs étalons et d'importer celle des champions, garantir une assurance contre la perte imprévue d'un étalon et permettre l'accès au sperme congelé si le sperme frais ou refroidi n'est pas disponible. Les agents cryoprotecteurs sont soit non pénétrants (lait, jaune d'œuf) soit pénétrants (glycérol). Elle consiste en une série d'étapes allant de la récolte et évaluation de la semence jusqu'à la décongélation. Cependant, le spermatozoïde (SPZ) est sensible à de nombreux facteurs de l'environnement tels que la température, la lumière, certains facteurs d'agression physique ou chimique. Les dégâts subis par les SPZs du fait des chocs thermiques dus au froid sont attribués à des modifications de la structure lipidique de la membrane plasmique. De ce fait, le diagnostic des lésions subies par le SPZ lors des processus de conservation doit être affiné et des méthodes de prévention adaptées aux lésions observées doivent être proposées. De plus, l'amélioration des propriétés physico-chimiques des milieux de congélation devrait permettre de mieux conserver et protéger le SPZ des lésions de congélation ou d'oxydation, le tout en évitant l'emploi de composants potentiellement toxiques pour celui-ci. Dans notre pays, l'opération de la cryoconservation étant très délicate, nécessitant la bonne volonté, le bon investissement afin d'élargir l'utilisation et d'augmenter les essais sur les différents milieux de cryoconservation afin d'obtenir ceux qui ont les meilleurs effets sur les paramètres de sperme de nos étalons.

**Mots-clés :** Cryoconservation, sperme, étalon, méthode, limites, perspectives.

**Summary:**

The objective of this work was to describe the factors limiting the freezing of equine semen while reporting perspectives in this area. Generally, stallion semen can be used directly fresh after harvest for immediate insemination, or stored in refrigerated or frozen form for subsequent insemination. Sperm cryopreservation involves storing sperm at subzero temperatures. This has helped spread the genetics of our top stallions and import that of the champions, ensure insurance against the unexpected loss of a stallion and allow access to frozen semen if fresh or chilled semen is not available. Cryoprotective agents are either non-penetrating (milk, egg yolk) or penetrating (glycerol). It consists of a series of steps from harvesting and evaluating the semen to thawing. However, the sperm (SPZ) is sensitive to many environmental factors such as temperature, light, certain physical or chemical stressors. The damage to SPZs due to thermal shock due to cold is attributed to changes in the lipid structure of the plasma membrane. Therefore, the diagnosis of lesions undergone by SPZ during preservation processes must be refined and prevention methods adapted to the lesions observed must be proposed. In addition, improving the physicochemical properties of freezing media should allow SPZ to be better preserved and protected from freezing or oxidation damage, while avoiding the use of potentially toxic components for it. In our country, the operation of cryopreservation being very delicate, requiring goodwill and good investment in order to broaden the use and increase the tests on the different cryopreservation media in order to obtain those with the best effects on the semen parameters of our stallions.

**Keywords:** Cryopreservation, sperm, standard, method, limits, prospects.

## ملخص :

كان الهدف من هذا العمل هو وصف العوامل التي تحد من تجميد السائل المنوي للخيل أثناء الإبلاغ عن وجهات النظر في هذا المجال. بشكل عام ، يمكن استخدام السائل المنوي للفحل مباشرة بعد الحصاد للتلقيح الفوري ، أو تخزينه في شكل مبرد أو مجمد للتلقيح اللاحق. يتضمن تجميد الحيوانات المنوية تخزين الحيوانات المنوية في درجات حرارة تحت الصفر. وقد ساعد هذا في نشر الجينات الوراثية لفحولنا واستيراد الأبطال ، وضمان التأمين ضد الخسارة غير المتوقعة للفحل والسماح بالوصول إلى السائل المنوي المجمد في حالة عدم توفر السائل المنوي الطازج أو المبرد. العوامل الواقية من التجمد هي إما غير قابلة للاختراق (الحليب ، صفار البيض) أو مختزقة (الجلسرين). يتكون من سلسلة من الخطوات من حصاد وتقييم السائل المنوي إلى الذوبان. ومع ذلك ، فإن الحيوانات المنوية (SPZ) حساسة للعديد من العوامل البيئية مثل درجة الحرارة والضوء وبعض الضغوط الفيزيائية أو الكيميائية. الأضرار التي لحقت SPZs بسبب الصدمة الحرارية بسبب البرودة يعزى إلى التغيرات في البنية الدهنية لغشاء البلازما. لذلك ، يجب تحسين تشخيص الآفات التي خضعت لها SPZ أثناء عمليات الحفظ ، ويجب اقتراح طرق وقائية تتكيف مع الآفات التي تمت ملاحظتها. بالإضافة إلى ذلك ، يجب أن يسمح تحسين الخصائص الفيزيائية والكيميائية لوسائط التجميد بالحفاظ على SPZ بشكل أفضل وحمايته من أضرار التجميد أو الأكسدة ، مع تجنب استخدام المكونات السامة المحتملة لها. في بلدنا ، تكون عملية الحفظ بالتبريد دقيقة للغاية ، وتتطلب حسن النية ، واستثمارًا جيدًا من أجل توسيع الاستخدام وزيادة الاختبارات على وسائط الحفظ بالتبريد المختلفة من أجل الحصول على الأفضل التأثيرات على معايير السائل المنوي لفحولنا.

**الكلمات المفتاحية:** الحفظ بالتبريد ، الحيوانات المنوية ، المعيار ، الطريقة ، الحدود ، الآفاق

## ***Remerciements***

Je tiens tout d'abord à remercier le Tout Puissant

qui a guidé mes pas dans mes études.

*A Monsieur R. KAIDI, Professeur à l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida, qui nous a fait un très grand honneur d'accepter d'être mon co-promoteur afin de conduire avec la plus grande probité notre travail.*

*A Docteur N. MIMOUNE, Maître de conférences A à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire ENSV ; promotrice, pour nous avoir soutenu et conseillé, pour sa disponibilité, ses compétences et la confiance qu'elle nous a accordé pour l'élaboration de ce travail.*

*Sincères gratitude.*

*A Monsieur L. DOUKARA, Maître de conférences B à la faculté de biologie de Blida, qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude pour toute l'aide et les précieux conseils qu'il nous a prodigué tout au long de ce travail.*

*Sincères reconnaissances.*

*A Docteur R. BAAZIZI, Maître de conférences A à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire ENSV ; pour avoir accepté d'examiner notre modeste travail. Merci*

*Dédicace :*

*A mon défunt frère IBRAHIM auquel va ma première pensée, celui qui m'a accompagné le long de mes études. J'aurais aimé vivre ce moment mémorable avec lui.*

*A ma fratrie chérie sans oublier mes parents qui, à travers leur soutien indéfectible, n'ont ménagé aucun effort pour que je réussisse.*

*A tous mes professeurs de tous les paliers d'enseignement en particulier ma promotrice Dr Mimoune Nora.*

## Liste des tableaux

<b>Chapitre II : collecte et conservation de la semence chez l'étalo</b>	
<b>Tableau 01</b> : les modèles du vagin artificiel couramment utilisés et leurs caractéristiques principales (Steven et al, 2011)	<b>13</b>
<b>Tableau 02:</b> Les principaux dilueurs	<b>18</b>

## Liste des figures

### Chapitre I : Rappels d'anatomie et de physiologie sexuelle de l'étalon

<b>Figure 01</b> :Représentation schématique des enveloppes testiculaires. (BARONE 2001)	<b>5</b>
<b>Figure 02</b> :Structures du testicule et de l'épididyme gauche (COLLIN 20030)	<b>6</b>
<b>Figure 03</b> :Coupe longitudinale de la partie libre du pénis (BARONE, 2001)	<b>8</b>
<b>Figure 04</b> :La spermatogenèse (SENGER, 2012)	<b>9</b>
<b>Figure 05</b> : structure du spermatozoïde (PONTHIER et al, 2014)	<b>10</b>
<b>Chapitre II : collecte et conservation de la semence chez l'étalon</b>	
<b>Figure 06</b> : vagin artificiel de type Missouri (Steven et al, 2011)	<b>13</b>
<b>Figure 07</b> : vagin artificiel de type Colorado (Dascanio, 2014)	<b>13</b>
<b>Figure 08</b> :vagin artificiel de type Nishikawa (Steven et al, 2011)	<b>13</b>
<b>Figure 09</b> :Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et quelque anomalie pouvant être rencontrées	<b>15</b>
<b>Figure 10</b> :identification (A), remplissage (B) et bouchage (C) des paillettes	<b>20</b>
<b>Figure 11</b> :paillettes déposées sur une grille (A) ensuite placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide (B) puis stockées dans une cuve d'azote liquide	<b>21</b>



**SOMMAIRE :**

<b>Introduction :</b> .....	<b>2</b>
<b>Chapitre I : Rappels d'anatomie et de physiologie sexuelle de l'étalon.....</b>	
<b>I. Anatomie de l'appareil reproducteur de l'étalon:.....</b>	<b>4</b>
<b>I.1. Enveloppe des testicules :</b> .....	<b>4</b>
<b>I.1.1 Les enveloppes testiculaires superficielles :</b> .....	<b>4</b>
1. Scrotum.....	<b>4</b>
2. Fascia spermatique externe .....	<b>4</b>
<b>I.1.2 Les enveloppes testiculaires profondes .....</b>	<b>4</b>
1. Crémaster : .....	<b>4</b>
2. Fascia spermatiques interne et tunique vaginale .....	<b>4</b>
<b>I.2 Testicule :</b> .....	<b>5</b>
<b>I.3 Voies spermatique :</b> .....	<b>5</b>
<b>I.3.1 L'épididyme :</b> .....	<b>5</b>
<b>I.3.2 Conduit ou canal déférent .....</b>	<b>7</b>
<b>I.3.3 Conduit ou canal éjaculateur.....</b>	<b>7</b>
<b>I.3.4 Urètre.....</b>	<b>7</b>
<b>I.4 Glandes annexes de l'urètre .....</b>	<b>7</b>
<b>I.4.1 Glande vésiculaire .....</b>	<b>7</b>
<b>I.4.2 La prostate .....</b>	<b>7</b>
<b>I.4.3 Glande bulbo-urétrale.....</b>	<b>7</b>

