

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

Effet de la centrifugation avec et sans coussin sur la qualité de la semence équine.

Soutenu le 01/10 /2020

Présenté par : M^r Barkat Mohamed Ayoub

M^r Saila Walid

Devant le Jury :

Mr. OUCHENE N.	MCA	U. Blida 1	Président
Mme. KHELIFI N.	MCA	U. Blida 1	Examinatrice
Mr. BELALA R.	MCA	U. Blida 1	Promoteur

Remerciement

Merci ALLAH de nous avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever nos mains vers le ciel et dire

ALHAMDOULLAH

A Monsieur BELALA Redha, qui fut à l'origine de ce travail, Pour m'avoir proposé ce sujet et pour m'avoir accompagné et aidé pendant toute la réalisation de ce travail. Qui a bien voulu accepter la responsabilité de me guider, pour votre confiance, votre si grande disponibilité, votre investissement, Vos nombreux conseils et votre gentillesse. Je suis honorée de vous avoir comme professeur.

Hommage respectueux.

Au Dr OUCHEN. N qui a bien voulu accepter de présider l'examinations de mon mémoire.

Hommage respectueux.

Au Dr KHELIFI N. A, qui a bien voulu accepter d'examiner mon mémoire.

Hommage respectueux.

DIDICACE

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents.

**Pour leur soutien inconditionnel et leur
bienveillance Toute ma reconnaissance
et mon amour.**

**Mon frère Abdel Samii et mes
sœurs .Mes amis Amine, Khaoula ,
Asma, Rachad , Imane, Zakaria Et a
toute la famille Barkat.**

**ET grand dédicace à mon binôme
SAILA WALID**

PAR BARKAT MOHAMED.A

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents.

**Pour leur soutien inconditionnel et leur
bienveillance Toute ma reconnaissance
et mon amour.**

**Mes frère et mes sœurs .Mes amis
Khaoula, Rachad, Asma, Amine,
Imane, Fatima, Adda, Mokhtar, Saida,
Amina,**

**Adel, zakaria Et a toute la famille
SAILA.**

**ET grand dédicace à mon binôme
MOHAMED AYOUB**

PAR SAILA WALID

Résumé

La centrifugation de la semence d'étalon fait partie intégrante de la procédure de cryoconservation, permettant principalement la concentration de sperme et l'élimination du plasma séminal. Le processus de centrifugation, cependant, a des effets délétères potentiels, y compris la réduction de la qualité du sperme ainsi que la perte du nombre de spermatozoïdes. Étant donné que la centrifugation joue un rôle si crucial dans le traitement du sperme, le but de la présente étude est de comparer plusieurs protocoles de centrifugation avec le protocole conventionnel dans la cryoconservation de la semence équine. 20 éjaculats récoltés à partir de 5 étalons sont utilisés dans cette étude. Après récolte et filtration, chaque éjaculat est soumis à un processus de cryoconservation avec comme variante plusieurs centrifugations sans coussin (600xg pendant 10min, 600xg pendant 20min, 800xg pendant 10min et 800xg pendant 20min) et avec coussin (1000xg pendant 10min + Maxi Freeze®, 1000xg pendant 5min + Maxi Freeze®, 1200xg pendant 10min + Maxi Freeze®, 1200xg pendant 5min + Maxi Freeze®). L'effet de différents protocoles étudiés sur la qualité du sperme équin congelé-décongelé a été étudié par analyse des paramètres cinétiques au moyen d'un système CASA (HT-IVO II) et les caractéristiques d'intégrité par le biais d'un cytomètre de flux (Guava EasyCyte Plus).

En résumé, les pertes de spermatozoïdes peuvent être considérablement réduites en centrifugeant le sperme d'étalon à des forces centrifuges et pendant des durées prolongées par rapport au protocole conventionnel sans altérer la fonction du sperme in vitro après cryoconservation.

Mots clés :

Étalon, sperme, cryoconservation, centrifugation, coussin, motilité.

Abstract

Centrifugation of the standard semen is an integral part of the cryopreservation procedure, primarily allowing the concentration of sperm and the elimination of seminal plasma. The centrifugation process, however, has potential deleterious effects, including reduction in sperm quality as well as loss of sperm count. Since centrifugation plays such a crucial role in semen processing, the aim of the present study is to compare several centrifugation protocols with the conventional protocol in cryopreservation of equine semen. 20 ejaculates collected from 5 standards are used in this study. After harvest and filtration, each ejaculate is subjected to a cryopreservation process with as a variant several centrifugations without cushion (600xg for 10min, 600xg for 20min, 800xg for 10min and 800xg for 20min) and with cushion (1000xg for 10min + Maxi Freeze®, 1000xg for 5min + Maxi Freeze®, 1200xg for 10min + Maxi Freeze®, 1200xg for 5min + Maxi Freeze®). The effect of different protocols studied on the quality of frozen-thawed equine semen was studied by analyzing the kinetic parameters using a CASA system (HT-IVO II) and the integrity characteristics using a cytometer. flow (Guava EasyCyte Plus).

In summary, sperm loss can be significantly reduced by centrifuging the stallion sperm under centrifugal forces and for prolonged periods of time compared to the conventional protocol without altering sperm function in vitro after cryopreservation.

key words :

Stallion , semen, cooling, centrifugation, motility

ملخص

يعتبر الطرد المركزي للسائل المنوي القياسي جزءًا لا يتجزأ من إجراء الحفظ بالتبريد ، مما يسمح بشكل أساسي بتركيز الحيوانات المنوية والتخلص من البلازما المنوية. ومع ذلك ، فإن عملية الطرد المركزي لها آثار ضارة محتملة ، بما في ذلك انخفاض جودة الحيوانات المنوية وكذلك فقدان عدد الحيوانات المنوية. نظرًا لأن الطرد المركزي يلعب دورًا مهمًا في معالجة السائل المنوي، فإن الهدف من الدراسة الحالية هو مقارنة العديد من بروتوكولات الطرد المركزي مع البروتوكول التقليدي في حفظ السائل المنوي للخيول بالتبريد. تم استخدام 20 قذفاً تم جمعها من 5 معايير في هذه الدراسة. بعد الحصاد لمدة 10 دقائق xg والترشيح ، تخضع كل قذفة لعملية حفظ بالتبريد مع العديد من أجهزة الطرد المركزي بدون وسادة (600 لمدة 10 دقائق xg لمدة 20 دقيقة) وبوسادة (1000 xg لمدة 10 دقائق و 800 xg لمدة 20 دقيقة و 800 xg و 600 ، Maxi Freeze® لمدة 10 دقائق 1200xg ، Maxi Freeze® لمدة 5 دقائق 1000xg ، Maxi Freeze® ، تمت دراسة تأثير البروتوكولات المختلفة التي تمت دراستها على جودة (Maxi Freeze® لمدة 5 دقائق 1200xg CASA (HT-IVO II) السائل المنوي للخيول المذابة المجمدة من خلال تحليل المعلمات الحركية باستخدام نظام (GuavaEasyCyte Plus) وخصائص السلامة باستخدام مقياس الخلوي. التدفق

باختصار، يمكن تقليل فقد الحيوانات المنوية بشكل كبير عن طريق الطرد المركزي للحيوانات المنوية الفحل تحت قوى الطرد المركزي ولفترات طويلة من الوقت مقارنة بالبروتوكول التقليدي دون تغيير وظيفة الحيوانات المنوية في المختبر بعد الحفظ بالتبريد

الكلمات المفتاحية:

الفحل، الحيوانات المنوية، الحفظ بالتبريد، الطرد المركزي، الوسادة، الحركة

Table des matières

Remerciement.....	
DEDICACES.....	
Résumé:.....	
Abstract.....	
ملخص :.....	
Liste des figures :.....	
Liste des tableaux :.....	
Liste des abréviations:.....	
Introduction :.....	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 1. Données bibliographiques	
1.1. L'appareil reproducteur de l'étalon	3
1.1.1. La partie glandulaire (Testicules)	4
1.1.1.1. Topographie des testicules	4
1.1.1.2. Anatomie des testicules	5
1.1.2. La partie tubaire (excrétrice).....	11
1.1.3. La partie uro-génitale	13
1.2. Physiologie de la reproduction de l'étalon :	16
1.2.1. Puberté.....	16
1.2.2. Ejaculation.....	16
1.2.3. Sperme	16
1.3. Cryoconservation des spermatozoïdes équins	19
1.3.1. Les effets du froid sur le spermatozoïde équin	20
1.2.1.3. Effet sur le noyau et l'ADN	21
1.3.2. La cryoprotection des spermatozoïdes équins	21
1.4. Analyse des spermatozoïdes équins	25
1.4.1. Analyses conventionnelles	25
1.4.2. Analyses non conventionnelles	27
Chapitre 2. Matériel et méthodes	31
2.1. Problématique et objectifs.....	31
2.2. Lieu de l'étude.....	31

2.3. Animaux.....	31
2.4. Récolte.....	32
2.5. Filtration du sperme.....	33
2.6. Evaluation initiale.....	33
2.6.1. Examen macroscopique	33
2.6.2. Examen microscopique	33
2.6.2.1. Détermination de la concentration.....	33
2.7 Première dilution	Erreur ! Signet non défini.
2.8. Desc1ente de température à +22°C.....	35
2.9. Centrifugation	35
2.10 Deuxième dilution (Redilution)	36
2.11. Equilibration.....	37
2.12. Mise en paillettes.....	37
2.13. Congélation et stockage.....	37
2.14. Décongélation des paillettes.....	38
2.15. Evaluation de la fertilité <i>in vitro</i>	39
2.15.1. Analyse de la mobilité par système CASA.....	39
2.15.2. Analyse spermatique par cytométrie de flux.....	40
2.16. Collecte des données et analyse statistique	40
Chapitre 3. Résultats et discussion	41
CONCLUSION.....	47
Références bibliographiques	48

Liste des figures:

Figure 1: Dessin du tractus reproductif de l'étalon vue en coupe sagittale (MC. Kinnon A.1993).....	3
Figure 2 : Testicule et épидидyme gauche d'un étalon (Barone, 2001).....	5
Figure 3 : Le testicule et ses enveloppes, conformation externe (Barone, 2001).....	6
Figure 4 : conformation intérieure et structure du testicule de l'étalon (Picket B.W. 1993)....	8
Figure 5 : glandes génitales accessoires de l'étalon, vue dorsale (P.L. Senger, Ph. D., 2003). La verge ou pénis.....	14
Figure 6 : structure de pénis et du prépuce de l'étalon (P.L. Senger, Ph. D., 2003).....	14
Figure 7 : photomètre Mini tube avec cuvette remplie en sperme (John Dascanio. 2014)...	27
Figure 08: Les paramètres cinétiques du spermatozoïde.....	28
Figure 09: La récolte de sperme sur mannequin.....	32
Figure 10 : Filtration de l'éjaculat.....	33
Figure 11 : Centrifugation a 600 x g pendant 10min.....	36
Figure 12 : Coussin de centrifugation utilisé « MaxiFreeze®, IMV Technologies	36
Figure 13: Machine à remplir et a souder MRS I, IMV-Technologies.....	37
Figure 14 : Après avoir été remplis les paillettes sont étalées sur des racks.....	37
Figure 15 : Courbe de congélation équine (descente de +4°C à -100°C à la vitesse « 60°C/min » puis jusqu'à -140°C à la vitesse « 20°C/min »).....	38
Figure 16 : A gauche : Récupération des paillettes congelées à -140°C du Mini-Digit Cool. A droite : Immersion des paillettes dans l'azote liquide (-196°C).....	38
Figure 17 : Paramétrage technique de l'analyseur HT-IVOS II pour l'analyse des spermatozoïdes équins.....	39

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Caractéristiques principales du sperme d'étalon.....	18
Tableau 2 : Quelques caractéristiques du sperme de différentes races d'étalons de sport (DOWSETT, PATTIE 1987 CITE PAR NICHOLICH,1989).....	18
Tableau 3 : Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction del'âge(DOWSETT, PATTIE 1987 CITE PAR NICHOLICH,1989).....	19
Tableau 4 : Identification des échantillons (chevaux).....	31
Tableau 5 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992).....	34
Tableau 6 : Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992).....	34
Tableau 7 : présent effet de protocole de centrifugation sur le taux de récupération et les paramètres spermatiques.....	43

Liste des abréviations :

CASA: Computerized Assisted Sperm Analysis **FIV:** La Fécondation in Vitro

IA : Insémination Artificielle

SIRE : LE Système d'Information Relatifs aux Equidés

MOT: Motilité Totale **PROG:** Motilité Progressif **VIAB:** Viabilité

ACRO: Réaction Acrosomique

ROS: Réactif Oxygen Species

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

CMF : Cyto-Métrie en Flux

IP : Iodure de Propidium

PNA/FITC: Pisum Sativum Agglutinin-Fluorescein Iso Thio Cyanate

IAC : Insémination Artificielle Congelée

IFCE : Institut Français du Cheval et de l'Équitation

SD : écart type

SEM : Erreur Standard de la Moyenne

SPZ: Spermatozoïdes

CLC: Cholesterol Loaded Cyclodextrins

TLC: α -tocopherol Loaded Cyclodextrins

Introduction:

De nombreuses études ont démontré l'effet bénéfique de la dilution du sperme frais avec un diluant approprié. Ainsi, l'influence négative du plasma séminal sur la conservation du sperme équin peut être réduite. La centrifugation de la semence équine diluée et la remise en suspension ultérieure du culot de sperme dans un dilueur frais peuvent encore réduire davantage la quantité de plasma séminal dans les échantillons stockés (**Carver et Ball., 2002**). Une faible proportion de plasma séminal dans le sperme améliore la motilité des spermatozoïdes après refroidissement et stockage (**Jasko et al., 1991**).

Cependant, la centrifugation elle-même peut agir comme une arme à double tranchant exerçant des effets à la fois bénéfiques et délétères sur la motilité des spermatozoïdes (**Martin et al., 1979**). Bien que le nombre de spermatozoïdes puisse être maximisé en augmentant le temps et la force de centrifugation, des dommages physiques sont exercés en même temps sur les spermatozoïdes. Le résultat négatif direct de la centrifugation sur la qualité du sperme est démontré par la diminution de la motilité et de la vitesse par rapport aux témoins non centrifugés (**Jasko et al., 1991**) qui indique que le protocole de centrifugation peut jouer un rôle important dans la qualité des spermatozoïdes (**Ponthier et al., 2014**).

L'importance d'un protocole de centrifugation approprié a été clairement démontrée pour le sperme humain. Il a été démontré que la durée de la centrifugation était plus importante que la force de centrifugation pour provoquer des lésions iatrogènes de la membrane du sperme, ce qui a entraîné une formation accrue de radicaux libres (**Shekarriz et al., 1995**). Chez les verrats, des résultats similaires ont été décrits : un protocole de centrifugation avec une force centrifuge élevée pendant une courte période ($2400 \times g$ pendant 3 min) a été utilisé sans effets néfastes sur le rendement du sperme par rapport protocole standard ($600 \times g$ pendant 10 min) (Carvajal et al., 2004). De plus, un effet positif sur la qualité du sperme après cryoconservation a été détecté lors de l'utilisation de forces g élevées pendant une période plus courte (**Carvajal et al., 2004**). Des expériences avec du sperme équin ont été effectuées où le sperme a été centrifugé à $400 \times g$ pendant une période de temps croissante. La perte de sperme était d'environ 20%, si les échantillons étaient centrifugés pendant 10 min ou plus, alors qu'aucun effet indésirable sur la motilité immédiatement après la centrifugation n'était présent, sauf si le sperme a été centrifugé pendant 20 min. Cependant, les effets sur la conservation par refroidissement ou congélation n'ont pas été déterminés

(**Heitland et al., 1996**). Une force g élevée pendant une courte période n'a pas été préjudiciable au sperme de porc (**Carvajal et al., 2004**) et une centrifugation prolongée du sperme équin a eu une influence négative sur la qualité du sperme (**Heitland et al., 1996 ; Ponthier et al., 2014 ; Marzano et al., 2020**).

Le but de la présente étude est de comparer plusieurs protocoles de centrifugation avec le protocole conventionnel sur la semence équine cryoconservée. L'effet de différents protocoles étudiés sur la qualité du sperme équin congelé-décongelé a été étudié.

Ce mémoire, débute par une introduction, suivie d'une partie théorique ou « données bibliographiques » puis une partie pratique ou expérimentale et finit par une conclusion et des recommandations. La partie expérimentale se scinde en deux chapitres à savoir « matériel et méthodes » et « résultats et discussion ».

Malheureusement, la conjoncture sanitaire liée à la pandémie de COVID-19 que connaît notre pays ainsi que le monde entier nous a empêché de faire la réalisation pratique de notre travail selon le protocole détaillé dans le chapitre « matériel et méthode ». Ainsi, en l'absence de résultats personnels à discuter dans le chapitre « résultats et discussion », nous nous sommes penchés sur l'analyse de la littérature en nous basant sur les études ayant le même objectif que nous et les conditions expérimentales les plus proches de notre protocole.

