

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة ابن خلدون تيارت
UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET
معهد علوم البيطرة
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
قسم الصحة الحيوانية
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master complémentaire

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Vétérinaires

Présenté par

KHAROUBI Rostoum

Thème :

Méthodes actuelles de la cryoconservation du sperme du cheval au niveau de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Tiaret

Soutenu publiquement le :

Jury :

Président :

Dr. AGGAD Hebib

Encadreur :

Dr. SAIM Mohamed Said

Examinateur I :

Dr. AYAD Mohamed Amine

Examinateur 2 :

DR. DERRAR Sofiane

Grade :

Pr

MCA

MCA

MCA

Année universitaire 2019 / 2020

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions ALLAH Dieu le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la patience pour faire ce travail.

A MON ENCADRER DE THÈSE Dr :

SAIM MOHAMED SAID

Nous vous reconnaissons la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail.

Vous vous y êtes grandement impliqués par vos directives, vos remarques et suggestions, mais aussi par vos encouragements dans les moments clés de son élaboration.

Nous tenons à vous remercier aussi pour cette liberté que vous avez permise, votre manière de penser, d'analyser et procéder, votre manière d'être, bref toute votre personnalité.

Je remercie également tous les membres des jurys

Je remercie enfin toutes les personnes qui m'ont aidée à réaliser ce travail et dont je n'ai pas cité le nom.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À ma très chère mère

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi.

Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours.

À mon très cher père

À mes sœurs (Imane – Lina – Asmaa) et à mon frère, ma fille Nibras Amira , et Fatima zohra la fille de ma sœur , ma femme et à toute la famille .

À mes amis et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

LISTE DES TABLEAUX :

Titres des tableaux	Page
Tableau 1 : Caractéristiques principales du sperme d'étalon	5
Tableau 2 : Quelques caractéristiques du sperme de différentes races d'étalons de sport	6
Tableau 3 : Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction de l'âge	6
Tableau 4 : les 4 sous-populations distinguables par un test PNA-FITC/IP/SYTO	16
Tableau 5 : Classification de la qualité des doses de sperme congelé proposée par Vidament (2005)	20
Tableau 6 : Composition du diluant à base de lait ½ écrémé	25
Tableau 7 : Composition du diluant de KENNEY ® pour 1 L (Préparation simplifiée par l'utilisation de glucose isotonique)	26
Tableau 8 : Composition chimique du diluant INRA 82 - Hépès ®	26
Tableau 9 : Composition chimique du dilueur INRA 96 ®	27
Tableau 10 : définitions des trajectoires et des paramètres étudiés par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur	41
Tableau 11 : classification de la qualité des doses de sperme congelé proposée par Vidament (2005)	42
Tableau 12 : Tests de normalité (Shapiro-Wilk et Anderson-Darling) pour les variables spermatiques continues issues de l'étude.	51
Tableau 13. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur le nombre sauts.	52
Tableau 14. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur le temps de récolte.	52
Tableau 15. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur le volume totale récolté	53
Tableau 16. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur le volume de gel	53
Tableau 17. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur le volume de gel	54
Tableau 18. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur la motilité	54
Tableau 19. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur la concentration	55

Tableau 20 : Régression linéaire généralisée (GLM) de modèle multivarié de l'effet de temps de réaction, Volume total, volume du gel, concentration de l'éjaculat, mobilité totale des spermatozoïdes, la race et l'âge des étalons sur la réussite de l'insémination naturelle.	56
---	----

LISTE DES FIGURES :

Titres des figures	Page
Figure 01 : Mannequin de récolte pour étalons	4
Figure 02 : Différents compartiments et montage d'un vagin artificiel	4
Figure 03 : Différents types de vagins artificiel	5
Figure 04 : Les paramètres cinétiques du spermatozoïde	10
Figure 05 : Schéma de l'appareillage de la cytométrie en flux	11
Figure 06 : Les différents systèmes intervenants dans le cytomètre en flux	12
Figure 07 : Interaction de la lumière avec la cellule	13
Figure 08 : Les taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement	19
Figure 09 : Le processus de congélation de la semence équine	21
Figure 10 : mettre la semence dans un bain-marie à 22°C	22
Figure 11 : Phase d'équilibration de la semence à 4°C	24
Figure 12 : structure schématique du spermatozoïde	33
Figure 13 : capacitation du spermatozoïde	35
Figure 14 : processus de congélation de la semence équine	36
Figure 15 : trajectoires analysées par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur	40
Figure 16 : L'échographe DRAMIŃSKI ISCAN (Animalprofil).	53

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Liste des matières	
Liste des tableaux	
Listes des figures	
introduction	1
CHAPITRE 1 : La semence équine	
1. Physiologie de la reproduction des mâles	3
1.1. Puberté	3
1.2. Ejaculation	3
1.3. Sperme	3
1.4. Sex ratio	3
2. Collecte du sperme	5
3. Les caractéristiques du sperme	5
3.1. Couleur	5
3.2. Volume	5
3.3. Concentration et nombre total des cellules	5
3.4. Motilité	6
4. Conservation du sperme	7
5. Evaluation de la semence équine.	8
5.1. Les examens de première intention	8
5.1.1. Les examens de première intention	8
5.1.1.1. L'examen microscopique de la mobilité	9
5.1.1.2. La numération	9
5.1.2. Le spermocytogramme	9
5.2. Les examens de seconde intention	9
5.2.1. L'analyse informatique de la semence (CASA : Computerized Assisted Sperm Analysis)	9
5.2.2. La cytométrie en flux	11
5.2.2.1. Définition	11
5.2.2.2. Le système optique (Capture des signaux lumineux)	12
5.2.2.3. Avantages et inconvénients de la cytométrie en flux	12
5.2.2.4. Application de la cytométrie en flux en reproduction équine	14
Chapitre II : La cryoconservation de la semence équine	
1. Définition	18
2. Objectifs de la cryoconservation	18
3. Le diluant de cryoconservation	18
3.1. Définition	18
3.2. Physique de la congélation et dommages subis par les cellules	18
4. La technique de congélation de la semence équine	20
4.1. Les règles à respecter lors de la fabrication des doses d'insémination artificielle congelées	20
4.2. Les étapes de la congélation de la semence équine	21
4.2.1. La première dilution	21

4.2.2. La première descente en température (de + 37°C à + 22°C)	22
4.2.3. L'élimination du plasma séminal	22
4.2.4. La seconde dilution	23
4.2.5. La seconde descente en température (de + 22°C à + 4°C) suivie du conditionnement en paillettes.	23
4.2.6. La congélation des paillettes (de + 4°C à - 196°C)	24
4.2.7. La décongélation des paillettes	24
5. Rôle et caractéristique du dilueur	25
5.1. Les principaux diluants employés dans l'espèce équine	25
5.2. Les diluants de réfrigération	25
5.3. Les diluants de congélation	25
6. La technique de la double congélation (La recongélation)	28
CHAPITRE III congélation du sperme dans l'espèce équine	
1. Introduction	31
2. Notions De Cryobiologie	31
3. Spermatozoïdes, Spermatogenèse, Capacitation Et Fécondation	33
3.1. Le spermatozoïde	33
3.2. De la spermatogenèse à l'éjaculation	35
3.3. Capacitation du spermatozoïde et fécondation	35
4. Techniques de congélation du sperme	36
5. Détermination de la qualité du sperme équin	38
5.1. Concentration en spermatozoïdes	38
5.2. Mobilité des spermatozoïdes	39
5.3. Examens microscopiques après coloration	42
5.4. Nouveaux contrôles de qualité	43
6. Résultats, limites et perspectives en reproduction équine	44
6.1. Prédiction de la congélabilité	44
6.2. Amélioration de la technique de congélation	46
6.3. Amélioration des milieux de congélation	46
6.4. Implication des formes activées de l'oxygène	47
7. Conclusions	49
Résultat et discussion	
Résultat	51
Discussion	57
Conclusion général	63
Références bibliographiques	68

INTRODUCTION

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cheval occupe une place privilégiée dans la vie et l'imaginaire des populations rurales algérienne. Il constitue un véritable acteur de développement durable notamment dans le domaine environnemental, en jouant un rôle particulier dans une gestion des espaces et des paysages bénéfiques au maintien et au développement de la biodiversité (Benhamadi et al 2016), mais également dans son rapport avec l'homme en contribuant par ailleurs aux activités sportives, sociales et culturelles. La population équine est représentée par deux races et de plusieurs croisements: Barbe, Pur sang Arabe. Elle est estimée à 250.000 chevaux, est constituée à 90% de chevaux Barbe et Arabe Barbe (et Selle algérien). Les 10% restant se répartissent entre chevaux Arabe, Pur-sang Anglais et Trotteur Français (Rahal et al, 2009).

L'Algérie, ainsi que les autres pays du Maghreb, berceau de la race Barbe a pris conscience de l'importance du cheval Barbe, pure sang Arabe, Arabe-Barbe et Selle algérien.

Dans ce contexte, le développement de l'élevage équin nécessite sa rationalisation et par conséquent l'emploi des techniques modernes de gestion des ressources génétiques équines, plus précisément les biotechnologies de la reproduction.

Actuellement La reproduction équine est un domaine en pleine évolution avec l'augmentation du nombre d'inséminations artificielles, notamment l'insémination artificielle profonde et le développement du transfert d'embryon (J.Ponthier, et al 2015) Quelque soit la méthode utilisée, l'objectif principal est d'obtenir une bonne fertilité en fin de saison (Citée par Marie A et al, 2010). Pour se faire il est important de se soucier aussi bien de la jument que de l'étalon lors de l'analyse des résultats de fertilité. De ce fait nous aborderons ici le thème de la fertilité de l'étalon et de la jument, et plus précisément les méthodes permettant d'évaluer les paramètres de fertilités.

CHAPITRE I

La semence équine

1. Physiologie de la reproduction des mâles

1.1. 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 spermatozoïdes par les testicules commence entre 13 et 20 mois (**Nicolich, 1989**).

1.2. Éjaculation

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**).

1.3. 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**).

1.4. Sexe ratio

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**).

2. 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 2ème, une heure plus tard en moyenne (Nicolich, 1989).



Figure 01 : Mannequin de récolte pour étalons (Letenre Jessica 29 avril 2016)

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.

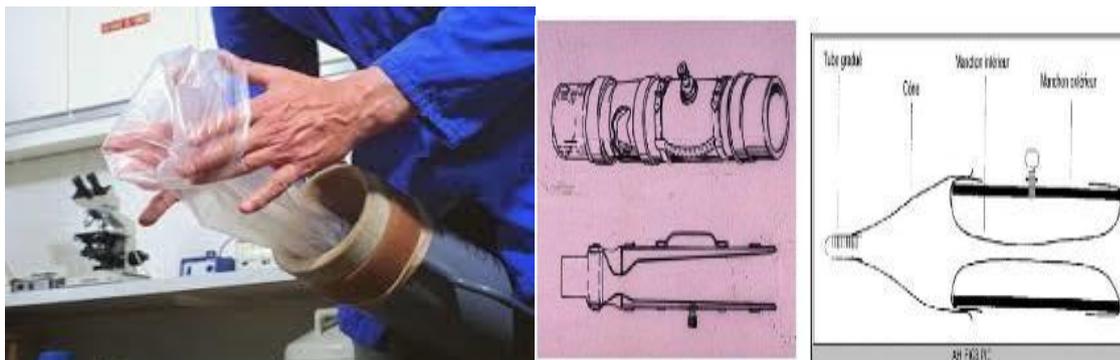


Figure 02 : Différents compartiments et montage d'un vagin artificiel (Letenre Jessica 29 avril 2016)



Figure 03 : Différents types de vagins artificiel (Letenre Jessica 29 avril 2016)

3. Les caractéristiques du sperme

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

3.1. Couleur :

Normalement, le sperme est blanc laiteux.

3.2. 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).

3.3. Concentration et nombre total des cellules :

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

3.4. Motilité :

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 (%)	Références
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
52,5 ± 34,1	200 (50-400)	10 (3-20)	75	Besse, 1993
	176 ± 125	7,8 ± 5,7	59±14	Langlois1977.

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 cité par Nicolich, 1989).

	Nombre	Vol. sans gel (ml)	Vol. de gel (ml)	Vol. total (ml)	Concentration (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 cité par Nicolich, 1989).

	Nombre	Vol. sans gel (ml)	Vol. de gel (ml)	Vol. total (ml)	Concentr. (10 ⁶ /ml)	Nbre de spz (10 ⁶)	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

4. Conservation du sperme

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 spermatozoïdes. Avec des doses de 400 millions de spermatozoïdes, 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 spermatozoïdes 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 minute est idéale soit 10 heures pour passer de +37°C à +4°C. **Palmer (1984)** utilise du lait écrémé ajouté d'antibiotiques comme dilueur. L'insémination doit être faite dès les 10 heures qui suivent la collecte (**Magistini, 1990**).

5. Évaluation de la semence équine

Afin d'estimer la fertilité du mâle, il faut évaluer la qualité de la semence.

L'évaluation de la semence fraîche renseigne sur le fonctionnement testiculaire et épидидymaire alors que l'évaluation de la semence congelée-réanimée renseigne sur les dommages subis par les spermatozoïdes au cours du processus de congélation.

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.

5.1. Les examens de première intention :

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.

5.1.1. 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.

5.1.1.1. 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 fléchants 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.

5.1.1.2. 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 Thomas 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 :

Équation 1: $N = n \times V \times (1/d) \times 50000$

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

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

5.1.2. 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 cents 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.

5.2. Les examens de seconde intention :

5.2.1. L'analyse informatique de la semence (CASA : Computerized Assisted Sperm Analysis) :

L'analyseur informatique de la semence ou communément appelé le système CASA est une méthode microphotographique. Il consiste en un dispositif incluant un matériel d'enregistrement microphotographique et en un support informatique pour la reconstruction et l'analyse des trajets. Cette technique permet de générer un nombre considérable de paramètres, obtenu grâce à l'analyse individuelle de chaque spermatozoïde. Cette technique permet donc de réaliser des analyses objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement.

Il calcule plusieurs paramètres de mobilité à savoir :

- **La motilité totale (TMOT) :** ce paramètre représente le pourcentage des gamètes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement par rapport à la population totale.
- **Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (PMOT) :** ce paramètre inclut tous les spermatozoïdes ayant une VAP > 50 µm/seconde et une linéarité (VSL/VAP) supérieure à 75%.
- **Le pourcentage des spermatozoïdes statiques :** il représente tous les spermatozoïdes qui ne bougent pas pendant l'analyse.
- **les mouvements rapides, moyens et lents** des spermatozoïdes (Speed, Medium et Slow).

- les différentes vitesses de progression :

La “**VCL**” (Velocity Curvilinear): cette vitesse prend en considération la totalité de la distance (point par point) parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné.

La “**VSL**” (Velocity Straight line) : cette vitesse prend en considération, pour un temps donné, les points de départ et d’arrivée du spermatozoïde, indépendamment de son trajet.

La “**VAP**” (Velocity Average Pathway) : cette vitesse correspond à la VCL, mais après lissage de son trajet.

L’**ALH** (Amplitude of Lateral Head Displacement) : ce paramètre correspond à la distance, en μm , balayée par la tête des spermatozoïdes durant le mouvement de battement.

Le **BCF** (Beat Cross Frequency) : Il mesure en Hertz la fréquence de battement de la tête des spermatozoïdes en mouvement (nombre de battement par unité de temps).