<b>I.5 La partie libre du pénis .....</b>	<b>7</b>
<b>II. Physiologie sexuelle de l'étalon .....</b>	<b>8</b>
<b>II.1 La saison sexuelle de l'étalon.....</b>	<b>8</b>
<b>II.2 Spermatogénèse et spermiogénèse .....</b>	<b>8</b>
<b>II.2.1 Spermatogénèse.....</b>	<b>8</b>
<b>II.2.2 La spermiogénèse .....</b>	<b>9</b>
<b>II.3 Le spermatozoïde .....</b>	<b>9</b>
<b>Chapitre II : Collecte et conservation de la semence chez l'étalon.....</b>	
<b>I. Collecte de la semence .....</b>	<b>12</b>
<b>I.1 Méthodes de récolte de la semence.....</b>	<b>12</b>
<b>I.1.1 Récolte à l'aide du vagin artificiel.....</b>	<b>12</b>
<b>A. Description.....</b>	<b>12</b>
<b>B. Choix de type du vagin artificiel.....</b>	<b>12</b>
<b>C. Préparation du vagin artificiel .....</b>	<b>13</b>
<b>D. La collecte de sperme .....</b>	<b>14</b>
<b>I.1.2 La récolte par électro-éjaculation :.....</b>	<b>14</b>
<b>I.1.3 La récolte par éjaculation chimique .....</b>	<b>14</b>
<b>II. Contrôle de la semence.....</b>	<b>14</b>
<b>II.1 Examens macroscopiques.....</b>	<b>14</b>
<b>II.1.1 Volume.....</b>	<b>14</b>
<b>II.1.2 Couleur et aspect.....</b>	<b>14</b>
<b>II.1.3 PH.....</b>	<b>15</b>
<b>II.2 Examen microscopique.....</b>	<b>15</b>

<b>II.2.1</b> Concentration .....	<b>15</b>
<b>II.2.2</b> La Motilité.....	<b>15</b>
<b>II.2.3</b> La morphologie.....	<b>15</b>
<b>III.</b> Conservation de la semence.....	<b>15</b>
<b>III.1</b> Conservation à court terme.....	<b>16</b>
<b>III.1.1</b> Semence fraîche.....	<b>16</b>
<b>III.1.2</b> Semence refroidie.....	<b>16</b>
<b>III.2</b> Conservation à long terme .....	<b>16</b>
<b>III.2.1</b> Définition.....	<b>16</b>
<b>III.2.2</b> principe .....	<b>16</b>
<b>III.3</b> La cryoconservation dans l'espèce équine.....	<b>16</b>
<b>III.3.1</b> Les agents cryoprotecteurs .....	<b>16</b>
<b>III.3.2</b> Dilution du sperme.....	<b>17</b>
<b>III.3.3</b> Les différentes étapes de la cryoconservation .....	<b>19</b>
<b>A.</b> Récolte et évaluation de la semence .....	<b>19</b>
<b>B.</b> Séparation des différentes phases du sperme par centrifugation .....	<b>19</b>
<b>C.</b> La dilution .....	<b>19</b>
<b>D.</b> L'équilibration [La réfrigération].....	<b>19</b>
<b>E.</b> Le conditionnement .....	<b>20</b>
<b>F.</b> La congélation.....	<b>20</b>
<b>G.</b> La décongélation.....	<b>21</b>
<b>H.</b> Evaluation de la qualité de la semence congelée.....	<b>21</b>

<b>Chapitre III : Les facteurs qui influencent la congélation du sperme chez l'étalon .....</b>	
III.1. Facteurs limitant la congélation du sperme chez l'étalon	<b>23</b>
III.2. Prédiction de la congélabilité	<b>24</b>
III.3. Amélioration de la technique de congélation	<b>24</b>
III.4. Amélioration des milieux de congélation	<b>25</b>
III.5. Implication des formes activées de l'oxygène	<b>27</b>
<b>Conclusion</b>	<b>29</b>
<b>Références</b>	<b>31</b>

# *Introduction*

## Introduction

---

### Introduction :

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

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

C'est pour cela que nous avons envisagé cette synthèse bibliographique afin d'étudier les facteurs qui influent sur la congélation du sperme chez l'étalon. Dans un premier temps, nous avons passé en revue les rappels d'anatomie et de physiologie sexuelle de l'étalon ; par la suite, une présentation des méthodes de collecte et de conservation de la semence chez la même espèce (plus spécifiquement la congélation) a été réalisée. Tout cela ayant pour but la mise en évidence des facteurs limitant la congélation du sperme chez l'étalon tout en rapportant des perspectives dans le même contexte.

# **Chapitre I : Rappels d'anatomie et de Physiologie Sexuelle de l'étalon**

**I. Anatomie de l'appareil reproducteur de l'étalon:**

L'appareil génital du mâle est formé par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et du dépôt de celui-ci dans les voies génitales femelles. Il se compose de trois grandes parties : les testicules, les voies spermatiques et de l'urètre (**Roger, 2009**).

**I.1. Enveloppes des testicules :**

Ces enveloppes protègent et soutiennent la glande génitale et ses premières voies d'excrétion.

**I.1.1 Les enveloppes testiculaires superficielles : (figure 01)****A. Scrotum :**

Il est constitué de :

- **La peau** : elle forme un sac superficiel commun aux deux testicules
- **Dartos** : il double intimement la face profonde du scrotum

**B. Fascia spermatique externe :**

Le fascia spermatique externe est une couche de tissu conjonctif formée de minces lamelles superposées et translucides (**Collin, 2003**).

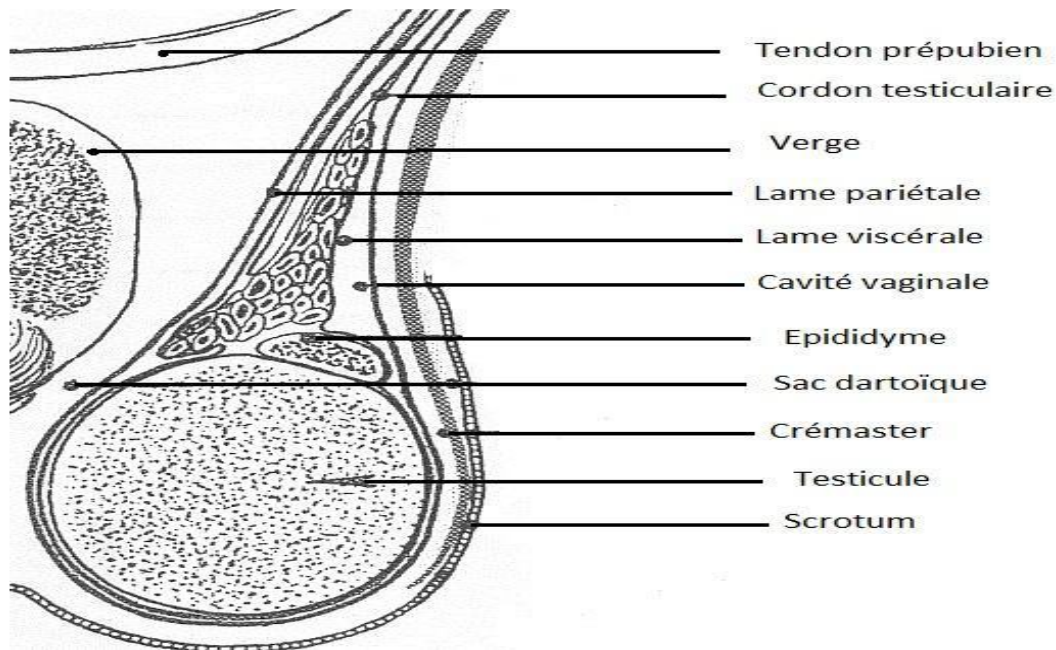
**I.1.2. Les enveloppes testiculaires profondes (figure 01)****A. Crémaster :**

Les muscles striés de la paroi sont réduits ont une dépendance de l'oblique interne de l'abdomen. (**Barone, 2001**).

**B. Fascia spermatiques interne et tunique vaginale :**

Ils forment la gaine vaginale du testicule est en réalité une séreuse (**Collin, 2003**) (**Figure 1**).





**Figure 1:** Représentation schématique des enveloppes testiculaires (Barone, 2001)

## I.2. Testicule :

Le testicule, glande génitale male, est un organe pair, Il a une fonction exocrine en assurant la spermatogénèse et une fonction endocrine en sécrètent la testostérone (Collin, 2003).

## I.3. Voies spermatique :

Les voies d'excrétion du sperme ou voies spermatiques s'étendent des testicules jusqu'au sinus urogénital (Barone, 2001).

### I.3.1 L'épididyme :

L'épididyme représente la partie des voies spermatiques. Il est situé le long du bord dorsal ou épiddymaire du testicule.

- **Conformation :** l'épididyme est fondamentalement un système de conduit dont la longueur totale peut atteindre 1000 fois la longueur du testicule. L'organe est cependant pelotonné, replié sur lui-même, entouré par une membrane ce qui lui donne l'aspect d'une production allongée ne mesurant finalement que 12 à 13 cm de longueur ; on lui reconnaît une tête, un corps et une queue.

**La tête de l'épididyme** : élargi couvre le pôle crânial du testicule avec lequel elle est en continuité directe puisqu'à ce niveau, elle reçoit les 12 à 13 canalicules efférents provenant eux-mêmes du rete testis.

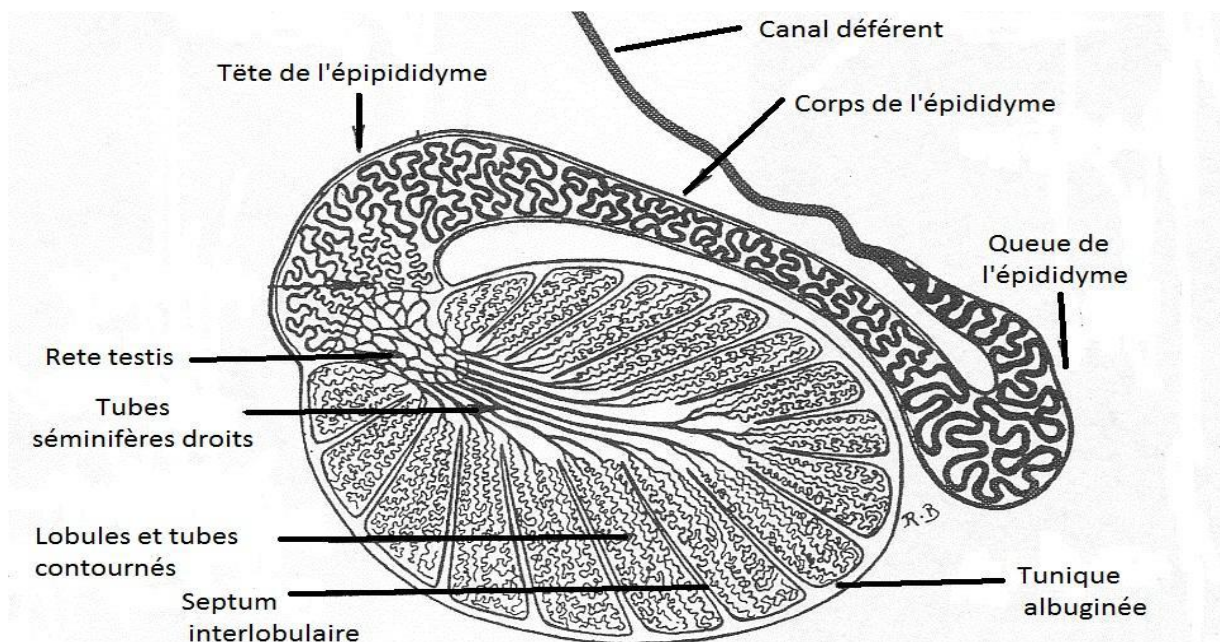
**Le corps de l'épididyme** : est aplati d'un côté à l'autre. Il est parallèle au bord dorsale et épидидymaire du testicule.