1.1. L'appareil reproducteur de l'étalon

L'appareil reproducteur mâle a pour rôle la production de sperme et son dépôt dans les voies génitales femelles où se réalise la fécondation, il peut se décomposer en trois grandes parties qui possèdent des fonctions différentes : (**Baronne R. 2001 ; Florence Batellier ; 2005**)

- **une partie glandulaire**, à savoir les deux testicules dont le rôle est la formation des spermatozoïdes et l'élaboration des hormones sexuelles mâles.
- **une partie tubulaire**, à savoir les voies spermatiques qui acheminent les spermatozoïdes à l'intérieur des testicules puis à l'extérieur par l'épididyme et le conduit déférent jusqu'à l'urètre.
- **une partie uro-génitale**, commune aux voies urinaire et génitale, composée elle-même de deux parties : **l'urètre pelvien**, situé dans le bassin, où de nombreuses glandes **annexes** sécrétrices se terminent, assurant l'élaboration d'un liquide spermatique qui dilue et nourrit les spermatozoïdes afin de faciliter leur maturation leur survie et leur transport, et **l'urètre pénien** qui aboutit au méat urinaire et auquel s'ajoutent des formations érectiles annexes volumineuses.

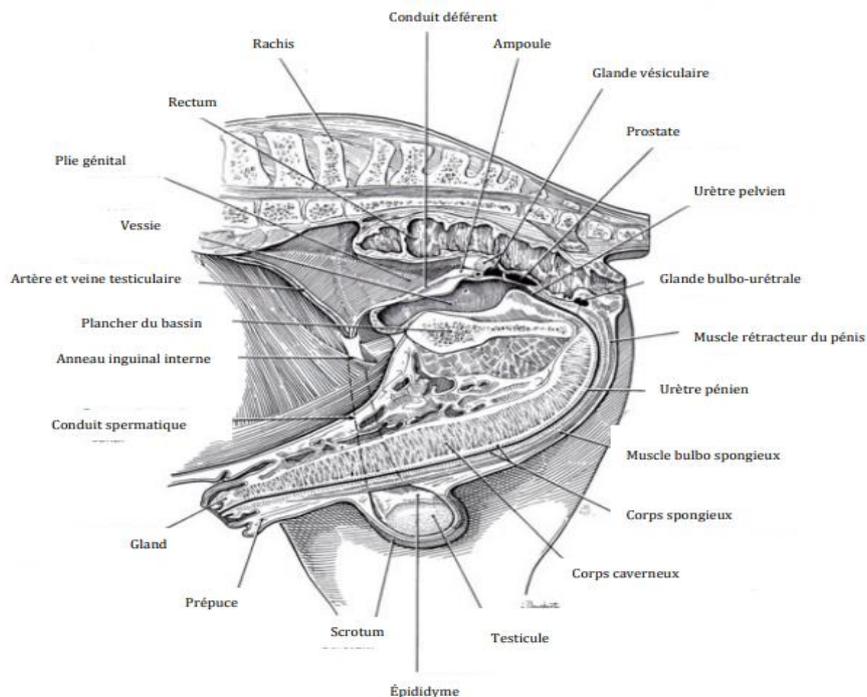


Figure 01 : Dessin du tractus reproductif de l'étalon vue en coupe sagittale (MC. Kinnon A.1993).

1.1.1. La partie glandulaire (Testicules)

1.1.1.1. Topographie des testicules

Les testicules sont des organes pairs dont la taille et le poids sont proportionnels au poids de l'animal, ils se différencient près des reins, mais ils subissent plus ou moins tôt par rapport à la naissance, une migration qui les amène à la périphérie du corps à fin que la température soit inférieure à celle du corps pour la production de spermatozoïdes féconds (**Florence Batellier ; 2005**).

Les testicules sont des organes parenchymateux constitués de tissu conjonctif lâche, formant l'albuginée, et de nombreux lobules divisés eux même en tubes séminifères contournés et en tissu interstitiel. Ils sont alors de forme ovoïde, suspendus en position horizontale par le scrotum en regard de la région pelvienne de L'étalon. Ils sont responsables de la production des spermatozoïdes et de la sécrétion de testostérone (**Tibary et al, 2005**).

Le testicule gauche est en général situé un peu plus bas et un peu plus caudalement que le droit, l'albuginée est relativement épaisse et la pulpe brune jaunâtre ou grisâtre, le mediastinumtestis est peu développé, beaucoup plus rapproché du bord épидидymaire que le bord libre. Il est parcouru par une forte veine longitudinale (**Barone 2001**).

Les ongulés (comme les équidés) sont dits exorchides permanents, car la migration des testicules est irréversible et ils se situent près de l'aîne chez le cheval (**Florence Batellier ; 2005**).

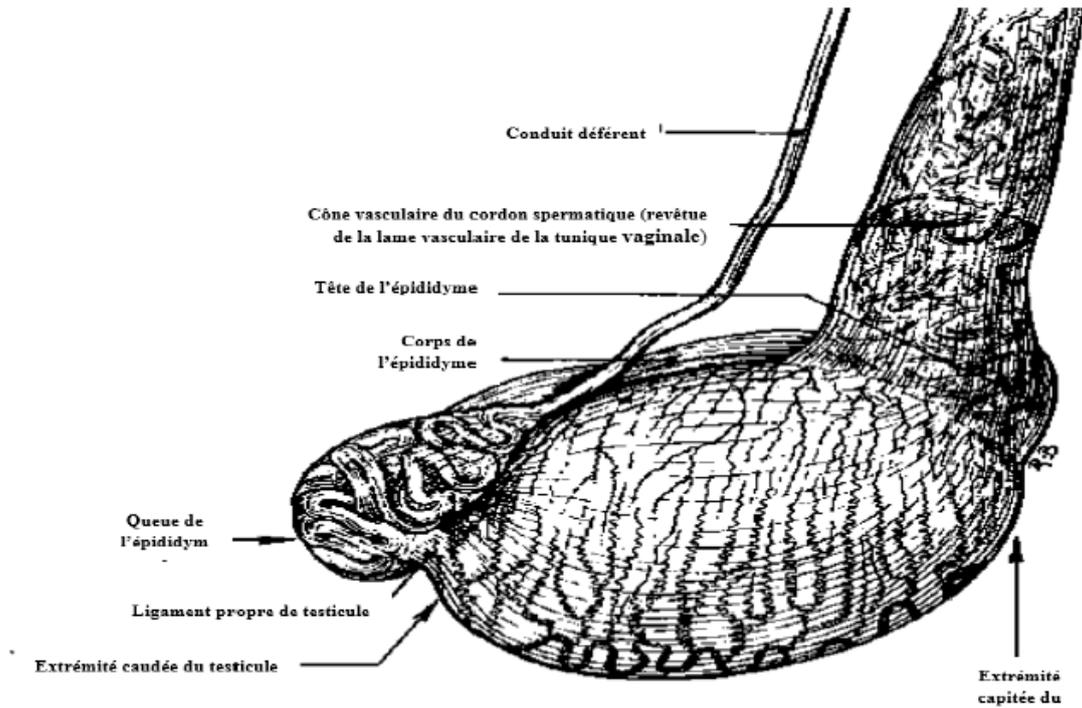


Figure 02 : Testicule et épididyme gauche d'un étalon (Barone, 2001)

1.1.1.2. Anatomie des testicules

La taille des testicules varie de **8 à 14 cm** de longueur pour **5 à 8 cm** de largeur suivant les individus. Ils peuvent peser de **225 à 350** grammes chacun. Leur taille et poids augmente proportionnellement à ceux de l'individu jusqu'à environ l'âge 5ans (**Chirent Mylène ; 2015**).

1.1.1.2.1. Organisation externe des testicules

Les enveloppes testiculaires superficielles

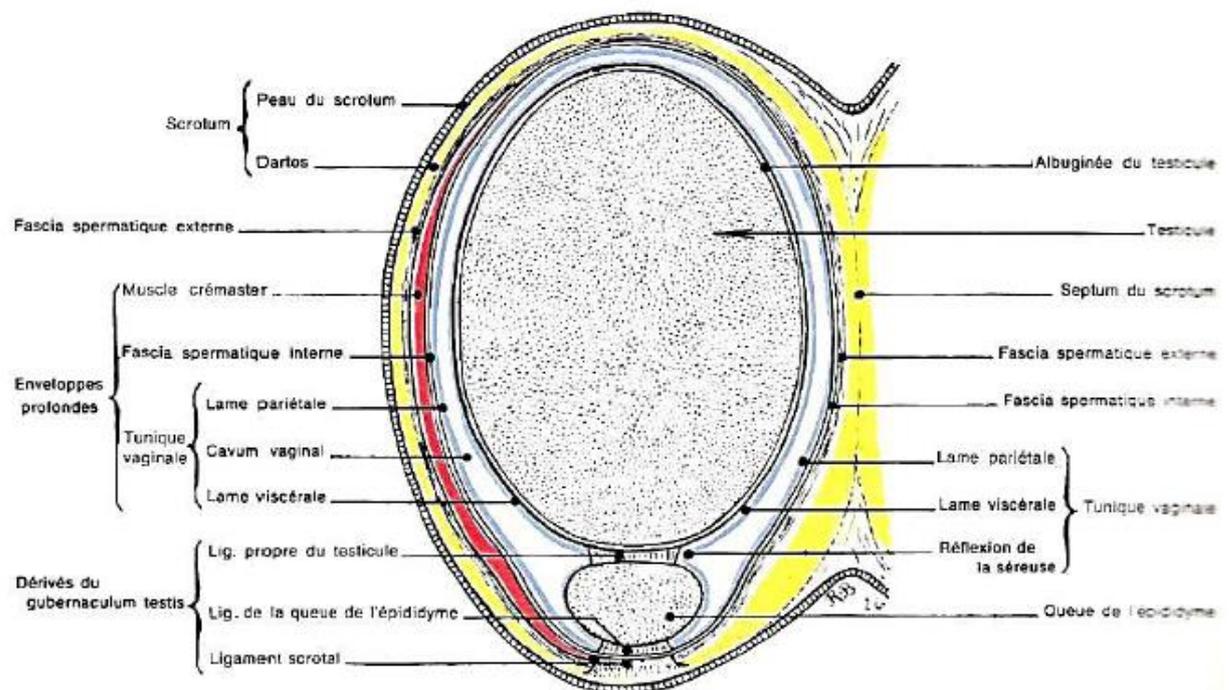


Figure 03 : Le testicule et ses enveloppes, conformation externe (Barone, 2001).

Scrotum

Le scrotum est une enveloppe superficielle constituée d'une fine couche de peau recouvrant diverses couches fibro-élastiques et musculaires, dont la plus importante est le dartos, il est volumineux mais relativement peu détaché et à peine rétrécit à sa base (**Barone 2001**).

La peau de scrotum représente l'enveloppe cutanée unique commune aux deux testicules. Elle est mince, glabre, très pigmentée, noirâtre et adhérente au dartos, recouverte d'un duvet court et très fin, et très riche en glandes sébacées dont leurs sécrétions lui donnent une consistance onctueuse (**Meskini Zakaria ; 2017 ; Barone 2001**), elle joue un rôle thermorégulateur grâce à sa finesse (**Florence Batellier ; 2005**).

Le dartos forme un sac autour de chaque testicule, constitué de fibres musculaires lisses et de fibres élastiques, il est relativement fort et délègue des expansions nettes dans le prépuce, sur le périnée et autour de la région inguinale (**Barone 2001**) ; il a un rôle thermorégulateur grâce aux contractions musculaires qui provoquent des rides de scrotum en cas de froid (**Florence Batellier ; 2005**).

Le fascia spermatique externe ou tunique celluleuse

Il représente l'enveloppe intermédiaire de testicule, c'est un tissu conjonctif très mobile situé entre les enveloppes profondes et le scrotum (**Florence Batellier ; 2005**). Il permet une grande mobilité au testicule et à son sac fibreux, le protégeant contre les compressions et les chocs (**Vaissaire, 1977 ; Drion et al, 1993**). C'est dans cette couche que siègent habituellement les infiltrations pathologiques en raison de la nature dissociable de ce tissu (**Delphine ; 2003**).

Les enveloppes testiculaires profondes

Le crémaster

Est un muscle rouge et strié à contraction volontaire, épais et large, étalé sur la face externe et les bords de la gaine vaginale, il couvre les faces latérale et caudales du fascia spermatique interne. Sa contraction est à l'origine de l'ascension du testicule (**Vaissaire, 1977 ; Barone 2001**), grâce à ses contractions importantes, il éloigne ou rapproche le testicule du corps (**Florence Batellier ; 2005**).

Le fascia spermatique interne ou tunique fibreuse

Il forme un sac autour de chaque testicule prenant un sac dans l'abdomen et passant l'anneau inguinal. Chaque sac est formé par deux tuniques : la tunique vaginale et la tunique fibreuse de nature conjonctive, il permet la fixation du crémaster et la protection du testicule (**Florence Batellier ; 2005**).

Chez le cheval, le fascia spermatique interne est relativement épais et uni au dartos par un ligament scrotal épais et solide, son collet est relativement large (**Barone 2001**).

La séreuse vaginale est une expansion du péritoine. Elle comprend un feuillet pariétal qui tapisse la face interne de la fibreuse et un feuillet viscéral qui recouvre le testicule et le cordon testiculaire (**Drion et al, 1993**).

1.1.1.2.2. Organisation interne des testicules

On retrouve un parenchyme, de couleur jaune-ocre chez le cheval, qui correspond à la partie non capsulaire du testicule, entouré par une charpente fibreuse solide, l'albuginée, dans

laquelle se trouvent les vaisseaux testiculaires. A la périphérie, recouvrant l'albuginée, se trouve un revêtement séreux, une portion de la lame viscérale de la tunique vaginale, il est continu avec le revêtement de l'épididyme et des mésos. Il est également très adhérent à la tunique albuginée (Rezzi Léa ; 2016).

L'albuginée envoie des expansions à l'intérieur du testicule : elles forment des cloisons qui délimitent des lobules testiculaires (200 à 300). Ces cloisons interlobulaires se rejoignent au centre du testicule, formant le mediastinum testis.

Chaque lobule est donc composé de plusieurs tubes séminifères entre lesquels se trouve un tissu conjonctif lâche très vascularisé. C'est au sein de ce tissu interstitiel que l'on trouve les cellules de Leydig (Akerejola, 1978 ; Allison N, 1999).

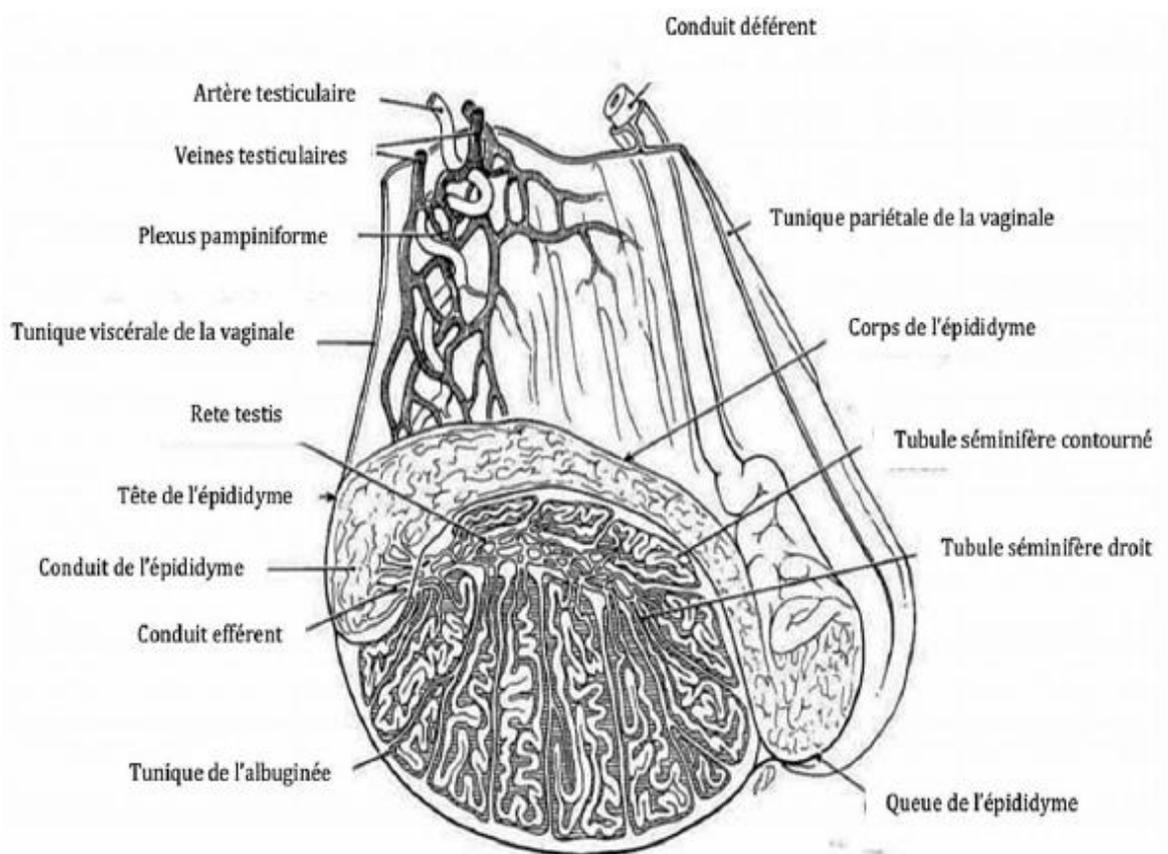


Figure 04 : conformation intérieure et structure du testicule de l'étalon (Picket B.W. 1993)

Les tubes séminifères

Chaque lobule du parenchyme testiculaire regroupe deux à quatre tubes séminifères contournés, siège de la spermatogénèse. Ces tubes sont fortement intriqués et échangent des anastomoses ; ils sont collectés par les tubes séminifères droits, situés au sommet de chaque lobule. (**Barone, 1956**).