Il s’agit d’une méthode d’analyse rapide qui permet d’analyser un grand nombre de spermatozoïdes en un bref temps. Cependant, ce test nécessite un appareillage couteux réservé pour les centres spécialisés

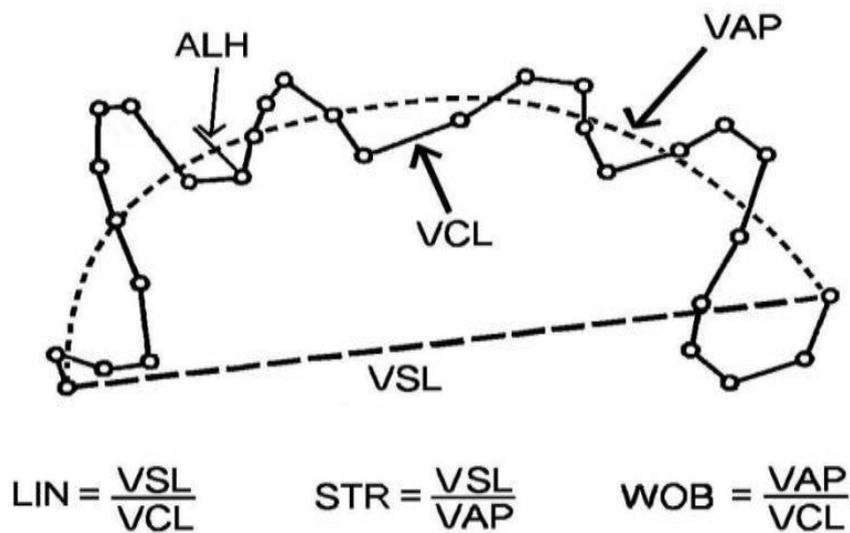


Figure 04 : Les paramètres cinétiques du spermatozoïde

5.2.2. La cytométrie en flux (CMF)

5.2.2.1. Définition

La cytométrie mesure les propriétés optiques d'une cellule, transportée par un liquide vecteur caractérisé par le flux, jusqu'à une source d'excitation lumineuse étant la plupart

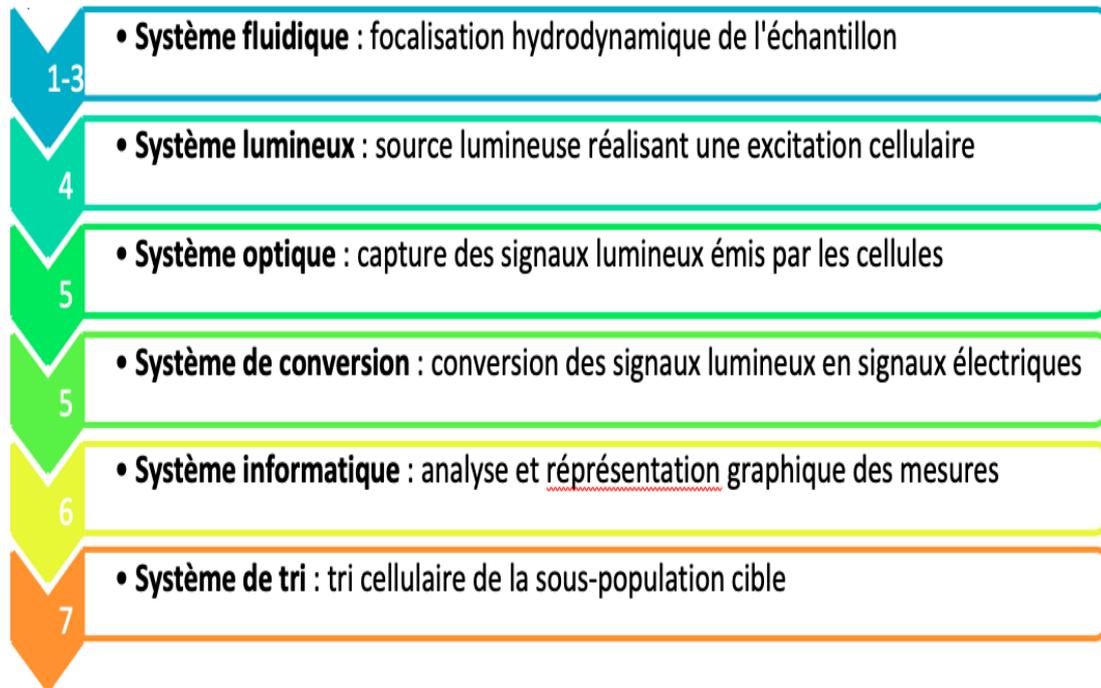


Figure 05 : Schéma de l'appareillage de la cytométrie en flux (Tourrel-Cuzin, 2012) du temps un laser (Diaz, 2014). En effet, elle effectue une analyse multiparamétrique, de cellules individualisées, à la vitesse de milliers d'évènements à la seconde. L'ordinateur associé calcule des statistiques sur la distribution des paramètres mesurés et les représentent sous forme d'histogramme ou cytogramme. Enfin, l'ultime fonction du cytomètre est de séparer les sous-populations cellulaires en fonction de leurs propriétés optiques et permettre ainsi un tri cellulaire (Cambournac, 2012).

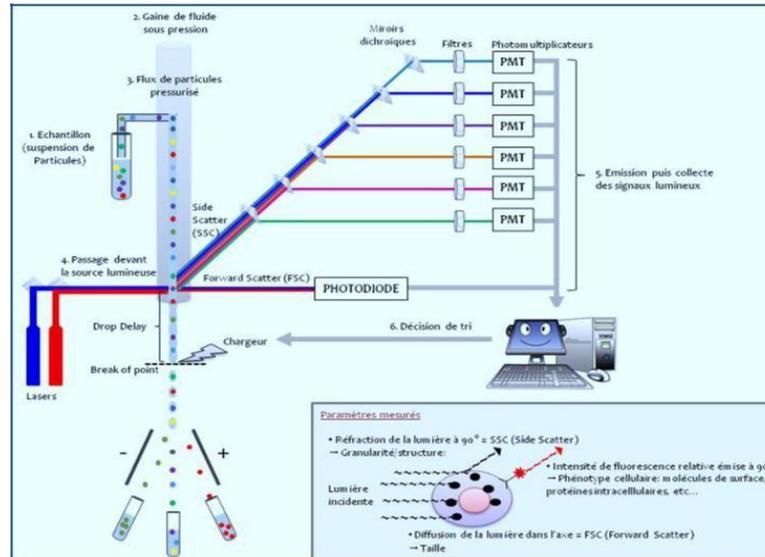


Figure 06 : Les différents systèmes intervenant dans le cytomètre en flux

5.2.2.2. Le système optique (Capture des signaux lumineux)

Le système optique intervient lors du passage des cellules au niveau de la source lumineuse. Ces dernières émettent en réponse à cette excitation différents signaux lumineux qui sont collectés et dirigés vers les photo-détecteurs à l'aide d'un banc optique. Les signaux lumineux détectés sont de différentes natures (**Gilman-Sachs, 1994; Ronotet al., 2006; Shapiro, 2005**):

- **FSC (Forward Scatter)** : lumière diffractée aux petits angles, elle renseigne sur la taille des particules et sur la surface cellulaire.
- **SSC (Side Scatter)** : la lumière réfléchiée et réfractée aux grands angles, elle renseigne sur la granularité et la complexité cellulaire.

La fluorescence émise à 90°C dépend du phénotype cellulaire :

- Fluorescence émise par la cellule elle-même : auto fluorescence.
- Fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome avec liaison spécifique à la cellule.

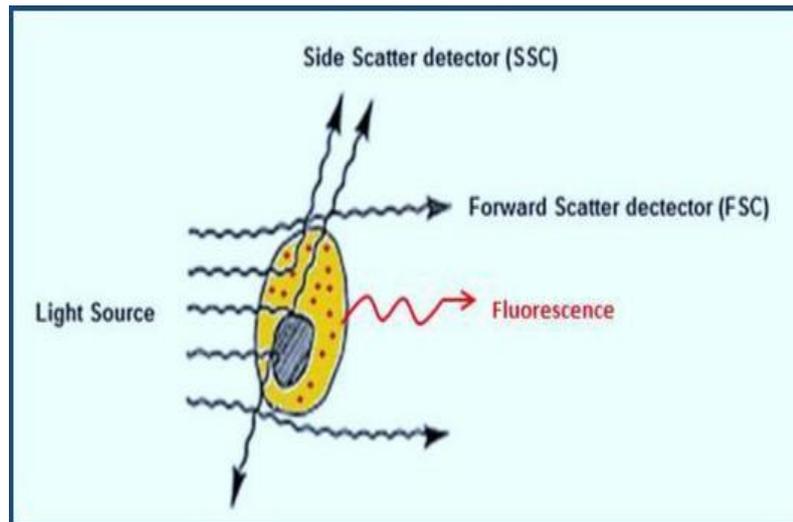


Figure 07 : Interaction de la lumière avec la cellule (Aberdeen, 2010)

5.2.2.3. Avantages et inconvénients de la cryométrie en flux

Les dernières années furent riches en progrès technique pour la détermination de la fertilité de la semence. Les analyses classiques de la semence par l'étude macroscopique et microscopique de la mobilité et de la morphologie ont comme inconvénient d'être subjectives.

Aujourd'hui le gold-standard dans les laboratoires est une analyse de la mobilité grâce à l'analyseur d'images CASA, associée à des tests de fluorescence évaluant l'intégrité fonctionnelle de la semence (Nizanski et al., 2012). Ces dernières sont réalisées soit à la microscopie à fluorescence, soit au cytomètre en flux. Or la cytométrie en flux possède de nombreux avantages face à la microscopie à fluorescence :

- **Rapidité** : une analyse de plus de 10 000 cellules en 1 minute.
- **Répétabilité** : analyse objective et standardisée.
- **Sensibilité de détection** : mise en lumière de différences subtiles au sein de la semence notamment lors de traitement *in-vitro* différents (Peña et al., 1999).
- **Analyse multiparamétrique, quantitative, de paramètres qualitatifs** : permet de mieux cibler le pouvoir fécondant de la semence (Petrunkina et al., 2007 ; Petrunkina et Harrison, 2011).
- **Analyse quantitative par dénombrement** : mise à disposition de nombreuses données pouvant permettre une étude statistique entre les variables étudiées et la fertilité de la semence (Sellem et al., 2015 ; Silva et Gadella, 2006).

- **Tri cellulaire de la population cible.**

Les principaux inconvénients de cette technique sont le coût du cytomètre en flux et des colorants fluorescents. Même si la cytométrie en flux est très utilisée dans les laboratoires d'andrologie humaine, cet investissement est encore très peu réalisé en médecine vétérinaire. Les autres inconvénients sont les réglages du cytomètre qui doivent être réalisés minutieusement, et les risques dus aux matériels utilisés. On peut citer les risques chimiques et biologiques dus à l'origine même des échantillons. Il y a également un risque optique avec l'utilisation du laser et un risque électrique par l'utilisation de haute tension associée à une partie fluidique.

5.2.2.4. Application de la cytométrie en flux en reproduction équine

Le cytomètre en flux va permettre d'évaluer la concentration de la semence, l'intégrité des différents organites du spermatozoïde et donc sa fonctionnalité, dont notamment : la membrane plasmique, l'acrosome, la mitochondrie, le noyau ainsi que le stress oxydatif sachant que la fertilité de la semence est conditionnée par l'intégrité de ses organites.

Dans cette revue de la littérature, nous nous intéresserons uniquement à quelques paramètres qui sont d'intérêt dans notre mémoire en l'occurrence l'intégrité de la membranaire plasmique, de l'acrosomique.

- **Intégrité de la membrane plasmique (Test de viabilité)**

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 dits

« Moribonds » sont également visibles à la microscopie à fluorescence. (**Garner et Johnson, 1995**). Avec la cytométrie en flux, les spermatozoïdes colorés à la fois de rouge et de vert sont inclus dans les spermatozoïdes morts.

- **Capacitation et statut acrosomique (Le test PNA/FITC/IP)**

L'évaluation du statut acrosomique 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).

Tableau 4 : les 4 sous-populations distinguables par un test PNA-FITC/IP/SYTO

Fluorescence	IP	PNA-FITC	SYTO 83	Interprétation des colorations
Réaction	-	-	+	Spz vivant Acrosome intact
	+	-	-	Spz mort Acrosome intact
	+	+	-	Spz mort Acrosome défectueux
	-	+	+	Spz vivant Acrosome défectueux
Interprétation de la fluorescence	Incolore Membrane plasmique intègre Rouge Membrane plasmique lésée	Incolore Acrosome intact Vert Acrosome lésé	Incolore Débris cellulaire Jaune Membrane plasmique intègre	

Le test à l'ionophore A23 187: évaluation de la réaction acrosomique

6. En plus du pourcentage de cellules présentant un acrosome intact, leur capacité à effectuer la réaction acrosomique après induction est également considérée comme un paramètre fonctionnel important. L'inducteur de la réaction acrosomique utilisé est l'ionophore Ca^{2+} (A23-187) qui provoque l'influx entrant de calcium dans les cellules. Selon la majorité des études réalisées chez les équidés lors de l'application d'ionophore calcique, l'induction de la réaction acrosomique a lieu en 5 minutes. Cet influx calcique entrant est mesurable par le cytomètre en flux grâce au fluorochrome fluo3-AM. Il dépend des facteurs d'incubation comme la présence ou non du plasma séminal et des conditions en aérobie ou anaérobie. L'induction de la réaction acrosomique grâce à l'ionophore Ca^{2+} est aussi mesurable à la cytométrie en flux grâce aux fluorochromes PNA/FITC/SYTO/IP décrits dans la partie précédente (Magistrini et al., 1997; Szasz et al., 2000).

Chapitre II

*La cryoconservation de la semence
équine*

Le succès de la congélation de la semence bovine a impulsé de nombreuses recherches pour développer ces techniques dans les autres espèces de mammifères domestiques, en particulier dans l'espèce équine.

Initialement, les techniques mises au point dans l'espèce bovine ont été extrapolées à l'espèce équine, et ont montré des résultats décevants. La persévérance des chercheurs a permis d'adapter ces techniques aux particularités de la semence équine, améliorant ainsi les résultats de fertilité par cycle.

1. Définition

La cryoconservation est la conservation à une température inférieure à -80°C d'une suspension de cellules après leurs préparations. Cette conservation peut-être dure plusieurs années et son utilisation après réchauffement à une température de 37°C .

2. Objectifs de la cryoconservation

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

3. Le diluant de cryoconservation

3.1. Définition

Le diluant est un milieu spécifique qui est employé pour diluer la semence et qui protège les spermatozoïdes contre les effets délétères de la congélation.

3.2. Physique de la congélation et dommages subis par les cellules

La cryoconservation des cellules consiste à utiliser des températures extrêmement basses pour préserver leur structure intacte et viable (**Ponthier J., Van Den Berghe F, 2014**). Lors de la réfrigération, le métabolisme cellulaire est réduit, ce qui augmente la durée de conservation des spermatozoïdes (**Barbas J.P., Mascarhenas R.D.: 2008**). Lors de la cryoconservation, l'activité cellulaire est interrompue (et rétablie après remise à température corporelle de la semence) (**Diaz J.: Nantes: 2013**) ; ce qui équivaut presque à interrompre le « cours du temps biologique » pour la cellule.

Il existe actuellement deux méthodes pour la cryoconservation des spermatozoïdes : la congélation et la vitrification. La première technique consiste à congeler de façon lente, tandis que dans la seconde, les taux de refroidissement sont très élevés.

Chacune de ces techniques nécessite l'emploi d'agents cryoprotecteurs, à des concentrations particulièrement élevées lors de la vitrification ; ce qui pose des problèmes de toxicité aux

spermatozoïdes.

Enfin, lors du processus de cryoconservation des gamètes mâles, ces derniers sont exposés à plusieurs mécanismes aux effets délétères considérables s'ils ne sont pas maîtrisés :

A. **Le cold-shock**, phénomène commun à la réfrigération et à la congélation de la semence, qui est détaillé plus haut

B. **La cristallisation intracellulaire**, qui engendre des lésions mécaniques des structures intracellulaires telles que les organelles.

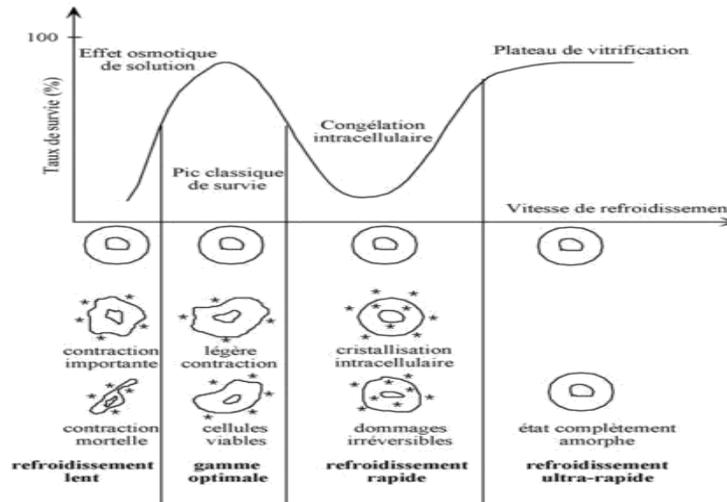


Figure 08 : Les taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement (Courbière & al. 2009).

