



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abd El Hamid Ibn Badis – Mostaganem

Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département d'Agronomie

Laboratoire de physiologie animale appliquée

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de

Master En sciences agronomiques

Spécialité : Génétique et Reproduction animale.

THEME :

La Spermoculture Chez Le Cheval

Présenté par : BENCHAIB Mohamed Nadjib

Devant le jury :

Présidente	: Mme SAIAH Farida	MCB	univ.Mostaganem
Examinatrice	: Mme YAHIAOUI Hassiba	MCB	univ.Mostaganem
Encadreur	: M. SAIM Mohamed Said	MCB	univ.Tiaret
Co- Encadreur	: Mme. SOLTANI Fatiha	MAA	univ.Mostaganem

Année Universitaire : 2019- 2020

Remerciement

Toute notre grande gratitude, grâce et remerciement à ALLAH le tout puissant et miséricordieux je tiens à remercier vivement tous ceux qui, de près ou de loin ont participé à la rédaction de ce modeste travail il s'agit plus particulièrement :

À tous les enseignants de l'université Mostaganem qui ont contribué à notre formation, en particulier du département **d'agronomie**

Je tiens tout d'abord à remercier mon encadreur Dr. SAIM Mohamed said, pour la confiance qu'il m'accorde en me proposant ce thème. De plus, son enthousiasme, son encouragement, son entière disponibilité au cours de ce travail et ses judicieux conseils.

Je tiens aussi à remercier mon Co- Encadrant : Mme. SOLTANI fatiha qui m'a confié ses rigueurs scientifiques et son sens d'écoutes et d'échanges.

Je vifs remerciements aux membres de jury et à sa présidente .

Je tiens enfin à remercier également la famille ASNOUNE pour leur soutien, conseils et aides.

Merci

DÉDICACE

JE DÉDIE CE TRAVAIL AUX ÂMES
PURES QUI NOUS ONT TOUJOURS
ILLUMINÉ ET ACCOMPAGNÉ DURANT
NOS ÉCHECS ET FORCES ET C'EST
GRÂCE A LEURS AMOURS ET
SOUTIENS QUE NOUS SOMMES CE NOUS
SOMMES AUJOURD'HUI.

UN DEDICACE SPECIALE A MA
GRAND-MÈRE MIMMA RABI

YERHAMEHA

Résumé

La spermoculture est un examen d'aide au diagnostic de certaines infections (induisant ou non à un problème de fertilité masculine). Elle accompagne ou suit généralement un spermogramme ou spermocytogramme qui sont des examens de première intention qui peuvent aussi être complétés d'examens visant à apprécier les fonctions fécondantes du spermatozoïde (Cf. capacités de pénétration de l'ovocyte), ou celles impliquées dans la mobilité nécessaire à la traversée des voies génitales féminines.

La spermoculture guide le choix de l'andrologue vers une thérapeutique antibiotique. Une spermoculture négative ne garantit pas l'absence d'infection surtout en présence d'une leucocytose.

La congélation des spermatozoïdes est à l'origine d'une importante diminution du métabolisme voire son arrêt complet.

Le refroidissement entraîne un changement de composition des membranes, à l'origine d'une altération voire d'une rupture de la membrane. Ce changement de composition de membrane peut entraîner une « fausse » réaction acrosomique et ainsi diminuer la durée de vie du spermatozoïde ainsi que son pouvoir fécondant, c'est ce qu'on appelle la cryocapacitation.

L'étape de centrifugation est réalisée après la récolte de la semence et a pour but de séparer le liquide séminal des spermatozoïdes et d'améliorer la qualité de la semence réfrigérée ou congelée. Cependant, la centrifugation est à l'origine de perte de spermatozoïdes lorsque la force utilisée n'est pas adaptée. De nouvelles techniques de centrifugation sont de plus en plus utilisées telles que la centrifugation sur « coussins » qui permet de réduire les dommages causés aux spermatozoïdes ou la centrifugation sur colloïdes et la filtration dont le but est de sélectionner un sperme de haute qualité