**La queue de l'épididyme** : est globuleuse et située médialement par rapport au pôle caudal du testicule avec lequel elle n'est pas en continuité de substance. Elle est de plus attachée au fascia spermatique interne. La queue de l'épididyme se prolonge vers le haut par le canal déférent.

• **Structure** : l'épididyme est constitué par un très long système canaliculaire enfermé dans une membrane albuginée et recouvert par une séreuse.

- Le système canaliculaire de l'épididyme est formé au niveau de la tête par l'aboutissement des canalicules efférents, prolongation du rete testis. Ils confluent pour former un conduit unique très flexueux, le conduit épидидymaire dont la longueur peut atteindre 85 cm chez le cheval.

- La progression des spermatozoïdes dans le système canaliculaire est assurée par les fibres musculaires lisses présentes au niveau de l'albuginé de la tête de l'épididyme, et aux battements des cils de l'épithélium des canalicules efférents et la musculature lisse du conduit épидидymaire qui est responsable d'ondes péristaltiques régulières. Durant cette traversée, les spermatozoïdes mûrissent et deviennent féconds (Collin, 2003) (Figure 2).



**Figure 2** : Structures du testicule et de l'épididyme gauche (Collin, 2003)

**I.3.2. Conduit ou canal déférent :**

Le canal déférent fait suite au conduit épидидymaire et s'étend jusqu'à la portion pelvienne de l'urètre (**Barone, 2001 ; Roger, 2009**).

**I.3.3. Conduit ou canal éjaculateur :**

Le conduit éjaculateur résulte de la réunion de la terminaison du conduit déférent avec celui de la glande vésiculaire. Il est très bref chez le cheval (**Collin, 2003**).

**I.3.4. Urètre :**

L'urètre male Est un long conduit impair ayant pour fonction l'excrétion de l'urine et aussi celle du sperme(**Barone, 2001**).

**I.4. Glandes annexes de l'urètre :**

A nombre de trois glande, la prostate et les deux glandes bulbo-urétrales déversent au moment de l'éjaculation leur sécrétion dans la cavité de la partie pelvienne de l'urètre.

**I.4.1. Glande vésiculaire :**

La glande vésiculaire ou glande séminale est une glande allongée, paire située au-dessus de la vessie et de son col ; el déverse son produit de sécrétion dans l'urètre par l'intermédiaire d'un conduit ou canal éjaculateur rudimentaire qu'elle a en commun avec le conduit ou canal déférent (**Temin, 2015**).

**I.4.2. La prostate :**

La prostate est plus un complexe glandulaire qu'une véritable glande impaire, la prostate de l'étalon est une glande large, bilobée qui coiffe la face dorsale et les faces latérales de l'urètre et les cotée du col de la vessie(**Barone, 2001**).

**I.4.3. Glande bulbo-urétrale:**

De chaque côté de la fac dorsale de la partie pelvienne de l'urètre, un peu avant du bulbe de l'urètre, existe une glande bulbo-urétrale ou glande de cowper (**Temin, 2015**)

**I.5. La partie libre du pénis :**

La zone du périnée s'étend de l'anus aux enveloppes testiculaires. Le prépuce y fait suite et se termine par un ostium préputial. Le prépuce est un repli de peau en continuité avec la peau de l'abdomen qui entoure la partie libre du pénis (**Barone, 2001**) (**Figure 3**).

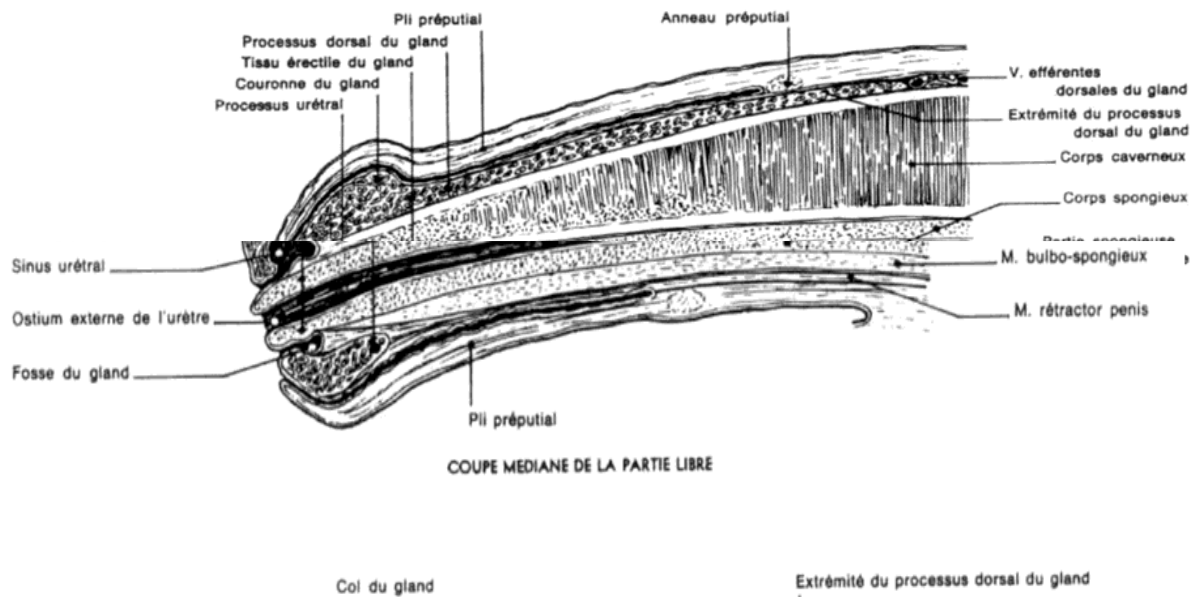


Figure 3 : Coupe longitudinale de la partie libre du pénis (Barone, 2001)

## II-Physiologie sexuelle de l'étalon

### II.1 La saison sexuelle de l'étalon:

L'étalon peut se reproduire physiologiquement toute l'année mais de par la saisonnalité de la jument, il exprime son comportement sexuel en même temps que cette dernière. Il est par contre possible de prélever des étalons toute l'année soit pour effectuer une analyse de la semence lors de problème de fertilité, soit pour congeler des paillettes de sperme (Tibaryet al, 2005)

### II.2 Spermatogénèse et spermiogénèse :

La formation du spermatozoïde se fait en deux étapes: la spermatogénèse et la spermiogénèse. Qui débutent au niveau des tubes séminifères puis se déroulent dans l'épididyme, pour finir dans les voies génitales femelles. La durée de la formation du spermatozoïde est de **49 jours** chez l'étalon. La connaissance de cette durée est importante pour la préparation de l'animal en vue d'une saison de monte. De même un incident influençant la production des spermatozoïdes peut avoir des répercussions sur l'aptitude reproductrice **49 jours** plus tard(Barone, 2001).

#### II.2.1 Spermatogénèse :

La spermatogénèse commence dans les testicules, en tout premier lieu dans les tubes séminifères. Elle se met en route après la puberté sous l'action de la LH (luteinising hormone) sur les cellules de leydig et de la FSH (follicule stimulating hormone) sur les cellules de sertoli (Heymonet al, 2005).

Chez l'étalon, la spermatogénèse permet de produire  $16 \times 10^6$  spermatozoïdes par jour par gramme de testicule (Senger, 2012) (Figure 4).

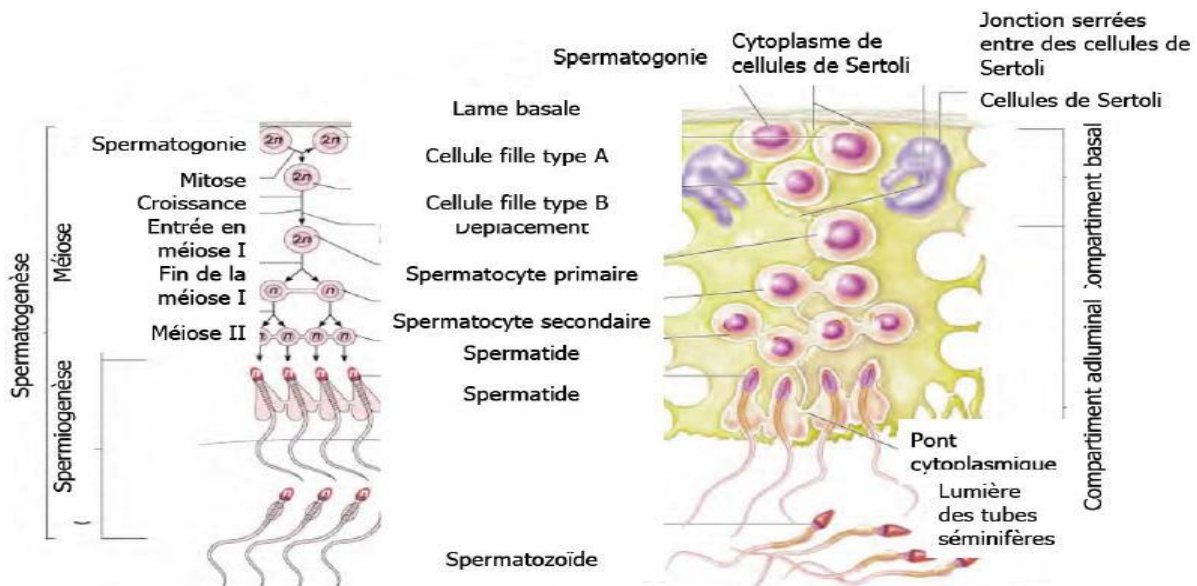


Figure 4 : La spermatogénèse (Senger, 2012)

### II.2.2 La spermiogénèse :

La spermiogénèse permet le passage de la spermatide (cellule arrondie ayant une organisation cytoplasmique banale) au spermatozoïde (petite cellule très effilée, mobile pauvre en cytoplasme et en réserves (Thibault et al, 2001).