Un refroidissement lent entraîne la formation de cristaux de glace dans le milieu extracellulaire. Les cristaux de glace étant exclusivement composés d'eau pure, la concentration du milieu extracellulaire augmente ; ce qui entraîne une sortie de l'eau intracellulaire et donc une déshydratation cellulaire par effet d'osmose. Cette déshydratation s'accompagne d'une déformation cellulaire à l'origine de contraintes mécaniques substantielles sur la membrane plasmique. Lorsque ce phénomène est trop marqué, ces contraintes mécaniques peuvent causer la mort des cellules.

Un refroidissement rapide empêche la déshydratation cellulaire par effet osmotique car l'eau n'a pas le temps de quitter les cellules pour rétablir l'équilibre de part et d'autre de la membrane plasmique. Cela conduirait à la cristallisation intracellulaire. Il semble cependant qu'il n'y ait pas de preuve de formation de glace intracellulaire, et que les effets délétères du refroidissement rapide soient plutôt le fait d'un déséquilibre osmotique au moment de la congélation.

Il existe une vitesse de congélation optimale (ou plutôt la moins néfaste possible) pour chaque

type cellulaire, associée à un taux de survie cellulaire maximum, qui est un compromis entre une vitesse suffisamment lente pour permettre à l'eau de sortir de la cellule et ainsi prévenir la formation de cristaux de glace intracellulaire et une vitesse trop lente responsable de déshydratation cellulaire, qui engendre une compaction et une déformation du spermatozoïde. La vitesse de congélation optimale de la semence équine, en présence d'agent cryoprotecteur, est de -60°C par minute.

Enfin l'intervalle de températures comprises, selon les sources, entre 0 et -80°C ou entre -55 et -70°C est très délicat à traverser, tant au moment de la congélation que de la décongélation des spermatozoïdes. Le traverser rapidement permet de limiter les dommages cellulaires.

4. La technique de congélation de la semence équine

4.1. Les règles à respecter lors de la fabrication des doses d'insémination artificielle congelées (Barrier-Battut I. & al 2014)

Une dose d'IAC doit contenir au minimum 400 millions de spermatozoïdes totaux, un système pour harmoniser les doses d'insémination congelées commercialisées en France, selon les normes des Haras Nationaux. Ce système, présenté dans le tableau suivant, permettrait de mieux garantir la qualité des doses commercialisées.

Tableau 5: Classification de la qualité des doses de sperme congelé proposée par Vidament (2005) (Ponthier J., & al 2014)

CRITERE	INDICE	DEFINITION
Nombre de spermatozoïdes pour la saison	A***	$> 3 \times 750 \times 10^6$ soit $2,25 \times 10^9$ spermatozoïdes pour 3 cycles
	A**	$> 2 \times 750 \times 10^6$ soit $2,25 \times 10^9$ spermatozoïdes pour 2 cycles
	A*	$> 1 \times 750 \times 10^6$ soit $2,25 \times 10^9$ spermatozoïdes pour 1 cycle
	B	Autres offres ou non spécifié
% de mobilité rapide en décongélation	A	$> 35\%$
	B	$< 35\%$ ou non spécifié
% de glycérol dans la paillette	A	$< 4\%$
	B	$> 4\%$ ou non spécifié

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

4.2. Les étapes de la congélation de la semence équine.

Dans le monde, il existe actuellement quatre techniques principales de congélation de la semence équine. Elles comportent globalement les mêmes étapes, dont l'enchaînement peut légèrement varier (**Barrier-Battut I. & al 2014**). La technique utilisée en France est une adaptation de celle mise au point par Palmer décrite en 1984, et résumée dans le schéma ci-dessous.

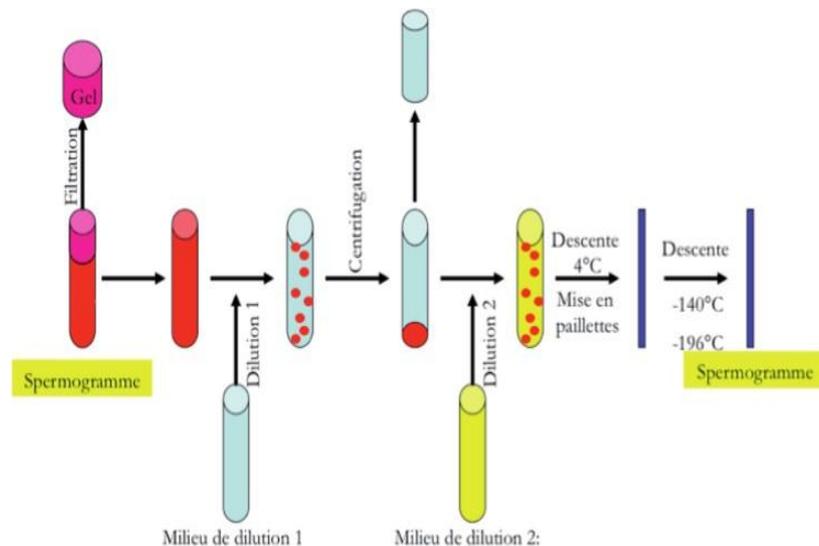


Figure 09 : Le processus de congélation de la semence équine (Ponthier J., Van Den Berghe F, 2014)

Cette technique comprend la dilution de la semence en deux étapes successives avec deux dilueurs de composition différente (le second contenant du glycérol) séparées par une centrifugation, un premier refroidissement suivi du conditionnement en paillettes puis la congélation.

4.2.1. La première dilution

Immédiatement après la récolte, l'éjaculat est filtré sur gaz, et sa concentration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

La semence est diluée avec un premier dilueur D1 préalablement placé au bain-marie à + 35°C. D1 est également appelé le dilueur de centrifugation. Selon les protocoles, il peut être composé du milieu INRA 82 ® additionné de 2% de jaune d'œuf, ou de lait écrémé UHT additionné d'antibiotiques, ou encore actuellement de l'INRA 96 ®.

Pour un éjaculat normalement concentré, le taux de dilution est de ¼ de sperme pour ¾ de dilueur, sans jamais dépasser les 2,5 milliards de spermatozoïdes par pot.

4.2.2. La première descente en température (de + 37°C à + 22°C)

La préparation est placée au bain-marie à + 22°C durant 10 minutes.



Figure10: Mettre la semence dans un bain-marie à 22°C (Ponthier J., Van Den Berghe F, 2014).

4.2.3. L'élimination du plasma séminal

Cette étape permet la concentration du sperme et la réduction des effets néfastes du plasma séminal. En effet des études ont permis de montrer les effets délétères de l'exposition prolongée des spermatozoïdes au plasma séminal : la mobilité des spermatozoïdes post-congélation est meilleure lorsque l'échantillon est incubé avant congélation avec 5% de plasma séminal en comparaison aux échantillons en contenant 20%. Le contact prolongé avec le plasma séminal réduit donc le pouvoir fécondant des spermatozoïdes après décongélation car l'environnement auxquels ils sont soumis est inapproprié d'où l'intérêt de l'étape d'élimination du plasma séminal dans les protocoles de congélation de la semence équine.

Plusieurs techniques sont décrites dans la littérature pour éliminer le plasma séminal :

- Par récolte à vagin ouvert, pour ne collecter que la fraction de l'éjaculat riche en spermatozoïdes
- Par centrifugation de l'éjaculat

L'option retenue en France est la centrifugation de l'éjaculat à température ambiante, pour éliminer totalement le plasma séminal. La semence est centrifugée pendant 10 minutes à 600 x g, puis le surnageant (composé de dilueur D1 et de plasma séminal) est enlevé par aspiration.

Lors de la centrifugation, une perte importante en spermatozoïdes est déplorée : 20 à 50% des spermatozoïdes peuvent ainsi être éliminés dans le surnageant. De récents dispositifs que nous développerons plus loin permettent d'améliorer les résultats de cette étape.

4.2.4. La seconde dilution

Cette seconde dilution permet d'apporter le cryoprotecteur (le glycérol), et d'obtenir une concentration finale de 100 millions de spermatozoïdes par ml.

Le diluant de congélation D2 aura été préalablement réchauffé au bain-marie à + 22°C.

Il est ajouté en deux fois successives au culot de spermatozoïdes en suspension, séparés par une étape de mesure de la concentration du sperme à la cellule hématimétrique de façon à adapter précisément le volume de D2 ajouté.

4.2.5. La seconde descente en température (de + 22°C à + 4°C) suivie du conditionnement en paillettes.

Les tubes de semence diluée sont bouchés puis placés à + 4°C pendant 1 heure 20 minutes. L'équilibration consiste à laisser incuber la semence avec le diluant de congélation avant d'effectuer la congélation des doses. Cette étape permet de stabiliser l'équilibre osmotique entre le milieu extracellulaire et intracellulaire, donc permet la pénétration du glycérol à l'intérieur des spermatozoïdes.

Le matériel nécessaire à la mise en paillette est placé à + 4°C et l'enceinte de congélation est préparée ainsi que le jonc d'identification.

Les paillettes de 0,5 ml préalablement identifiées sont remplies soit manuellement soit à l'aide d'une machine à remplir et à souder les paillettes puis placées sur la rampe de congélation.

La paillette la plus fréquemment utilisée est la paillette Cassou dont une extrémité est obstruée par deux tampons de coton entre lesquels se trouve de la poudre d'alcool polyvinylique (l'ensemble devient étanche au contact d'un liquide), et l'autre extrémité est fermée soit par soudure soit en la trempant dans de la poudre d'alcool polyvinylique.

L'opérateur veillera à ne pas attraper les paillettes à mains nues en leur milieu, pour éviter d'éventuelles variations de températures.



Figure 11 : Phase d'équilibration de la semence à 4°C (Ponthier J., Van Den Berghe F, 2014).

4.2.6. La congélation des paillettes (de + 4°C à – 196°C)

Deux dispositifs permettent la congélation des paillettes :

- soit en adaptant la hauteur des paillettes au-dessus du niveau d'azote liquide dans un récipient contenant de l'azote liquide.

Placer les paillettes pendant 10 minutes à 4 cm au-dessus du niveau d'azote liquide. Les plonger ensuite dans le gobelet d'azote et placer le gobelet dans la cuve de stockage remplie d'azote. Chaque gobelet contient un éjaculat.

- soit en utilisant un congélateur programmable, réglé avec une vitesse de refroidissement de – 60°C par minute entre + 4 et – 140 °C.

Le contrôle de qualité consiste ensuite à observer au microscope 3 paillettes de chaque éjaculat pour évaluer la mobilité des spermatozoïdes après décongélation.

4.2.7. La décongélation des paillettes

L'étape de décongélation de la semence est une phase importante dans la préservation de la survie des spermatozoïdes (Barrier-Battut I. & al. 2014).

La vitesse de décongélation dépend de la vitesse de congélation des paillettes.

Les 8 paillettes sont sorties de la cuve d'azote liquide à la pince et rapidement plongées dans un bain-marie à + 35°C pendant 30 secondes.

Les 8 paillettes sont sorties du bain-marie en deux séries successives de 4, essuyées et vidées dans un tube. Après agitation, la dose est aspirée dans un cathéter d'insémination artificielle et utilisée dans les 3 minutes. Un contrôle de la qualité est effectué au microscope sur une goutte de la dose.

5. Rôle et caractéristique du dilueur

Isotonicité : pour ne pas perturber les conditions osmotiques des spermatozoïdes.

pH et pouvoir tampon : pH optimal se situe au niveau de la neutralité et aussi à un pouvoir tampon pour éviter l'acidité causée par l'activité métabolique des spermatozoïdes.

Pouvoir nutritif : il contient des substances nutritives pour maintenir la survie des spermatozoïdes.

Pouvoir antioxydants : contre les radicaux libres.

Action stabilisante : comme le jaune d'œuf protège les spermatozoïdes.

Action protectrice : contre les cristaux formés lors de la congélation.

Action antibactérienne : contient des antibiotiques.

5.1. Les principaux diluants employés dans l'espèce équine

Les principaux milieux de dilution de la semence utilisés dans l'espèce équine sont présentés ici. Il s'agit soit des préparations commerciales soit des milieux à préparer. Le choix du milieu employé dépend de la durée de conservation souhaitée de la semence, du coût et des considérations pratiques (aboutissant au choix de fabriquer le milieu de dilution ou d'en acheter un prêt à l'emploi).

5.2. Les diluants de réfrigération

Les principaux diluants de réfrigération employés dans l'espèce équine sont le lait demi-écrémé additionné d'antibiotiques, l'INRA 96 ® et le KENNEY ®.

Tableau 6 : Composition du diluant à base de lait ½ écrémé (BARRIER-BATTUT I.& AL 2014)

Composants	Quantité
Lait UHT ½ écrémé	1 L
Gentamycine	50 mg
Amoxicilline	100 mg

Tableau 7 : Composition du diluant de KENNEY ® pour 1 lL (Préparation simplifiée par l'utilisation de glucose isotonique) (Barrier-Battut I. & al. 2014).

Composants	Quantité
Lait écrémé en poudre	6,1 g
Soluté isotonique de glucose 5%	250 mL
Volume total, une fois la poudre de lait dissoute	255 mL

Le diluant KENNEY ® n'est pas commercialisé : il faut compter 5 à 10 minutes pour le préparer. Il peut être additionné d'antibiotiques.

Tableau 8 : Composition chimique du diluant INRA 82 - Hépès ® (Pillet E, 2009).

Composants	Quantité (g/L)
Glucose	25
Lactose	1,5
Raffinose	1,5
Citrate de sodium	0,25
Citrate de potassium	0,4
Hépès (tampon) [Uniquement en cas de fabrication de diluant de congélation]	4,76
Eau distillée	Qsp 0,5L
Lait UHT écrémé	0,5L

Le diluant INRA 82 ® n'est pas commercialisé : il faut compter 30 à 40 minutes pour le préparer.

Lors de son utilisation pour la semence réfrigérée, il est additionné d'antibiotiques.

Tableau 9 : Composition chimique du dilueur INRA 96 ® (Pillet E, 2009).

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

Ce dilueur est commercialisé prêt à l'emploi, et contient déjà des antibiotiques et un antifongique. Sa composition est chimiquement définie et il contient une concentration en micelles de caséines deux fois supérieure à celle du milieu INRA 82 ®. De plus ces caséines sont présentes sous leur forme native dans le milieu INRA 96 ®, représentée par une fraction purifiée de caséines : la phosphocaséine native.

5.3. Les diluants de congélation

(Aurich C. :2008) (Barrier-Battut I. & al 2014) (Pillet E. & al 2008).

Les principaux diluants de congélation employés dans l'espèce équine sont l'INRA 82-Hépès additionné de jaune d'œuf, de glycérol et d'antibiotiques ; l'INRA 96 ® également additionné de jaune d'œuf et de glycérol, le milieu lactose-EDTA, le KENNEY® modifié, le BOTUCRIO ® et le milieu INRA-Freeze ®.

La fabrication du diluant de congélation à partir du milieu INRA 82 – Hépès ® dure une heure et demi. 2% de jaune d'œuf centrifugé et 2,5% de glycérol sont ajoutés au milieu de base. La même fabrication est réalisable à partir du milieu INRA 96 ®.

Le Botucurio ® et l'INRA-Freeze ® sont commercialisés prêts à l'emploi.