Le conditionnement correspond au fractionnement de la semence dans le but de la rendre plus facilement stockable, identifiable et utilisable. Il existe deux types de conditionnement chez les différentes espèces : les pastilles et les paillettes, les paillettes étant les plus couramment utilisées de nos jours. Le volume des paillettes ainsi que la concentration en spermatozoïdes dans les paillettes possèdent une influence sur la qualité de la semence. En général, ce sont des paillettes de 0,25 millilitre qui sont utilisées avec une concentration de 200 millions de spermatozoïdes par millilitre

Ces dernières années l'origine génétique de certains problèmes de subfertilité chez l'étalon a été étudiée par le biais de technologies émergentes. D'autres études, destinée à améliorer la compréhension de la fertilité de l'homme, ont abordé les mécanismes moléculaires de régulation du développement et de la fonction des spermatozoïdes. Ses travaux pourraient ainsi avoir un intérêt chez l'étalon, même s'il convient de rester prudent quant à l'extrapolation de résultats d'une espèce à l'autre

Mots clés : Spermoculture-sperme-cryoconservation-congélation-semence .

Abstract

Sperm culture is an examination to help diagnose certain infections (whether or not it induces a male fertility problem). It generally accompanies or follows a spermogram or spermocytogram, which are first-line examinations, which can also be supplemented by examinations aimed at assessing the fertilizing functions of the spermatozoon (Cf. oocyte penetration capacities), or those involved in mobility. necessary for crossing the female genital tract.

Sperm culture guides the andrologist's choice towards antibiotic therapy. A negative sperm culture does not guarantee the absence of infection, especially in the presence of leukocytosis.

Freezing sperm causes a significant decrease in metabolism or even a complete stop.

The aim of the study was to evaluate the zootechnical performance of dairy cows and to determine the strengths and weaknesses of the dairy cattle herd management with regard to reproductive management, particularly the synchronization of heat, reproductive performance and productivity of females. The study was based on the use of the following protocols (PRID Delta, use of prostaglandin F2 Alpha, GPG protocol).

Cooling leads to a change in membrane composition, causing membrane alteration or even rupture. This change in membrane composition can lead to a "false" acrosomal reaction and thus reduce the life span of the sperm and its ability to fertilise, this is called cryocapacitation.

The centrifugation step is carried out after the semen is harvested and its purpose is to separate the seminal fluid from the sperm and to improve the quality of the refrigerated or frozen semen. However, centrifugation causes loss of sperm when the force used is not adapted. New centrifugation techniques are increasingly being used such as "cushion" centrifugation, which reduces sperm damage, or colloid centrifugation and filtration to select high quality semen .

Conditioning is the fractionation of semen to make it more easily storable, identifiable and usable. There are two types of conditioning in different species: pellets and straws, with straws being the most commonly used nowadays. The volume of the straws as well as the concentration of sperm in the straws have an influence on the quality of the semen. In general, 0.25 milliliter straws are used with a concentration of 200 million spermatozoa per milliliter.

In recent years the genetic origin of some stallion sub-fertility problems has been studied through emerging technologies. Other studies, aimed at improving the understanding of male fertility, have addressed the molecular mechanisms regulating the development and function of spermatozoa. This work could thus be of interest to the standard, although caution should be exercised when extrapolating results from one species to another.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
DEDICACES.....	3
Résumé.....	4
Abstract	5
LISTES DES ILLUSTRATIONS	9
LISTES DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES ABBREVIATION	12
INTRODUCTION	13
Chapitre I : Rappels d'Anatomie et de Physiologie	16
I. L'appareil génital du mâle : rappels anatomiques....	16
1. Les enveloppes des testicules ou bourses testiculaires	17
a. Les enveloppes superficielles.....	17
b. Les enveloppes profondes.....	18
2. Les testicules	19
a. Caractères généraux, conformation et moyens de fixité	19
b. Structure du testicule.....	20
3. Les voies spermatiques	21
a. L'épididyme.....	22
b. Le canal déférent.....	22
c. Les glandes vésiculaires.....	23
4. L'urètre du mâle (canal uro-génital)	23
a. Caractère généraux	24
b. Glandes annexées à l'urètre.....	25
c. Formations érectiles annexées à l'urètre	25
5. La verge ou pénis.....	27
a. Caractères généraux.....	27
b. Vascularisation et innervation	29
c. Le fourreau ou prépuce	30
II. Physiologie de la reproduction chez l'étalon	31
1. La spermatogénèse et ses spécificités chez l'espèce équine	31
2. La régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez l'étalon.....	35
a. L'axe hypothalamo-hypophysaire	35
b. Les hormones testiculaires.....	36
c. La régulation de la fonction de reproduction.....	37