Cette étape correspond à de nombreux remaniements cytoplasmiques et à la condensation de la chromatine (Dadoune et al, 2001).

### II.3 Le spermatozoïde :

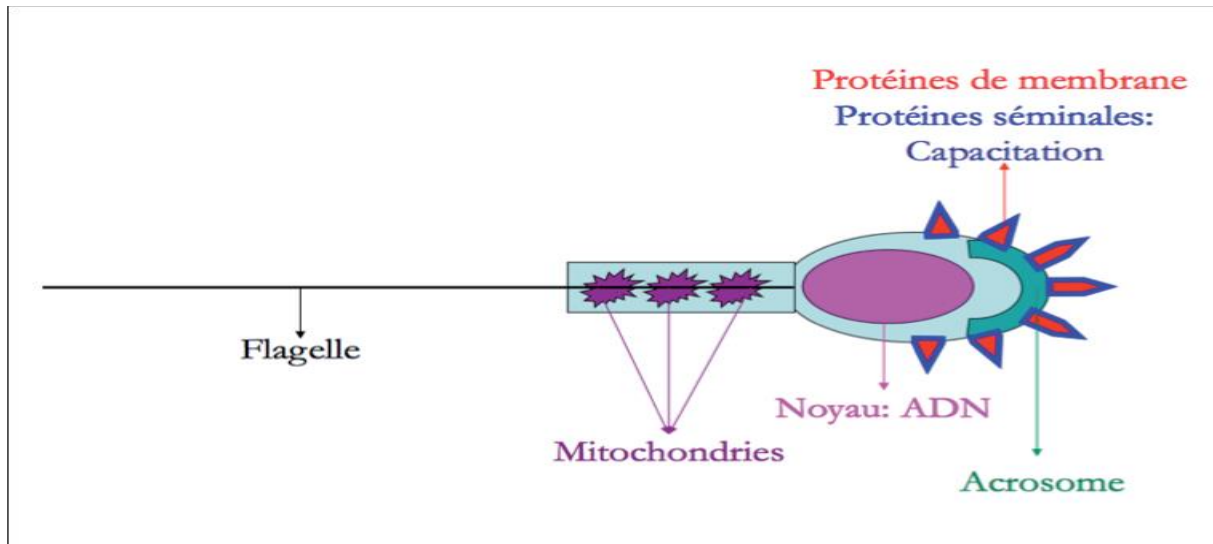
Le spermatozoïde correspond au gamète mâle, il transporte l'information génétique dans le tractus génital femelle et la délivre à l'intérieur de l'ovocyte. Afin d'accomplir cette mission, le spermatozoïde est hautement différencié, Il s'agit d'une cellule de petite taille mais longuement flagellée et mobile (Ponthier et al, 2014).

La taille et la forme du spermatozoïde varient entre espèces (Senger, 2005). Chez l'étalon, il mesure  $60 \mu\text{m}$  de long sur  $2,7 \mu\text{m}$  de large (Amann et al, 2011). Morphologiquement, le spermatozoïde des mammifères est divisé en deux parties (Figure 5).

**La tête :** comprend l'acrosome, le chapeau nucléaire, et le noyau cellulaire.

**La queue ou flagelle :** comprend la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale.

**La membrane cytoplasmique :** constitue la barrière avec le milieu extérieur, Elle n'est pas homogène mais est divisée en de nombreux micro-domaines (mosaïque) où des protéines spécifiques sont fixées (Senger, 2005 ; Lopez et al 2007 ; Boerkeet et al, 2008 ; Gadella, 2008).



**Figure 5 :** Structure du spermatozoïde (Ponthier et al, 2014).

## **Chapitre II :**

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

### I. Collecte de la semence :

#### I.1 Méthodes de récolte de la semence

##### I.1.1 Récolte à l'aide du vagin artificiel :

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

##### A. Description :

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

- **Un manchon extérieur** : c'est un cylindre en caoutchouc rigide, dont la longueur et le diamètre intérieur varient selon le type du vagin artificiel utilisé lors de la collecte chez l'étalon.

- **Un manchon intérieur** : c'est une capote amovible et gonflable, également en caoutchouc. La paroi qui le constitue est donc double et l'espace entre les deux manchons peut être rempli d'eau chaude en quantité suffisante à l'aide d'une valve extérieure de façon à ce que la température de la lumière du vagin artificiel soit comprise entre 45 et 48°C et la pression soit également équivalente à celle du vagin de la femelle.


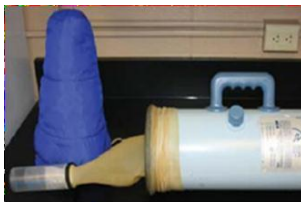

- **Un cône en silicone** : qui prolonge le vagin artificiel, à l'extrémité duquel est fixé un tube de collecte en verre ou en plastique gradué pour recueillir le sperme, et l'autre extrémité servant à introduire le pénis est lubrifiée (Noakes et al, 2009).

##### B. Choix de type du vagin artificiel :

Le tableau suivant présente les modèles du vagin artificiel les plus utilisés.



*Tableau 01 : les modèles du vagin artificiel couramment utilisés et leurs caractéristiques principales (Stevenet al, 2011).*

<b>Vagin artificiel Missouri</b>	<b>Vagin artificiel Colorado</b>	<b>Vagin artificiel Japonais (Nishikawa)</b>
<p>-C'est le plus largement utilisé surtout aux États-Unis.</p> <p>-Peu couteux, léger, facile à assembler et à nettoyer.</p> <p>- La température interne de sa lumière peut dépasser le seuil de tolérance au sperme de 45 à <b>48 °C</b>, une propriété avantageuse pour les étalons qui préfèrent les températures plus élevées.</p> <p>-La chance de contamination du sperme collecté par une fuite d'eau est très minime.</p> <p>-deux longueurs sont disponibles (<b>16 pouces et 22 pouces</b>), les étalons avec un grand pénis peu préférer le liner plus long.</p>	<p>-Le modèle Colorado original</p> <p>Est plus encombrant à utiliser que le modèle Missouri.</p> <p>-Il offre une bonne rétention de la chaleur du fait qu'il y a deux doublures en caoutchouc entre la chambre d'eau et la lumière du vagin.</p> <p>-Le risque de contamination du sperme collecté est aussi réduit.</p> <p>-La température doit être soigneusement réglée pour éviter tout dommage thermique excessif au sperme éjaculé car la veste d'eau est plus longue que le pénis.</p>	<p>Il n'est plus disponible aux États-Unis.</p> <p>-Il' est composé d'un petit boîtier en aluminium, avec un matériel léger facile à assembler et à nettoyer.</p> <p>-Le contact du sperme avec le liner en caoutchouc est très minime.</p> <p>-L'eau peut facilement couler ce qui réduit la pression du vagin et augmente le risque de contamination de l'eau dans l'éjaculat.</p> <p>-Des trous très ponctuels peuvent se développer dans la gaine en caoutchouc entraînant une fuite d'eau dans la lumière du vagin.</p>
		
<p><i>Figure 06 : vagin artificiel de type Missouri (Steven P. et al. 2011).</i></p>	<p><i>Figure 07 : vagin artificiel de type Colorado (John Dascanio.2014)</i></p>	<p><i>Figure 08: vagin artificiel de type Nishikawa (Steven P. et al. 2011).</i></p>

### C. Préparation du vagin artificiel :

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

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

### **D. La collecte de sperme :**

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

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

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

#### **I.1.2 La récolte par électro-éjaculation :**

La technique d'électro-éjaculation consiste à stimuler de façon électrique les centres nerveux responsables de l'émission et de l'éjaculation. La stimulation électrique est réalisée à travers la muqueuse rectale par le passage d'un courant de façon diffuse dans la sphère génitale. Ce sont le nerf hypogastrique responsable de l'émission et les nerfs honteux interne et pelvien, responsables de l'érection et de l'éjaculation, qui sont stimulés. L'obtention de l'érection, si elle est fréquente, n'est pas toujours observée et n'est pas indispensable (*Noakes et al, 2009*).

#### **I.1.3 La récolte par éjaculation chimique :**

Le sperme peut être prélevé sur des étalons présentant un handicap physique ou un problème éjaculatoire selon la procédure d'éjaculation chimique, connue sous le nom « **d'éjaculation ex copula induite par un médicament** ». Les étalons reproducteurs pour lesquels cette procédure est bénéfique incluent les chevaux avec des problèmes musculo- squelettiques graves, des défauts neurologiques, une paralysie de pénis et autres problèmes (*Dascanio, 2014*).

## **II. Contrôle de la semence :**

### **II.1 Examens macroscopiques :**

#### **II.1.1 Volume :**

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

#### **II.1.2 Couleur et aspect :**

Le sperme apparaît blanc, laiteux à l'état normal, mais celui-ci peut présenter des teintes jaune, brunâtre, grisâtre, considérées alors comme pathologiques (présence de pus, d'urine) (*Derivaux, 1971*). Suivant sa teneur en gel, variant de 6 à 94 pour cent, la semence apparaît plus ou moins gélatineuse (*Pickett, 1971*).

### II.1.3 PH :

Le PH physiologique du sperme est légèrement basique, avec des valeurs de l'ordre de 7,2 à 7,7. La saison, la fréquence des éjaculations et la concentration en spermatozoïdes constituent des facteurs à l'origine de variation des valeurs de ce PH du sperme normal des étalons (**Blanchard et al, 2005**).

### II.2 Examen microscopique :

#### II.2.1 Concentration :

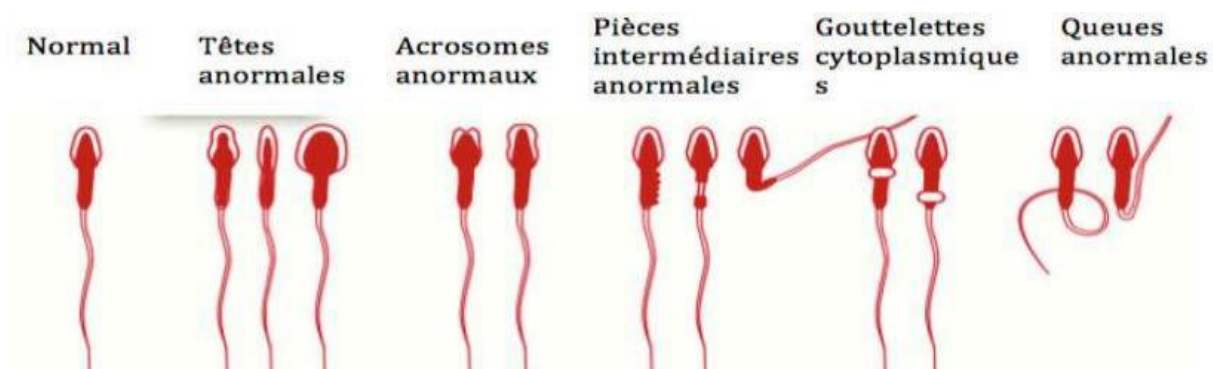
C'est un critère important pour le jugement de la qualité de la semence, dont l'objectif est de redéterminer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de semence pure. Elle peut être déterminée directement par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique, ou à l'aide d'un spectrophotomètre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

#### II.2.2 La Motilité :

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

#### II.2.3 La morphologie :

L'étude de la morphologie des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope avec un objectif à immersion au grossissement x1000. Les microscopes à lumière directe peuvent être utilisés pour examiner les frottis de semence à condition que les colorants utilisés soient appropriés (**Blanchard, 2003**) (**figure 9**).