Une étude publiée en 2007 compare les résultats de fertilité obtenus avec de la semence équine congelée avec le milieu INRA 96 ® et le milieu INRA 82 ® ; tous les deux additionnés de 2% de jaune d'œuf et de 2,5% de glycérol. Deux expérimentations ont été effectuées successivement :

Des analyses *in-vitro* ont porté sur les paramètres de mobilité des spermatozoïdes après décongélation, et sur l'intégrité de leur membrane plasmique. Les résultats du test d'intégrité membranaire étaient en faveur du milieu INRA 96 ®, tandis que ceux de mobilité des spermatozoïdes étaient en faveur du milieu INRA 82 ®. Ces résultats sont cohérents avec la littérature. Les paramètres de mobilité ne reflètent pas la fertilité potentielle de la semence : aucune hypothèse n'est pour le moment avancée pour expliquer cela. Les essais de fertilité ont porté sur 84 cycles. Les taux de fertilité par cycle obtenus étaient de 71% avec le milieu INRA 96 ® et de seulement 40% avec le milieu INRA 82 ®.

Le milieu INRA 96 ®, développé en 1997, est donc un milieu de composition chimiquement défini qui permet de maintenir le pouvoir fécondant des spermatozoïdes tant lors du processus de réfrigération que lors de celui de congélation de la semence équine.

6. La technique de la double congélation (la recongélation)

Le processus de congélation et décongélation a des effets négatifs graves sur les spermatozoïdes, dont beaucoup résultent de dommages sublétaux des cellules et réduction subséquente de la fertilité (Ricker et al., 2006).

La membrane plasmique est la première barrière qui protège le spermatozoïde du milieu ambiant et, en même temps, c'est le premier site de dégâts dû à la congélation - décongélation.

Le stress osmotique est une raison pour les dommages causés par la congélation - décongélation.

Le résultat du stress osmotique est un déséquilibre des flux d'ions et du potentiel membranaire. Cela peut entraîner une motilité réduite et augmenter la perméabilité de la membrane plasmique (**Ricker et al., 2006**).

Pendant la congélation, les cellules se déshydratent et rétrécissent. À cet égard, le taux de congélation est une étape importante pour la déshydratation progressive des spermatozoïdes et pour maintenir l'intégrité et la fonctionnalité cellulaire (**Parks & Graham, 1992**).

La décongélation est associée au volume d'expansion. Le rétrécissement et le gonflement des cellules sont limités par leur capacité à résister à de tels changements (**Sieme et al., 2008**).

Une longue exposition à des diluants contenant du glycérol peut avoir un effet toxique sur les spermatozoïdes et cause un changement osmotique qui affectent la viabilité après la décongélation (**Alvarenga et al., 2005**).

Pour obtenir la meilleure population de spermatozoïdes pour la congélation, une centrifugation à gradient de densité (EquiPure) peut être facilement ajoutée à la procédure normale de congélation de sperme (**Gutierrez-Cepeda et al., 2011**).

CHAPITRE III

***Congélation du sperme dans l'espèce
équine***

1. Introduction

Depuis vingt ans, la congélation du sperme équin a permis de diffuser la génétique de nos meilleurs étalons et d'importer celle des champions. Les congélations effectuées en dehors des saisons sportives permettent d'inséminer de nombreux juments pendant la saison de reproduction pendant que les étalons concourent dans des lieux éloignés. Ainsi, les éleveurs ont en permanence accès à des doses d'insémination sans risques sanitaires.

Malheureusement, des inconvénients subsistent. D'une part, après décongélation, la durée de vie des spermatozoïdes est courte, ce qui oblige à inséminer ou échographier plus souvent la jument (**Daels, 2003**). D'autre part, malgré une bonne qualité de sperme frais, 20 % des éjaculats équins ne supportent pas la congélation ; la qualité du sperme après décongélation étant insuffisante pour des raisons encore inconnues (**Vidament *et al.*, 1997**;

Vidament, 2005). Les doses n'étant pas commercialisables, la perte est lourde pour le propriétaire de l'étalon : la gestion de la carrière de reproducteur est plus compliquée, l'exportation hors Europe est impossible et la génétique est moins diffusée.

Face à ces faits, la recherche s'oriente actuellement dans plusieurs directions. Une première approche vise à optimiser le milieu de congélation (ou *extender*) (**Vidament *et al.*, 2001 ; 2005 ; Squires, 2005 ; Morrell, 2006 ; Pillet *et al.*, 2008 ; 2010**). La recherche s'intéresse aussi aux méthodes de descente en température pour diminuer les lésions cellulaires dues au froid (**Nawroth *et al.*, 2002 ; Isachenko *et al.*, 2003 ; 2005**). Une autre approche est la détermination de l'origine des lésions subies par le spermatozoïde lors de la congélation. Actuellement, les formes activées de l'oxygène (FAO) (*reactive oxygen species*), des composés hautement réactifs interagissant avec différentes molécules, sont particulièrement mises en cause en andrologie humaine et vétérinaire (**Wang *et al.*, 1997a ; Ball *et al.*, 2001 ; Aitken et Baker, 2004 ; Morrell, 2006**).

Le but de cet article est de revoir la physiologie du spermatozoïde et d'en discuter les implications dans le contexte de la congélation. Les améliorations des techniques de congélation présentes ou à venir seront aussi évoquées.

2. Notions de cryobiologie

La congélation des cellules a pour but de réduire leur métabolisme cellulaire au maximum afin d'augmenter leur durée de conservation. Cependant, l'exposition des cellules au froid

leur fait courir trois types de danger : le choc thermique qui entraîne la dénaturation de certaines protéines, la cristallisation intracellulaire qui provoque des lésions des organelles et la déshydratation intracellulaire qui entraîne la dénaturation de certaines protéines et l'accumulation de composés toxiques (**Graham, 2011**).

La technique de congélation idéale devrait prévenir ces différents risques. Cependant, chaque technique de congélation va limiter certains risques, mais en promouvoir d'autres. Lors de la congélation, qui consiste à faire diminuer progressivement la température, le risque de formation de cristaux intracellulaires est élevé, ce qui implique le recours à de fortes concentrations en agent cryoprotecteur. Lors de la vitrification, qui consiste en une diminution brutale de la température, la réorganisation en cristaux n'a pas lieu, mais le risque de dénaturation des protéines est présent (**Graham, 2011**). Cette technique nécessite cependant le recours à de hautes concentrations en agent cryoprotecteur (**Bagchi et al., 2008**) même si de récentes publications laissent penser que non (**Nawroth et al., 2002**).

Les milieux de congélation vont contenir des agents cryoprotecteurs afin de diminuer la formation de cristaux intracellulaires. Il existe deux types d'agents cryoprotecteurs :

- les agents pénétrants comme le glycérol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) (**Gilmore et al., 2000**) ou les amides (**Alvarenga et al., 2005**) : ils sont de bas poids moléculaire ; en entrant dans la cellule, ils limitent la formation de cristaux intracellulaires ;
- les agents non pénétrants, comme le saccharose ou le tréhalose : ils vont rester à l'extérieur de la cellule et la déshydrater par osmose ou protéger la cellule en augmentant la viscosité du milieu.

Les concentrations en agent cryoprotecteur doivent être minimales, car ces derniers peuvent être toxiques au niveau cellulaire. Cette concentration dans un milieu de congélation doit être néanmoins suffisante pour limiter les dégâts cellulaires liés à la congélation mais doit rester basse pour limiter sa toxicité surtout chez le cheval et le porc, chez lesquels la membrane du spermatozoïde est particulièrement sensible aux effets osmotiques toxiques des agents cryoprotecteurs (**Squires et al., 2004**).

Le spermatozoïde est une cellule contenant relativement peu d'eau par rapport aux autres cellules, ce qui limite la formation de glace intracellulaire, mais l'expose aussi rapidement aux dangers liés à la déshydratation cellulaire et à la dénaturation des protéines. La

connaissance de l'anatomie et de la physiologie du spermatozoïde permet de comprendre quelles structures sont sensibles aux effets de la congélation.

3. Spermatozoïdes, spermatogenèse, capacitation et fécondation

3.1. Le spermatozoïde

Le spermatozoïde transporte l'information génétique dans le tractus génital femelle et la délivre à l'intérieur de l'ovocyte. Afin d'accomplir cette mission, le spermatozoïde est hautement différencié. La taille et la forme du spermatozoïde varient entre espèces (Senger, 2005). Chez l'étalon, il mesure 60 μm de long sur 2,7 μm de large (Amann et Graham, 2011). Morphologiquement, le spermatozoïde des mammifères est divisé en deux parties (figure 1) (Senger, 2005) : (i) la tête comprend l'acrosome, le chapeau nucléaire et le noyau cellulaire et (ii) la queue ou flagelle comprend la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale.

La membrane cytoplasmique constitue la barrière avec le milieu extérieur. Elle n'est pas homogène mais est divisée en de nombreux micro-domaines (mosaïque) où des protéines

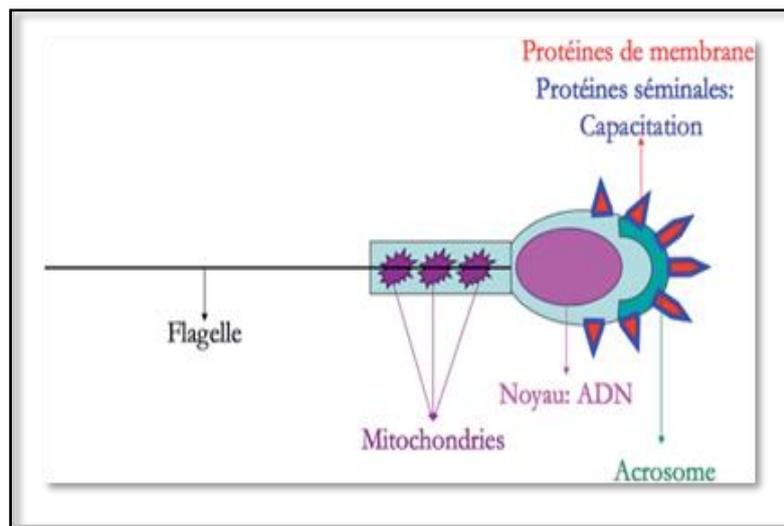


Figure 12: Structure schématique du spermatozoïde

spécifiques sont fixées (Senger, 2005 ; Lopez *et al.*, 2007 ; Boerke *et al.*, 2008 ; Gadella, 2008b). De nature lipidique, la membrane peut être modifiée par le milieu où se trouve le spermatozoïde avec lequel des échanges sont possibles comme par exemple avec le

cholestérol (Moore *et al.*, 2005a ; Oliveira *et al.*, 2010). Chez le cheval, le bovin et l'homme, la membrane est sensible aux dommages causés par la congélation (Barthelemy *et al.*, 1990 ; Blottner *et al.*, 2001 ; Bollwein *et al.*, 2008). Les FAO semblent induire des lésions de la membrane lipidique lors du processus de congélation chez l'homme (Wang *et al.*, 1997c), le bovin (Köss *et al.*, 2007) et le cheval (Neild *et al.*, 2005 ; Ortega Ferrusola *et al.*, 2009a) même si des modèles de production *in vitro* de FAO n'ont pas augmenté la peroxydation des membranes du spermatozoïde équin (Baumber *et al.*, 2000).

Classiquement, la tête est décrite comme comprenant trois parties : (i) l'acrosome, (ii) le noyau et (iii) le chapeau nucléaire (Blom et Birch Andersen, 1975). La surface de la membrane de la tête est structurée en une mosaïque de territoires exposant des protéines nécessaires à la capacitation (Senger, 2005 ; Boerke *et al.*, 2008 ; Gadella, 2008a ; Gadella *et al.*, 2008). L'acrosome est une vacuole située à l'avant du noyau qui est formée lors de la spermiogenèse pendant la phase de Golgi (Senger, 2005 ; Amann et Graham, 2011). Les enzymes hydrolytiques synthétisés par l'acrosome sont responsables de la lyse de la zone pellucide ovocytaire lors de la fécondation (Senger, 2005 ; Amann et Graham, 2011). La congélation provoque des réactions acrosomiales prématurées (Barthelemy *et al.*, 1990 ; Schembri *et al.*, 2002).

Le noyau comprend le matériel génétique mâle. Il est récemment apparu que le noyau du spermatozoïde mature produit encore des ARN messagers (Miller, 2007), contredisant l'idée généralement admise de l'inactivité du matériel génétique des gamètes matures. Chez le cheval et l'homme, la présence de FAO entraîne la fragmentation de l'ADN du noyau (Irvine *et al.*, 2000 ; Baumber *et al.*, 2003), et des FAO peuvent être produites au cours du processus de congélation (Wang *et al.*, 1997b). La fragmentation de l'ADN a été directement associée à la fertilité chez l'homme (Evenson et Jost, 2000).

La queue comprend trois parties : la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. La queue s'attache via une pièce spécifique, le *capitulum* à la tête du spermatozoïde. La pièce intermédiaire est élargie par des mitochondries (figure 1), produisant l'ATP, disposées en hélice autour de l'hélice fibreuse qui recouvre l'axonème central (Senger, 2005 ; Amann et Graham, 2011). Chez le cheval, il a été montré que la congélation provoque une diminution de l'activité mitochondriale (Schober *et al.*, 2007). La pièce principale est composée de l'axonème central et la pièce terminale ne comprend que la fin des fibres du flagelle (Senger, 2005).

3.2. Capacitation du spermatozoïde et fécondation

Pour pouvoir féconder l'ovocyte, les spermatozoïdes doivent transiter entre l'utérus et l'isthme de l'oviducte du tractus génital femelle afin d'y subir la capacitation : les protéines et glucides présents à la surface de la tête vont être détachés (Gadella, 2008a ; 2008b) (figure 2). Lors de la capacitation, les spermatozoïdes seront immobilisés sur l'épithélium de l'oviducte et seront ensuite libérés pendant plusieurs heures ou jours (Senger, 2005 ; Sostaric *et al.*, 2008b). Après congélation, une augmentation de la proportion de spermatozoïdes capités a été observée chez le cheval, le bovin et le porc (Cormier *et al.*, 1997 ; Schembri *et al.*, 2002 ; Thomas *et al.*, 2006) : en l'absence de fixation aux voies génitales femelles en attendant une libération postérieure, le spermatozoïde a une durée de vie et de fécondation après insémination réduite à 12-24 heures chez la jument.

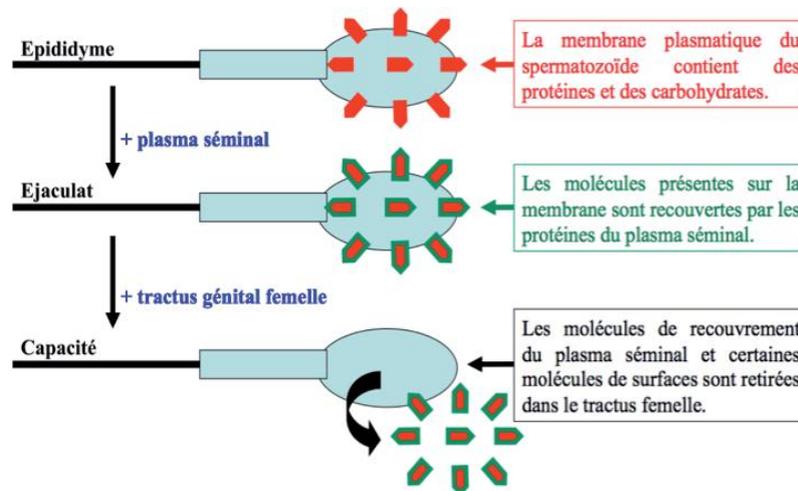


Figure 13 : Capacitation du spermatozoïde

Dans l'oviducte, les mouvements du spermatozoïde augmentent et ne sont plus linéaires. Le spermatozoïde va s'arrimer à des composants spécifiques de la zone pellucide (ZP3) grâce à des zones de liaison présentes sur sa tête (Senger, 2005 ; Amann et Graham, 2011); la fixation va activer la réaction acrosomiale. La réaction acrosomiale et l'hyperactivation du spermatozoïde vont permettre la pénétration de la zone pellucide (Senger, 2005 ; Amann et Graham, 2011). Ensuite, les membranes du spermatozoïde et de l'ovocyte fusionnent, le noyau se décondense en formant le pronucléus mâle (Senger, 2005 ; Amann et Graham, 2011).