3. La puberté chez l'étalon	38
Chapitre II : Le sperme de l'étalon	40
I. Le sperme de l'étalon : de la production à la fécondation.....	40
1 – Aspect externe et composition.....	40
1.1 – Aspect externe.....	40
1.2 – Composition chimique.....	41
2 – Spermatogénèse et spermiogénèse	41
2.1 – Spermatogénèse.....	42
2.2 La spermiogénèse.....	43
2.3 – Facteurs d'altération de la formation des spermatozoïdes	44
3 – Structure du spermatozoïde.....	45
3.1 – La tête.....	45
3.2 – La région intermédiaire	46
3.3 – Le flagelle.....	46
4 – Devenir des spermatozoïdes	47
4.1 – La maturation dans l'épididyme.....	47
4.2 – La remontée des voies génitales femelles.....	47
4.3 – La fécondation.....	48
Chapitre III : Le traitement de la semence équine	52
Le traitement de la semence équine.....	52
1 – Prélèvement de sperme d'étalon	52
1.1 – Le vagin artificiel.....	52
1.2 – Caractéristiques du mannequin	55
2 – Techniques générales de manipulation de la semence.....	57
3 – Evaluation macroscopique de la semence	58
4 – Détermination de la concentration en spermatozoïdes	59
4.1 – Utilisation de la cellule hématimétrique	59
4.2 – Utilisation du spectrophotomètre.....	61
4.3 – Utilisation du compteur de particules.....	61
4.4 – Détermination du nombre total de spermatozoïdes par éjaculat	62
5 – Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes.....	62
5.1 – Méthode classique	63
5.2 – Autres méthodes	66
6 – Etude morphologique des spermatozoïdes.....	69
6.1 – Diversité des méthodes possibles	69
6.2 – Evaluation et classification	71

6.3 – Interprétation de la qualité de la semence	72
Chapitre IV : La cryoconservation.....	75
I. Définition et objectifs de la cryoconservation.....	75
A. Définition	75
B. Objectifs de la cryoconservation de la semence.....	75
C. Avantages et inconvénients de la cryoconservation.....	76
II. Les effets de la cryoconservation sur la semence.....	77
A. Effets de la cryoconservation sur les différentes fonctions cellulaires	77
1.Effets sur le métabolisme cellulaire.....	77
2.Effets sur les membranes cellulaires.....	77
3.Effet sur le noyau et l'AND.....	78
4.Les changements de type capacitation.....	79
B. Effets des différentes étapes de cryoconservation sur les spermatozoïdes.....	80
1.Effet de l'ajout de l'agent cryoprotecteur.....	80
2.Conséquences de l'étape de congélation proprement dite et de décongélation.....	80
III. Les différentes étapes de la cryoconservation de la semence..	83
A. Récolte et évaluation de la semence	83
B. Les techniques de séparation des différentes phases du sperme	83
1. La centrifugation.....	84
2. Les autres techniques de séparation de la semence	89
C. La dilution.....	96
1. La composition du dilueur.....	97
2. Le nombre d'étapes.....	107
3. Le taux de dilution ou la concentration finale en spermatozoïdes.....	107
D. L'équilibration	109
E. La réfrigération de la semence.....	111
F. Le conditionnement	115
G. La congélation.....	118
H. Le stockage et le transport de la semence congelée	124
I. La décongélation	125
CONCLUSION	129
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	130