**Figure 09:** Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et de quelques anomalies pouvant être rencontrées (**Steven et al, 2011**).

### III. Conservation de la semence :

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

### III.1 Conservation à court terme :

#### III.1.1 Semence fraîche :

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

#### III.1.2 Semence refroidie :

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

### III.2 Conservation à long terme (La Cryoconservation) :

#### III.2.1 Définition :

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

#### III.2.2. Principe :

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

#### III.2.2. La cryoconservation dans l'espèce équine :

Grâce à la cryoconservation, un intérêt plus vif est apporté à la reproduction des chevaux de course, ce qui a permis de diffuser la génétique de nos meilleurs étalons et d'importer celle des champions, garantir une assurance contre la perte imprévue d'un étalon et permettre l'accès au sperme congelé si le sperme frais ou refroidi n'est pas disponible avec la possibilité d'expédier le sperme dans le monde entier (Dascanio, 2014).

#### III.3.1. Les agents cryoprotecteurs :

##### A. Les cryoprotecteurs non pénétrants :

Ils agissent uniquement dans le milieu extracellulaire.

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

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

### **B. Les cryoprotecteurs pénétrants**

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

### **III.3.2 Dilution du sperme :**

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

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

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

Les principaux dilueurs à l'heure actuelle sont (**tableau 2**) :

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

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

**Tableau 02 : Les principaux dilueurs(Dascanio, 2014)**

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

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

†TAMU, Texas A&M University.

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

\*No endorsement of products is intended.

### III.3.3 Les différentes étapes de la cryoconservation :

#### A. Récolte et évaluation de la semence :

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

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

#### B. Séparation des différentes phases du sperme par centrifugation :

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

La semence est diluée avec un dilueur primaire à 37°C, Les tubes sont centrifugés, idéalement à 600xg pendant 10 minutes (**Barrier-Battut 2013 ; Neto et al. 2013**). Ensuite, le surnageant est enlevé, et les spermatozoïdes du culot sont alors remis en suspension dans une quantité appropriée de dilueur(**Barrier-Battut 2013**). L'ajout des milieux coussin à base d'une solution d'iodixanol, au fond des tubes a permis d'augmenter jusqu'à plus de 90 % le pourcentage de récupération des spermatozoïdes après centrifugation (**Waite et al, 2008 ; Hoogewijs et al, 2010**).

#### C.La dilution :

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

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

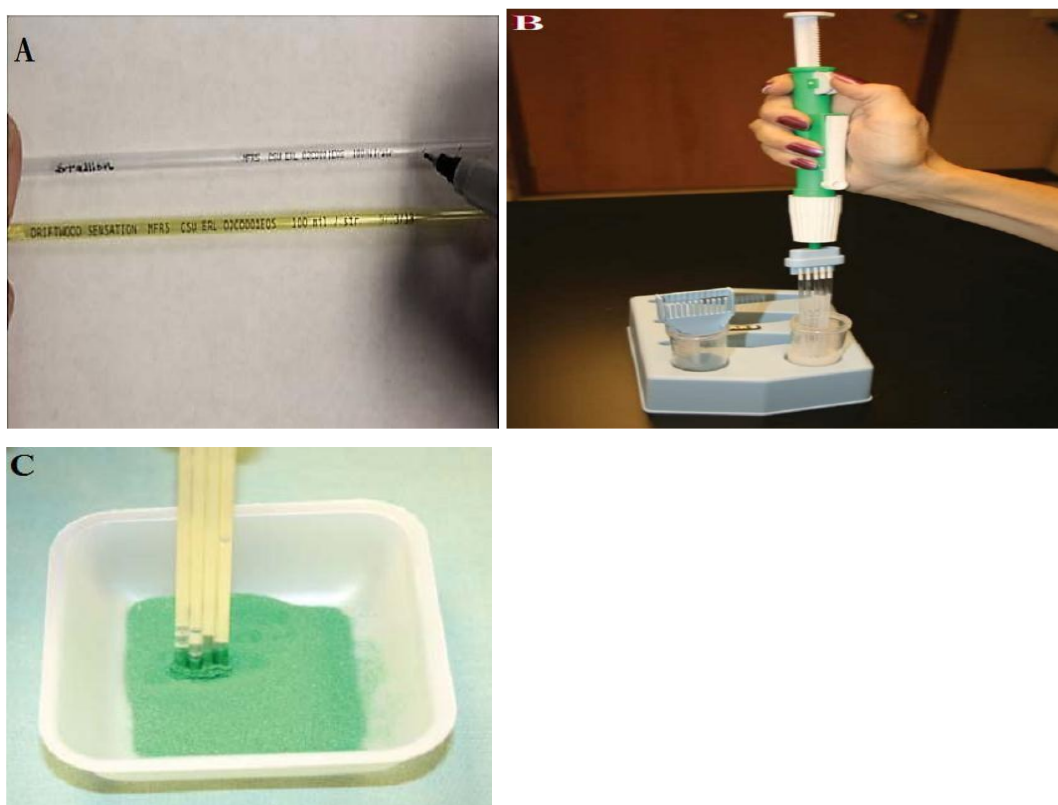
#### D.L'équilibration (la réfrigération) :

Le premier palier de la descente en température consiste à équilibrer la température du sperme à 4°C pendant 75 minutes (**Ponthier et al. 2014**). Cette étape d'équilibration fait suite à la centrifugation et à la dilution et correspond à la réfrigération préalable de la semence avant la congélation proprement dite. Elle permet au glycérol de pénétrer dans la cellule et serait à l'origine d'une meilleure survie des spermatozoïdes après décongélation en leur évitant un refroidissement trop brutal (**Marc, 2015**).

### E. Le conditionnement :

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

Une fois remplies, les paillettes qui sont identifiées (nom du mâle prélevé, de son numéro d'identification, de la date de récolte, de dilueur et de sa concentration et de l'identification du centre d'insémination) sont bouchées au moyen de poudre d'alcool polyvinylique et une légère agitation permettra de ménager une place pour l'obturation et la bulle d'air nécessaire pour permettre la dilution du sperme lors de la congélation(Loomis 2006 ; Hanzen 2014) (figure 10).



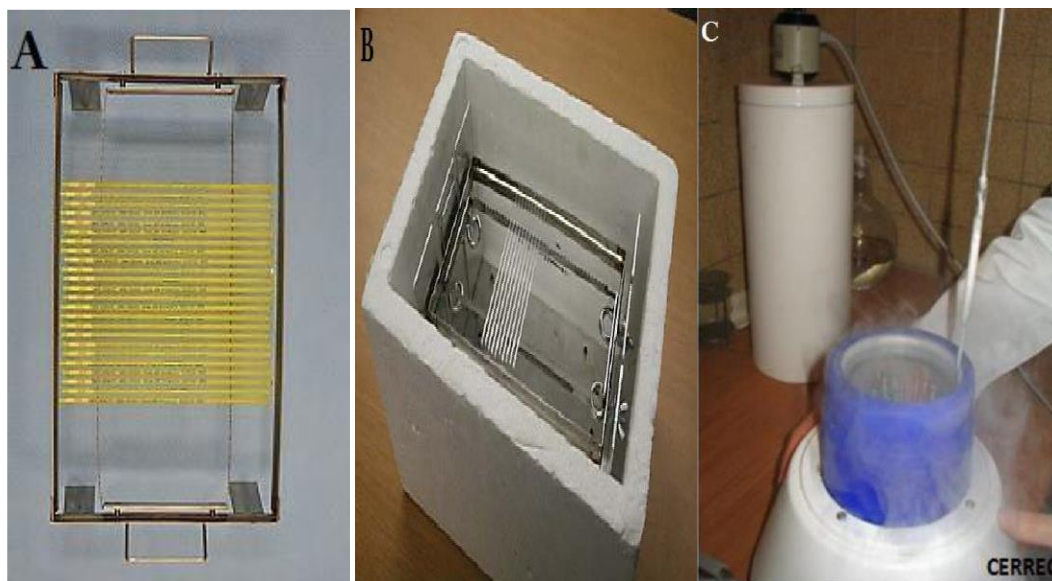
**Figure 10:** identification (A), remplissage (B) et bouchage (C) des paillettes (Dascanio, 2014).

### F. La congélation :

Après l'étape d'équilibration, les paillettes peuvent être refroidies dans un congélateur programmable qui permet d'atteindre  $-140^{\circ}\text{C}$ , avec une pente variante, selon le milieu de congélation utilisé, entre  $-20^{\circ}\text{C}$  et  $-60^{\circ}\text{C}$  par minute. Et elles sont ensuite immergées dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  (Ponthier et al, 2014). Comme elles peuvent être congelées dans une boîte de polystyrène contenant de l'azote liquide : Les paillettes chargées sont placées dans une grille pré-refroidie à  $5^{\circ}\text{C}$  de telle sorte qu'elles se trouvent de 3 à 6 cm au-dessus de l'azote liquide pendant 10 minutes d'équilibration, ou jusqu'à ce que la température atteigne  $-120^{\circ}\text{C}$ , elles sont ensuite plongées dans l'azote liquide,



placées dans des gobelets qui sont déjà fixés sur des cannes et finalement stockées dans un réservoir d'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  pendant des mois, voire des années(*Dascanio, 2014*) (figure 11).



**Figure 11** : paillettes déposées sur une grille (A) ensuite placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide (B) puis stockées dans une cuve d'azote liquide(C) (*Dascanio, 2014*)

### G. La décongélation :

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

### H. Evaluation de la qualité de la semence congelée :

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

*Chapitre III :*

*La Congélation du Sperme Chez l'étalon :*

*Limites & Perspective*

### III.1. Facteurs limitant la congélation du sperme chez l'étalon :

Pour des raisons inconnues, 20 % des éjaculats de bonne qualité ne sont pas congelables malgré l'amélioration des techniques (Vidament, 2005). Actuellement, les recherches s'orientent sur quelques nouvelles voies pour améliorer les protocoles de congélation et la qualité du sperme congelé.