4. Techniques de congélation du sperme

Après la récolte, le sperme équin est filtré pour extraire la fraction gel du sperme, une sécrétion filamenteuse des glandes annexes. Le sperme est ensuite analysé pour déterminer ses caractéristiques (concentration en spermatozoïdes, mobilité). Le sperme est dilué une première fois avec le premier milieu à base de lait ou de composants de lait et ne contenant pas d'agent cryoprotecteur. Différentes formulations commerciales existent et servent à conserver le sperme frais dans une gamme de température allant de 5 à 20°C.

Chez le cheval, le sperme est relativement peu concentré, contrairement à ce qui est observé dans d'autres espèces comme le bovin (**Baracaldo, 2007**) : le plasma séminal doit donc être éliminé par centrifugation (figure 3). Les tubes sont

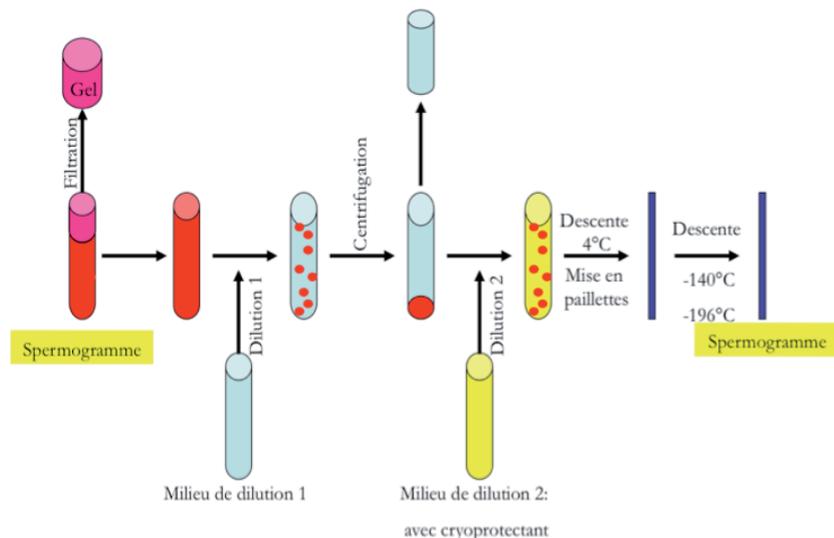


Figure 14 : Processus de congélation de la semence équine

centrifugés à température ambiante (**Vidament *et al.*, 2000**) et le surnageant est enlevé. Certaines équipes (**Salazar *et al.*, 2008** ; **Ponthier *et al.*, 2013**) proposent de conserver une petite fraction de plasma séminal, de l'ordre de 5 % du volume final pour la congélation, mais d'autres recommandent de le retirer entièrement (**Vidament *et al.*, 2000** ; **2001**) car le plasma séminal ne semble pas bénéfique pour la congélation du sperme équin (**Moore *et al.*, 2005b**).

De nouveaux protocoles utilisant des milieux coussins ont permis d'augmenter jusqu'à plus de 90 % le pourcentage de récupération des spermatozoïdes après centrifugation. L'ajout de ces milieux, qui sont composés d'une solution d'iodixanol, au fond des tubes permet

d'augmenter l'accélération de la centrifugeuse (1000 g pendant 20 minutes au lieu de 600 g pendant 10 minutes, sans milieu coussin) et le temps de centrifugation sans provoquer de lésions du spermatozoïde (Waite *et al.*, 2008 ; Hoogewijs *et al.*, 2010). Le nombre de paillettes produites par éjaculat est donc plus grand car le nombre total de spermatozoïdes après centrifugation est plus élevé (90 % des spermatozoïdes récupérés au lieu de 60 % avec le protocole de centrifugation n'utilisant pas les milieux coussins). Une alternative à la centrifugation est de séparer les fractions d'éjaculation lors de la récolte pour ne conserver que la fraction riche en spermatozoïdes (Sieme *et al.*, 2004 ; Kareskoski *et al.*, 2005), comme chez le chien (Linde Forsberg, 1991 ; Thirumala *et al.*, 2003 ; Kutzler, 2005). Cependant, cette technique demande de l'expérience de la part des personnes effectuant la récolte.

Une étape intermédiaire peut être ajoutée au processus de congélation classique : la centrifugation sur des milieux colloïdaux. Cette méthode permet de séparer les spermatozoïdes anormaux, les débris cellulaires et les bactéries et d'ainsi améliorer la qualité du sperme après décongélation en ne sélectionnant que les spermatozoïdes normaux qui sont considérés comme mobiles et potentiellement fertiles (Glander *et al.*, 1990 ; Kobayashi *et al.*, 1991 ; Loomis, 2006 ; Morrell, 2006 ; Edmond *et al.*, 2008 ; Hoogewijs *et al.*, 2010 ; Ponthier *et al.*, 2013). Cette méthode est très utile chez les étalons dont la qualité du sperme frais est faible, mais elle nécessite du temps et entraîne de grandes pertes en spermatozoïdes et donc une diminution de la production de paillettes par éjaculat.

Une fois que le culot riche en spermatozoïdes est obtenu, il est dilué avec le milieu de congélation. Chez le cheval, les milieux de congélation sont produits à base de lait ou de composants de lait contrairement aux milieux utilisés chez l'humain, le bovin et le chien dont la base est un milieu tris-fructose (Esteves *et al.*, 2003 ; Thirumala *et al.*, 2003 ; Baracaldo, 2007). Du jaune d'œuf est aussi ajouté au milieu de congélation chez toutes les espèces. Récemment, le plasma de jaune d'œuf a été utilisé chez le cheval pour remplacer le jaune d'œuf (Pillet *et al.*, 2011). L'utilisation de milieux de congélation sans protéines d'origine animale doit encore être étudiée chez le cheval, mais les premiers essais réalisés avec du sperme réfrigéré sont décevants (Woelders *et al.*, 2007).

Le glycérol est l'agent cryoprotecteur le plus utilisé pour congeler du sperme. Alors que les spermatozoïdes humains (Agarwal, 2000), bovins (Baracaldo, 2007) et canins (Farstad, 1998) supportent des concentrations en glycérol entre 6 et 8 % du volume total, la

concentration chez le cheval ne devrait idéalement pas dépasser les 3,5 % du volume total (Vidament, 2005 ; Vidament *et al.*, 2005). Récemment, un milieu de congélation ne contenant que 2,5 % de glycérol a été développé et donne de très bons résultats de fertilité observée (Pillet *et al.*, 2008 ; 2011). Un autre milieu de congélation ne contenant que 1 % de glycérol est également disponible et donne de bons résultats de qualité de sperme (Alvarenga *et al.*, 2005). Cependant, ce milieu de congélation contient aussi des amides qui interviennent dans la cryopréservation, portant la concentration totale en agent cryoprotecteur total à 5 % (Alvarenga *et al.*, 2005). Le volume du milieu de congélation nécessaire pour atteindre la concentration finale désirée dans les paillettes est ajouté (Vidament, 2005).

Le premier palier de la descente en température consiste à équilibrer la température du sperme à 4°C pendant 75 minutes (Vidament *et al.*, 2000). Le sperme est ensuite conditionné en paillettes de 0,5 ml (Vidament *et al.*, 2000). Les paillettes sont refroidies dans un congélateur électronique qui envoie des vapeurs d'azote pour atteindre -140°C, avec une pente variant, selon le milieu de congélation utilisé, entre -20°C et -60°C par minute (Alvarenga *et al.*, 2005 ; Pillet *et al.*, 2008). Les paillettes sont ensuite immergées et stockées dans l'azote liquide (-196°C). Pour les décongeler, les paillettes sont immergées pendant 30 secondes dans un bain-marie à 37°C (Vidament, 2005). Deux paillettes de chaque lot sont ensuite analysées avant la commercialisation.

5. Détermination de la qualité du sperme équin

5.1. Concentration en spermatozoïdes

La concentration était classiquement déterminée par le comptage cellulaire sur hémocytomètre ou cellule de Thomas. L'utilisation de la photométrie a facilité la détermination de la concentration, mais certains biais existent si le sperme était contaminé par d'autres types cellulaires. De plus, cette méthode n'était pas utilisable pour du sperme dilué dans un milieu opaque, comme les milieux de congélation à base de lait. La coloration nucléaire à l'iodure de propidium après lyse membranaire et la détermination électronique du nombre de noyaux colorés représente actuellement la méthode la plus rapide et la moins biaisée (Johansson *et al.*, 2008).

Dans le sperme frais, la concentration en spermatozoïdes est habituellement comprise entre

150 et 300 x 10⁶ spermatozoïdes/ml (**Pickett, 1993**). Cependant, la concentration dépend du volume de plasma séminal émis par les glandes annexes : l'excitation sexuelle augmente la sécrétion des vésicules séminales, en augmentant le volume et en diminuant proportionnellement la concentration (**Magistrini et al., 1987 ; Pickett, 1993 ; Sieme et al., 2004**). Un éjaculat équin compte en moyenne 10 milliards de spermatozoïdes, ce nombre variant selon la fréquence et la répétition des récoltes (**Magistrini et al., 1987 ; Sieme et al., 2004**).

Lors du processus de congélation, le culot cellulaire obtenu après centrifugation peut être plus ou moins dilué avec le milieu de congélation. La concentration du sperme congelé dépend donc des options de commercialisation choisies lors de la production, mais aussi de la contrainte technique imposée par le milieu de congélation. En effet, si l'on utilise des milieux de congélation contenant de basses concentrations en agent cryoprotecteur, il faudra minimiser le rapport entre le volume du milieu de congélation et le volume du culot cellulaire afin que la concentration en agent cryoprotecteur ne soit pas trop basse dans la dilution finale. Le producteur peut donc définir sa dose de sperme congelé comme étant de huit paillettes de 0,5 ml (norme française, avec des concentrations en agent cryoprotecteur basse dans le milieu de congélation) ou de quatre paillettes de 0,5 ml (normes allemande et américaine, avec des milieux de congélation plus concentrés en agent cryoprotecteur), avec des concentrations respectives 100 ou 200 x 10⁶ spermatozoïdes/ml (**Samper, 2001 ; Vidament, 2005**). Il est conseillé d'inséminer avec des doses contenant au moins 400 x 10⁶ spermatozoïdes (**Vidament, 2005**).

5.2. Mobilité des spermatozoïdes

Les mouvements des spermatozoïdes peuvent être évalués au microscope entre lame et lamelle sur une platine de microscope chauffante. On distingue la mobilité totale et la mobilité progressive. La mobilité totale correspond au pourcentage de spermatozoïdes qui se déplacent quelle que soit leur trajectoire. La mobilité progressive reflète, quant à elle, la proportion de spermatozoïdes se déplaçant en ligne droite. L'évaluation de ces paramètres est fortement liée à l'opérateur et subjective, ce qui limite les comparaisons entre examens.

Les méthodes CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) ont permis de standardiser les examens de mobilité totale et progressive dans un même laboratoire et de caractériser le sperme au moyen de plusieurs paramètres définis à la figure 4 et dans le tableau I.

Cependant, le matériel d'analyse et les réglages de ces machines n'étant pas standardisés entre laboratoires, il est difficile de comparer les analyses entre des différents centres (Hoogewijs *et al.*, 2011). En effet, ni les vitesses minimales, ni les trajectoires, ni le type de lame et le milieu de dilution utilisés pour l'analyse de mobilité ne sont définis. L'absence d'un protocole standardisé implique malheureusement de grandes variations dans les résultats d'analyse et donc dans les qualités de sperme commercialisé.

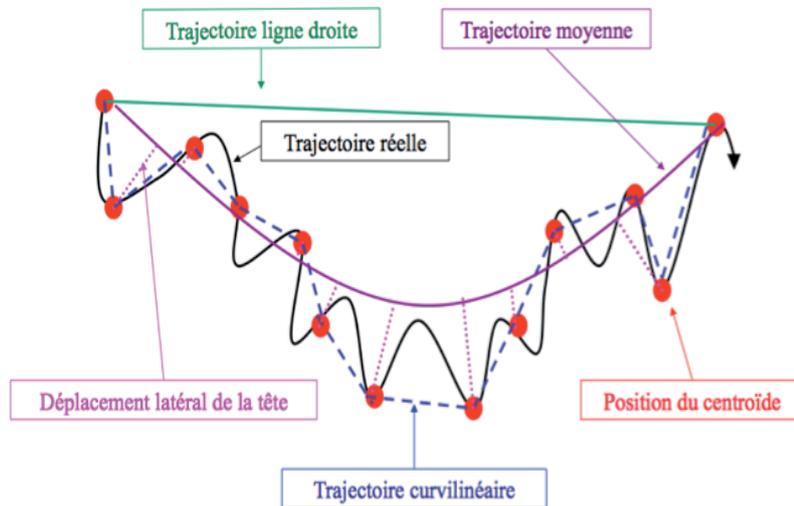


Figure 15 : Trajectoires analysées par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (*Computer Assisted Semen Analyser, CASA*).

La mobilité totale est le pourcentage de spermatozoïdes dont la vitesse de la trajectoire moyenne (*velocity average path*) du centroïde, qui représente le centre géométrique de la tête du spermatozoïde, est supérieure à 10-15 mm/s (Amann et Graham, 2011) ou supérieure à 20 $\mu\text{m/s}$ (Vidament, 2005). Du sperme équin frais maintenu à 37°C a une mobilité totale proche de 70 % (Amann et Graham, 2011), mais il existe de grandes variations entre les étalons et éjaculats ainsi que selon les conditions de récolte. Après décongélation, la mobilité totale doit approcher les 50 % (Amann et Graham, 2011). Cependant, dans le sperme frais comme dans le congelé, la mobilité totale est peu prise en compte : les doses sont idéalement définies à partir du nombre de spermatozoïdes progressifs.

La mobilité progressive est définie comme le pourcentage de spermatozoïdes dont la vitesse de la courbe moyenne (*Velocity Average Path, VAP*) est supérieure à 10-15 mm/s avec une

rectitude (STR) (rapport de la vitesse linéaire (VSL) sur la vitesse de la courbe moyenne (VAP)) égale à 100 % (Amann et Graham, 2011). Vidament (2005) a défini dans ses conditions d'analyse la mobilité progressive comme la proportion de spermatozoïdes avec une VAP supérieure à 40 $\mu\text{m/s}$ et une rectitude (STR) supérieure à 80 %. D'autres décrivent la mobilité progressive comme étant une VAP supérieure à 30 $\mu\text{m/s}$ et une rectitude (STR) supérieure à 50 % (Brinsko *et al.*, 2003). Idéalement, la mobilité progressive du sperme frais équin est supérieure à 50-60 % (Amann et Graham, 2011).

Tableau 10 : Définitions des trajectoires et des paramètres étudiés par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (*Computer Assisted Semen Analyser, CASA*)

Paramètre	Abréviation	Définition
Vitesse de la trajectoire curvilinéaire	VCL (<i>velocity curvilinear path</i>)	Vitesse de la trajectoire entre centroïdes dans un intervalle de temps défini
Vitesse de la trajectoire moyenne	VAP (<i>velocity average path</i>)	Vitesse de la trajectoire lissée entre n positions du centroïde par intervalle de n temps
Vitesse de la trajectoire en ligne droite	VSL (<i>velocity straightline path</i>)	Vitesse de la trajectoire entre 2 positions du centroïde pris entre n intervalle de temps
Linéarité	LN (<i>linearity</i>)	VSL/VCL
Rectitude	STR (<i>staightness</i>)	VSL/VAP
Oscillation	WOB (<i>wobble</i>)	VAP/VCL

Chez l'homme, une mobilité progressive de 30 % est un critère de qualité après décongélation, mais la congélation peut aussi être considérée comme réussie si la diminution de mobilité progressive entre le sperme frais et congelé est inférieure à 40 % (Brotherton, 1990 ; Zavos *et al.*, 1991 ; Royere *et al.*, 1996 ; Agarwal, 2000). Chez le cheval, on observe habituellement une diminution de 40 % de la mobilité progressive après décongélation, mais cette valeur est très variable selon le milieu de congélation utilisé et l'étalon. Des variations peuvent même être observées chez le même étalon entre les séances de prélèvement. De plus, la qualité d'un sperme congelé commercialisable doit être déterminée indépendamment des critères observés dans le sperme frais, ce qui empêche d'utiliser ce dernier critère pour le sperme d'étalon. Chez le cheval, il a été montré que la mobilité progressive et la vitesse de la trajectoire moyenne (VAP) après décongélation étaient corrélées avec la fertilité (Vidament, 2005). Sur cette base, les Haras nationaux français recommandent une mobilité progressive supérieure à 35 % et un nombre total de spermatozoïdes progressifs par dose supérieur à 140 x 10⁶ spermatozoïdes

Tableau 11 : Classification de la qualité des doses de sperme congelé proposée par **Vidament (2005)**

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

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

après décongélation (**Vidament, 2005**). Idéalement, les doses ne correspondant pas à ce critère de qualité ne sont pas commercialisées. Dans ce contexte, le concept de « congélabilité » (en anglais : « *frezability* ») du sperme désigne la capacité d'un éjaculat à être de qualité suffisante après décongélation sur base de sa mobilité progressive. Le tableau II (**Vidament, 2005**) propose un système d'harmonisation des doses commercialisées selon les normes des Haras nationaux français. Récemment, la *World Breeding Federation* a recommandé 250 x 10⁶ spermatozoïdes progressifs par dose. La cohabitation de ces deux normes complexifie les seuils à fixer pour la production alors que les conditions d'analyse ne sont toujours pas définies.