LISTES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Représentation schématique des enveloppes testiculaires. (BARONE 2001).....	18
Figure 2: Testicule et épидидyme gauches du cheval. Conformation et moyen de fixité.	20
Figure 3: Schéma de la conformation interne du testicule et de l'épididyme.	21
Figure 4: Schéma de l'aspect médial du canal déférent droit de l'étalon. (BARONE, 2001).....	23
Figure 5: Schéma de l'aspect médial de l'urètre droit de l'étalon. (BARONE, 2001).....	24
Figure 6: Coupe transversale du pénis du Cheval, au niveau de la partie moyenne du pénis. (BARONE, 2001)	28
Figure 7: Coupe transversale du pénis du Cheval, en arrière de la couronne du gland (le gland isolé est vu par derrière). (BARONE, 2001)	28
Figure 8: Vascularisation de la verge chez l'étalon. A. : artère, V. : veine. (BARONE, 2001)	29
Figure 9: Partie libre du pénis et prépuce du Cheval. (CONSTANTINESCU, 2010)	30
Figure 10: Etapes de la spermatogénèse. (d'après AMANN, 2011).....	32
Figure 11: Schéma illustrant l'organisation cellulaire des tubes séminifères. (d'après AMANN, 2011)	34
Figure 12: Schéma de la régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez l'étalon. A : activine; E : œstrogènes ; I : inhibine ; T : testostérone. (d'après AMANN, 2011)	37
Figure 13: aspect du sperme d'étalon après centrifugation.....	41
Figure 14: la spermatogénèse (d'après Nicole Vacheret)	42
Figure 15: formation de l'acrosome au cours de la spermiogénèse	43
Figure 16 : structure d'un spermatozoïde (d'après Mariana Riuz)	46
Figure 17 : la fécondation :	50
Figure 18: préparation d'un vagin artificiel de type Missouri (mise en place du manchon de	54
Figure 19: manchons plastiques (capotes) pour vagin de type Missouri sans (A) ou avec (B) poche de recueil (d'après IMV-technologies).....	55
Figure 20: mannequin de récolte	56
Figure 21 : cuve pour bain-marie contenant le milieu de dilution et les récipients allant	57
Figure 22: cellules de Thoma (d'après les laboratoires Fiers) : les spermatozoïdes présents dans les grands carrés sont comptés.....	59
Figure 23 : représentation de l'image obtenue lors de l'observation des spermatozoïdes sur une cellule de Thoma (d'après Milian Swiss).....	60
Figure 24: photomètre AccuRead®(d'après IMV technologies).....	61

Figure 25: représentation de cinq types de trajets de spermatozoïdes équiins	63
Figure 26: microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante	65
Figure 27: représentation schématique des anomalies chromosomiques possibles.....	72
Figure 28: Exemple de « coussin » de centrifugation MaxiFreeze® de chez IMV Technologies et CushionFluid® de chez Minitube	87
Figure 29: Filtre Sperme Filter® (Barrier-Battut, 2013).....	88
Figure 30: Lavage et sélection des spermatozoïdes après centrifugation sur colloïde monocouche (BarrierBattut, 2013).....	89
Figure 31: Lavage et sélection des spermatozoïdes par centrifugation sur colloïde monocouche en fonction du volume de sperme (Barrier-Battut, 2013)	90
Figure 32: Les différentes techniques de centrifugation de la semence : intérêts et inconvénients (BarrierBattut, 2013).....	95
Figure 33: Exemple de boîte de transport pour semence réfrigérée (Minitube®)	113
Figure 34: Identification des paillettes (Clichés CERREC).....	116
Figure 35: Paillettes dans les vapeurs d'azote liquide (Cliché CERREC, photo de gauche. Cliché UCEAR, Centre de collecte de semences bovines, photo de droite).....	118
Figure 36: Positionnement vertical des paillettes (Cliché CERREC)	123
Figure 37: Stockage des paillettes dans la cuve d'azote liquide (Cliché CERREC, photo de gauche. Cliché UCEAR, Centre de collecte de semences bovine, photo de droite).....	124
Figure 38: Stockage des paillettes dans le container de transport en polystyrène (Cliché CERREC).....	125
Figure 39: Retrait des paillettes de la cuve d'azote liquide avant leur transfert dans le bain- marie (Cliché UCEAR, Centre de collecte de semences bovines).....	125