Les spermatozoïdes sont sensibles à des nombreux facteurs de l'environnement tels que **la température, la lumière**, certains facteurs d'**agression physique ou chimique**. Les dégâts subis par les spermatozoïdes du fait de **chocs thermiques dus au froid** sont attribués à des modifications de la structure lipidique de la membrane plasmique.

Le refroidissement de sperme dilué pour le transport est généralement possible si **la qualité initiale de l'éjaculat** est bonne, si **une technique de stockage adaptée est employée** et si l'insémination n'a pas lieu après plus de 24 heures de conservation. Pour certains étalons, de très bons taux de gestations sont obtenus avec du sperme conservé pendant 48 à 72 heures avant l'insémination.

Il est assez courant que la conservation du sperme d'étalon par congélation conduise à de plus mauvais résultats que la conservation par réfrigération et à de beaucoup plus mauvais résultats que la congélation du sperme de taureaux laitiers. **L'application directe des méthodes de congélation du sperme bovin a conduit à des résultats décourageants avec le sperme d'étalon**, ce qui est probablement dû à la différence de composition des spermatozoïdes entre ces deux espèces. Les travaux de recherche ont montré que le spermatozoïde de taureau laitier a une résistance exceptionnelle face aux effets de la cryoconservation. Ce phénomène est probablement à attribuer à des années de sélection menteuse des taureaux sur le critère de la capacité de leur sperme à être conservé par congélation. Ce mode de conduite de la sélection des reproducteurs n'a pas été suivi dans le monde de l'élevage du cheval.

La conservation du sperme commence réellement avec **le prélèvement de semence**. Afin d'assurer une qualité optimale de l'éjaculat, il convient de **réaliser son prélèvement selon les principes et les recommandations**. Indépendamment de **la technique de conservation du sperme qui sera employée**, il est important de **mélanger le sperme dans un dilueur approprié**, dans les **quelques minutes qui suivent le prélèvement**. Pour que la congélation du sperme puisse être un succès, il ne faut pas l'appliquer aux échantillons de **sperme de mauvaise qualité**. Si la qualité de la semence fraîche d'un étalon est faible ou si un étalon a une faible fertilité lors de mise à la reproduction avec du sperme frais, il est fortement probable que l'utilisation de technique de conservation du sperme conduira à des très mauvais résultats (Terry et al, 2005).

### III.2. Prédiction de la congélabilité :

Actuellement, la qualité du sperme congelé d'un étalon ne peut pas être prédite de manière fiable. Les essais de congélation sont coûteux et requièrent l'immobilisation de l'étalon en centre de reproduction, l'empêchant de poursuivre sa carrière sportive. Des marqueurs de la congélabilité ont été décrits dans différentes espèces, mais leur utilisation reste encore anecdotique en raison des difficultés techniques et du manque de recul à propos de l'utilité de ces marqueurs en pratique courante. En médecine humaine, plusieurs marqueurs de la congélabilité ont été étudiés (**ManiaPramanik et al, 2004 ; Eggert-Kruse et al, 2008**). Le HOST (hypo-osmotic swelling test), un test évaluant l'intégrité de la membrane plasmique basé sur l'entrée d'eau dans le spermatozoïde en milieu hypo-osmotique, ne semble pas corrélé aux caractéristiques observées après décongélation (**Chan et al, 1990 ; Volpes et al, 1992**).

Chez le bovin, la VAP et la VSL observées lors de l'analyse CASA du sperme frais permettent de prédire la mobilité après décongélation (**Defoin et al, 2008**). Chez le chien, les indices morphométriques observables en microscopie ont été décrits pour prédire le résultat de congélation (**NunezMartinez et al, 2007**). Chez le cheval, peu de facteurs prédisant la congélabilité du sperme ont été décrits. Une ancienne étude estime que, dans 80 % des cas, la qualité après décongélation peut être prédite par quelques facteurs simples : analyse du sperme frais, concentrations en phosphatase alcaline et en protéines totales (**Bittmar et Kosiniak, 1992**). Cependant, des études postérieures n'ont pas pu prédire la congélabilité du sperme d'étalon en se basant sur les uniques données de base du spermogramme : volume, concentration, morphologie et mobilité (**Torres-Boggino et al, 1995**). Actuellement, dans les centres zootechniques, malgré la sélection des éjaculats congelables sur le critère de la mobilité progressive du sperme frais, 20 % des éjaculats sont de qualité insuffisante après décongélation (**Vidament et al, 1997 ; Vidament, 2005**). Récemment, des études de cytométrie de flux sur le sperme équin ont montré que si des marqueurs apoptotiques étaient observés dans les mitochondries des spermatozoïdes du sperme frais, la qualité de sperme après décongélation était mauvaise (**Ortega Ferrusola et al, 2009**), permettant de prédire la congélabilité. Les études par coloration spécifique des organites du spermatozoïde sont en plein essor, mais actuellement, peu de centres zootechniques disposent de ce matériel et ces analyses manquent aussi d'harmonisation entre équipes. En conclusion, en andrologie humaine et vétérinaire, la prédiction de la congélabilité manque de méthodes simples et utilisables en pratique.

### III.3. Amélioration de la technique de congélation

Dans un premier temps, les courbes et paliers de descente en température utilisés pour l'étalon ont été empiriquement déduits et adaptés de ceux utilisés chez le bovin. Ces étapes de descente en

## Chapitre III : La congélation du sperme chez l'étalon : limites & perspective

---

température pendant le conditionnement de sperme sont progressivement remises en cause afin de les adapter à chaque espèce. L'étape de refroidissement et d'équilibration à 4°C a été étudiée chez le cheval. Par exemple, la centrifugation à 4°C semble diminuer la qualité du sperme après décongélation si on la compare à celle effectuée 25°C (Vidament et al, 2000 ; Knop et al, 2005). Il a aussi été montré qu'après une centrifugation à 25°C, le refroidissement à 4°C pendant 12 heures avant la congélation pouvait être bénéfique pour la mobilité en décongélation (Crockett et al, 2001). L'allongement de la phase d'équilibration de la température à 4°C semble donc permettre une meilleure survie des spermatozoïdes à la congélation. Les courbes de congélation sont aussi discutées : diverses modifications des vitesses de descente en température et des paliers de descente ont été testées. En se basant sur des propriétés physicochimiques du spermatozoïde comme la taille, le volume et la composition des membranes cellulaires, les courbes théoriques de descentes en température obtenues chez l'humain et le bélier sont supérieures à -100°C/min (Curry et al, 1994), ce qui entrainerait en pratique une destruction de la plupart des spermatozoïdes. De nouveaux modèles mathématiques prennent en compte l'osmolarité, la concentration en agent cryoprotecteur et les températures de formation de glace intracellulaire (Devireddy et al, 2002 ; Thirumala et al, 2003 ; Woelders et Chaveiro, 2004). La vitesse optimale sans agent cryoprotecteur semble être de -30°C/min, alors qu'en présence de cryoprotecteur, elle est de -60°C/min chez le cheval et le chien (Devireddy et al, 2002 ; Thirumala et al, 2003 ; Woelders et Chaveiro, 2004). Ces modèles mathématiques incluant les données physico-chimiques du spermatozoïde et de son milieu sont actuellement mis en place pour tenter de définir des courbes de descente en température spécifiques à chaque type de sperme (Devireddy et al, 2002 ; Thirumala et al, 2003 ; Woelders et Chaveiro, 2004). La vitrification (Holt, 1997) est une technique de congélation avec des descentes en température plus rapides (Pegg, 2005). Elle consiste en une brusque mise en contact du sperme avec l'azote liquide, mais elle nécessite généralement de hautes concentrations en agent cryoprotecteur (Holt, 1997 ; Hossain et Osuamkpe, 2007). Elle évite la formation de cristaux intracellulaires qui peuvent être dangereux pour la cellule et ses organites en court-circuitant la phase de réorganisation en cristaux. Des essais ont permis de mener à bien la congélation de spermatozoïdes de mammifères en l'absence d'agent cryoprotecteurs (Isachenko et al, 2003 ; 2004). Chez le cheval, aucune étude n'a encore été réalisée pour déterminer si cette technique pouvait permettre de préserver la fertilité.

### III.4. Amélioration des milieux de congélation

Le choix du milieu de congélation chez l'étalon est critique pour la production de paillettes équinnes. Plusieurs facteurs interviennent : la concentration et la nature de l'agent cryoprotecteur ainsi que les caractéristiques physico-chimiques du milieu. Actuellement, les milieux de dilution du sperme équin sont classiquement préparés avec du lait ou des protéines micellaires de lait et différentes proportions

### Chapitre III : La congélation du sperme chez l'étalon : limites & perspective

---

de jaune d'œuf et de glycérol (**Vidament et al, 2001**). Depuis la découverte de ses propriétés cryoprotectrices, le glycérol est utilisé pour congeler le sperme de nombreuses espèces. La concentration optimale en glycérol dans le milieu de congélation est variable selon l'espèce. Chez le cheval, la concentration maximale est de 3,5 % (**Vidament et al, 2005**). La toxicité du glycérol réside dans son faible passage à travers les membranes cellulaires, entraînant un choc osmotique pour le spermatozoïde (**Ball et Vo, 2001 ; Squires et al, 2004**). Le spermatozoïde du cheval et du porc supportant très mal les variations osmotiques, des agents cryoprotecteurs traversant plus facilement les membranes ont été étudiés (**Squires et al, 2004**). Le DMSO a été étudié chez le cheval, mais le sperme était de moindre qualité après décongélation (**Ball et Vo, 2001**). Les propriétés cryoprotectrices de certains lipides, les phosphatidylcholines (**Ricker et al, 2006**), d'agents protéiques (**Prathalingam et al, 2006**) et de certaines amines (**Squires et al, 2004 ; Alvarenga et al, 2005**) et de la glutamine (**Khelifaoui et al, 2005**) ont donné de bons résultats de qualité après décongélation. Les amines ont déjà partiellement remplacé le glycérol dans certains milieux de congélation commerciaux équinés comme le BotuCryo® (**Alvarenga et al, 2005**). Actuellement, en médecine vétérinaire, les milieux de congélation utilisent des composés d'origine animale comme le lait ou le jaune d'œuf pour des raisons économiques et de disponibilité. L'étude de leur formulation vise à adapter leur contenu en protéines, glucides et lipides afin d'assurer aux spermatozoïdes une base nutritionnelle et de protéger les membranes des effets de la congélation. Par exemple, de manière anecdotique, l'effet de l'addition de jaune d'œuf de canard a amélioré la qualité après décongélation par rapport au jaune d'œuf de poule (**Clulow et al, 2007**). D'autres études se sont penchées sur les facteurs nécessaires à la congélation : la membrane cytoplasmique pouvant intégrer des molécules hydrophobes, la composition lipidique du milieu de congélation est déterminante (**Gadella, 2007**). Cependant, la vitesse et la proportion des échanges lipidiques entre le milieu et la membrane cytoplasmique du spermatozoïde doivent être pris en compte (**Gadella, 2007**). Par exemple, l'ajout de cholestérol au premier milieu de congélation a amélioré la qualité du sperme après décongélation (**Moore et al, 2005**).