5.3. Examens microscopiques après coloration

L'inactivation du sperme (typiquement au formol) suivi de l'examen en microscopie à contraste de phase permet de déterminer la morphologie des spermatozoïdes sur la lame. Diverses colorations, dont le kit rapide Diff- Quick®, permettent aussi d'observer la morphologie des spermatozoïdes. Chez l'étalon, la proportion de spermatozoïdes anormaux doit être inférieure à 35 % (**Amann et Graham, 2011**). Les anomalies primaires, comme les anomalies de la tête ou de la pièce intermédiaire, sont le signe d'une dysfonction de la spermatogenèse tandis que les anomalies secondaires, comme les anomalies de la queue ou les gouttelettes distales sont l'expression d'erreurs de récolte (par exemple, le suremploi de l'étalon, qui mène à l'apparition de gouttelettes cytoplasmiques distales par manque de maturation épидidymaire) ou d'erreurs de conservation du sperme comme un choc thermique (**Pickett, 1993 ; Amann et Graham, 2011**). Les analyseurs automatiques de sperme

permettent aussi d'analyser la morphologie mais les résultats diffèrent encore trop souvent des observations à l'examen visuel (**Gravance *et al.*, 1997**). L'examen au Diff-Quick® permet en outre d'identifier les cellules d'origine inflammatoire ou les cellules somatiques provenant de la desquamation du tractus génital.

L'éosine est un colorant entrant dans les spermatozoïdes lorsque leur membrane est lésée (**Leeb et Rennhofer, 1954 ; Bjorndahl *et al.*, 2003**). La coloration à l'éosine nigrosine permet donc de colorer et de quantifier la proportion de spermatozoïdes dont l'intégrité membranaire est perdue. De nouvelles méthodes observant la fluorescence du noyau après coloration au l'iodure de propidium permettent de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes ayant une membrane perméable et de donner un indice d'intégrité membranaire et de viabilité (**Johansson *et al.*, 2008**).

5.4. Nouveaux contrôles de qualité

Les contrôles de qualité actuels reposent sur le postulat qu'un spermatozoïde progressif est de bonne qualité et que, par conséquent, il pourra féconder l'ovocyte. Cependant, une fois arrivé à l'ovocyte, le spermatozoïde va devoir utiliser d'autres organites pour accomplir d'autres fonctions : se fixer sur l'ovocyte, traverser la zone pellucide, fusionner et libérer une information génétique non altérée. Diverses structures du spermatozoïde ont été étudiées : on peut citer l'intégrité de l'acrosome (**Oliveira *et al.*, 2010**), l'intégrité de l'ADN (**Baumber *et al.*, 2003**), la fonction mitochondriale (**Ortega Ferrusola *et al.*, 2009b**), l'intégrité membranaire (**Oliveira *et al.*, 2010**) et les indices morphométriques qui évaluent la forme géométrique du spermatozoïde (**Gravance *et al.*, 1997**).

L'analyse par cytométrie de flux permet de standardiser l'interprétation de la fluorescence émise par les sondes moléculaires spécifiques aux différentes parties du spermatozoïde (**Varner, 2008**). Le recours à ces techniques permet d'augmenter le nombre de paramètres étudiés dans le spermogramme en donnant un aperçu plus complet de la qualité du sperme. Ces méthodes ont déjà montré un grand intérêt clinique : chez l'homme, la fragmentation de l'ADN est reliée à la fertilité du sperme (**Evenson et Jost, 2000**) et chez le cheval le potentiel des mitochondries dans le sperme frais permet de prévoir la qualité du sperme après décongélation (**Ortega Ferrusola *et al.*, 2009b**). Cependant, les valeurs seuils de chaque test ne sont pas fixées et les seules observations cohérentes

se font en comparant un individu de fertilité inconnue à un individu de fertilité connue (**Morrell, 2006**), ce qui limite les comparaisons entre équipes et même entre analyses.

6. Résultats, limites et perspectives en reproduction équine

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

6.1. Prédiction de la congélabilité

Actuellement, la qualité du sperme congelé d'un étalon ne peut pas être prédite de manière fiable. Les essais de congélation sont coûteux et requièrent l'immobilisation de l'étalon en centre de reproduction, l'empêchant de poursuivre sa carrière sportive. Des marqueurs de la congélabilité ont été décrits dans différentes espèces, mais leur utilisation reste encore anecdotique en raison des difficultés techniques et du manque de recul à propos de l'utilité de ces marqueurs en pratique courante.

En médecine humaine, plusieurs marqueurs de la congélabilité ont été étudiés. L'élastase, une enzyme contenue dans les neutrophiles est un marqueur de l'inflammation du tractus génital mais pas de la congélabilité (**Mania Pramanik et al., 2004 ; Eggert-Kruse et al., 2008**). Le HOST (*Hypo-Osmotic Swelling Test*), un test évaluant l'intégrité de la membrane plasmique basé sur l'entrée d'eau dans le spermatozoïde en milieu hypo-osmotique, ne semble pas corrélé aux caractéristiques observées après décongélation (**Chan et al., 1990 ; Volpes et al., 1992**). Cependant, des résultats inverses ont été obtenus lors d'une étude postérieure (**Aribarg et al., 1995**). La fluidité des membranes est un marqueur de la congélabilité du sperme humain (**Giraud et al., 2000**). Plus récemment, l'intégrité et la symétrie membranaire ont été déterminées par une technique simple de marquage du spermatozoïde frais à l'annexine V, détectable en cytométrie de flux (**Sion et al., 2004**). Le marquage des spermatozoïdes frais par l'annexine V est négativement corrélé à la qualité du sperme après congélation (**Sion et al., 2004**). La concentration en glutathion et l'expression des gènes de la glutathion peroxydase (GPx) 1 et 4, enzymes réduisant l'activité des FAO, sont un pronostic de la congélabilité du sperme humain (**Meseguer et al., 2004**), mais le dosage d'ARN messagers spécifiques à la GPx est difficilement utilisable en pratique quotidienne. L'intégrité membranaire et le statut antioxydant semblent donc jouer un rôle déterminant dans le processus de congélation et sur la qualité du sperme congelé. Actuellement, les causes et implications physiopathologiques de ces marqueurs observées dans le sperme frais sur la qualité du sperme congelé sont inconnues et leur utilisation reste

empirique. De plus, même si ces facteurs de congélabilité sont établis chez l'humain, ils sont difficilement accessibles pour les centres zootechniques.

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

En conclusion, en andrologie humaine et vétérinaire, la prédiction de la congélabilité manque de méthodes simples et utilisables en pratique.

6.2. Amélioration de la technique de congélation

Dans un premier temps, les courbes et paliers de descente en température utilisés pour l'étalon ont été empiriquement déduites et adaptées de ceux utilisés chez le bovin. Ces étapes de descente en température pendant le conditionnement de sperme sont progressivement remises en cause afin de les adapter à chaque espèce.

L'étape de refroidissement et d'équilibration à 4°C a été étudiée chez le cheval. Par exemple, la centrifugation à 4°C semble diminuer la qualité du sperme après décongélation si on la compare à celle effectuée 25°C (**Vidament *et al.*, 2000 ; Knop *et al.*, 2005**). Il a aussi été montré qu'après une centrifugation à 25°C, le refroidissement à 4°C pendant 12 heures avant

la congélation pouvait être bénéfique pour la mobilité en décongélation (**Crockett *et al.*, 2001**). L'allongement de la phase d'équilibration de la température à 4°C semble donc permettre une meilleure survie des spermatozoïdes à la congélation.

Les courbes de congélation sont aussi discutées : diverses modifications des vitesses de descente en température et des paliers de descente ont été testées. En se basant sur des propriétés physicochimiques du spermatozoïde comme la taille, le volume et la composition des membranes cellulaires, les courbes théoriques de descentes en température obtenues chez l'humain et le bélier sont supérieures à -100°C/min (**Curry *et al.*, 1994**), ce qui entrainerait en pratique une destruction de la plupart des spermatozoïdes. De nouveaux modèles mathématiques prennent en compte l'osmolarité, la concentration en agent cryoprotecteur et les températures de formation de glace intracellulaire (**Devireddy *et al.*, 2002 ; Thirumala *et al.*, 2003 ; Woelders et Chaveiro, 2004**). La vitesse optimale sans agent cryoprotecteur semble être de -30°C/min, alors qu'en présence de cryoprotecteur, elle est de -60°C/min chez le cheval et le chien (**Devireddy *et al.*, 2002 ; Thirumala *et al.*, 2003 ; Woelders et Chaveiro, 2004**). Ces modèles mathématiques incluant les données physico-chimiques du spermatozoïde et de son milieu sont actuellement mis en place pour tenter de définir des courbes de descente en température spécifiques à chaque type de sperme (**Devireddy *et al.*, 2002 ; Thirumala *et al.*, 2003 ; Woelders et Chaveiro, 2004**).

La vitrification (**Holt, 1997**) est une technique de congélation avec des descentes en température plus rapides (**Pegg, 2005**). Elle consiste en une brusque mise en contact du sperme avec l'azote liquide, mais elle nécessite généralement de hautes concentrations en agent cryoprotecteur (**Holt, 1997 ; Hossain et Osuamkpe, 2007**). Elle évite la formation de cristaux intracellulaires qui peuvent être dangereux pour la cellule et ses organites en court-circuitant la phase de réorganisation en cristaux. Des essais ont permis de mener à bien la congélation de spermatozoïdes de mammifères en l'absence d'agent cryoprotecteurs (**Isachenko *et al.*, 2003 ; 2004**). Chez le cheval, aucune étude n'a encore été réalisée pour déterminer si cette technique pouvait permettre de préserver la fertilité.

6.3. Amélioration des milieux de congélation

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

micellaires de lait et différentes proportions de jaune d'œuf et de glycérol (**Vidament *et al.*, 2001**).

Depuis la découverte de ses propriétés cryoprotectrices, le glycérol est utilisé pour congeler le sperme de nombreuses espèces. La concentration optimale en glycérol dans le milieu de congélation est variable.

D'autres études ont permis de séparer et de déterminer la concentration idéale en LDL (*Low Density Lipoproteins*) issus du plasma de jaune d'œuf chez le bovin (**Amirat *et al.*, 2004**), le chien (**Varela *et al.*, 2009**). Chez le cheval, des essais utilisant le plasma de jaune d'œuf qui contient des LDL ont montré de bons résultats en termes de fertilité alors que la mobilité après décongélation n'était pas augmentée (**Pillet *et al.*, 2008 ; 2011**), illustrant bien les limites de l'examen de la mobilité comme critère de fertilité.

En andrologie humaine, les milieux de congélation ne contiennent souvent plus de protéines animales. Les résultats obtenus chez l'homme avec des milieux de congélation « synthétiques » sont comparables à ceux contenant des protéines animales (**Akinola et Ashiru, 1993**). Chez le chien (**Beccaglia *et al.*, 2009**) et chez le verrat (**Erokhin et Evtukh, 2007**), l'utilisation de lécithine de soja pour remplacer le jaune d'œuf a montré de bons résultats.

Les mécanismes d'interaction et d'échange entre les spermatozoïdes et leur milieu sont encore peu connus. L'étude des échanges lipidiques, de la fixation des protéines et des effets du froid sur la membrane doit encore être approfondie chez le cheval. Cependant, les milieux sans protéines animales doivent rester économiquement viables pour avoir un réel intérêt en reproduction équine.

6.4. Implication des formes activées de l'oxygène

Depuis quelques années, les andrologies animales et humaines se penchent sur les origines et effets des FAO. Chez l'humain comme chez le cheval, ces molécules hautement réactives ont des effets délétères sur la mobilité progressive (**Baumber *et al.*, 2000 ; Pasqualotto *et al.*, 2000**), l'intégrité des membranes et l'ADN du spermatozoïde (**Baumber *et al.*, 2000 ; 2003 ; Said *et al.*, 2005**). La production de ces molécules semble augmenter lors du passage à 4°C avant la congélation (**Wang *et al.*, 1997b**). Actuellement, la recherche s'oriente sur deux axes: (i) trouver l'origine des FAO et (ii) inhiber leurs effets.

L'origine des FAO dans le sperme est multiple : chez l'humain, la voie de production dite intrinsèque correspond à la production endogène par le spermatozoïde et la

voie extrinsèque correspond à la production de FAO par les cellules inflammatoires, principalement les neutrophiles (**Henkel et al., 2005**). La voie extrinsèque semble être la principale source de FAO dans le sperme humain (**Henkel, 2005**). Récemment, une voie alternative, liée aux débris cellulaires présents dans le sperme, a été mise en évidence chez l'étalon (**Ponthier et al., 2008 ; 2010a ; 2010b ; 2012**) :

la myéloperoxydase (MPO), une enzyme produite par les neutrophiles, est présente dans le sperme, et elle est associée aux débris cellulaires présents dans le sperme en l'absence de neutrophiles. Sa concentration dans le sperme congelé influence négativement les paramètres de qualité après la décongélation (**Ponthier et al., 2008 ; 2010a ; 2010b ; 2012**).

L'autre approche consiste à inhiber la production ou les effets des FAO, mais les résultats ne sont pas constants selon les agents utilisés et les espèces étudiées. L'incorporation au sperme de molécules antioxydantes à large spectre comme la vitamine E ou la vitamine C ont donné des résultats contradictoires. Chez le cheval, l'ajout de vitamine E dans le sperme congelé n'a pas amélioré la mobilité après décongélation (**Baumber et al., 2005**), mais l'a augmenté chez le porc (**Breining et al., 2005**). Chez le chien, la vitamine E a augmenté la viabilité des spermatozoïdes après décongélation (**Michael et al., 2007**). Un autre antioxydant, l'acide ascorbique ou vitamine C, n'a pas montré de résultats sur le sperme frais de donneurs humains sains (**Branco et al., 2010**).

Alors que les effets antioxydants à large spectre se révèlent variables et parfois décevants, les études récentes sur des inhibiteurs spécifiques de la MPO comme le resveratrol et la curcumine ont quant à eux montré des effets positifs sur la qualité du sperme humain, ovin et porcin après décongélation (**Jang et al., 2009 ; Branco et al., 2010 ; Bucak et al., 2010**), indiquant qu'une inhibition ciblée des sources de FAO pourrait améliorer la situation.

Pour résumer, ces données montrent que la compréhension de l'origine des FAO dans le sperme reste incomplète et que l'apparition de traitements efficaces et ciblés contre le stress oxydant nécessite des nouvelles recherches.

7. Conclusions

Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée dont la fonction est de transporter et de délivrer le message génétique mâle dans le tractus génital femelle. La conservation du sperme demande la mise au point de critères standardisés permettant de déterminer les lésions subies lors du conditionnement. Cependant, les critères actuels d'appréciation des spermatozoïdes comme la mobilité et la viabilité sont arbitraires et les critères de définition de la mobilité ne sont pas harmonisés entre équipes. Même s'il existe des normes définissant la qualité des doses de sperme après décongélation, ces recommandations sont peu connues ou reconnues par les différents producteurs. De plus, la capacité du gamète mâle à apporter un matériel génétique en bon état au sein du gamète femelle n'est pas déterminée par les analyses de routine, comme la mobilité et la viabilité. Par exemple, l'intégrité de l'ADN ayant été directement associée à la fertilité chez l'humain, cette analyse sera peut-être ajoutée aux futures normes de qualité. Un organisme international central dictant les règles d'analyse permettrait de garantir la qualité des doses commercialisées.