LISTES DES TABLEAUX

Table 1 : les différents types de vagins artificiels.....	53
Table 2: description des dilueurs de semence couramment employés	64
Table 3: description des préparation de différentes colorations pour l'observation	70
Table 4: caractéristiques du sperme d'étalon (spz : spermatozoïdes).....	73
Table 5: Avantages et inconvénients des différentes techniques de centrifugation(d'après : Barrier-Battut, 2013)	96
Table 6: Exemples de dilueurs du commerce (d'après: IMV technologies, Mopa Global, Minitube)	109

LISTE DES ABBREVIATION

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ALH**: Amplitude of Lateral Heat Displacement
- ART** : technologies de reproduction assistée
- ATP** : Adénosine Tri Phosphate
- BCF**: Beat Cross Frequency
- BHT**: butylhydroxytoluene
- CLC**: cholesterol-loaded cyclodextrin
- DMSO**: diméthylsulfoxyde
- DSO**: Daily Sperm Output
- EDTA**: Acide Éthylène Diamine Tétracétique
- FSH**: Follicle-Stimulating Hormone
- GnRH**: Gonadotropin-Releasing Hormon
- HTMA**: Hamilton-Thorn motility analyzer
- IA** : L'insémination artificielle
- LDL**: low-density lipoproteins
- LH** : luteinizing hormone
- MAD**: Mean Angular Displacement
- MDA**: malondialdéhyde
- MOT** : Total Spermatozoal Motility
- PMOT**: Progressive Spermatozoal Mobility
- ROS** : Reactive Oxygen Species
- SDS** : Sodium dodécyl sulfate
- VCL**: Curvilinear Velocity
- VSL** : Straight-Line Velocity
- ZP** : zone pellucide
- ISVT** : instituts des sciences vétérinaires Tiaret

INTRODUCTION

Le cheval occupe une place privilégiée dans la vie et l'imaginaire des populations rurales algériennes. 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 all 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 principales 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 (dit Selle algérien). Les 10% restante 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, pur sang Arabe, Arabe-Barbe et Selle algérien.

Vu cette importance, le développement de l'élevage équin a nécessité sa rationalisation et l'emploi des techniques modernes de gestion des ressources génétiques équines, plus précisément les biotechnologies de la reproduction.

Pour la sauvegarde du matériel génétique est la pureté des lignées plusieurs travaux ont été effectués dans la spermoculture.

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'embryons (J.Ponthier, et all 2015) Quelle que soit la méthode utilisée, l'objectif principal est d'obtenir une bonne fertilité en fin de saison (*Cité par Marie A et all, 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.

Notre étude vise comme objectif principal la contribution à la cryoconservation du sperme du cheval on maîtrise les facteurs de réussite de la récolte ; l'analyse et le traitement de la semence équine est cela par :

- choix des étalons reproducteurs.
- préparation du matériel nécessaire.
- récolte et analyse des paramètres spermatiques des étalons sélectionnés par l'étude.
- conservation de la semence que ce soit par la méthode réfrigérée ou par la cryoconservation.
- analyse des paramètres spermatiques après la décongélation.
- étude microbiologique de la semence équine (identification des germes ou la flore totale dans le sperme de l'étalon)

Autrefois, dans notre pays la seule technique de reproduction utilisée dans l'espèce équine était la monte naturelle qui est actuellement le moyen disponible au niveau du service de reproduction équine à l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret.

Comme toute discipline sportive le choix des étalons se fait sur des bases des performances obtenues, cela conduit à une sur exploitation des étalons et par conséquent un taux de fertilité qui n'est pas satisfaisant, de plus le manque des moyens diagnostiques permettant d'évaluer la fertilité au niveau du HARAS national de Chaouchaoua oblige le personnel à écarter des juments et des étalons fertile tout en favorisant d'autres infertiles, ainsi que la monte naturelle qui est elle-même un moyen de dissémination des maladies vénériennes.

Sur le plan économique un étalon peut saillir trois juments par semaine (à raison de 10000 DA/ Jument) ; alors L'étalon est économisé puisqu'en moyenne un éjaculat permet de servir environ 25 juments sans limitation du nombre d'IA par chaleur (250000DA), de plus il peut poursuivre parallèlement une carrière sportive (A. Margat, P. Doligez, 2017).