D'autres études ont permis de séparer et de déterminer la concentration idéale en LDL (lowdensitylipoproteins) issus du plasma de jaune d'œuf chez le bovin (**Amirat et al, 2004**), le chien (**Varela et al, 2009**). Chez le cheval, des essais utilisant le plasma de jaune d'œuf qui contient des LDL ont montré de bons résultats en termes de fertilité alors que la mobilité après décongélation n'était pas augmentée (**Pillet et al, 2008 ; 2011**), illustrant bien les limites de l'examen de la mobilité comme critère de fertilité. L'étude des échanges lipidiques, de la fixation des protéines et des effets du froid sur la membrane doit encore être approfondie chez le cheval. Cependant, les milieux sans protéines animales doivent rester économiquement viables pour avoir un réel intérêt en reproduction équine.

### III.5. Implication des formes activées de l'oxygène

Depuis quelques années, les andrologies animales et humaines se penchent sur les origines et effets des FAO. Chez l'humain comme chez le cheval, ces molécules hautement réactives ont des effets délétères sur la mobilité progressive, l'intégrité des membranes et l'ADN du spermatozoïde (**Baumber et al, 2000 ; 2003 ; Said et al, 2005**). La production de ces molécules semble augmenter lors du passage à 4°C avant la congélation (**Wang et al, 1997**). Actuellement, la recherche s'oriente sur deux axes : (i) trouver l'origine des FAO et (ii) inhiber leurs effets. L'origine des FAO dans le sperme est multiple. Récemment, une voie alternative, liée aux débris cellulaires présents dans le sperme, a été mise en évidence chez l'étalon : la myéloperoxydase (MPO), une enzyme produite par les neutrophiles, est présente dans le sperme, et elle est associée aux débris cellulaires présents dans le sperme en l'absence de neutrophiles. Sa concentration dans le sperme congelé influence négativement les paramètres de qualité après la décongélation (**Ponthier et al, 2008**). L'autre approche consiste à inhiber la production ou les effets des FAO, mais les résultats ne sont pas constants selon les agents utilisés et les espèces étudiées. L'incorporation au sperme de molécules antioxydantes à large spectre comme la vitamine E ou la vitamine C ont donné des résultats contradictoires. Chez le cheval, l'ajout de vitamine E dans le sperme congelé n'a pas amélioré la mobilité après décongélation, mais l'a augmenté chez le porc (**Breining et al, 2005**). Pour résumer, ces données montrent que la compréhension de l'origine des FAO dans le sperme reste incomplète et que l'apparition de traitements efficaces et ciblés contre le stress oxydant nécessite des nouvelles recherches.

## **Conclusion & perspectives**



### Conclusion & perspectives :

Aux États-Unis, l'utilisation du sperme réfrigéré ou congelé est en augmentation croissante. En dehors des États-Unis, l'insémination artificielle équine est employée à grande échelle : en Chine, ces dernières années, plus de 100 000 juments ont été inséminées avec du sperme transporté soit réfrigéré, soit congelé. En Europe, le sperme conservé est utilisé principalement dans les races de chevaux de selle, chez les trotteurs et chez les chevaux lourds.

Les incitations économiques pour améliorer les techniques de conservation du sperme des étalons sont en train de devenir de plus en plus évidents, au point que la majorité des registres de races autorise maintenant son utilisation. Auparavant, les soutiens financiers des recherches dans ce domaine étant limités, l'amélioration des techniques de réfrigération comme de congélation de sperme a progressé très lentement. Les progrès récemment enregistrés dans ce secteur ont conduit à une amélioration de la durée de conservation du sperme réfrigéré et à une congélation efficace du sperme pour une plus grande proportion d'étalons.

Le diagnostic des lésions subies par le spermatozoïde lors des processus de conservation doit être affiné et des méthodes de prévention adaptées aux lésions observées doivent être proposées. De plus, l'amélioration des propriétés physico-chimiques des milieux de congélation devrait permettre de mieux conserver et protéger le spermatozoïde des lésions de congélation ou d'oxydation, le tout en évitant l'emploi de composants potentiellement toxiques pour le spermatozoïde.

Dans notre pays, l'opération de la cryoconservation étant très délicate, nécessitant la bonne volonté, le bon investissement afin d'élargir l'utilisation et d'augmenter les essais sur les différents milieux de cryoconservation afin d'obtenir ceux qui ont les meilleurs effets sur les paramètres de sperme d'étalon.

## *Références*

## Références

---

### References:

- ◆ **AMANN R, GRAHAM K, 2011.**Spermatozoal function.2<sup>nd</sup> edition.
- ◆ **ALVARENGA M.A., PAPA F.O., LANDIM-ALVARENGA F.C., MEDEIROS A.S.** Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim.Reprod. Sci.*, 2005, **89**, 105-113.
- ◆ **AMIRAT L., TAINTURIER D., JEANNEAU L., THORIN C., GERARD O., COURTENS J.L., ANTON M.** Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 2004, **61**, 895-907.
- ◆ **BARONNE R, 2001.**Appareil génital male .In : Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie 2 .Edition VIGOT 2001. Page83-250.
- ◆ **BARONE R, (2001),** Anatomie comparée des Mammifères Domestiques. Tome 4. Splanchnologie II. Appareil uro-génital, Foetus et annexes, Péritoine et topographie abdominale.3ème Edition. EdsVigot, Paris., 896p
- ◆ **BARRIER-BATTUT I. 2013.** Collecte et traitement de la semence d'étalon. Equ'idée. Article 2-7
- ◆ **BLANCHARD TL, ET AL. 2003.** Manual of equine reproduction. 2ndedition.Mosby
- ◆ **BLANCHARD TL , ET AL. 2005.** Manuel de de reproduction équine .2ieme édition.
- ◆ **BOERKEA , TSAI P.S, GARCLAGIL N, BREWIS I.A, GADELLA B.M, 2008.** Capacitation –dépendentréorganisation of microdomains in the apical sperm head plasma membrane . Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology*,70, pages :1188-1196.
- ◆ **BRITO LEONARDO F.C. (2007)** Evaluation of Stallion Sperm Morphology.
- ◆ **BREININGER E., BEORLEGUI N.B., O'FLAHERTY C.M., BECONI M.T.** Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameter in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 2005, **63**, 2126-2135.
- ◆ **BITTMAR A., KOSINIAK K.** The role of selected biochemical components of equine seminalplasma in determining suitability for deep-freezing. *Arch. Vet. Pol.*,1992, **32**, 17-29.
- ◆ **BALL B.A., VO A.T., BAUMBER J.** Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 508- 515.
- ◆ **BAUMBER J., BALL B.A., GRAVANCE C.G., MEDINA V., DAVIES-MOREL M.C.** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.*, 2000, **21**, 895-902.

## Références

---

- ◆ **BAUMBER J., BALL B.A., LINFOR J.J., MEYERS S.A.** Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J. Androl.*, 2003, **24**, 621-628.
- ◆ **COLLIN B.2003.**Anatomie du cheval.
- ◆ **CHAN S.Y., CRAFT I.L., CHAN Y.M., LEONG M.K., LEUNG C.K.** The hypoosmotic swelling test and cryosurvival of human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1990, **5**, 715-718.
- ◆ **CROCKETT E.C., GRAHAM J.K., BRUEMMER J.E., SQUIRES E.L.** Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology*, 2001, **55**, 793-803.
- ◆ **CURRY M.R., MILLAR J.D., WATSON P.F.** Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. *Biol. Reprod.*, 1994, **51**, 1014-1021.
- ◆ **CLULOW J.R., MAXWELL W.M., EVANS G., MORRIS L.H.** A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Aust. Vet. J.*, 2007, **85**, 232-235.
- ◆ **DADOUNEJ-P,DEMOULIN A.2001.** Structure et fonction du testicule. In : La reproduction chez les mammifères et homme. INRA Edition.
- ◆ **DAELS P.F. 2003.** New technics of artificial insemination in the mare. In: Belgian Equine Practitioners Society (Ed.), Proceedings de la 20e journée d'étude de la Belgian Equine Practitioners Society, Bruxelles.
- ◆ **DAY JOHN G. ET STACEY GLYN N. 2007.** Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Second Edition. HumanaPress Inc. 365p.
- ◆ **DERIVAUXJ .1971** .Reproduction chez les animaux domestiques .In – (le male . Insémination artificielle) . Edition DEROUAUX , Liège II .
- ◆ **DEFOIN L., GRANADOS A., DONNAY I.** Analysing motility parameters on fresh bull semen could help to predict resistance to freezing: a preliminary study. *Reprod. Domest. Anim.*, 2008, **43**, 606-611.
- ◆ **DEVIREDDY R.V., SWANLUND D.J., OLIN T., VINCENTE W., TROEDSSON M.H., BISCHOF J.C., ROBERTS K.P.** Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol. Reprod.*, 2002, **66**, 222-231.
- ◆ **E G G E RT-KRUSE W. , ZIMMERMANN K., GEISSLER W., EHRMANN A., BOIT R., STROWITZKI T.** Clinical relevance of polymorphonuclear (PMN-) elastase determination in semen and serum during infertility investigation. *Int. J.Androl.*, 2008, **32**, 317-329.