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

Résultat et discussion

1. ANALYSES DES PARAMETRES SPERMATIQUES :

1.1. Test de normalité

Tableau 12 : Tests de normalité (**Shapiro-Wilk** et **Anderson-Darling**) pour les variables spermatiques continues issues de l'étude.

Variable	Moyenne	Ecart-type	Valeurs de P	
			Shapiro-Wilk	Anderson-Darling
Saut	1,66	0,73	<0,0001	<0,0001
TMPS RECOLTE	3,215	2,010	0,007	0,009
VOLUME ml	102,185	35,455	0,009	0,019
VOLUME GEL	38,667	25,794	0,012	0,005
V.FILTRE	63,148	33,677	0,002	0,002
CONCENTRAT	107,148	16,974	0,050	0,041
% MOBIL	3,000	0,707	0,001	0,000

Interprétation :

Le test de **Shapiro-Wilk** nous a révélé que le saut, temps de récolte, volume, volume de gel, volume après filtration et le pourcentage des spermatozoïdes mobiles ne suivent pas la loi normal (**p<0.05**). De ce fait des transformations logarithmique et racine carré ont été utilisées pour ces variables (**Tableau14**) afin qu'elles suivent la loi normale.

Résultat

1.2 Nombre de Sauts :

Tableau 13. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur le nombre sauts.

Paramètre	Class	Saut	Estimation	Erreur standard	OR	95% IC	P
Race	Arabe	1.71±0.72	0,023	0,300	1,02	0,55-	0,94
	Barbe	1.61±0.76	Référence			1.90	
Age	<9 ans	1.42±0.53	-0,314	0,342	0,73	0,36-	0,36
	≥9 ans	1.75±0.78	Référence			1.48	

Interprétation :

Le tableau nous montre aucun effet ni de race (**p=0.94**) ni de l'âge (**p=0.36**) de l'étalon sur le nombre de sauts.

1.3 Temps de récolte :

Tableau 14. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur le temps de récolte.

Paramètre	Class	Temps de récolte (min)	Estimation	Erreur standard	OR	95% IC	P
Race	Arabe	3.49±2.20			1,76	0,81-	0.15
	Barbe	2.48±1.54	Référence	0,57	0,38	3.84	
Age	<9 ans	2.12±0.86			1,58	0,24-	0.031
	≥9 ans	3.59±2.16	Référence	-0,55	0,43	1.40	

Résultat

Interprétation :

Le tableau montre un effet significatif de l'âge ($p=0.031$) sur le temps de la récolte de la semence. Aucun effet de la race de la race sur le temps de récolte des étalons ($p=0.15$).

1.4 Volume totale :

Tableau 15. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur le volume totale récolté

Paramètre	Class	Volume totale (ml)	Estimation	Erreur standard	OR	95% IC	P
Race	Arabe	104.57±36.89				0,54-	0.57
			0,23	0,41	1,27	2.59	
	Barbe	99.61±35.14	Référence				
Age	<9 ans	110.71±34.57				0,57-	0.4
			0,39	0,46	1,49	3.91	
	≥9 ans	99.20±36.14	Référence				

Interprétation :

Le tableau nous montre aucun effet ni de race ($p=0.57$) ni de l'âge ($p=0.4$) de l'étalon sur le volume totale récolté.

1.5 Volume de gel :

Tableau 16. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur le volume de gel

Paramètre	Class	Volume de gel (ml)	Estimation	Erreur standard	OR	95% IC	P
Race	Arabe	34.57±21.03				0,29-	0.36
			-0,39	0,41	0,68	1.58	
	Barbe	43.07±30.35	Référence				
Age	<9 ans	36.57±29.08				0,30-	0.63
			-0,23	0,47	0,79	2.08	

Résultat

Interprétation :

Le tableau nous montre aucun effet ni de race ($p=0.36$) ni de l'âge ($p=0.63$) de l'étalon sur le volume de gel.

1.6 Volume filtré :

Tableau 17. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur le volume de gel

Paramètre	Class	Volume filtré (ml)	Estimation	Erreur standard	OR	95% IC	P
Race	Arabe	69.28±43.66				0,73-	0.21
			0,51	0,40	1,67	3.78	
	Barbe	56.53±17.32	Référence				
Age	<9 ans	72.71±30.71				0,68-	0.24
			0,54	0,45	1,72	4.39	
	≥9 ans	59.80±34.76	Référence				

Interprétation :

Le tableau nous montre aucun effet ni de race ($p=0.21$) ni de l'âge ($p=0.24$) de l'étalon sur le volume filtré

1.7 Motilité :

Tableau 18. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur la motilité

Paramètre	Class	Motilité (%)	Estimation	Erreur standard	OR	95% IC	P
Race	Arabe	3.00±0.73				0,56-	0.58
			0,21	0,39	1,24	2.75	
	Barbe	3.00±0.70	Référence				
Age	<9 ans	3.43±0.53				0,98-	0.049
			0,89	0,44	2,42	6.01	

Résultat

Interprétation :

Le tableau nous montre que la motilité est élevée de une fois et demi (**OR=2.42 ; 95% IC= 0,98-6.01 ; p=0.049**) chez les étalons âgés moins de 9 ans par rapport les étalons âgés plus ou égale de 9 ans. Cependant, la race n'a aucun effet sur la motilité des **spermatozoïdes (p=0.58)**

1.8 Concentration :

Tableau 19. Régression linéaire généralisée (GLM) de l'effet de l'âge et de la race sur la concentration.

Paramètre	Class	Concentration	Estimation	Erreur standard	OR	95% IC	P
Race	Barbe	101.28±16.69				0,47-	0.041
	Arabe	113.46±15.46	Référence	-0,35	0,20	1,71	1.06
Age	<9 ans	111.57±14.95				0,71-	0.76
	≥9 ans	105.60±17.71	Référence	0,06	0,20	1,06	1.60

Interprétation :

Le tableau nous montre un effet significatif de la race (**p=0.041**) sur la concentration des spermatozoïdes, Aucun effet de l'âge n'a été enregistré sur la concentration de la semence des étalons.

2. EFFETS DES PARAMETRES SPERMATIQUES SUR LE TAUX DE REUSSITE DE L'INSEMINATION DES ETALONS :

Tableau 20 : Régression linéaire généralisée (GLM) de modèle multivarié de l'effet de temps de réaction, Volume total, volume du gel, concentration de l'éjaculat, mobilité totale des spermatozoïdes, la race et l'âge des étalons sur la réussite de l'insémination naturelle.

Paramètres		β	Erreur standard	OR	Intervalle de confiance 95%	Valeur de P
Temps de réaction		0,000	0,124	1,0004	0,771-1,297	0,997
Volume total		-0,002	0,010	0,997	0,977-1,018	0,814
Volume du gel		-0,029	0,022	0,971	0,927-1,017	0,210
Concentration		-0,001	0,016	0,998	0,966-1,032	0,946
Mobilité		0,625	0,409	1,868	0,793-4,400	0,143
Race	Arabe	1,920	0,882	6,823	1,076-43,24Z	0,042
	Barbe	Référence				
Age	<9ans	0,366	0,544	1,442	0,462-4,501	0,509
	≥9ans	Référence				

Interprétation :

La régression linéaire généralisée de modèle multivarié où nous avons introduit toutes les variables dans le même modèle nous révèle un effet significatif de la race des étalons sur le taux de réussite de l'insémination artificielle. De ce fait, la chance de réussite de l'insémination artificielle a été plus élevée de 6 fois chez la race Arabe par rapport la race barbe (**OR=6.82, IC95%= 1.07-43.23, p=0.042**). Cependant, nous n'avons remarqué aucun effet de temps de réaction, volume total, volume du gel, concentration, mobilité des spermatozoïdes et l'âge des étalons sur le taux de réussite de l'insémination artificielle (**p>0.05, tableau**

Discussion

Les paramètres Spermatiques :

Effet de l'âge et de la race sur le nombre sauts.

Aucun effet ni de la race $p=0.94$ ni de l'âge $p=0.36$ sur le nombre de sauts

Nos résultats sont similaires a tous les travaux cités par S. Deuleuze .2011, Videment, Ifce 2017 qui indique que plus la date de 1er saut est retardée plus la fertilité apparente est diminuée (le nombre de chaleurs exploitées diminue).

1. Temps de récolte :

Un effet significatif de l'âge ($p=0.031$) sur le temps de la récolte de la semence. Aucun effet de la race sur le temps de récolte des étalons ($p=0.15$).

Nos résultats sont similaires a ceux cités par A. Najjar, et all. 2009 qui rapporte que les étalons jeune ont un temps de récolte inferieur a celui des étalons les plus vieux.

On peut expliquer cet effet par le fait que plus l'étalon est jeune son métabolisme basale est plus accéléré par rapport a un étalon plus âgé. CLEMENT, 1995, dans son étude sur la caractérisation de la **fonction spermatique** de l'étalon (quantité de semence et surtout qualité fonctionnelle des spermatozoïdes indique que le temps de récolte est sous control hormonal qui est lui-même sous contrôle de l'alimentation et surtout de la biodisponibilité nutritionnelle.

Volume totale :

Aucun effet ni de race ($p=0.57$) ni de l'âge ($p=0.4$) de l'étalon sur le volume totale récolté. J. Ponthier 2014 ; Il est difficile de définir une norme pour le volume de l'éjaculat d'un étalon. En effet, l'excitation prolongée va augmenter la sécrétion des glandes annexes et donc le volume. Notre expérience montre qu'un étalon habitué à la récolte et éjaculant rapidement après son entrée en salle de monte aura un volume d'éjaculat de 40 à 77.7 ml tandis qu'un étalon s'étant excité longuement avant de saillir aura un volume d'éjaculat de 80 à 120 ml. De plus, il existe des variations individuelles et saisonnières dans le volume de l'éjaculat.

La fraction gel de l'éjaculat est produite par les vésicules séminales (Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D. Manual of Equine Reproduction, Third Edition edition. Maryland Heights: Mosby Elsevier, 2011; 323 cité par J.Ponthier 2014.). Elle devra être filtrée à l'aide de compresses ou de filtres commerciaux (Amann RP. Equine Reproduction, 1 edition. 1993, Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D. Manual of Equine Reproduction, 2011;323. Evenson D, Jost L. 2000. Afin d'avoir du sperme utilisable en

Discussion

solution. Cette production de gel est dépendante de facteurs individuels, raciaux et saisonniers.

3. Motilité :

Le tableau nous montre que la motilité est élevée de une fois et demi (OR=2.42 ; 95% IC= 0,98-6.01 ; p=0.049) chez les étalons âgés moins de 9 ans par rapport les étalons âgés plus ou égale de 9 ans. Cependant, la race n'a aucun effet sur la motilité des spermatozoïdes (p=0.58). Cependant nos résultats sont similaires à ceux cités par A.Najjar 2009 dans une étude avec les Haras nationaux qui indique que les pourcentages de mobilité chez les étalons les plus jeunes sont plus élevés par rapport aux étalons âgés P =0.0001. Love et al 2003 indique qu'au fur et à mesure que l'étalon avance en âge le pourcentage des spermatozoïdes diminue.

Les travaux dirigés par S. Deleuze et cités par J.Ponthier indiquent que la mobilité a longtemps été déterminée par examen de goutte épaisse sous le microscope. L'examineur déterminait le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de spermatozoïdes avançant en ligne droite, dénommés progressifs, de manière subjective. Pour réaliser un examen au microscope, il doit être équipé d'une plaque chauffante pour maintenir la lame à 37°C. La concentration doit être faible (20 à 30x10⁶spz/ml) et identique entre les différents éjaculats. L'utilisation de concentrations basses et semblables permet à l'œil de déterminer la mobilité de chaque spermatozoïde et évite d'influencer les résultats de mobilité. En effet, l'œil humain est naturellement attiré par la concentration, ce qui influencera positivement les résultats de mobilité si la concentration est plus élevée. L'examen par goutte épaisse au microscope ne permet que de donner une estimation à 5% de la mobilité et pour un même opérateur, la différence interpersonnelle étant parfois élevée.

1. Concentration :

Un effet significatif de la race (**p=0.041**) sur la concentration des spermatozoïdes, Aucun effet de l'âge n'a été enregistré sur la concentration de la semence des étalons.

La race arabe a présenté une concentration meilleure par rapport à celle du barbe cette différence peut être liée à la génétique des races pures par rapport aux autres races.

Ponthier et al 2014 explique que Il est très difficile de définir une norme pour la concentration en spermatozoïdes dans le sperme d'étalon : plus l'excitation est longue et plus les glandes annexes vont produire de plasma séminal, en diminuant mathématiquement la concentration (Amann RP. Equine Reproduction, 1^{ed}ition. 1993,

Discussion

Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D. Manual of Equine Reproduction, 2011;323. Evenson D, Jost L. 2000)

Dans notre étude, chez les étalons arabes montant sur la jument sans excitation préalable, des concentrations supérieures à 100×10^6 spz/ml vont être observées. Chez des étalons Barbes étant stimulés longuement avant la saillie, et montant plusieurs fois sur le mannequin avant d'éjaculer, des concentrations inférieures à 80×10^6 spz/ml peuvent être observées. La concentration en spermatozoïdes est diminuée en hiver (Janett F, Thun R, Niederer K, Burger D, Hassig M. 2003).

De plus, lors de récoltes répétées dans des conditions identiques, un effet individuel est souvent observé, la concentration et le volume se stabilisant.

Effets des paramètres spermatiques sur le taux de réussite de l'insémination des étalons :

La régression linéaire généralisée de modèle multivarié où nous avons introduit toutes les variables dans le même modèle nous révèle un effet significatif de la race des étalons sur le taux de réussite de l'insémination artificielle. De ce fait, la chance de réussite de la monte en main a été plus élevée de 6 fois chez la race Arabe par rapport la race barbe (OR=6.82, IC 95%= 1.07-43.23, p=0.042).

Nos résultats sont similaires à ceux cités par Langlois 1977, cité par Chevalier, 1980 qui rapporte 55 % de fertilité en monte en main. En Bretagne, en fin de saison le taux de fertilité était de 70 à 80 % de 1983 à 1985, et de 41 % par chaleur (Fauquenot, 1987).

Magistrini (1990) signale que pour les inséminations des haras nationaux en 1989 une fertilité de 82 % en fin de saison et de 43 % par cycle pour les étalons de sang et 77 % en fin de saison et de 42 % par cycle pour les étalons lourds.

Ce ci est peut être due a de nombreuses facteurs tel que la génétique du pur sang ainsi que les caractéristiques morpho métriques des étalons arabes qui peut un facteur limitant dans la qualité de la monte en main.

Pickett BW ; et all 1993 indique que Pour saillir, le dos et les membres postérieurs vont devoir fournir un effort important. Les pathologies ostéo-articulaires peuvent donc

Discussion

limiter l'instinct de saillie de l'étalon. D'autre part, le stress ou l'agressivité lors de la saillie ou de la récolte de sperme peuvent aussi devenir des facteurs limitant.

Conclusion

CONCLUSION

Pour ce qui est des analyses spermatiques ; la collecte du sperme en utilisant un vagin artificiel s'est avéré très efficace.

L'évaluation du sperme est la plus importante étape dans l'établissement de la fertilité de l'étalon.

Au cour de notre expérimentation nous avons remarqué un effet significatif de l'âge sur le temps de la récolte, et la motilité des spermatozoïdes.

Aucun effet ni de race ni de l'âge de l'étalon sur le volume totale récolté.

L'évaluation des étalons utilisés pour la reproduction doit être faite durant chaque année, avant chaque saison de reproduction afin d'établir le nombre de juments recommandé.

Un effet significatif de la race sur la concentration des spermatozoïdes et sur le taux de réussite de la monte en main, de ce fait, la chance de réussite de la monte en main a été plus élevée de 6 fois chez la race Arabe par rapport la race barbe.