À la sortie d'un lobule, les tubes séminifères se jettent dans un tube droit dont la paroi ne comporte plus que des cellules cubiques, homologues des cellules de sertoli, et reposant sur une lame basale. Dans le corps de highmore, les tubes droits s'anastomosent et forment un réseau de canaux, le rete-testis qui se dirige vers la tête de l'épididyme.

Chaque tube séminifère, fortement pelotonné sur lui-même, peut mesurer jusqu'à **2 à 3 m** de long chez les grandes espèces et **120 à 300 µm** de diamètre (**Florence Batellier ; 2005**).

Autour d'une lumière centrale pouvant contenir des spermatozoïdes, on observe sur la coupe transversale d'un tube un épithélium stratifié reposant sur une lame basale, cet épithélium assure la spermatogénèse, il comporte deux types de cellules :

Les cellules de sertoli

Ce sont des cellules somatiques à fonction identique et aux structures semblables à celles de tous les vertébrés (**Thibault et al, 1998**). Elles ont une forme pyramidale reposant sur la membrane basale. Les cellules de Sertoli s'étendent sur la hauteur du tube séminifère et s'unissent, d'une part, entre elles par des jonctions serrées, et d'autre part, avec les cellules germinales par des jonctions d'ancrages (**Dadoune et Demoulin, 2001**).

Les cellules de Sertoli possèdent un rôle nourricier fondamental ainsi qu'un rôle de nettoyage. En effet, elles permettent la résorption des corps résiduels et la phagocytose des spermatozoïdes en dégénérescence. Sous l'influence de la FSH (**follicule Stimulatinghormon**), elles produisent de nombreuses molécules telles que l'**ABP (AndrogenBindingProtein : protéine qui se lie à la testostérone et en augmente la solubilité)**, l'inhibine, l'activine, les activateurs du plasminogène, la transferrine, l'oestradiol, ainsi que des facteurs de croissance. Ces molécules sont ensuite déversées dans l'épididyme et permettant la maturation et la nutrition des spermatozoïdes (**Noakes et al. 2009**).

Les cellules germinales aux différents stades de leur évolution

Sont les spermatogonies, les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes dérivant toutes des gonocytes.

Les spermatogonies

Situées près de la membrane basale, ces cellules ont un noyau arrondi, foncé à chromatine finement dispersée, et désignées par **Ad** (Dark, type A). Par mitose, elles donnent une spermatogonie **Ad** et une spermatogonie **Ap** (pâle, type A) appelée aussi « poussiéreuse » ayant une chromatine plus claire toujours finement dispersée. La division de celle-ci aboutit aux spermatogonies **B** ou « croûteuses ». Les spermatogonies croûteuses se divisent une à trois fois pour donner des « spermatocytes du premier ordre » ou « spermatocytes I » (**George, 1996**).

Les spermatozoïdes

Le spermatozoïde est le résultat final de la spermatogénèse qui se caractérise par plusieurs étapes de différenciation et de multiplication des cellules de la lignée germinale à partir des spermatogonies ou cellules initiales en aboutissant à la production des spermatozoïdes.

C'est une cellule hautement différenciée, à n chromosomes, de 50 à 80 µm de longueur comportant trois parties : la tête, le col et le flagelle avec ses trois pièces : pièce intermédiaire, pièce principale et pièce terminale (**Florence Batellier ; 2005**).

Le flagelle, par ses mouvements, est à l'origine de la motilité des spermatozoïdes liée à leur pouvoir fécondant, car les mitochondries assurent les phosphorylations oxydatives du fructose présent dans le liquide séminal fournissant l'énergie nécessaire aux mouvements de la queue, tandis que les structures de l'axonème ont des propriétés contractiles. Ainsi, les microtubules périphériques sont riches en ATPase (**Mc Donald, 1980 ; Albert et Jean, 2001**).

Le tissu interstitiel

Il est constitué de tissu conjonctif dans lequel se trouve des petits amas de cellules endocrines : les cellules de Leydig, situées le long des capillaires sanguins. Ces cellules assurent la sécrétion d'hormones sexuelles males.

La production de testostérone par les cellules de Leydig est contrôlée par une gonadotropine, l'hormone LH (Luteinizinghormon). Une concentration basse en testostérone induit une augmentation de la sécrétion de LH par la glande pituitaire antérieure. Cette augmentation de

LH entraîne la sécrétion de testostérone par les testicules. Il existe un rétrocontrôle négatif entre la LH et la testostérone. La testostérone diffuse du tissu interstitiel jusqu'aux tubes séminifères, où elle agit sur le bon déroulement de la spermatogenèse par le maintien du processus de méiose (**Reece 1997**).

Vascularisation et innervation des testicules

Le testicule reçoit sa vascularisation de l'artère testiculaire qui provient de l'aorte abdominale en regard de la 4ème vertèbre lombaire près du départ de l'artère mésentérique caudale. Ce vaisseau gagne l'anneau vaginal après avoir longé la paroi abdominale et passe dans le bord crânial du mésorchium. Il a alors un trajet de plus en plus flexueux au sein du cône vasculaire. L'artère testiculaire délègue un rameau épидидymaire avant d'atteindre le mésorchium distal.

La veine testiculaire ne se constitue qu'à distance de la glande, au voisinage de l'anneau vaginal. Dans le testicule, les lobules sont drainés par des veines superficielles et des veines profondes. La veine testiculaire se continue ensuite dans le cordon par une grosse « **veine droite funiculaire** » qui, enlacée par les flexuosités de l'artère testiculaire, se poursuit elle-même par la veine testiculaire après avoir drainé le plexus pampiniforme(**Delphine ; 2003**).

Les nerfs proviennent principalement du plexus mésentérique caudal et forment le plexus testiculaire. Ils se distribuent dans l'albuginée par des terminaisons sensibles libres. Il semblerait que les fibres nerveuses ne pénètrent pas dans les tubes séminifères (**Barone 2001**).

1.1.2. La partie tubaire (excrétrice)

1.1.2.1. Les voies spermatiques intra-testiculaires

Les voies de conduction spermatique testiculaires sont formées par les tubes droits prolongés par le rêtetestis d'où émergent une vingtaine de canaux efférents. Ces conduits quittent le testicule en traversant l'albuginée et convergent ensuite pour former la tête de l'épididyme (**Barone 2001**).

Les tubes droits :

Courts et rectilignes, ils prolongent les tubes séminifères et sont bordés par un tissu épithélial simple formé de cellules cubiques qui sont équivalentes aux cellules de Sertoli des tubes séminifères. Au niveau des tubes droits, on ne trouve par contre plus de cellules de la lignée germinale, à l'exception d'amas de spermatozoïdes en cours de migration.

Le rêtetestis :

Est bordé d'un épithélium simple et cubique

Les canaux efférents :

Ils cheminent dans le tissu conjonctif. Après la traversée de l'albuginée, ils prennent le nom de cônes efférents qui, par fusion, forment le canal épидидymaire unique. Ils ont un rôle de conduction et de progression des spermatozoïdes.

Le liquide du rêtetestis véhicule des spermatozo ides immobiles. Il ne serait qu'une sécrétion tubulaire remaniée, probablement du fait d'échanges avec les veines testiculaires superficielles (**Thibault C. ; 2001**).

1.1.2.2. Les voies spermatiques extra-testiculaires

L' pididyme

L'épididyme est un organe allongé, qui suit le bord supérieur du testicule. Il reçoit de l'extrémité capit e de la glande testiculaire les canalicules efférents et se continue caudalement par le canal d f rent. Il joue un rôle important dans le stockage des spermatozo ides, qui subissent une maturation lors de sa traversée. La longueur de l'organe en place est de **12 à 13** centimètres mais en réalité, l'épididyme est formé par un tube très flexueux log  à l'intérieur d'une gaine contentive : une fois totalement déplié, ce tube atteint chez le cheval une longueur moyenne de **70 à 80 mètres** (**Barone, 1956**).

L'épididyme est constitué par un long système canaliculaire pelotonné à l'intérieur d'une membrane albuginée, qui fait suite à la tunique albuginée du testicule. Cette membrane se réduit peu à peu à un mince tissu conjonctif sous-séreux à l'origine du canal d f rent. Le système canaliculaire est d'abord formé par les canalicules efférents issus de la glande testiculaire, puis ceux-ci se rejoignent et constituent un canal unique : le canal épididymaire dont les circonvolutions forment la quasi -totalité du corps et de la queue de l'épididyme (**Barone, 1956**).

Le canal d f rent

Il est dans le prolongement de la queue de l'épididyme et accompagne le cône vasculaire à travers le canal vaginal. Il chemine à la face médiale du mésorchium porté par le mesoductusdeferens. Il est long de **60 à 70 cm**. Sa partie initiale est très flexueux puis il

devient rapidement rectiligne et remonte dans la région inguinale. Après avoir cheminé dans le cordon spermatique, le conduit déférent se porte, au-delà de l'anneau vaginal, sur le côté de la cavité pelvienne puis à la face dorsale de la vessie pour déboucher dans la portion initiale de la partie pelvienne de l'urètre (**Delphine ; 2003**).

Les glandes vésiculaires

Ce sont des glandes tubulo-alvéolaires. Les vésicules séminales (ou glandes vésiculaires) et le conduit déférent se terminent par un conduit commun : le conduit éjaculateur qui débouche ensuite dans l'urètre. Les cellules épithéliales des vésicules séminales sécrètent des protéines (enzymes, inhibiteurs d'enzymes, protéines structurales) et un mucus gélatineux, épais et blanc, composé entre autres de fructose et de prostaglandines. Les prostaglandines jouent un rôle dans les contractions des voies génitales femelles, et favorisent donc la migration des spermatozoïdes dans ces voies femelles (**Barone R. 2001 ; Thibault C. ; 2001**).

1.1.3. La partie uro-génitale

L'urètre d'étalon

L'urètre du cheval est un long conduit impair de **60 à 70 cm**, ayant pour fonction l'excrétion de l'urine et aussi celle du sperme. Il fait suite au col de la vessie ; près de son origine, il reçoit le débouché des voies spermatiques. Il longe le plancher pelvien, puis sort du bassin et se poursuit dans le pénis, à l'extrémité duquel il se termine par le méat urinaire (**Barone ; 2001**).

L'urètre pelvien

C'est la partie la plus proximale de l'urètre, elle est dite intra-pelvienne : d'une longueur seulement de 10 à 12 cm, elle est dépourvue de formations érectiles mais présente des glandes annexes importantes (**Barone ; 2001**).

L'urètre pelvien est limité par deux rétrécissements : le premier, proximal, correspond au col de la vessie et le second, caudal, correspond à l'isthme de l'urètre. Ces deux rétrécissements délimitent une partie plus large appelée fosse prostatique, au niveau de laquelle se trouvent les orifices éjaculateurs, dans lesquels s'abouchent en commun les canaux déférents et les vésicules séminales. C'est également au niveau de la fosse prostatique que se trouvent les orifices des canaux excréteurs de la prostate (**Barone, 2001 ; Roger, 2009**).

L'urètre pénien

Il représente la partie distale de l'urètre, dite extra-pelvienne ou pénienne, elle commence par un bulbe du pénis long de **8 à 10 cm** et assez peu renflé, sa largeur n'excédant pas **5 à 6 cm**, alors que le corps spongieux à un diamètre extérieur de **2,5 cm** et, au contraire de la portion précédente, elle est entourée de tissu érectile mais dépourvue de glandes annexes (**Barone, 2001**).

La portion pénienne comporte à son origine les orifices excréteurs des glandes bulbo-urétrales, encore appelées glandes de Cowper, et se situe au sein du corps spongieux (**Barone, 2001 ; Roger, 2009**).

Glandes annexées à l'urètre

A l'urètre sont annexées des glandes dont les sécrétions sont déversées au moment de l'éjaculation et diluent le sperme, lui donnant ainsi sa composition finale. L'une de ces glandes est impaire et volumineuse : il s'agit de la prostate. Les autres, plus petites et paires, constituent les glandes bulbo-urétrales (**Barone ; 2001**).

La prostate

La prostate est une glande impaire, volumineuse, ferme et constituée de deux lobes réunis par un isthme. Elle se situe dorsalement à la terminaison de la vésicule séminale et à la partie terminale du canal déférent. Elle résulte en fait de l'agglomération de glandules multiples, unies par un stroma commun, mais débouchant par des conduits distincts (**10 à 20** de chaque côté, chez le Cheval), dans la partie initiale de l'urètre (**Barone ; 2001**).

Les sécrétions prostatiques représentent **20 à 30 %** du volume éjaculé, et sont déversées dans la lumière puis sont acheminées par des canaux dans l'urètre. Elles sont riches en acides aminés et en enzymes (phosphatases alcalines et acides). Elles permettent de neutraliser l'acidité liée au métabolisme des spermatozoïdes. Cette acidité est due à la production de lactate de **CO₂** et déclenche la mobilité des spermatozoïdes. L'activité de la prostate est sous la dépendance d'androgènes (**Thibault ; 2001**).

Les glandes de Cowper

Les glandes bulbo urétrales sont au nombre de deux, elles se situent crânialement et dorsalement à l'arcade ischiatique, de consistance ferme et de texture plus dense que la prostate. Leur taille est d'environ **4 à 5 cm** de diamètre. Elles sont constituées de lobules

responsables de la sécrétion dans l'urètre pelvien d'une partie minoritaire du plasma séminal, nécessaire à la formation du bouchon muqueux ans les voies génitales femelle (**Chirent Mylène ; 2015**).

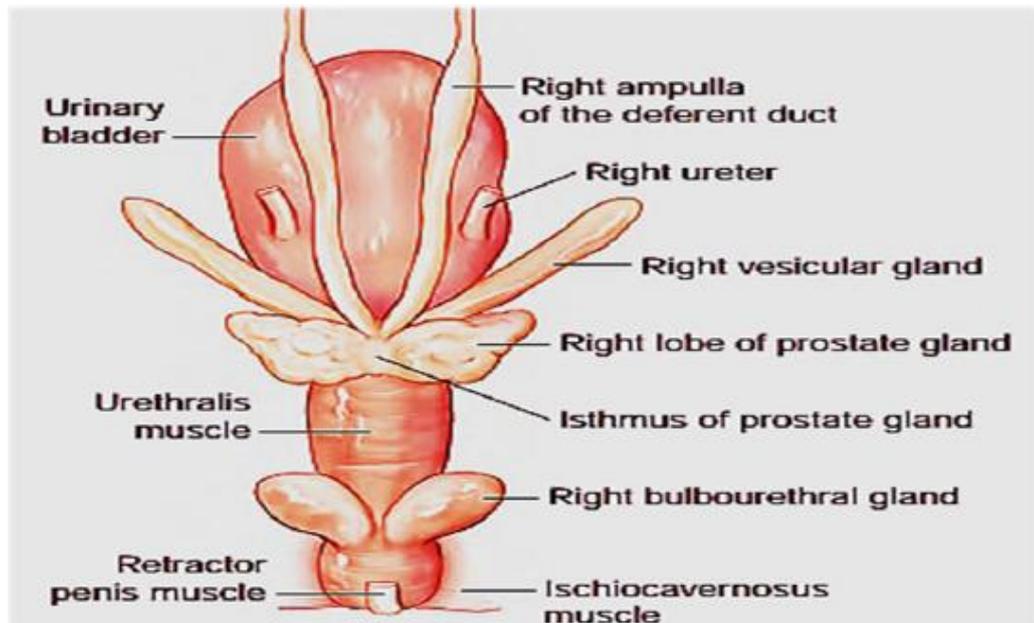


Figure 05 : glandes génitales accessoires de l'étalon, vue dorsale (P.L. Senger, Ph. D., 2003).