## Références

---

- ◆ **GADELLA B.M,2008.** Sperm membrane physiology and relevance for fertilization 107. Pages, 229-236.
- ◆ **GADELLA B.M.** Gamete membrane technology: What is required for mammalian fertilization and how is this challenged during gamete processing? *Reprod. Domest.Anim.*,2007, **42** :Suppl 2, 62-63.
- ◆ **HEYMONY ,VIGNON X ,2005.** Reproduction des animaux d'élevage .Edition Educagri.
- ◆ **HOLT W.V.** Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod. Fertil.Dev.*,1997, **9**, 309-319.
- ◆ **HOSSAIN A.M., OSUAMKPE C.O.** Sole use of sucrose in human sperm cryopreservation. *Arch.Androl.*,2007, **53**, 99-103.
- ◆ **ISACHENKO E., ISACHENKO V., KATKOV, II, DESSOLE S., NAWROTH F.** Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod. Biomed.Online*, 2003, **6**, 191-200.
- ◆ **ISACHENKO E., ISACHENKO V., KATKOV, II, RAHIMI G., SCHONDORF T., MALLMANN P., DESSOLE S., NAWROTH F.** DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum. Reprod.*,2004, **19**, 932-939.
- ◆ **JOHN DASCANIO AND PATRICK MCCUE. 2014.** Equine Reproductive Procedures, First Edition. Edited by John Wiley & Sons, Inc. Published 2014 by John Wiley & Sons, Inc. 560p (p333).
- ◆ **KATILA T.1997.** Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*. 48(7) 1217-27.
- ◆ **KNOP K., HOFFMANN N., RATH D., SIEME H.** Evaluation of slow cooling after centrifugation and glycerol addition at 22 degrees C versus direct freezing of semen in stallions with good and poor sperm longevity. *Anim. Reprod.Sci.*, 2005, **89**, 299-302.
- ◆ **KHLIFAOU M., BATTUT I., BRUYAS J.F., CHATAGNON G., TRIMECHE A., TAINTURIER D.** Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology*, 2005, **63**, 138- 149.
- ◆ **LOOMIS P.R. 2006.** Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 22, 663-676.
- ◆ **LOPEZ-FERNANDEZ C, 2007.** Dynamic s of sperm DNA fragmentation in domestic animals: 2. Thestallion. *Theriogenology*, 68.Pages:1240-1250.
- ◆ **MARC STEPHANIE. 2015.** Thèse : Actualités En Cryoconservation Des Semences Des Principales Espèces D'intérêt Vétérinaire, Université CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie).

## Références

---

- ◆ **MOORE A.I., SQUIRES E.L., GRAHAM J.K. 2005.** Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 63, 2372-2381.
- ◆ **MANIA-PRAMANIK J., POTDAR S.S., VADIGOPPULA A., SAWANT S.** Elastase: a predictive marker of inflammation and/or infection. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2004, **18**, 153-158.
- ◆ **MOORE A.I., SQUIRES E.L., GRAHAM J.K.** Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 2005a, **51**, 241-249.
- ◆ **NOAKES D.E., PARKINSON TIMOTHY J. ET ENGLAND G.C. 2009.** Veterinary reproduction and obstetrics. Ninth edition. Saunders Elsevier. 961p..
- ◆ **NUNEZ-MARTINEZ I., MORAN J.M., PENA F.J.** Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *Int. J. Androl.*, 2007, **30**, 182-189.
- ◆ **ORTEGA FERRUSOLA C., GONZALEZ FERNANDEZ L., MORRELL J.M., SALAZAR SANDOVAL C., MACIAS GARCIA B., RODRIGUEZMARTINEZ H., TAPIA J.A., PENA F.J.** Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*, 2009a, **138**, 55-63.
- ◆ **PICKETT B.W.** Effectifs of ejaculation frequency on equine semen. *J. Anim. Sci.* 33, 264.
- ◆ **PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F., PARRILLA-HERNANDEZ S., HANZEN C. ET DELEUZE S. 2014.** Congélation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives.
- ◆ **PEGG D.E.** The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Hum. Fertil. (Camb.)*, 2005, **8**, 231-239.
- ◆ **PRATHALINGAM N.S., HOLT W.V., REVELL S.G., MIRCZUK S., FLECK R.A., WATSON P.F.** Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*, 2006, **66**, 1894- 1900.
- ◆ **PILLET E., BATELLIER F., DUCHAMP G., FURSTOSS V., LE VERN Y., KERBOEUF D., DESHERCES S., SCHMITT E., MAGISTRINI M.** High fertility rates with stallion sperm cryopreserved in INRA96 based extender are not predicted by in vitro parameters. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008, **107**, 339-340.
- ◆ **PILLET E., DUCHAMP G., BATELLIER F., BEAUMAL V., ANTON M., DESHERCES S., SCHMITT E., MAGISTRINI M.** Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, 2011, **75**, 105-114.
- ◆ **PONTHIER J., FRANCK T., MOTTART E., SERTEYN D., DELEUZE S.** Equine frozen semen parameters in relation with total myeloperoxidase concentration. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008, **107**, 40-41.

## Références

---

- ◆ **ROGER T, (2009)**, L'appareil génital mâle des Mammifères domestiques. Documents de cours de l'Unité d'anatomie, Vetagro-sup, Campus vétérinaire de Lyon, 54pp.
- ◆ **RICKER J.V., LINFOR J.J., DELFINO W.J., KYSAR P., SCHOLTZ E.L., TABLIN F., CROWE J.H., BALL B.A., MEYERS S.A.** Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol. Reprod.*, 2006, **74**, 359-365.
- ◆ **SALAZAR J.L., HAYDEN S.S., WAITE J.A., COMERFORD K.L., EDMOND A.J., TEAGUE S.R., LOVE C.C., VARNER D.D. 2008.** Effect of cryopreservation protocol on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*107, 347-348.
- ◆ **SENGER P, 2005.**Pathways to pregnancy and parturition .Current Conception: Pullman. Page 373.
- ◆ **SENGER J.2012.**Pathways to pregnancy and parturition . 3eme Edition.
- ◆ **STEVEN P. BRINSKO, TERRY L. BLANCHARD, DICKSON D. VARNER, JAMES SCHUMACHER, CHARLES C. LOVE, KATRINHINRICHS, DAVID L. HARTMAN. 2011.** Manual of equine reproduction – 3rd edition, 325p (p161-162).
- ◆ **SQUIRES E.L., KEITH S.L., GRAHAM J.K.** Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 2004, **62**, 1056-1065.
- ◆ **SAID T.M., AZIZ N., SHARMA R.K., LEWIS-JONES I., THOMAS A.J., JR., AGARWAL A.** Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. *Asian J.Androl.*,2005, **7**, 121-126.
- ◆ **TERRY L. BLANCHARD , DICKSON D. VARNER , JAMES SCHUMACHER, CHARLES C . LOVE , STEVEN P. BRINSKO , SHERRI L. RIGBY (Manuel de reproduction equine)2005**
- ◆ **THIBAUT C,2001.** La reproduction chez les mammifères et l'homme. Edition Ellipses.
- ◆ **TIBARY A, BAKKOWY M,20005.** Reproduction équine .Tome 2 : l'étalon . Edition Actes. *Clinical Techniques in Equine Practice*. Vol. 6, n° 4, p 249-264.
- ◆ **TIBARY, A., BAKKOURYM. 2005.** Equine Reproduction. Tome2. L'étalon. Vol. 2. Actes Éditions. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Maroc, 554p.
- ◆ **TIMMIM S, 2015.**Support du cours 3eme année vétérinaire ENSV.
- ◆ **THIRUMALA S., FERRER M.S., AL-JARRAH A., EILTS B.E., PACCAMONTI D.L., DEVIREDDY R.V.** Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology*, 2003, **47**, 109-124.
- ◆ **TORRES-BOGGINO F., SATO K., OKA A., KANNO Y., HOCHI S., OGURI N., BRAUN J.** Relationship among seminal characteristics, fertility and suitability for semen preservation in draft stallions. *J. Vet. Med. Sci.*,1995, **57**, 225-229.

## Références

---

- ◆ **VARNER DD, BLANCHARD TL, LOVE CL, GARCIA MC, KENNEY RM. 1988.** Effects of cooling rate and storage temperature on equine Spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*. 29 (5) 1043-54.
- ◆ **VIDAMENT M., ECOT P., NOUE P., BOURGEOIS C., MAGISTRINI M., PALMER E. 2000.** Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 54, 907-919.
- ◆ **VIDAMENT M., YVON J.M., COUTY I., ARNAUD G., NGUEKAMFEUGANG J., NOUE P., COTTRON S., LE TELLIER A., NOEL F., PALMER E., MAGISTRINI M. 2001.** Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 201-218.
- ◆ **VARELA A.S., CORCINI C.D., ULGUIM R.R., ALVARENGA M.V.F., BIANCHI I., CORREA M.N., LUCIA T., DESCHAMPS J.C.** Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim.Reprod. Sci.*, 2009, **115**, 323-327.
- ◆ **VIDAMENT M., VINCENT P., YVON J.M., BRUNEAU B.,** extender is a limiting factor in the fertility in asine and equine species. *Anim. Reprod. Sci.*, 2005, **89**, 302-305.
- ◆ **VOLPES A., SAMMARTANO F., COFFARO F., GUIDA S., SCAGLIONE P., ALLEGRA A.** Is it possible to use the hypoosmotic swelling test as criteria for “freezeability” of human semen in an AID program? *Acta Eur. Fertil.*, 1992, **23**, 191-194.
- ◆ **VIDAMENT M., DUPERE A.M., JULIENNE P., EVAIN A., NOUE P., PALMER E.** Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 1997, **48**, 907-917.
- ◆ **VIDAMENT M., VINCENT P., YVON J.M., BRUNEAU B., MARTIN F.X.** Glycerol in semen extender is a limiting factor in the fertility in asine and equine species. *Anim. Reprod. Sci.*, 2005, **89**, 302-305.
- ◆ **VIDAMENT M., ECOT P., NOUE P., BOURGEOIS C., MAGISTRINI M., PALMER E.** Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 2000, **54**, 907- 919.
- ◆ **VIDAMENT M., YVON J.M., COUTY I., ARNAUD G., NGUEKAMFEUGANG J., NOUE P., COTTRON S., LE TELLIER A., NOEL F., PALMER E., MAGISTRINI M.** Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim. Reprod. Sci.*, 2001, **68**, 201-218.
- ◆ **WAITE J.A., LOVE C.C., BRINSKO S.P., TEAGUE S.R., SALAZAR J.L., JR., MANCILL S.S. 2008.** Varner D.D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology*, 70,704-714.



## Références

---

- ◆ **WANG A., FANNING L., ANDERSON D.J., LOUGHLIN K.R.** Generation of reactive oxygen species by leukocytes and sperm following exposure to urogenital tract infection. *Arch.Androl.*,1997a, **39**, 11-17.
- ◆ **WANG A.W., ZHANG H., IKEMOTO I., ANDERSON D.J., LOUGHLIN K.R.** Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, 1997b, **49**, 921-925.
- ◆ **WANG Y., SHARMA R.K., AGARWAL A.** Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. *Urology*, 1997c, **50**, 409-413.
- ◆ **WOELDERS H., CHAVEIRO A.** Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes. *Cryobiology*, 2004, **49**, 258-271.
- ◆ **YOANN, JEAN, FRANÇOIS. 2008.** Mémoire de doctorat sous le thème : Etude sur la conservation de la semence équine dans une boîte de transport jetable exposée à différentes températures positives pendant 22 heures. La faculté de médecine de Créteil.