Vu les circonstances sanitaires actuelles causées par la pandémie du covid-19, on n'a pas pu de réaliser la partie expérimentale pour cela nous nous somme limitée à la partie bibliographique qui est structuré en deux parties.

❖ La première partie comprend deux chapitres ;

- le premier chapitre est consacré à un rappèle anatomique et physiologique de l'appareil reproducteur de l'étalon et le deuxième chapitre étudie le sperme de l'étalon.

❖ La deuxième partie est consacrée à la spermoculture, cette dernière elle-même est constitué deux chapitres :

-le troisième chapitre concerne l'analyse et le traitement de la semence et un quatrième chapitre la cryoconservation de la semence équine.

Chapitre

I

Chapitre I : Rappels d'Anatomie et de Physiologie

I. L'appareil génital du mâle : rappels anatomiques

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

Une des caractéristiques de l'organe qu'est le testicule est qu'il subit une migration, encore appelée descente testiculaire, au cours du développement de l'individu. Ce phénomène est commun à l'ensemble des mammifères et permet au testicule de se trouver à une température inférieure à la température corporelle. Il s'agit là d'une obligation fonctionnelle, nécessaire à une spermatogénèse efficace (ROGER, 2009)

Principe de la descente testiculaire

La migration ou descente testiculaire est le phénomène par lequel la glande génitale mâle subit un déplacement qui la conduit de la région sous-lombaire à la région sous-inguinale dans un diverticule de la cavité péritonéale où elle vient faire saillie sous des enveloppes, apparentées à la paroi abdominale (BARONE, 1956).

Au début du développement embryonnaire, l'ébauche testiculaire est suspendue au méso urogénital en position intermédiaire entre le ligament diaphragmatique (crânialement) et le *gubernaculum testis* (caudalement). Ce dernier est constitué de trois éléments : le ligament testiculaire qui le solidarise au testicule, le ligament inguinal et le ligament scrotal.

Ces deux derniers éléments sont solidaires de la cavité pelvienne.

Lors du développement fœtal, ces différents éléments de suspension ont une croissance différentielle : la croissance du *gubernaculum testis* est interrompue alors que le ligament diaphragmatique s'allonge, suivant ainsi la croissance du fœtus. Comme la cavité abdominale continue pour sa part de s'agrandir, le *gubernaculum testis*, fixé en région inguinale, impose ainsi au testicule une descente relative. Dans un deuxième temps, un phénomène de rétraction active du *gubernaculum testis* se met en place : l'ébauche testiculaire est alors attirée à l'extérieur de la cavité abdominopelvienne. Au même moment, la zone d'attache caudale du *gubernaculum testis* subit une cavitation : la cavité vaginale est alors mise en place. (BARONE 1956 ; ROGER 2009).

Chez les équidés, cette migration testiculaire est définitive : une fois descendus, les testicules ne peuvent remonter dans la cavité abdominale du fait de la présence d'une constriction de l'anneau vaginal, phénomène survenant après la naissance (BARONE, 2001). Une fois leur migration achevée, les testicules, les premières voies d'excrétion (épididymes et début des canaux déférents) ainsi que leurs vaisseaux se trouvent logés dans les bourses testiculaires.

1. Les enveloppes des testicules ou bourses testiculaires

De la surface vers la profondeur, ces bourses sont constituées de cinq tuniques superposées, elles-mêmes pouvant être subdivisées en plusieurs plans. Il s'agit du scrotum, du dartos, du fascia spermatique externe, du crémaster et de la fibro-séreuse, divisée en fascia spermatique interne et tunique vaginale (BARONE, 2001).

a. Les enveloppes superficielles

Scrotum

Il s'agit de l'enveloppe testiculaire la plus superficielle, simplement constituée par la peau et le dartos. La peau du scrotum présente des caractères particuliers : elle est mince, élastique et recouverte par un duvet fin. Contrairement aux autres enveloppes testiculaires, le scrotum constitue un sac commun aux deux testicules (BARONE, 2001).