La verge ou pénis

Le pénis est l'organe copulateur du mâle ; il est essentiellement constitué de formations érectiles (corps caverneux, corps spongieux de l'urètre et du gland). Chez les équidés, il commence au niveau de l'arcade ischiale ; il descend entre les deux cuisses, passe entre les deux sacs dartoïques et se prolonge sous le ventre, où sa partie libre est contenue dans le fourreau. En effet, cet organe comporte deux parties : une partie fixe, proximale, qui est maintenue par un système d'aponévrose et de ligaments et une partie libre, mobile et détachée, qui peut être portée dans les voies génitales femelles lors de l'érection (**Barone ; 2001**)

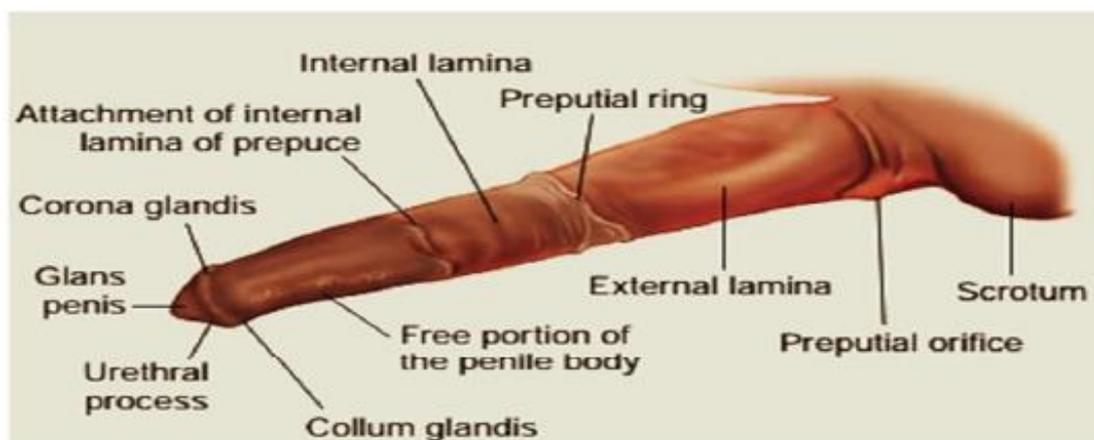


Figure 06 : structure de pénis et du prépuce de l'étalon (P.L. Senger, Ph. D., 2003).

1.2. Physiologie de la reproduction de l'étalon :

1.2.1. Puberté

La puberté apparaît vers 2,5 ans. Les étalons effectuent la monte à partir de 3 (poneys et chevaux lourds) ou 4 ans (**BADINAND, 1985**). La production de spz par les testicules commence entre 13 et 20 mois (**NICOLICH, 1989**).

1.2.2. Ejaculation

L'étalon est sensible à des stimulations visuelles, olfactives (odeur de l'urine de jument en chaleur) et tactile entraînant le flehmen ou rictus sardonique : la lèvre supérieure est retroussée et la tête levée (**CHEVALIER, 1980**).

1.2.3. Sperme

La spermatogenèse dure 55 jours environ (**Nicolich, 1989**) ou 35 à 42 jours (**CHEVALIER, 1980**). L'éjaculat est composé de 6 à 9 jets. L'éjaculation dure 6 à 7 secondes (**NICOLICH, 1989**).

Il est possible de distinguer le pré-sperme, une sécrétion visqueuse qui coule pendant l'excitation sexuelle, avant le vrai sperme (rôle lubrifiant) :

- ✓ la fraction riche des premiers jets, un mucus blanchâtre ou incolore, de 30 à 75 ml,
- ✓ le post-sperme, un gel trouble et visqueux, de 8 à 85 ml (rôle antimicrobien),
- ✓ la fraction post-coïtale, incolore, peu visqueuse et avec peu de gel (**NICOLICH, 1989**).

Etant donné la longueur de l'œstrus et que l'étalon saillit chaque femelle en œstrus de nombreuses fois, il ne peut servir qu'un nombre limité de juments : de 15 à 30 juments (**VALON, 1985**).

1.2.3.1. Collecte du sperme

Certains étalons sont habitués à monter sur un mannequin. En général il faut recourir à une jument en œstrus. L'aire péri-génitale de celle-ci est nettoyée, on lui met un tord-nez et on entrave ses membres postérieurs. Il vaut mieux que l'étalon soit manipulé par une personne qui le connaît, et dans un lieu qu'il connaît, sans stress. L'érection est plus ou moins rapide. L'éjaculation est relativement courte (**VALON ET CHAFFAUX, 1983**).

Le temps de réaction (entre le début des stimulations et la monte) est de 3,5 min (211 secondes) pour le 1er éjaculat et de 3,85 min (231 secondes) pour le 2eme, une heure plus tard en moyenne (**NICOLICH, 1989**)

Le prélèvement peut être effectué dans le vagin de la femelle (mais pas pour l'insémination artificielle), avec un condom en caoutchouc ou en plastique souple, ou mieux, avec un vagin artificiel. La température de l'eau du vagin artificiel au départ varie de 42°C à 50°C selon le temps estimé que l'étalon prendra pour éjaculer. (**VALON ET CHAFFAUX, 1983**). La capote est lubrifiée avec de la vaseline et la pression doit être proche de celle exercée par le vagin de la jument (**CHEVALIER, 1980**). L'opérateur qui prélève est de côté par rapport à l'étalon. Il dévie le pénis au moment du saut et présente le vagin artificiel (**CORDE, 1985**).

Il faut en moyenne 30 minutes pour obtenir une éjaculation. La température de l'eau du vagin artificiel est comprise entre 42°C et 44°C au moment de la collecte (**FAUQUENOT, 1987**). La saillie elle-même dure 2 minutes environ. Le sperme doit être mis à l'abri de la lumière.

1.2.3.2. Les caractéristiques du sperme

Des substances gélatineuses sont élaborées par les vésicules séminales. En premier lieu, ce gel est retenu par un filtre.

Couleur :

Normalement, le sperme est blanc laiteux.

Volume :

Le volume est important. Il est plus faible pour les étalons de sang (30-50 ml) que pour les races lourdes (120-150 ml) (**FAUQUENOT, 1987**).

Concentration et nombre total des spermatozoïdes :

La concentration du sperme équin varie entre 100 et 200 millions spz par ml. En tenant compte du volume spermatique, elle correspond à un nombre total des spermatozoïdes de 10 milliards en moyenne.

Motilité :

La motilité est de 75 % en moyenne (**BESSE, 1993**).

Tableau 1 : Caractéristiques principales du sperme d'étalon

Volume total (ml)	Concentration (10 ⁶ /ml)	Nombre total (10 ⁹)	Motilité (%)	Reference
70 (30-300)	120 (30-8000)			Kolb, 1975
60-120	50-350		60	Corde, 1985
60-100	150-300	5-15	40-75	Hafez, 1987
30-50 ou 120-150	100-200		60-80	Fauquenot, 1987
	200 (50-400)	10 (3-20)	75	Besse, 1993
52,5 ± 34,1	176 ± 125	7,8 ± 5,7	59±14	Langlois 1977.

Ces caractéristiques varient avec la race (Tableau 2), l'âge de l'étalon (Tableau 3), la saison, de la fréquence d'éjaculation, etc.

Tableau 2 : Quelques caractéristiques du sperme de différentes races d'étalons de sport (DOWSETT, PATTIE 1987 CITE PAR NICHOLICH, 1989)

	Nombre	Vol. sans gel (ml)	Vol. de gel (ml)	Vol. total (ml)	Concentr. (10 ⁶ /ml)	Nbre de spz (10 ⁶)	Spz morts (%)
Races		gel (ml)	(ml)	(ml)	(10 ⁶ /ml)	spz (10 ⁶)	(%)
P.S.A.	73	36,2	1,0	37,2	286,8	12 661	10,1
Quarterhorse	30	23,8	4,0	27,8	171,7	5 372	23,8
Pur Sang	141	28,3	2,7	31,0	114,3	5 027	21,6
Arabe 1/2 sang	73	33,2	5,5	38,7	116,1	4 854	17,1
A.Q.P.S.	111	30,2	3,1	33,3	97,2	4 738	15,4
Palomino	44	23,8	1,1	24,9	138,5	4 016	21,3
Appaloosa	18	23,3	2,0	25,3	90,4	3 331	15,8
Shetland	8	44,4	13,1	57,5	101,3	1 720	38,5
Poney	38	20,8	2,5	23,3	114,0	1 122	24,7
Moyenne		29,3	3,9	33,2	136,7	4 760	20,9

Tableau 3 : Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction de l'âge
(DOWSETT, PATTIE 1987 CITE PAR NICHOLICH, 1989)

	Nom bre	Vol. sans	Vol. de gel	Vol. total	Concent r.	Nbre de	Spz morts
Age		gel (ml)	(ml)	(ml)	(10 ⁶ /ml)	spz (10 ⁶)	(%)
1-2 ans	28	15,6	0,4	16	43,4	481	30,8
3-13 ans	427	30,2	4	34,2	147,8	5 053	18,8
>13 ans	81	33,7	1,4	35,1	83,2	3 252	22,8

1.3. Cryoconservation des spermatozoïdes équins

Le sperme peut être utilisé frais, réfrigéré progressivement à 12-14°C (dans les 24 à 96 heures) ou plus souvent 4°C (0-5°C, jusqu'à 8 jours) ou congelé dans l'azote liquide. Le sperme dilué peut être conservé au réfrigérateur réglé à 7 °C (DUSSAUGE, 1963 ; MAGISTINI, 1990).

Pour le **sperme frais**, les doses de 20 ml comprennent 400 millions de spz. Avec des doses de 400 millions de spz, et un rythme de 3 récoltes par semaine, au moins 20 doses de semence peuvent être produites par éjaculat (FAUQUENOT, 1987).

Pour le **sperme réfrigéré**, immédiatement après la récolte, le sperme est dilué dans un bain-marie maintenu à 35-37°C (MAGISTINI, 1990). La reproduction du cheval a été étudiée dans les années 1950 par Nishikawa au Japon qui a mis au point les premiers dilueurs pour la semence d'étalon (NISHIKAWA, 1975).

Les dilueurs ont un pH proche de celui du plasma séminal, apportent des éléments nutritifs et contiennent des substances tampon, des antibiotiques et des cryoprotecteurs, ces derniers protégeant les spz des effets de la congélation et de la décongélation

La vitesse du refroidissement doit être contrôlée et adaptée à la température de conservation. Pour la conservation à +4°C, une descente initiale de - 0,3°C par min est idéale soit 10 heures pour passer de +37°C à +4°C. Palmer (1984) utilise du lait écrémé ajouté d'antibiotiques

comme diluer. L'insémination doit être faite dès les 10 heures qui suivent la collecte (MAGISTINI, 1990).

Concernant la cryoconservation, elle sera présentée en détail dans les sections suivantes.

1.3.1. Les effets du froid sur le spermatozoïde équin

1.2.1.1. Effets sur le métabolisme cellulaire

L'intensité du métabolisme est fonction de la température. Une diminution de la température entraîne une nette réduction de l'activité métabolique. A des températures suffisamment basses, c'est-à-dire négatives, la plupart des processus métaboliques sont stoppés.

La congélation des spermatozoïdes induit donc un ralentissement voire un arrêt de leur métabolisme (Loomis et Graham, 2008).

1.2.1.2. Effets sur les membranes cellulaires

La cryoconservation a des effets majeurs sur la membrane plasmique, que cette dernière subisse des modifications chimiques, topographiques ou mécaniques.

La membrane plasmique est une bicouche lipidique dont les parties hydrophiles des lipides et les protéines sont orientées vers l'extérieur alors que les parties hydrophobes sont orientées vers le centre de la membrane. Il existe différents types de lipides, tous étant particulièrement sensibles aux radicaux libres, libérés lors de la congélation par les cellules altérées. Ces radicaux libres sont à l'origine d'un phénomène de peroxydation, observé au niveau des lipides membranaires.

Il faut savoir que chaque espèce de lipide possède une température de changement de phase, c'est-à-dire une température pour laquelle les lipides passent de l'état fluide à l'état de gel.

Lorsque la température devient inférieure à la température de changement de phase d'un type de lipides, tous les lipides de cette espèce se regroupent en microdomaines. Ceci est à l'origine d'une réorganisation de la membrane plasmique créant des trous entre les microdomaines de lipides et les portions fluides de membrane. Ce réarrangement des lipides membranaire induit par le froid est ce qu'on appelle le « **cold shock** » ou « **choc induit par le froid** » et il entraîne une fragilisation de la membrane voire des dommages ou des ruptures membranaires.

Lorsque la température corporelle est de nouveau atteinte après décongélation, les lipides retrouvent leur forme liquide mais la membrane plasmique ne retrouve pas son organisation initiale et reste altérée. Les conséquences des altérations membranaires sont multiples car la membrane plasmique est atteinte tout comme les membranes des organites de la cellule

spermatique. Ainsi, les spermatozoïdes congelés-décongelés peuvent présenter une perte de la structure interne de l'acrosome ou des mitochondries, qui représentent les structures cellulaires les plus sensibles à la cryoconservation.

Cela conduit à de sévères conséquences sur la viabilité de la cellule mais également à des dysfonctionnements dans l'activation de la mobilité ou dans la réaction acrosomique et la fécondation.

1.2.1.3. Effet sur le noyau et l'ADN

Le noyau du spermatozoïde peut également être altéré durant la cryoconservation. Or, la préservation de l'intégrité de l'ADN est primordiale pour l'obtention d'une descendance viable et conforme aux parents.

Les spermatozoïdes endommagés sont susceptibles de produire des radicaux libres très rapidement, en particulier après congélation. Ces produits de peroxydation sont très délétères pour l'ADN et peuvent induire à la fois des cassures et des modifications de bases. Les conséquences sont dramatiques dans la mesure où le génome de la descendance, sa viabilité et la qualité de son développement sont altérés (Labbé et al, 2002; Luvoni, 2003).

1.3.2. La cryoprotection des spermatozoïdes équins

1.3.2.1. Définition

La cryoconservation correspond à l'utilisation de faibles températures pour préserver la structure intacte de cellules et de tissus vivants. Elle est utilisée dans la conservation des spermatozoïdes. Une congélation sans protection peut s'avérer mortelle pour les cellules et cette seconde partie vise à analyser les procédés utilisés lors de la congélation afin de protéger au mieux les spermatozoïdes et montrer comment leur refroidissement permet leur conservation dans des conditions stables et la préservation de la vie.

1.3.2.2. Objectifs de la cryoconservation de la semence

La cryoconservation permet de conserver le génome de spermatozoïdes pendant des dizaines d'années sans l'altérer. Elle permet donc de conserver le matériel génétique d'espèces de bonne qualité ou en danger.

1.3.2.3. Avantages et inconvénients de la cryoconservation

La congélation de la semence permet la conservation *ex situ* de la diversité génétique des espèces de mammifères ainsi que le désaisonnement de la reproduction favorisant la gestion de la production et des géniteurs.

En théorie, la cryoconservation n'altère pas le génome des spermatozoïdes qui peuvent ainsi être conservés pendant des dizaines d'années, voire plus, avant d'être utilisés. Il est alors possible de conserver le matériel génétique d'espèces en danger ou de bons reproducteurs et de transmettre ce potentiel à la descendance lorsque l'animal ne pourra plus reproduire, suite à des affections pathologiques ou à la vieillesse, ou après sa mort (en France, la réglementation autorise l'utilisation de la semence congelée après la mort d'un animal).

La congélation permet également de transporter la semence sur de longues distances sans avoir à faire subir le voyage au mâle ou à la femelle, ce qui est particulièrement stressant pour l'animal et donc néfaste au bon déroulement de l'accouplement et de la fécondation. De plus, la législation de nombreux pays est de plus en plus contraignante pour l'introduction d'animaux sur leur territoire, avec parfois des quarantaines de plusieurs jours ce qui rend impossible un accouplement au moment le plus propice du cycle de la femelle. La congélation et le transport de la semence permettent alors de s'affranchir de ces problèmes. Le transport de la semence congelée permet également une dispersion incomparable de caractères génétiques intéressants (**Labbé et al. 2002**).

1.3.2.4. Etapes de la cryoconservation

1.3.2.4.1. Filtration

1.3.2.4.2. Première dilution

1.3.2.4.3. Première descente de la température (jusqu'à +22°C)

1.3.2.4.4. Centrifugation et élimination totale du plasma séminal

La centrifugation elle-même peut agir comme une épée à double tranchant exerçant des effets à la fois bénéfiques et délétères sur la motilité des spermatozoïdes. Bien que le nombre de spermatozoïdes puisse être maximisé en augmentant le temps et la force de centrifugation, des dommages physiques sont exercés en même temps sur les spermatozoïdes. Le résultat négatif direct de la centrifugation sur la qualité du sperme est démontré par la diminution de la motilité et de la vitesse par rapport aux témoins non centrifugés.

La méthode de centrifugation : force et durée :

Directement après récolte, la semence est diluée avec un dilueur primaire à 37°C, ce qui permet de protéger les spermatozoïdes. Les tubes sont ensuite placés dans la centrifugeuse et le choix de la force ainsi que de la durée de centrifugation dépend du protocole utilisé. Ensuite, le surnageant est enlevé, de façon très précautionneuse, suffisamment rapidement

mais sans provoquer de turbulences, sous peine de perdre une grande partie des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes du culot sont alors remis en suspension dans une quantité appropriée de dilueur (**Barrier-Battut 2013**).