La monte en main est la meilleure technique de reproduction indiquée chez les purs sangs arabes.

La comparaison entre les deux race des juments étudiée nous a montré que La race des juments présente un effet significatif sur le changement des paramètres biochimiques potassium, de l'urée, de la GGT, de l'Albumine et du cortisol.

Les juments arabes présente des valeurs en biochimie sérique nettement supérieur par rapport aux juments barbes ; c'est une race a sang chaud.

Les juments arabes présente des valeurs en hématologie très stable par rapport aux juments barbes ;un effet significatif de la race sur les paramètres hématologiques Hématocrite, VGM, CCMH, Leucocytes, Poly éosinophiles, Poly basophiles, Lymphocytes et plaquettes est enregistré.

A travers cette étude nous avons constaté que les chevaux nés et élevé en Algérie sont dotés d'un haut potentiel reproductif et même comportemental qui est dans le cas d'une bonne gestion peut être plus rentable et plus organisé cela fait penser a une amélioration de la gestion générale de la reproduction (planification des étalons, suivie des juments, introduction des techniques moderne de reproduction assistée) il convient d'approfondir les recherches liée aux troubles de la reproduction par utilisation des tests immunologiques, microbiologiques, cytologiques et génétiques.

Bibliographie

Bibliographie

Bibliographie

1. A. Margat, P. Doligez, **Ifce** Mise à jour : Août 2017 <https://www.haras-nationaux.fr>.
 2. A. Najjar, évaluation de la qualité des spermatozoïdes d'étalon pur sang arabe congelées dans le milieu INRA 96 supplémenté de jaune d'œuf et du glycérol 2009 .
 3. Amann RP, Graham JK. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL (eds), Equine Reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993;715-745.
- Amann RP. Physiology and endocrinology. In: McKinnon A.O. VJL (ed), Equine Reproduction, 1 edition. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993;658-685.
- Amelie .C et Valdieu .2015.
- Andrewartha KA , Caple IW (1980). Effects of changes in nutritional copper on erythrocyte superoxide dismutase in sheep. Res. Vet.. Sci. **28**, 101-104.
- Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. Fertil Steril 2004;81: 349-354.
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. J Androl 2003;24: 621-628.
- Baumber J, Vo A, Sabeur K, Ball BA. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. Theriogenology 2002;57: 1025-1033.
- Beilstein MA, Whanger PD (1983). Distribution of selenium and glutathione peroxidase in blood fractions from Humans, rhesus and squirrel monkeys, rats and sheep. J. Nutr. **113**, 2138-2146.
- Biochimie de Harper, 25^{ème} édition, Murray, Granner, Mayes, Rodwell.**
- Bjorndahl L, Soderlund I, Johansson S, Mohammadieh M, Pourian MR, Kvist U. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. J Androl 2004;25: 671-678.
- Braun JP, Lefebvre HP (2008). Kidney Function and Damage. In : Kaneko, Harvey, Bruss, editors. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. San Diego, Academic Press, 485-528.

Bibliographie

Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D. Manual of Equine Reproduction, Third Edition edition. Maryland Heights: Mosby Elsevier, 2011;323.

Burlikowska K, Bogusławska-Tryk M, Szymeczko R, Piotrowska A. Haematological and biochemical blood parameters in horses used for sport and recreation 2015 - Journal of Central European Agriculture.

Carlson GP (2009). Clinical chemistry tests. In : Smith, editor. Large animal internal medicine. 4th ed. Missouri, Mosby Elsevier, 375-397.

Carlson GP, Bruss M (2008). Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Balance. In : Kaneko, Harvey, Bruss, editors. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. San Diego, Academic Press, 529-559.

Cebulj-Kadunc N, Bozic M, Kosec M, Cestnik V: The influence of age and gender on haematological parameter in Lippizan horses. J Vet Med A. 2002;49:217-221.

Cornell University. Cornell University College of Veterinary Medicine [en ligne]. Available:<https://ahdc.vet.cornell.edu/sects/clinpath/reference/chem.cfm> [Consulté le 24 juin 2015]

Desjardins I, Cadoré JL. Analyses sanguines équine. I – Hématologie: Approche Clinique. Pratique Vétérinaire Equine. 2006;38(151):9- 22.

Desjardins I, Cadoré JL. Analyses sanguines équine. II – Biochimie. Pratique Vétérinaire Equine. 2006; 38(152):7-16. Burlikowska, et al. Journal of Central European Agriculture. 2015;16(4):370-382.

ECKERSALL P.D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: KANEKO J.J., HARVEY J.W., BRUSS M.L., (dir.) (2008). Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th edition. Burlington, MA, USA: Academic Press Elsevier, pp. 117-155. Tennant et Center, 2008 ; Hornbuckle et al., 2008).

Eckersall PD. Proteins Proteomics and the Dysproteinemias. In Kaneko, J.J., Harvey, J.W. and Bruss, M.L., Eds., Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 6th Edition, Academic Press, San Diego. 2008; 117-155.

Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. Methods Cell Sci 2000;22: 169-189.

Bibliographie

Ferreira LF, Reid MB (2008). Acute exercise and oxydative stress : a 30 year history. *Dyn. Med.* **8**, 1.

Finco DR, Groves C (1985). Mechanism of renal excretion of creatinine by the pony, *Am. J. Vet. Res.* **46**, 1625-1628.

Gonzalez O, Gonzalez E, Sanchez C, Pinto J, Gonzalez I, Enriquez O, Martinez R, Filgueira G, White A. Effects of exercise on erythrocyte beta adrenergic receptors and plasma concentrations of catecholamines and thyroid hormones in Thoroughbred horses. *Equine Vet J* 1998, 30: 72-78.

GRONDIN T.M., DEWITT S.F. Normal Hematology of the Horse and Donkey.

Grondin TM, Dewitt SF. Normal hematology of the horse and donkey. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th Edn; 2010.

Haras Nationaux 2017 <https://www.haras-nationaux.fr>.

Harvey RB, Hambright MB, Rowe LD. Clinical, biochemical and hematologic values of the American miniature horse: Reference values. *Am J Vet Res.* 1984;45:97-101.

Hoffmann WE, Solter PF (2008). Diagnostic Enzymology of Domestic Animals. In : Kaneko, Harvey, Bruss, editors. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. San Diego, Academic Press, 351-378.

Hoogewijs M, De Vlieghe S, De Schauwer C, Govaere J, Smits K, Hoflack G, de Kruif A, Van Soom A. Validation and usefulness of the Sperm Quality Analyzer V equine for equine semen analysis. *Theriogenology* 2011;75: 189-194.

Hornbuckle WE, Simpson KW, Tennant BC (2008). Gastrointestinal Function. In : Kaneko, Harvey, Bruss, editors. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. San Diego, Academic Press, 413-457.

Illera JC, Silvan G, Munro CJ, Lorenzo PL, Illera MJ, Liu IK, Illera M. Amplified androstenedione enzymeimmunoassay for the diagnosis of cryptorchidism in the male horse: comparison with testosterone and estrone sulphate methods. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;84: 377-382.

In: WEISS D.J., WARDROP K.J. (dir.) (2010). *Schalm's Veterinary Hematology*. Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell, pp. 821-828. Cordonnier et Fontaine, 2005.

Bibliographie

Jagric MS, Nemec SA, Zrimšek P, Kramaric P, Kos Kadunc V, Vovk T, Kobal S. Plasma malondialdehyde, biochemical and haematological parameters in standardbred horses during a selected field exercise test, *Acta Vet-Beograd*. 2012;62:53-65.

Janett F, Thun R, Niederer K, Burger D, Hassig M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 2003;60: 453-461.

Johansson CS, Matsson FC, Lehn-Jensen H, Nielsen JM, Petersen MM. Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin-nigrosin stain. *Anim Reprod Sci* 2008;107: 325-326.

Johnson RM, Goyette GJr, Ravindranath Y, Ho YS (2005). Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **39** , 1407-1417.

Kaneko, Harvey, Bruss, editors. Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 6th ed.

Kastner SBR, Feige K, Weishaupt MA, Auer JA. Heart rate and hematological responses of Quarter horses to a reining competition. *J Equine Vet Sci*. 1999;19:127-131.

Kedzierski W, Bergero D, Assenza A. Trends of hematological and biochemical values in the blood of young race horses during standardized field exercise tests, *Acta Vet-Beograd*. 2009;59:457-466.

Lassen ED, Swardson CJ. Hematology and hemostasis in the horse: Normal functions and common abnormalities. *Vet Clin N Am-Equine*. 1995;11:351-389.

Latimer KS et Rakich PM (1992). Peripheral Blood Smears . In : Cowell, Tyler, editors. *Cytology and Hematology of the Horse*. 1st ed. Goleta, California, American Veterinary Publications, 191-207.

Lauš S, Trailovic R, Đokovic S, Lazarevic M, Trailovic D. Comparative analysis of some serum proteins and immunoglobulin G concentration in the blood of Yugoslav Trotter mares and newborn foals, *Acta Vet-Beograd*. 2012;62:569-578.

Mayes (2002). Oxydation biologique. In : Murray, Granner, Rodwell, Mayes, editors. *Biochimie de Harper*. 25th ed. Bruxelles, De Boeck Université, 130-136.

McConaghy FF, Hodgson DR, Evans DL, et Rose RJ (1995). Equine sweat composition : effects of adrenaline infusion, exercise and training. *Eq. Vet. J. Suppl.* **20**, 158-164. McDonnell SM. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex

Bibliographie

copula ejaculation in stallions. *Anim Reprod Sci* 2001;68: 153-159.

Morrell JM. Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod Domest Anim* 2006;41: 63-67.

Murray (2002d). Muscle et cytosquelette. In : Murray, Granner, Rodwell, Mayes, editors. *Biochimie de Harper*. 25th ed. Bruxelles, De Boeck Université, 715-736.

Murray RK (2002a) Erythrocytes et leucocytes. In : Murray, Granner, Rodwell, Mayes, editors. *Biochimie de Harper*. 25th ed. Bruxelles, De Boeck Université, 763-779.

Murray RK (2002b) Porphyrines et pigments biliaries. In : Murray, Granner, Rodwell, Mayes, editors. *Biochimie de Harper*. 25th ed. Bruxelles, De Boeck Université, 359-373.

Murray RK (2002c). Métabolisme des xénobiotiques. In : Murray, Granner, Rodwell, Mayes, editors. *Biochimie de Harper*. 25th ed. Bruxelles, De Boeck Université, 780-786.

Neuberg-Zuchowicz K, Geringer de Oedenberg H. Changes in hematological parameters of show jumping horses during yearly training cycle. *Medycyna Weterynaryjna*. 2011;67(11):765-769. (In Polish)

Oliveira CH, Vasconcelos AB, Souza FA, Martins-Filho OA, Silva MX, Varago FC, Lagares MA. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 2010;118: 194-200.

Ortega Ferrusola C, Gracia-Calvo J, Duque J, Martin-Cuervo M, Ibanez-Garcia I, Ezquerro J. Evaluation of testicular perfusion with color and pulsed Doppler ultrasonography after "standing laparoscopic peritoneal flap hernioplasty technique". *International Symposium on Stallion Reproduction VI (ISSR VI)*, Vienna, 2012;504.

Ortega-Ferrusola C, Garcia BM, Gallardo-Bolanos JM, Gonzalez-Fernandez L, Rodriguez-Martinez H, Tapia JA, Pena FJ. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009;114: 393-403.

Pickett BW. Reproductive Evaluation of the stallion. In: McKinnon A.O. VJL (ed), *Equine Reproduction*, 1 edition. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993;755-768.

Ponthier J, de la Rebiere de Pouyade G, Desvals M, Spalart M, Franck T, Sertejn D, Deleuze S. Is neutrophil elastase associated with myeloperoxidase concentration and post-thawing parameters in equine frozen semen? *Anim Reprod Sci* 2010;121S: S200-S202.

Bibliographie

D, Deleuze S. Myeloperoxidase in equine semen: Concentration and Localization during freezing processing. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012;32: 32-37.

PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F., PARRILLA-HERNANDEZ S., HANZEN C., DELEUZE S. 2014 ; Congélation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives

Prvanovic N, Kostelic T, Novak B, Cergolj M, Grizelj J, Samardzija M, Filipovic N, Lipar M, Dobranic T. The influence of age and gender on haematological parameters in protected and endangered Murinsulaner horses. In: *Proceedings of the XVIth SIVE International Congress / Piccione, Ellena (ed). Bologna: SIVE = Societa Italiana Veterinari per Equini. 2010;30-31.*

Reagan WJ, Irizarry Rovira AR, DeNicola DB (2008a). Normal Red Blood Cell Morphology. In : *Veterinary Hematology Atlas of Common Domestic and Non-Domestic Species. 2nd ed. Ames, Iowa, Wiley Blackwell, 13-16.*

Reagan WJ, Irizarry Rovira AR, et DeNicola DB (2008b). Normal White Blood Cell Morphology. In : *Veterinary Hematology Atlas of Common Domestic and Non-Domestic Species. 2nd ed. Ames, Iowa, Wiley Blackwell, 33-46.*

Reagan WJ, Irizarry Rovira AR, et DeNicola DB (2008c). Platelets. In : *Veterinary Hematology Atlas of Common Domestic and Non-Domestic Species. 2nd ed. Ames, Iowa, Wiley Blackwell, 57-58.*

Riber C, Rubio MD, Marquez F, Pinedo M, Munoz A, Castejon F. Haematological changes observed in Andalusian horses with laminitis. *J Vet Med Sci. 1995;57:981-984.*

Rodwell VW (2002). Transformation des acides aminés en produits spécialisés. In : Murray, Granner, Rodwell, Mayes, editors. *Biochimie de Harper. 25th ed. Bruxelles, De Boeck Université, 347-358.*

ROUSSET Oriane, 2009 **APPREHENSIONS DU COMPORTEMENT DE L'ÉTALON EN MILIEU DOMESTIQUE.**

Rubio MD, Munoz A, Santisteban R, Tovar P, Castejon FM: Comparative haematological study of two breeds of foals (Andalusian and Arab) subjected to exercise of progressive intensity. *J Vet Med Sci. 1995;57:311-315.*

S. Deleuze, *GESTION DE LA JUMENT POULINIÈRE ET DE L'ÉTALON* 2011.

Senger PL. *Pathways to pregnancy and parturition, second edition. Pullman,, 2005;373.*

Bibliographie

Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006;21: 986-993.

The University of Edinburgh. The University of Edinburgh Influencing the World Since 1583 [en ligne]. Available:http://www.ed.ac.uk/polopoly_fs/1.19330!/fileManager/reference%20intervals.pdf [Consulté le 24 juin 2015]

UC Davis School of Veterinary Medicine. UC Davis Veterinary Medicine. [en ligne]. Available:http://www.vetmed.ucdavis.edu/vmth/local_resources/pdfs/lab_pdfs/UC_Davis_VMTH_Chem_Reference_Intervals.pdf [Consulté le 24 juin 2015]

b_pdfs

[/UC_Davis_VMTH_Chem_Reference_Intervals.pdf](#) [Consulté le 24 juin 2015]

Varner DD. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 2008;70: 448-462.

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

Weiss D, Burger D, Weishaupt MA, Fakler A, Spichiger UE, Giese L, et al. (2002). Effects of a 61,7 km ride on magnesium and calcium homeostasis in well trained endurance horses. *J. of Eq.Vet. Sci.* **22**, 77-83.

Weiss DJ, Wardrop KJ (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6TH; 2010.

Weiss L (1984). *The blood cells and hematopoietic tissues*. 2nd ed. Elsevier, New York, 573p.

Welles EG (2010). Interpretation of equine leukocytes responses. In : Weiss, Wardrop, editors. *Schalm's veterinary hematology*. 6th ed. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell, 314-320.

White A, Handler P, Smith EL (1973). *Principles of Biochemistry*. New York, McGraw-Hill Williams DM, Lynch RE, Lee GR, and Cartwright GE (1975). Superoxide dismutase activity in copper-deficient swine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **149**, 534-536.

Winnicka A. *Reference values of basic laboratory research in veterinary sciences*. 1st ed., SGGW Warszawa; 2011.