Les alternatives à la méthode de centrifugation classique :

L'étape de centrifugation représente une étape critique car cette procédure causerait des dommages mécaniques aux spermatozoïdes, notamment lorsque la force de centrifugation utilisée est trop élevée. Les spermatozoïdes se retrouvent plaqués au fond du tube, ce qui serait à l'origine d'une perte en spermatozoïdes. Cette perte s'avère problématique, notamment pour les espèces dont l'éjaculat est relativement peu concentré, comme chez le cheval (**Mari et al. 2015**).

Pour limiter ces inconvénients, deux alternatives sont possibles : la centrifugation sur « coussin », développée depuis plusieurs années déjà, et plus récemment la concentration des spermatozoïdes sans centrifugation, à l'aide d'un filtre spécialement destiné à cet effet (**Barrier- Battut 2013**).

La centrifugation sur « coussin » :

La centrifugation sur coussin consiste à placer une couche de solution plus dense sous la semence diluée pour servir de « coussin » aux spermatozoïdes pendant la centrifugation et éviter que ceux-ci ne s'agglomèrent au fond du tube.

Initialement, de l'EDTA était utilisé mais il a rapidement été remplacé par le iodixanol qui s'est avéré plus efficace. Plusieurs « coussins » existent sur le marché mais ils sont tous constitués d'un liquide visqueux constitué d'une solution d'iodixanol à introduire délicatement dans le fond du tube contenant déjà la semence (exemple du MaxiFreeze® de chez IMV technologies, France ou du CushionFluid® de chez Mini tube, Allemagne). L'ajout de ces milieux « coussins » permet d'augmenter l'accélération de la centrifugeuse ainsi que le temps de centrifugation (jusqu'à 1200 xg pendant 10 minutes au lieu de 600 xg pendant 10 minutes sans milieu « coussin ») sans provoquer de lésions des spermatozoïdes. Le « coussin » amortit les chocs sur les spermatozoïdes, ceux-ci restant à l'interface coussin/dilueur, au lieu d'être plaqués au fond du tube par la force centrifuge. Ils sont également « englués » par la viscosité du liquide, ce qui empêche leur remontée dans le surnageant. Il y a donc moins de perte de spermatozoïdes après la centrifugation, ce qui peut être intéressant pour optimiser le

nombre de paillettes de sperme congelé produites par des mâles « petits producteurs ». Le nombre total de spermatozoïdes récupérés après centrifugation serait plus élevé que lors d'une centrifugation standard (90 % des spermatozoïdes récupérés au lieu de 60 % avec le protocole de centrifugation n'utilisant pas les milieux « coussins ») ce qui permet un nombre de paillettes produites par éjaculat plus important

L'inconvénient de la centrifugation sur coussin est le surcoût par rapport à une centrifugation classique, le « coussin » n'étant évidemment pas réutilisable. De plus, l'étape du retrait du matériel constituant le « coussin » après la centrifugation reste une étape critique. D'après **Hoogewijs**, l'utilisation d'un très petit volume de matériel (30 µL) sans l'enlever après centrifugation se révélerait inoffensif, mais ces petits volumes requièrent des tubes particuliers qui ne sont pas facilement disponibles en pratique (**Barrier-Battut 2013 ; Loomis 2006 ; Hoogewijs et al. 2010**).

1.3.2.4.5. Deuxième dilution (Apport du glycérol)

1.3.2.4.6. Deuxième descente de température de +22°C à +4°C.

1.3.2.4.7. Mise en paillettes

1.3.2.4.8. Congélation proprement dite (de +4°C à -196°C)

1.3.2.4.9. Contrôle de qualité

Etapes de congélation de la semence équine

Température	Etapes	Durée/vitesse/milieu
+37°C	RECOLTE-FILTRATION	INRA96 (Lait écrémé)
	CONCENTRATION	
	DILUTION	
	OBSERVATION	
+22°C	REFROIDISSEMENT A +22°C	10min
	CENTRIFUGATION	10min à 600xg
	REDILUTION	INRA-FREEZE Ajustement à 100 millions/ml

+4°C	EQUILIBRATION (Refroidissement à +4°C)	1H20min
	MISE EN PAILLETES	Conditionnement
+4°C à -196°C	CONGELATION	2min30 à (-60°C/min)
-196°C	STOCKAGE	Sélection

1.4. Analyse des spermatozoïdes équins

Il existe deux niveaux d'évaluation de la qualité spermatique à savoir les examens de première intention et les examens de seconde intention. Les premiers sont des tests de routine ne nécessitant que peu de matériel et qui sont réalisables par le vétérinaire inséminateur dans son exercice en clientèle. Les seconds sont des tests plus approfondis et plus appliqués dans l'étude du sperme, et qui sont réservés aux centres spécialisés.

1.4.1. Analyses conventionnelles

Ils sont communément appelés le spermogramme et le spermocytogramme. Ils sont couramment effectués avant chaque insémination artificielle et avant toute congélation ou réfrigération de la semence.

1.4.1.1. Le spermogramme

Le spermogramme est une étude stricte du sperme qui revêt le volume, l'aspect, l'odeur, le pH, la mobilité des spermatozoïdes, le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur vitalité. Dans la section suivante il ne sera fait mention que des éléments les plus importants à savoir la mobilité et la numération.

1.4.1.2. L'examen microscopique de la mobilité

C'est un examen réalisé sur une platine chauffante (37°C) pour éviter le ralentissement des spermatozoïdes causé par leur refroidissement. Cette analyse doit être effectuée rapidement après le prélèvement. Il existe deux niveaux d'observation microscopique de la mobilité spermatique, à savoir la mobilité massale et la mobilité individuelle.

L'examen de la mobilité massale est l'observation des mouvements de réunions et de dispersion des spermatozoïdes sur une goutte de sperme mise sur une lame au grossissement La notation se fait sur une grille de 0 à 5.

L'examen de la mobilité individuelle est l'observation d'une goutte de sperme placée entre lame et lamelle au fort grossissement 40 afin d'apprécier la mobilité progressive.

Le but de ce test est de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles ainsi que la proportion de spermatozoïdes fléchant c'est-à-dire qui traversent le champ rapidement en ligne droite. Une semence de bonne qualité comporte 70% de spermatozoïdes fléchants.

L'analyse de la mobilité spermatique par microscopie optique demeure un examen subjectif, même si l'erreur est réduite en confiant toujours la lecture au même opérateur expérimenté.

1.4.1.3. La numération

La numération est la détermination du nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat. Le sperme est dilué dans un liquide hypertonique comme le chlorure de sodium à 3% pour immobiliser les spermatozoïdes, cette dilution est réalisée dans un tube capillaire gradué (mélangeur de Potain). La dilution est faite par apport à la concentration observée lors de l'examen microscopique, elle est soit 1/100ème ou 1/200ème.

Les spermatozoïdes sont dénombrés grâce à cellule hématimétrique dite de Thoma ou de Mallassez. Une goutte est déposée entre lame et lamelle et l'observation au grossissement 40 et les spermatozoïdes sont dénombrés dans les quatre carrés extérieurs et dans un des carrés intérieurs. La concentration est donnée par la formule suivante :

$$\text{Equation 1: } N = n \times V \times (1/d) \times 50000$$

$$\text{Equation 2: } N = (\text{moyR1-5}) \times V \times 100 \times 250 \times 1000$$

Légende : (N: nombre spz /éjaculat - n : somme R1-5 V : volume de fraction spermatique (ml) d : dilution).

1.4.1.4. Evaluation par utilisation du spectrophotomètre

L'acquisition d'un spectrophotomètre (**Figure 7**) est justifiée pour les praticiens spécialisés ou les grands haras dans l'espèce équine, surtout quand l'insémination artificielle est utilisée. Cette technique mesure la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et en détermine la concentration. L'estimation de la concentration en spermatozoïdes d'un éjaculat par mesure de la densité optique doit être considérée comme assez juste et utilisable en routine pour la préparation de doses d'insémination, mais pouvant être soumise à des biais de mesure (**Allimant 2010**).



Figure 7: photomètre Mini tube avec cuvette remplie en sperme (John Dascanio. 2014).

1.4.1.5. Le spermocytogramme

Il s'agit de l'appréciation de la morphologie des spermatozoïdes. La lecture s'effectue sur un frottis coloré. Plusieurs anomalies sont rencontrées et classées en anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire (persistance gouttelette cytoplasmique) et du flagelle. La lecture de cent spermatozoïdes est effectuée au grossissement 40 pour obtenir le pourcentage de spermatozoïdes normaux et anormaux dans la semence.

Un sperme équin est fécondant lors d'un spermocytogramme n'excédant pas 20 à 30 % d'anomalies. L'application de ce seuil est importante lorsque la semence est destinée à la congélation et doit garder un pouvoir fécondant après décongélation.

1.4.2. Analyses non conventionnelles

1.4.2.1. Analyse de la mobilité assistée par ordinateur

Le système CASA est une méthode d'analyse de sperme informatisée qui permet d'obtenir des informations objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement. Le système détecte les mouvements des spermatozoïdes et suit chaque spermatozoïde séparément dans le temps et l'espace.

Les paramètres pouvant être calculés avec cette technique sont nombreux :

- le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (**MOT** : Total SpermatozoalMotility)
- le pourcentage de mobilité progressive (**PMOT** : Progressive SpermatozoalMobility)
- le pourcentage de spermatozoïdes fléchants (dont la trajectoire a des caractéristiques supérieures à une vitesse et une linéarité de mouvement prédéfinie)
- l'amplitude de mouvements latéraux de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement (**ALH**: Amplitude of Lateral Head Displacement)

- la vitesse moyenne de déplacement linéaire (**VSL** : Straight-Line Velocity)
- la vitesse curviligne (**VCL** : Curvilinear Velocity) c'est-à-dire la vitesse mesurée sur la distance totale parcourue
- la fréquence des rythmes de croisements des trajectoires (**BCF** : Beat Cross Frequency)
- la moyenne des déplacements angulaires (**MAD** : Mean Angular Displacement).

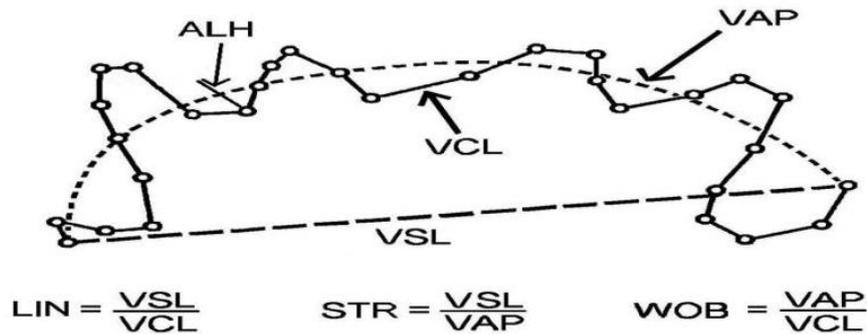


Figure 8 : Les paramètres cinétiques du spermatozoïde

1.4.2.2. Analyse par cytométrie de flux

L'application de la cytométrie en flux minimise, en partie, plusieurs difficultés d'analyse rencontrées. La cytométrie en flux est une approche automatisée capable de mesurer la quantité d'un ou de plusieurs marqueurs fluorescents associés avec la cellule de manière non biaisée. Cet appareil offre des propriétés incomparables de précision, de sensibilité, de rapidité et permet l'analyse multiparamétrique sur un nombre de cellules statistiquement approprié (Cordelli et al, 2005). De plus, la découverte d'une variété de fluorochromes et de composants conjugués à une sonde fluorescente rend possible une grande gamme d'analyses pour l'évaluation de la semence à des niveaux biochimiques, ultra structuraux et fonctionnels (Gillan et al, 2005).

1.4.2.2.1. Viabilité ou intégrité de la membrane plasmique

Ce paramètre est également mesurable par le cytomètre en flux à l'aide de plusieurs colorants tel que l'iodure de propidium et le fluorochrome SYBR 14.

Le cytomètre en flux distingue comme le microscope optique, 2 sous-populations de spermatozoïdes :

- Les spermatozoïdes verts : membrane plasmique intègre, spermatozoïde vivant.

- Les spermatozoïdes rouges : membrane plasmique lésée, spermatozoïde mort.

De plus, nous savons depuis 1995 qu'une 3^{ème} sous-population de spermatozoïdes dit « Moribonds », sont également visibles à la microscopie à fluorescence. (**GARNER AND JOHNSON, 1995**). Avec la cytométrie en flux, les spermatozoïdes colorés à la fois de rouge et de vert sont inclus dans les spermatozoïdes morts

1.4.2.2.2. Statut acrosomique

L'évaluation du statut acrosomial se réalise via les mêmes fluorochromes que ceux utilisés par la microscopie à fluorescence. Nous allons rappeler brièvement ces tests et expliquer les quelques différences observées avec la microscopie à fluorescence.

La lectine PNA liée à la fluorescéine FITC est un marqueur du statut acrosomial. Ensembles, elles se fixent à la membrane externe de l'acrosome. Dans le cas de la microscopie à fluorescence, les spermatozoïdes sont fixés et perméabilisés avec de l'éthanol. Le couple PNA-FITC rentre alors dans les gamètes et colore en vert la cellule lorsque l'acrosome est intact. Dans le cas de la cytométrie en flux, aucune fixation n'est nécessaire et la membrane plasmique du spermatozoïde reste imperméable au couple PNA/FITC. Ainsi, s'ils colorent le spermatozoïde en vert c'est que la réaction acrosomique a eu lieu, car des fragments de la membrane acrosomiale leur seront accessibles. (**PEÑA ET AL., 1999**)

On les associe la plupart du temps avec un fluorochrome évaluant l'intégrité membranaire comme l'iodure de propidium, permettant ainsi de différencier les spermatozoïdes vivants (IP négatif), des spermatozoïdes morts (IP positif).

Cependant, l'association de ces fluorochromes ne marque pas toujours tous les spermatozoïdes, par exemple ceux ayant une membrane plasmique et un acrosome intact seront incolores. Le cytomètre en flux va alors les considérer comme des particules non spermatiques et les exclure des résultats statistiques.

Pour pallier à ce défaut, un fluorochrome spécifique des cellules a été ajouté dans de nombreuses études. On peut citer par exemple l'utilisation du fluorochrome SYTO, marqueur de l'acide nucléique, perméable à la membrane plasmique, il va fixer l'ADN nucléaire et mitochondrial, ainsi que l'ARN.

Il permet de marquer positivement les cellules possédant une membrane plasmique intacte (SYTO +, IP -) et de les différencier des débris cellulaires (SYTO - et IP -) ou des cellules à la membrane lésée (SYTO -, IP +).

Il existe plusieurs sous-types de fluorochrome SYTO, certains vont émettre une fluorescence verte au contact de l'ADN (SYTO 9 à 25), certains une fluorescence orange (SYTO 80 à 86),

d'autres une fluorescence rouge (SYTO 61 à 64), ou encore une fluorescence bleue (SYTO 40 à 45).

1.4.2.2.3. Statut d'oxydation (Stress Oxydatif et radicaux oxygénés libres)

Le processus de cryoconservation peut être à l'origine de la production de radicaux oxygénés libres notamment, responsables de dommages sur la cellule (**Calamera, fernandez et al, 2001**) :(**Neild, Gadella et al, 2003**). La présence de radicaux libres au sein du spermatozoïde a été corrélée à une diminution de la mobilité (**Baumber, Ball Etat, 2000**), à une diminution de la capacité de fusion avec l'ovocyte (**Aitken, 1989**) et à de l'infertilité (**Agarwal, Makker et al, 2008**). Les EOR sont donc des molécules qui sont pour la plupart très réactives avec les différents composants cellulaires. Elles jouent des rôles physiologiques indispensables au dialogue intracellulaire, à la régulation de l'apoptose. Des niveaux physiques de ROS sont requis pour les fonctions normales des spermatozoïdes telles que l'hyperactivation, la capacitation, la réaction à l'acrosome et la fusion des ovocytes. Cependant, en cas d'excès, les ROS peuvent endommager l'ADN, inhiber la fusion spermatozoïdes-ovocytes et réduire la motilité des spermatozoïdes (**Awda, 2009**). Le stress oxydatif se produit dans les spermatozoïdes lorsque les niveaux intra et extra cellulaires de ROS dépassent la capacité antioxydante disponible. Les spermatozoïdes ont une quantité limitée de cytoplasme cellulaire dans lequel se trouvent des enzymes de récupération, ce qui rend les spermatozoïdes très sensibles aux dommages causés par les ROS (**Henkel, 2005**).

Chapitre 2 :

Matériel et méthodes

2.1. Problématique et objectifs

L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet de la centrifugation avec et sans coussin sur la qualité de la semence équine, donc avoir la meilleure centrifuge qui permette de garder une bonne mobilité et vitalité et concentration des spermatozoïdes.

2.2. Lieu de l'étude

L'étude expérimentale a été réalisée au niveau de la Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores de l'Université BLIDA1 (PBRC/U.BLIDA1).

2.3. Animaux

Cinq chevaux, choisis parmi les étalons du Haras Hocine el Mansour Mostaganem et de la ferme équestre SAHEL HADJOUT, dénommés : MAROUAN DE MONLOT, AURHEIN, OMBIORIX, DZIRI D'HEM & QUOTB ont été utilisés. Les cinq sont des pur-sang arabes afin de lutter contre les variations raciales, Leur fertilité était connue. Ces étalons ont été récoltés à raison de 4 récoltes par étalon pour totaliser vingt éjaculats (n=20) utilisés dans notre étude.

Tableau 4: Identification des échantillons (chevaux)

Nom	Race	Age	Etat de santé	Appareil uro-génital	Fertilité
MAROUAN DE MOMLOT	Pur-sang Arabe	9ans	Bon	RAS	Connue
OMBIORIX	Pur-sang Arabe	6ans	Bon	RAS	Connue
AURHEIN	Pur-sang Arabe	8ans	Bon	RAS	Connue
DZIRI D'HEM	Pur-sang Arabe	4ans	Bon	RAS	Connue
QUOTB	Pur-sang Arabe	9ans	Bon	RAS	Connue

2.4. Récolte

Avant la récolte, une étape d'excitation de l'étalon s'impose en faisant venir une jument en chaleur. Une fois qu'il l'a sentie et qu'il est prêt, on fait grimper le cheval non pas sur la jument, qui est mise à l'écart, mais sur le mannequin.

La récolte est réalisée dans une salle de monte. On se sert d'un mannequin, on appelle ça un "fantôme". Ça ressemble un peu à un cheval d'arçon, ça imite la forme du corps d'une jument. Détournant alors sa verge, et l'insère dans le vagin artificiel. Le sperme est recueilli dans la fiole. Cela dure quelques secondes, l'étalon est ensuite remis au box.

Nous travaillons toujours en équipe, de trois ou quatre soigneurs, jamais seul. La monte demande un effort pour l'étalon, donc il lui faut petite séance d'échauffement. Le lui fait faire des tours de manège à la longe pendant une quinzaine de minutes.

Il faut aussi préparer le matériel. Utilisant un vagin artificiel, lubrifié, et chauffé avec de l'eau. Au bout, on fixe une fiole pour recevoir la semence, Manchon protecteur pour vagin, et Mannequin sur tapis en caoutchouc anti dérapant.



Figure 09: La récolte de sperme sur mannequin.

2.5. Filtration du sperme

Immédiatement après le prélèvement, la semence est rapidement transportée au laboratoire pour réduire les risques d'altération liée à l'action de la lumière ou à un choc thermique (température ambiante trop froide ou trop chaude).

La semence était filtrée dans un récipient gradué sur un papier filtre ou une double gaze stérile pour en retirer les impuretés et le « gel » qui contiens le liquide séminal hautement toxique pour les SPZ en cryoconservation (**jasko DJ., 1991**)

L'ensemble est préalablement chauffé à l'étuve jusqu'à 37 °C pour éviter tout éventuel choc thermique. Le volume de l'éjaculat filtré était ensuite évalué puis aliquotésur 9 tubesCorning de 50 ml préalablement placées dans une étuve à 37°C. Ces 9 tubes seront destinés aux huit protocoles de centrifugation évalués dans notre étude.



Figure 10 : Filtration de l'éjaculat

2.6. Evaluation initiale

2.6.1. Examen macroscopique

L'évaluation de la semence doit être réalisée de manière méthodique et minutieuse par une personne expérimentée et dans un laboratoire correctement équipé. Le volume de la fraction sans gel, la couleur et l'aspect macroscopique sont notés.

2.6.2. Examen microscopique

2.6.2.1. Détermination de la concentration

La concentration en spermatozoïdes par mL de sperme était déterminée en utilisant un photomètre Mini tube(**SDM1**) calibré sur la semence équine. Où un échantillon de sperme bien mélangé est chargé au niveau de l'extrémité de la microcuvette en utilisant une pipete jetable, la surface externe de la cuvette est bien nettoyée pour éliminer tout excès du sperme et

la micro-cuvette est insérée par la suite au niveau de l'appareil, une fois le tiroir est fermé la lecture et le calcul de la concentration sont activés.

2.6.2.2. Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes

2.6.2.2.1. La mobilité massale : Dans un premier temps, le sperme est observé au faible grossissement (x10) sur platine chauffée à 37°C et au contraste de phase négative afin d'apprécier de façon subjective la mobilité massale, c'est-à-dire les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes. Une note variant de zéro à cinq est attribuée par l'observateur (Tableau 05).

Tableau 5: Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992)

Note	Interprétation
0	Pas de mouvements
1	Spermatozoïdes en mouvements mais pas de mouvements d'ensemble
2	Ebauche de mouvements d'ensemble circulaires
3	Mouvements d'ensemble : cercles centrés sur eux-mêmes
4	Mouvements d'ensemble : vagues rondes en mouvement
5	Mouvements d'ensemble intensifiés

2.6.2.2.2. La mobilité individuelle: Dans un second temps, le sperme est examiné entre lame et lamelle, au fort grossissement (x400) sur platine chauffée à 37°C et au contraste de phase négative, afin d'apprécier la mobilité individuelle. Le sperme doit être relativement peu concentré, afin que chaque spermatozoïde soit individualisable.

Tableau 6: Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992)

Note	Interprétation
0	Pas de mouvement
1	Mouvements oscillants légers sans progression
2	Mouvements oscillants et progression faible et intermittente
3	Mouvements oscillants fléchant et progression lente régulière
4	Mouvements fléchant et progression régulière vers l'avant
5	Mouvements fléchant avec progression rapide vers l'avant

2.7 Première dilution

Le dilueur utilisé est l'INRA96®, un dilueur de commerce fabriquée par IMV-Technologies, Aigle, France. Ce dilueur est ajouté à la semence dans chacun des 9 tubes précédents pour une dilution de 1 :3 c'est à dire rajouter 3 volume de dilueur pour 1 volume de sperme.

2.8. Descente de température à +22°C

Mettre les tubes contenant le sperme dilué dans un bain marie à 22 °C pendant 10 min.

2.9. Centrifugation

Après dilution du sperme brut avec INRA 96 et refroidissement à +22°C, les neuf (09) tubes de semence diluée préparés précédemment sont centrifugés avec un appareil HeraeusMultifuge 3 L-R (KendroLaboratoryProducts, Waltham, USA) à température ambiante (+22°C) selon les huitprotocole de centrifugation suivants :

1. Tube témoin non centrifugé.
2. 600xg pendant 10min sans coussin.
3. 600xg pendant 20min sans coussin.
4. 800xg pendant 10min sans coussin.
5. 800xg pendant 20min sans coussin.
6. 1000xg pendant 5min avec coussin.
7. 1000xg pendant 10min avec coussin.
8. 1200xg pendant 5min avec coussin.
9. 1200xg pendant 10min avec coussin.

Le tube 1 non centrifugé est considéré comme un témoin positif dans notre étude qui servira pour l'évaluation de la concentration sans perte des spermatozoïdes et l'évaluation de leur qualité après congélation-décongélation sans effet de la centrifugation.

Les tubes de 2 à 5 serviront à étudier l'effet de la force centrifuge (600 versus 800) et le temps de centrifugation (10min versus 20min) pour une vitesse inférieure à 1000xg ne nécessitant pas l'ajout d'un coussin.

Les tubes de 6 à 9 serviront à étudier l'effet de la force centrifuge (1000 versus 1200) et le temps de centrifugation (5min versus 10min) pour une vitesse supérieure ou égale à 1000xg qui nécessite l'ajout d'un coussin.



Figure11: Centrifugation a 600 x g pendant 10 min



Figure 12 - Coussin de centrifugation utilisé « MaxiFreeze®, IMV Technologies ».

2.10 Deuxième dilution (Redilution)

Une fois le culot riche en spermatozoïdes obtenu après l'étape de centrifugation, il est dilué avec le milieu de congélation (INRA-FREEZE, IMV-Technologies, Aigle, France). Le glycérol est l'agent cryoprotecteur le plus utilisé pour congeler du sperme. La concentration chez le cheval ne devrait idéalement pas dépasser les 3,5 % du volume total, dans notre milieu utilisé le taux du glycérol est de 2.5%.

Calcule du volume du 2eme dilueur à rajouter :

Rajouter le ½ Vol de D2 théorique par pot

VD2 théorique par pot= $N_{pot}/100 \cdot 10^6 = V_{sperme}/pot \cdot C_{initiale}$

Remise en suspension doucement à la main

2.11. Equilibration

Les tubes ont ensuite été équilibrés dans une vitrine réfrigérée à 4 ° C pendant 2 heures.

2.12. Mise en paillettes

Après équilibration, la semence diluée est conditionnée dans des paillettes moyennes de 0,5 mL et soudées avec une machine à remplir (MRS I dual V2) après avoir été identifier par une imprimante (Domino A420i).



Figure 13: Machine à remplir et a souder MRS I, IMV-Technologies

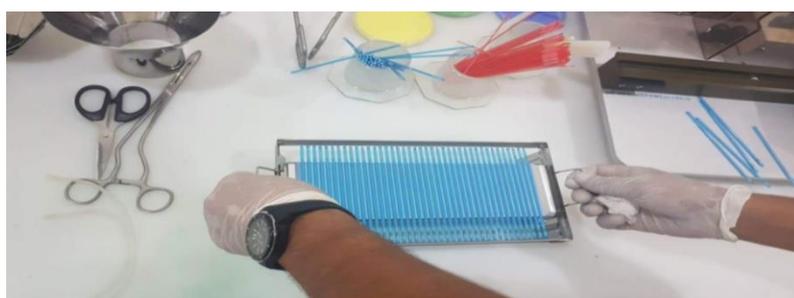


Figure 14: Après avoir été remplis les paillettes sont étalées sur des racks

2.13. Congélation et stockage

Les paillettes sont placées horizontalement sur le rack portoir et refroidies dans un congélateur programmable (Mini-Digit-Cool, IMV-Technologies, Aigles, France) qui envoie des vapeurs d'azote pour atteindre -140°C, avec une descente de +4°C à -100°C à la vitesse « 60°C/min » puis jusqu'à -140°C à la vitesse « 20°C/min ».

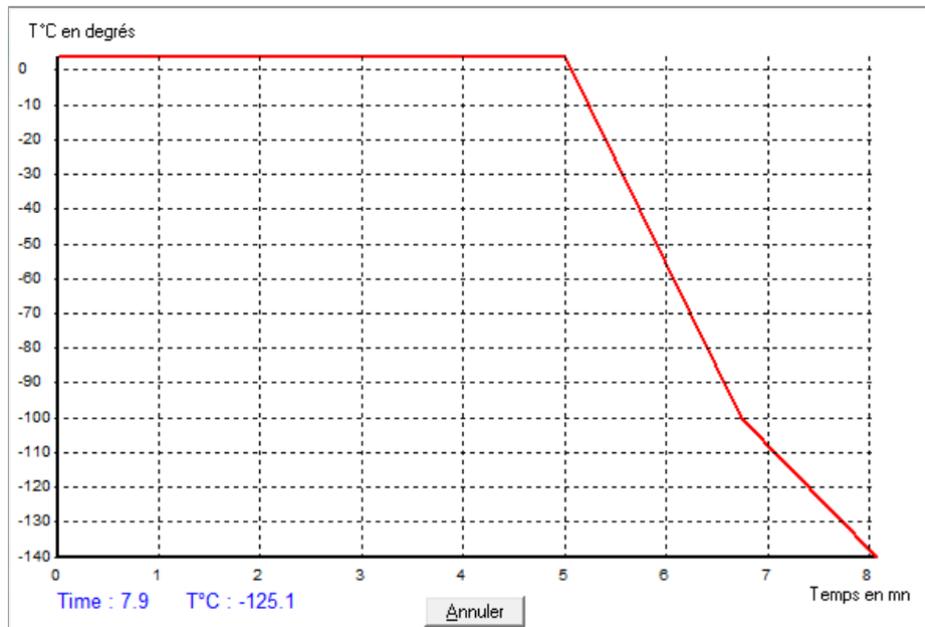


Figure 15 : Courbe de congélation équine (descente de +4°C à -100°C à la vitesse « 60°C/min » puis jusqu'à -140°C à la vitesse « 20°C/min »)

Les paillettes sont ensuite immergées et stockées dans l'azote liquide (-196°C).

On élimine les paillettes qui flottent à cause d'un défaut de remplissage.



Figure 16: A gauche : Récupération des paillettes congelées à -140°C du Mini-Digit Cool. A droite : Immersion des paillettes dans l'azote liquide (-196°C).

Le stockage des paillettes se fait dans des cuves d'azote liquide. Une vérification régulière du niveau d'azote de ces cuves s'impose. Par ailleurs, la température doit toujours y être inférieure à -120°C.

2.14. Décongélation des paillettes

Après au moins 72 heures dans l'azote liquide, les paillettes sont décongelées dans un décongélateur de paillettes à 37°C pendant 30 secondes.

2.15. Evaluation de la fertilité *in vitro*

2.15.1. Analyse de la mobilité par système CASA

Un examen de motilité par système casa Hamilton Thorn Motility Analyzer (HTM, EVOS II) et une chambre d'analyse d'une profondeur de 20 μm (Leja®, LEJA Product B. V. NETHERLANDS) selon la technique décrite par (Varner, *et al.* 1991).

Avant d'être analysé par le système IVOS II la semence a été diluée à la concentration de 25 million spz/ ml au moyen d'une solution tampon commerciale (EAZY BUFFER IMV, AIGLE, France) puis mise en incubation (Cuve MEMMERT) pendant 10 min.

L'analyse de la semence par l'IVOS II a été faite selon le paramétrage technique suivant :

Parameter	Value
Frames acquired	30
Frame rate (Hz)	60
Minimum contrast	60
Minimum cell size (pixels)	6
Minimum static contrast	25
Straightness cut-off (% STR)	75
Average-path velocity cut-off PM ($\mu\text{m/s}$, VAP)	50
VAP cut-off static cells ($\mu\text{m/s}$)	20
Cell intensity	100
Static head size	0.55–2.04
Static head intensity	0.45–1.70
Static elongation	11–99

Figure 17 : Paramétrage technique de l'analyseur HT-IVOS II pour l'analyse des spermatozoïdes équiens

Parmi la totalité des paramètres analysés par ce système, nous avons retenu pour notre étude, les deux paramètres les plus corrélés à la fertilité :

- ✓ Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles (**MOT**)
- ✓ Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (**PROG**)

2.15.2. Analyse spermatique par cytométrie de flux

Un cytomètre Guava-EasyCyte HT Plus (Millipore, USA) a été utilisé pour notre étude, afin d'évaluer deux paramètres spermatiques à savoir : la viabilité couplée à l'intégrité acrosomique et le statut oxydatif.

Cet appareil a l'avantage de fonctionner avec des kits rapides prêts à l'emploi sous forme de microplaques contenant des fluorochromes dosés dans les puits. Après plusieurs étapes de dilution et préparation de la semence, cette dernière est ajoutée aux fluorochromes, incubée puis directement chargée et analysée par le cytomètre.

Les deux kits utilisés dans notre étude, permettent d'évaluer :

- ✓ Le pourcentage des spermatozoïdes vivants avec acrosome intact « Fluorochromes : FITC/PNA/PI » (**Viab-Acro**)
- ✓ Le pourcentage des spermatozoïdes vivants oxydés (**ROS**) en mesurant le taux des radicaux libres intracellulaires suivants : H₂O₂, HOCl, ONOO⁻.

2.16. Collecte des données et analyse statistique

Les données brutes ont été soit directement saisies sur Excel (pour les analyses manuelles « concentration » et « notes de mobilité massale ») ou récupérées sur une table Excel à partir des deux systèmes d'analyse automatique de la semence utilisés (CASA et Cytomètre en flux).

Microsoft Excel a été utilisé pour la tabulation ainsi que le graphisme.

Le logiciel SPSS a été utilisé pour :

- ✓ Effectuer les statistiques descriptives (moyenne, écart type, erreur standard de la moyenne).
- ✓ Tester la distribution normale des séries statistiques.
- ✓ La transformation logarithmique des données si la distribution n'est pas normale.

La comparaison des moyennes entre les variables étudiées par analyse de variance (ANOVA) suivie des tests de Tukey et Duncun (Post hoc) afin d'effectuer la comparaison multiple et définir les différences significatives entre les diverses classes de données.

Le seuil de significativité a été défini à 5% ($p < 0.05$; $n = 18$) et les résultats ont été présentés sous forme de moyenne \pm SEM.

1. Résultat :

La centrifugation est l'une des procédures courantes lors du traitement de la semence équine. Actuellement, la centrifugation est obligatoire lorsque l'on soumet un éjaculat équin à la cryoconservation. Des approches alternatives telles que la collecte fractionnée ou l'utilisation des filtres à sperme ne sont pas aussi efficaces (**Sieme et al., 2004, Alvarenga et al., 2010**).

L'influence de la centrifugation sur les spermatozoïdes n'est pas complètement élucidée, ou du moins le principe par lequel les spermatozoïdes sont influencés en raison de la centrifugation reste incertain. Une première théorie repose sur des altérations de la forme des cellules soumises à la centrifugation. À l'aide d'un microscope à force atomique, installé dans une grande centrifugeuse, Van Loon et ses collaborateurs (2009) ont pu visualiser les ostéoblastes de souris pendant la centrifugation. Les ostéoblastes ont été nettement réduits en hauteur lors d'une faible centrifugation. Bien que la structure d'un spermatozoïde soit complètement différente de celle d'un ostéoblaste, en particulier en raison de la réduction spectaculaire du cytoplasme d'un spermatozoïde mature, il est probable que la centrifugation à des vitesses beaucoup plus élevées affecte également la structure d'un spermatozoïde. Un perfectionnement supplémentaire de cette technique par Van Loon et al. (2009) et des recherches sur différents types de cellules sont nécessaires pour décrire précisément ce qui se passe avec les spermatozoïdes lors de la centrifugation.

Une autre explication pourrait agir au niveau de la membrane spermatique. Comme toute membrane plasmique, une membrane spermatique est constituée d'une bicouche phospholipidique liquide (**Amann et Pickett, 1987**). Différents domaines de la membrane plasmique contiennent tous différentes concentrations et distributions de particules intra membraneuses, avec des fonctions spécifiques différentes dans le processus de fécondation (**Flesch et Gadella, 2010**). Ces domaines subissent une redistribution suite à la capacitation (**Gadella et al., 1994**). Peut-être que la centrifugation agit sur cette couche lipidique liquide et perturbe à ce titre sa fonction en réarrangeant la distribution des particules intra membraneuses. Des forces de centrifugation excessives induisent encore plus de dommages et provoquent un culot de sperme compact difficile à remettre en suspension (**Webb et Dean, 2009**).

Concentration de sperme équin et plasma séminal pendant sa conservation.

Il est généralement admis que la semence équine doit être diluée au moins 3 : 1 afin de diluer le plasma séminal à 25% (**Varner et al., 1988**). De plus, pour une conservation optimale, il est conseillé de diluer le sperme à une concentration de 25 à 50 * 10⁶ / mL (**Varner et al., 1987 ; Jasko et al., 1991, 1992**). Si la concentration initiale de spermatozoïdes est trop faible pour utiliser une dilution appropriée et maintenir une concentration acceptable en même temps, la centrifugation est vivement conseillée.

Les protocoles de centrifugation standard pour le sperme équin consistent en une force centrifuge de 400 à 600xg pendant 10 à 15 minutes. Le plus utilisé étant de 600xg pendant 10min. (**Loomis, 2006 ; Aurich, 2008**), et permet une récupération de 75% des spermatozoïdes (25% de perte) après élimination du surnageant et remise en suspension du culot de sperme.

Avant la centrifugation, le sperme doit être dilué au moins à un rapport de 1 : 1. Le plasma séminal agit comme une épée à double tranchant sur la fertilité : il est néfaste pour les spermatozoïdes des étalons pendant la conservation, mais d'un autre côté, il raccourcit la durée de l'endométrite post-inséminatoire provoquée par la réponse inflammatoire déclenchée par les spermatozoïdes (**Troedsson et al., 2000 , 2005**).

Avec la plupart des dilueurs, il est conseillé de conserver 5 à 20% de plasma séminal après la centrifugation (**Jasko et al., 1991**). Cependant, l'intégrité de l'ADN était mieux maintenue en l'absence totale de plasma séminal, tandis que les dommages à l'ADN augmentaient au fur et à mesure que les niveaux plasmatiques séminal augmentaient (**Love et al., 2005**).

L'effet de l'élimination du plasma séminal chez les étalons dont le sperme répond mal au refroidissement (appelés les étalons de « mauvais refroidissement ») reste un sujet de discussion. **Brinsko** et ses collaborateurs (2000a) ont constaté que l'élimination partielle du plasma séminal après la centrifugation avait un effet positif sur la motilité des spermatozoïdes après 48 stockage refroidi. Une étude plus récente, utilisant plus d'étalons, n'a démontré aucun effet de l'élimination du plasma séminal des étalons « à faible refroidissement » sur la motilité après un stockage refroidi. Seul le pourcentage de spermatozoïdes à membrane intacte était plus élevé pour les échantillons dépourvus de plasma séminal (**Barrier-Battut et al., 2010**).

Année	Auteur	Espèce	Paramètre Spermatique	Le protocole centrifugation Avec ou sans coussin	Taux de récupération
Mai 2011	M.Nicolas : M. Alvarez: E. Anel : F.Martínez :	Ours bruns	TM(%)70.6±3.2 PM(%)28.8±2.3 VCL(µm/s)95.5±4.7 VSL(µm/s)32.1±1.9	600xg pdt 6 min Sans coussin	65 % Des spermatozoides récupère
Juin 2010	Maarten Hoogewijs	cheval	Volume 18.3 _ 6.5 TM(%) 75.2 _ 12.8 PM(%) 40.7 _ 10.4 Concentration (_106/mL) 479.4 _ 203.6	600xgpdt 10 min 600xg pdt 5 min 1200xg 5min 1800xg à 5 min 2400xg à 5 min Sans coussin	78% de spz 60% de spz 77 % de spz 92.6% de spz 97.9%de spz
2012	S.B. BLISS	Cheval	TM(%) 86 PM(%) 54 VCL 232 STR 65 SMI 69	1000xg pdt 20 min Avec coussin De volume 1 ml 3.5ml	91% de spz 89% de spz
2014	Dr .ponthier	Cheval		1000xg pdt 20 min avec coussin 600xg pdt 10 min sans coussin	Est de 90 % De spz Est de 60%
2020	G. Decuadro-Hansen, G. Delhomme,	Cheval	TM(%) 39 % PM(%) 28 % VAP (mm/sec) 73	600xg pdt 10 min sans coussin	77% de spz

	Marianne Vidament		TM(%) 45% PM(%) 29% VAP (mm/sec) 78	1000xg pdt 20 min Avec coussin	99 % des spz
--	------------------------------	--	--	---	---------------------

Tableau7 : présent effet de protocole de centrifugation avec ou sans coussin sur le taux de récupération et les paramètres spermatiques.

2. Discussion :

Centrifugation du sperme équin.

Normalement, un taux de récupération des spermatozoïdes de 75%, obtenu après centrifugation conventionnelle (600xg pendant 10min) est rapporté (**Loomis, 2006; Aurich, 2008**). Des résultats contradictoires sont cependant également présents dans la littérature, avec des taux de récupération dépassant 98% en utilisant le même protocole de centrifugation (**Weiss et al., 2004**). Des pertes d'environ 25% sont convenues, mais peuvent être encore réduites en augmentant le temps et la force de centrifugation. Cependant, cela entraîne généralement une diminution de la qualité du sperme (**Loomis, 2006**).

En effet, les techniques de centrifugation sur coussin ont déjà été décrites comme une solution pour réduire les dommages causés aux spermatozoïdes tout en maximisant le taux de récupération des spermatozoïdes. Une variété de solutions denses jouant le rôle de coussin ont été décrites.

En 1984, **Cochran** et ses collaborateurs ont décrit une technique où une solution dense a été déposée en dessous du sperme dilué au fond d'un tube de centrifugation. Cette solution dense pourrait servir de coussin aux spermatozoïdes lors de la centrifugation (**Cochran et al., 1984**). Initialement, un coussin de glucose-EDTA a été utilisé et remplacé plus tard par un coussin d'extension contenant du jaune d'œuf supplémenté avec 4% de glycerol (**Amann et Pickett, 1987**). Tous ces rapports initiaux, à l'exception de Volkman et van Zyl (1987), ont montré un effet bénéfique sur la motilité des spermatozoïdes après centrifugation. Ensuite, une solution d'iodixanol à 60% a été placée sous le sperme dilué, suivie d'une centrifugation pendant 25 min à 1000xg. Ce coussin empêchait les spermatozoïdes de se compacter au fond du tube malgré la force centrifuge élevée utilisée et produisait 30% de spermatozoïdes vivants normaux en plus (**Revell et al., 1997**).

Plus tard, des rendements élevés de sperme après une centrifugation à grande vitesse sans nuire à la qualité du sperme ont été signalés en utilisant 3,5 ml ou 5 ml de liquide coussin dans un tube de centrifugation de 50 ml (**Ecot et al., 2005; Knop et al., 2005**).

Une variante de ces techniques a été décrite dans laquelle un petit volume (30 µL) de solution de coussin est placé au fond d'un tube de centrifugation à tétine spécialement conçu, suivi d'une centrifugation à 400xg pendant 20 min. Cette technique a des rendements de sperme légèrement inférieurs et des caractéristiques de qualité *in vitro* légèrement améliorées, et présente l'avantage supplémentaire de ne pas nécessiter d'aspiration du coussin après la centrifugation (**Waite et al., 2008**).

Alternatives à la centrifugation.

Comme alternative à la centrifugation pour augmenter la concentration de spermatozoïdes et réduire la quantité de plasma séminal, une collecte de sperme fractionné peut être utilisée. En utilisant un vagin artificiel Cracovie ou Missouri à extrémité ouverte modifiée, il est possible de récolter uniquement la fraction riche en spermatozoïdes de l'éjaculat. Un mannequin de récolte automatisé (EquidameR) peut également être utilisé. Cet appareil fournit des échantillons de sperme avec un nombre inférieur de colonies bactériologiques et avec une motilité similaire à celle du sperme recueilli à l'aide d'un vagin artificiel Missouri (**Lindeberg et al., 1999**). Cependant, il est important de réaliser que la collection fractionnée utilisant EquidameR ne correspond pas complètement à la collection fractionnée décrite ci-dessus. La séparation à l'aide de l'EquidameR n'est pas en concordance avec les jets éjaculés par l'étalon, mais est effectuée sur la base d'une séparation de volume ajustée dans les coupelles de collecte de sperme. Une fois qu'une tasse est remplie avec le volume pré-réglé, une tasse suivante est remplie (**Lindeberg et al., 1999**). Les spermatozoïdes provenant de fractions riches en spermatozoïdes avaient une motilité plus élevée 12 h et 24 h après la collecte que les spermatozoïdes provenant d'éjaculats totaux (**Varner et al., 1987**). Cependant, le plasma séminal des fractions riches en spermatozoïdes s'est avéré plus nocif pour la motilité des spermatozoïdes que le plasma séminal des fractions pauvres en spermatozoïdes (**Akcay et al., 2006**), indiquant que la centrifugation peut encore être souhaitable, en particulier pour une conservation prolongée.

En résumé, les pertes de spermatozoïdes peuvent être considérablement réduites en centrifugeant le sperme d'étalon à des forces centrifuges et pendant des durées prolongées par rapport au protocole conventionnel sans altérer la fonction du sperme *in vitro* après cryoconservation. Cela conduit à une augmentation du nombre de doses d'IA produites par éjaculat. Cela peut facilement entraîner deux doses supplémentaires d'IA à partir d'un éjaculat moyen de 10 milliards de spermatozoïdes. Néanmoins, les effets de ces protocoles de centrifugation sur les paramètres cinétiques et d'intégrité membranaire, acrosomique et de l'ADN nécessitent des recherches plus approfondies ainsi que l'impact sur la fertilité *in vivo*.

CONCLUSION

A l'issue de ce travail, il est à conclure ce qui suit :

- ✓ La centrifugation est l'une des procédures courantes lors de la conservation de la semence équine qui est obligatoire lorsque l'on soumet un éjaculat équin à la cryoconservation. Elle provoque des pertes importantes en spermatozoïdes et induit des dommages aux différentes parties et fonctions du spermatozoïde équin.
- ✓ Les pertes de spermatozoïdes peuvent être considérablement réduites en centrifugeant sur coussin le sperme d'étalon à des forces centrifuges élevée et pendant des durées prolongées par rapport au protocole conventionnel sans altérer la fonction du sperme *in vitro* après cryoconservation. Cela conduit à une augmentation du nombre de doses d'IA produites par éjaculat.
- ✓ Néanmoins, les effets de ces protocoles de centrifugation sur les paramètres cinétiques et d'intégrité membranaire, acrosomique et de l'ADN nécessitent des recherches plus approfondies ainsi que l'impact sur la fertilité *in vivo*.

Références bibliographiques

Barone R, Tagand R. 1956. Anatomie des équidés domestiques. Tome second. Splanchnologie et angiologie. Fascicule III. Appareil uro-génital. Péritoine, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, pp. 633-1010.

Baronne R. 2001. Chapitre II : Appareil génital mâle. In : Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie II. Vigot 83-250.

Florence Batellier (chap. 14 et 16), Elisabeth Blesbois (chap. 13 et 15), (Jean-Pierre Brillard (chap. 14, 15 et 17- poules reproductrices), Marina Gorovoum (chap. 14 et 16), (François Héroult (chap.17, palmipèdes gras), Yvan Heyman (chap.6), Guy Perrier (chapt.10), Marie-Claude Rogier-Saderne (chap. 17, palmipèdes gras), Fabrice Savary (chap. 17, faisans) et Xavier Vignon (chap.6). 2005. Reproduction des animaux d'élevage (2ème édition).

Vaissaire J-P. 1977. Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires. Maloine S.A. éditeur. 457p.p81-155.

Delphine, Marie, Ghislaine Fehrenbach. 2003. L'éventration post-castration chez le cheval ; Thèse Présentée à la faculté de médecine de Créteil.

Drion P-V, Beckers J.F, Ectors F, 1993. « Physiologie de la reproduction ». Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire Dumont P., 1997. « Point Vétérinaire ». Vol 28. N°185, Août –Septembre.

Chirent Mylène. 2015. Les alternatives à la castration chirurgicale chez l'étalon ; Thèse Présentée à l'université Claude Bernard – Lyon.

3atalina, M.; Lunetti, P.; Braccia, C.; Armirotti, .; Pisanello, F.; de Vittorio, M.; Zara, V.; Ferramosca, A. Comparative Proteomic Analysis of Proteins Involved in Bioenergetics Pathways Associated with HumanSperm Motility.*Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3000.

4maral, .; Ramalho-Santos, J. Assessment of Mitochondrial Potential: Implications for the CorrectMonitoring of Human Sperm Function. *Int. J. Androl.* **2010**, *33*, E180-E86.

56. Morrell, J.M.; Lagerqvist, .; Humblot, P.; Johannisson, A. Effect of Single Layer Centrifugation on ReactiveOxygen Species and Sperm Mitochondrial Membrane Potential in Cooled Stallion Semen. *Reprod. Fertil.Dev.* **2017**, *29*, 1039-1045.

Agarwal, .; Virk, G.; Ong, C.; Plessis, S.S.D. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J.Mens Health* **2014**, *32*, 1-17.

Aitken, R.J.; Gibb, Z.; Baker, .; Drevet, J.; Gharagozloo, P. Causes and consequences of Oxidative Stress in Spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* **2016**, *28*, 1-10.

Alessandra, F.; Provenzano, S.P.; Montagna, D.D.; Coppola, L.; Zara, V. Oxidative Stress Negatively Affects Human Sperm Mitochondrial Respiration. *Urology* **2013**, *82*, 78-83.

Alvarez, J.G.; Lasso, J.L.; Blasco, L.; Heyner, S.; Caballero, P.P.; Storey, B.T. Centrifugation of Human Spermatozoa Induces Sublethal Damage; Separation of Human Spermatozoa from Seminal Plasma by a Dextran Swim-up Procedure without Centrifugation Extends Their Motile Lifetime. *Hum. Reprod.* **1993**, *8*, 1087-1092.

Ambrosi, G.M.; Lacalandra, G.M.; Iorga, A.I.; De Santis, T.; Mugnier, S.; Matarrese, R.; Goudet, G.; Dell'aquila, M.E. Cytoplasmic Lipid Droplets and Mitochondrial Distribution in Equine Oocytes: Implications on Oocyte Maturation, Fertilization and Developmental Competence after ICSI. *Theriogenology* **2009**, *71*, 1093-1104.

Aurich C. 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* **107**:268-75.

Barth A.D., Oko R.J. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames, Iowa: Iowa State University Press.

Brinsko, S.P.; Crockett, E.C.; Squires, E.L. Effect of Centrifugation and Partial Removal of Seminal Plasma on Equine Spermatozoal Motility after Cooling and Storage. *Theriogenology* **2000**, *54*, 129-136.

Calvert, S.J.; Reynolds, S.; Paley, M.N.; Walters, S.J.; Pacey, . Probing Human Sperm Metabolism Using ¹³C-Magnetic Resonance Spectroscopy. *Mol. Hum. Reprod.* **2019**, *25*, 30-41.

Carvajal G., Cuello C., Ruiz M., Vazquez J.M., Martinez E.A., Roca J. 2004 Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *Journal of Andrology* **25**:389-96.

Choi, Y.H.; Chung, Y.G.; Walker, S.C.; Westhusin, M.E.; Hinrichs, K. In Vitro Development of Equine Nuclear Transfer Embryos: Effects of Oocyte Maturation Media and Amino Acid Composition During Embryo Culture. *Zygote* **2003**, *11*, 77-86.

Cochran J.D., Amann R.P., Froman D.P., Pickett B.W. 1984. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* **22**:25-38.

Darr, C.R.; Cortopassi, G.A.; Datta, S.; Varner, D.D.; Meyers, S.A. Mitochondrial Oxygen Consumption Is a Unique Indicator of Stallion Spermatozoal Health and Varies with Cryopreservation Media. *Theriogenology* **2016**, *86*, 1382-1392.

Darr, C.R.; Moraes, L.E.; Scanlan, T.N.; Baumber-Skaife, J.; Loomis, P.R.; Cortopassi, G.A.; Meyers, S.A. Sperm Mitochondrial Function Is Affected by Stallion Age and Predicts Post-Thaw Motility. *J. Equine Vet.Sci.* **2017**, *50*, 52-61.

De Pauw I.M.C., Van Soom A., Mintiens K., Verberckmoes S., de Kruif A. 2003 In vitro survival of bovine spermatozoa stored at room temperature under epididymal conditions. *Theriogenology***59**:1093-107.

De Riccardis, L.; Rizzello; Ferramosca, Urso, E.; de Robertis, F.; Danieli, A.; Giudetti, A.M.; Trianni,G.; Zara, V.; Maffia, M. Bioenergetics Profile of Cd4(+) T Cells in Relapsing Remitting Multiple SclerosisSubjects. *J. Biotechnol.* **2015**, *202*, 31-39.

Ecot P., Decuadro-Hansen G., Delhomme G., Vidament M. 2005.Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing.*Animal Reproduction Science* **89**:245-8.

England, G. *Fertility and Obstetrics in the Horse*; John Wiley Sons: Hoboken, NJ, USA, 2008; pp. 200-211.

Evenson D.P., Wixon R. 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility.*Theriogenology***65**:979-91.

Ferramosca, Focarelli, R.; Piomboni, P.; Coppola, L.; Zara, V. Oxygen Uptake by Mitochondria inDemembranated Human Spermatozoa: A Reliable Tool for the Evaluation of Sperm Respiratory Efficiency.*Int. J. Androl.* **2008**, *31*, 337-345.

Ferramosca, Zara, V. Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation.*Biomed.Res. Int.* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/902953.

Garner D.L., Johnson L.A. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide.*Biology of Reproduction* **53**:276-84.

Ghaleno, L.R.; Valojerdi, M.R.; Janzamin, E.; Chehrazi, M.; Sharbatoghli, M.; Yazdi, R.S. Evaluation ofConventional Semen Parameters, Intracellular Reactive Oxygen Species, DNA Fragmentation andDysfunction of Mitochondrial Membrane Potential after SemenPreparation Techniques: A FlowCytometric Study. *Arch. Gynecol. Obs.* **2014**, *289*, 173-180.

Gibb, Z.; Aitken, R.J.Recent Developments in Stallion Semen Preservation.*J. Equine Vet. Sci.* **2016**, *43*, S29-S36. 20. 20.

Gibb, Z.; Sarah, R.L.; Robert, J.A.The Paradoxical Relationship between Stallion Fertility and OxidativeStress1.*Biol. Reprod.***2014**, *91*, doi:10.1095/biolreprod.114.118539.

Gil M.C., Garcia-Herreros M., Baron F.J., Aparicio I.M., Santos A.J., Garcia-Marin L.J. 2009.Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen.*Theriogenology***71**:254-63.

Giuseppina, M.; Chiriaco, M.S.; Primiceri, E.; Dell' Aquila, M.E.; Ramalho-Santos, J.; Zara, V.; Ferramosca, A.; Maruccio, G. Sperm Selection in Assisted Reproduction: A Review of Established Methods and Cutting-Edge Possibilities. *Biotechnol.Adv.* **2019**, doi:10.1016/j.biotechadv.2019.107498.

Gravance, C.G.; Garner, D.L.; E Ball;Assessment of Equine Sperm Mitochondrial FunctionUsing Jc-1. *Theriogenology***2000**, *53*, 1691-1703.

Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K.; Nolan, J.P. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *J. Androl.* **1990**, *11*, 73-88.

Heitland A.V., Jasko D.J., Squires E.L., Graham J.K., Pickett B.W., Hamilton C. 1996 Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa.*Equine Veterinary Journal* **28**:47-53.

Henkel, R.R.; Schill, W.B. Sperm Preparation for Art.*Reprod. Biol. Endocrinol.* **2003**, *1*, 108.

Hinrichs, K. Assisted Reproductive Techniques in Mares. *Reprod. Domest. Anim.* **2018**, *53*, 4-13.

Jasko D.J., Moran D.M., Farlin M.E., Squires E.L. (1991) Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen.*Theriogenology***35**:1059-67.

Jasko, D.J.; Moran, D.M.; Farlin, M.E.; Squires, E.L. Effect of Seminal Plasma Dilution or Removal on Spermatozoal Motion Characteristics of Cooled Stallion Semen. *Theriogenology***1991**, *35*, 1059-1067.

Jezek, J.; Cooper, K.F.; Strich, R. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants* **2018**, *7*, doi:10.3390/antiox7010013.

Kareskoski ; Reilas, T.; Andersson, M.; Katila, T. Motility and Plasma Membrane Integrity of Spermatozoa in Fractionated Stallion Ejaculates after Storage. *Reprod. Domest. Anim.* **2006**, *41*, 33-38.

Katkov, II.; Mazur, P. Influence of Centrifugation Regimes on Motility, Yield, and Cell Associations of Mouse Spermatozoa. *J. Androl.* **1998**, *19*, 232-241.

Kim, S.; Agca, C.; Agca, Y. Effects of Various Physical Stress Factors on Mitochondrial Function and Reactive Oxygen Species in Rat Spermatozoa.*Reprod. Fertil. Dev.* **2013**, *25*, 1051-1064.

Knop K., Hoffmann N., Rath D., Sieme H. 2005. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability.*Animal Reproduction Science* 2005;**89**:294-7.

Leemans, B.; Stout, T.A.E.; De Schauwer, C.; Heras, S.; Nelis, H.; Hoogewijs, M.; Van Soom, A.; Gadella, B.M. Update on Mammalian Sperm Capacitation: How Much Does the Horse Differ from Other Species? *Reproduction* **2019**, *157*, R181.

Len, J.A.; Beehan, D.P.; Lyle, S.K.; Eilts, B.E. Cushioned Versus Noncushioned Centrifugation: Sperm Recovery Rate and Integrity. *Theriogenology* **2013**, *80*, 648-653.

Len, J.A.; Jenkins, J.A.; Eilts, B.E.; Paccamonti, D.L.; Lyle, S.K.; Hosgood, G. Immediate and Delayed (after Cooling) Effects of Centrifugation on Equine Sperm. *Theriogenology* **2010**, *73*, 225-231.

Li, Z.; Zhou, Y.; Liu, R.; Lin, H.; Lin, W.; Xiao W.; Lin, Q. Effects of Semen Processing on the Generation of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Membrane Potential of Human Spermatozoa. *Andrologia* **2012**, *44*, 157-163.

Lone, S.A.; Mohanty, T.K.; Baithalu, R.K.; Yadav, H.P. Sperm Protein Carbonylation. *Andrologia* **2019**, *51*, e13233. *Biology* **2020**, *9*, 22 16 of 17

Loomis P.R. 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **22**:663-76.

Loomis, P.R.; Graham, J.K. Commercial Semen Freezing: Individual Male Variation in Cryosurvival and the Response of Stallion Sperm to Customized Freezing Protocols. *Anim. Reprod. Sci.* **2008**, *105*, 119-128.

Love C.C., Brinsko S.P., Rigby S.L., Thompson J.A., Blanchard T.L., Varner D.D. 2005 Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* **63**:1584-91.

Maarten, H.; Rijsselaere, T.; de Vlieghe, S.; Vanhaesebrouck, E.; de Schauwer, C.; Jan Govaere Thys, M.; Hoflack, G.; van Soom, A.; de Kruif, A. Influence of Different Centrifugation Protocols on Equine Semen Preservation. *Theriogenology* **2010**, *74*, 118-126.

Magdanz, V.; Boryshpolets, S.; Ridzewski, C.; Eckel, B.; Reinhardt, K. The Motility-Based Swim-up Technique Separates Bull Sperm Based on Differences in Metabolic Rates and Tail Length. *PLoS ONE* **2019**, *14*, doi:10.1371/journal.pone.0223576.

Martin J.C., Klug E., Gunzel A.-R. 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* **27**:47-51.

Marzano, G.; Mastroiaco, Zianni, R.; Mangiacotti, M.; Chiaravalle, A.E.; Lacalandra, G.M.; Minervini, F.; Cardinali, A.; Macciocca, M.; Vicenti, R.; et al. Altered Morphokinetics in Equine Embryos from Oocytes Exposed to Dehp During Ivm. *Mol. Reprod. Dev.* **2019**, *86*, 1388-1404.

McKinnon, A.O.; Squires, E.L.; Vaala, W.E.; Varner, D.D. *Equine reproduction*, 2nd ed.; Wiley-Blackwell:Oxford, UK, 2011; pp. 867-1571.

Minervini, F.; Lacalandra, G.M.; Filannino, A.; Garbetta, A.; Nicassio, M.; Dell'Aquila, M.E.; Visconti, A. Toxic Effects Induced by Mycotoxin Fumonisin B1 on Equine Spermatozoa: Assessment of Viability, Sperm Chromatin Structure Stability, ROS Production and Motility. *Toxicology* **2010**, *24*, 2072-2078.

Moraes, C.R.; Meyers, S. The Sperm Mitochondrion: Organelle of Many Functions. *Anim. Reprod. Sci.* **2018**, *194*, 71-80.

Morte, M.I.; Rodrigues, A.M.; Soares, D.; Rodrigues, A.S.; Gamboa, S.; Ramalho-Santos, J. The Quantification of Lipid and Protein Oxidation in Stallion Spermatozoa and Seminal Plasma: Seasonal Distinctions and Correlations with DNA Strand Breaks, Classical Seminal Parameters and Stallion Fertility. *Anim. Reprod. Sci.* **2008**, *106*, 36-47.

Moscatelli, N.; Spagnolo, B.; Pisanello, M.; Lemma, E.D.; de Vittorio, M.; Zara, V.; Pisanello, F.; Ferramosca, A. Single-Cell-Based Evaluation of Sperm Progressive Motility Via Fluorescent Assessment of Mitochondria Membrane Potential. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10.

Muratori, M.; Tarozzi, N.; Cambi, M.; Boni, L.; Iorio, A.L.; Passaro, C.; Luppino, B.; Nadalini, M.; Marchiani, S.; Tamburrino, L.; et al. Variation of DNA Fragmentation Levels During Density Gradient Sperm Selection for Assisted Reproduction Techniques: A Possible New Male Predictive Parameter of Pregnancy? *Medicine (Baltim.)* **2016**, *95*, e3624.

Neuhauser, S.; Gosele, P.; Handler, J. Postthaw Addition of Autologous Seminal Plasma Improves Sperm Motion Characteristics in Fair and Poor Freezer Stallions. *J. Equine Vet. Sci.* **2019**, *72*, 117-123. *Biology* **2020**, *9*, 22 15 of 17

Oliveira, L.Z.; Arruda, R.P.; Celeghini, E.C.C.; de Andrade, A.F.C.; Perini, A.P.; Resende, M.V.; Miguel, M.C.V.; Lucio, A.C.; Hossepian de Lima, V. F. M. Effects of Discontinuous Percoll Gradient Centrifugation on the Quality of Bovine Spermatozoa Evaluated with Computer-Assisted Semen Analysis and Fluorescent Probes Association. *Andrologia* **2012**, *44*, 9-15.

Papas, M.; Catalan, J.; Fernandez-Fuertes, B.; Arroyo, L.; Bassols, A.; Miro, J.; Yeste, M. Specific Activity of Superoxide Dismutase in Stallion Seminal Plasma Is Related to Sperm Cryotolerance. *Antioxidants (Basel)* **2019**, *8*, doi:10.3390/antiox8110539.

Pena, F.J.; Ball, B.A.; Squires, E.L. A New Method for Evaluating Stallion Sperm Viability and Mitochondrial Membrane Potential in Fixed Semen Samples. *Cytom. B Clin. Cytom.* **2018**, *94*, 302-311.

Pena, F.J.; Garcia, B.M.; Samper, J.C.; Aparicio, I.M.; Tapia, J.A.; Ferrusola, C.O. Dissecting the Molecular Damage to Stallion Spermatozoa: The Way to Improve Current Cryopreservation Protocols? *Theriogenology* **2011**, *76*, 1177-1186.

Pena, F.J.; O'Flaherty, C.; Rodriguez, J.M.O.; Cano, F.E.M.; Gaitskell-Phillips, G.L.; Gil, M.C.; Ferrusola, C.O. Redox Regulation and Oxidative Stress: The Particular Case of the Stallion Spermatozoa. *Antioxidants (Basel)* **2019**, *8*, doi:10.3390/antiox8110567.

- Pickett B.W. 1993.** Collection and evaluation of stallion semen for artificial insemination. In: *Equine Reproduction*, McKinnon AO, Voss JL (Ed.), Williams & Wilkins, pp.705-14.
- Pickett, B.W.; Sullivan, J.J.; Byers, W.W.; Pace, M.M.; Remmenga, E.E.** Effect of Centrifugation and Seminal Plasma on Motility and Fertility of Stallion and Bull Spermatozoa. *Fertil. Steril.* **1975**, 26, 167-174.
- Piomboni, P.; Focarelli, R.; Stendardi, A.; Ferramosca, A.; Zara, V. The Role of Mitochondria in Energy Production for Human Sperm Motility. *Int. J. Androl.* **2012**, 35, 109-124.
- Rathi R., Colenbrander B., Stout T.A., Bevers M.M., Gadella B.M. 2003.** Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Molecular Reproduction and Development* **64**:120-8.
- Revell S.G., Pettit M.T., Ford T.C. 1997. Use of centrifugation over iodixanol to reduce damage when processing stallion sperm for freezing. *Journal of Reproduction and Fertility, Abstr series n°19*, p38.
- Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A. 2003** Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology* **60**:1553-68.
- Saraste, M. Oxidative Phosphorylation at the Fin De Siecle. *Science* **1999**, 283, 1488-1493.
- Shekarriz M., DeWire D.M., Thomas A.J. Jr., Agarwal A. 1995** A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *European Urology* **28**:31-5.
- Sieme, H.; Harrison R.A.; Petrunkina, A.M.** Cryobiological Determinants of Frozen Semen Quality, with Special Reference to Stallion. *Anim. Reprod. Sci.* **2008**, 107, 276-292.
- Varisli, O.; Uguz, C.; Agca, C.; Agca, Y.** Various Physical Stress Factors on Rat Sperm Motility, Integrity of Acrosome, and Plasma Membrane. *J. Androl.* **2009**, 30, 75-86.
- Verma, O.P.; Kumar, R.; Kumar, A.; Chand, S.** Assisted Reproductive Techniques in Farm Animal – from Artificial Insemination to Nanobiotechnology. *Vet. World* **2012**, 5, 301-310.
- 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**:907-19.
- Waite J.A., Love C.C., Brinsko S.P., Teague S.R., Salazar J.L. Jr., Mancil S.S., Varner D.D.** 2008. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology* **70**:704-14.
- Weiss S., Janett F., Burger D., Hassig M., Thun R.** 2004. The influence of centrifugation on quality and freezability of stallion semen. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **146**:285-93.

Yeste, M.; Estrada, E.; Rocha, L.G.; Marin, H.; Rodriguez-Gil, J.E.; Miro, J. Cryotolerance of Stallion Spermatozoa Is Related to ROS Production and Mitochondrial Membrane Potential Rather Than to the Integrity of Sperm Nucleus. *Andrology* **2015**, *3*, 395-407.

Yves, M.; Dale, B.; Cohen, M. DNA Damage and Repair in Human Oocytes and Embryos: A Review. *Zygote* **2010**, *18*, 357-365.

Zhu, W.J. Preparation and Observation Methods Can Produce Misleading Artefacts in Human Sperm Ultrastructural Morphology. *Andrologia* **2018**, *50*, doi:10.1111/and.13043.

Cochran, J.D., Amann, R.P., Fromann, D.P., Pickett, B.W., 1984. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* *22*, 25-35.

Crockett, E.C., Graham, J.K., Bruemmer, J.E., Squires, E.L., 2001. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology* *55*, 793-803.