Dartos

Il s'agit d'une couche de tissu musculaire composée de fibres conjonctives et de fibres élastiques qui tapisse la face interne de la peau scrotale. Il s'agit d'un véritable muscle peaucier qui joue un rôle important dans la suspension des testicules (BARONE, 2001).

Fascia spermatique externe

Cette enveloppe constitue un premier plan de clivage entre les différentes structures des bourses testiculaires. Elle est constituée de deux couches d'aspect lamellaire séparées par du tissu conjonctif lâche. Il s'agit d'une zone de désolidarisation entre enveloppes superficielles (scrotum et dartos) et testicules, ce qui assure une protection mécanique par exemple contre les chocs (ROGER, 2009).

b. Les enveloppes profondes

Muscle Crémaster

Il s'agit d'un muscle rouge vif issu du muscle oblique interne de l'abdomen. Il prend origine au niveau de l'anneau inguinal profond, traverse le canal inguinal et couvre les faces latérale et caudale du fascia spermatique interne (BARONE, 1956).

Fascia spermatique interne

Le fascia spermatique interne forme un sac piriforme débutant à l'anneau inguinal profond. Il est fortement solidarisé à la lame pariétale de la tunique vaginale ; ils constituent à eux deux la tunique fibro-séreuse (BARONE, 1956 ; ROGER, 2009)

Tunique vaginale

La tunique vaginale constitue la séreuse du testicule et de son cordon. Elle est constituée de deux lames, une lame pariétale et une lame viscérale, unies par le mésorchium et qui délimitent une cavité : la cavité vaginale, diverticule de la cavité péritonéale, avec laquelle elle communique au niveau de l'anneau vaginal (BARONE, 2001). La cavité vaginale contient une faible quantité de liquide séreux qui facilite les mouvements du testicule au sein de ses enveloppes (LITTLE et HOLYOAK, 1992).

La figure 1 illustre l'anatomie des différentes enveloppes testiculaires.

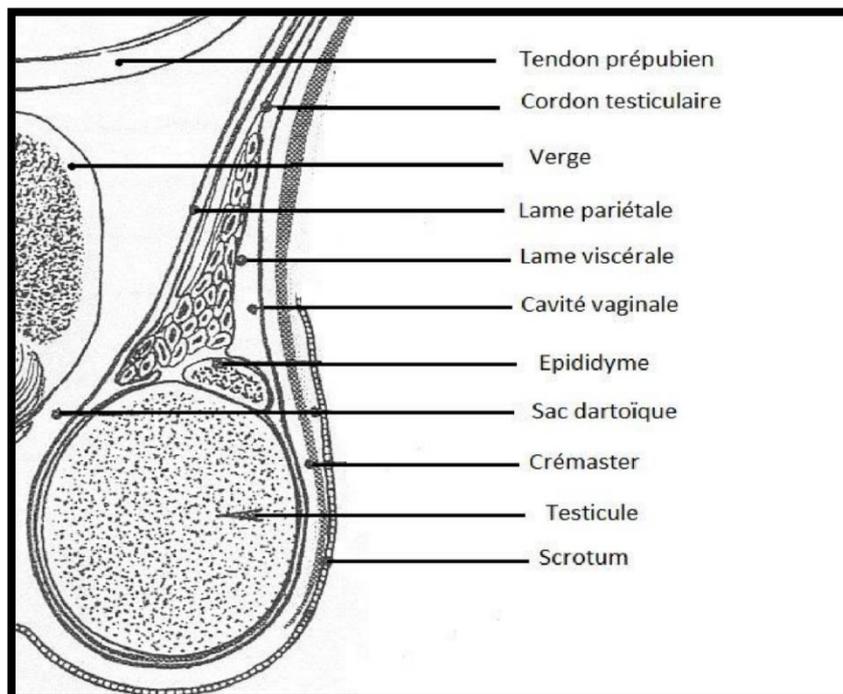


Figure 1: Représentation schématique des enveloppes testiculaires. (BARONE 2001)

En conclusion, les enveloppes testiculaires peuvent être considérées comme des dépendances, plus ou moins différenciées, des différentes couches de la paroi abdominale ; comme s'il y avait eu refoulement de ces divers plans anatomiques lors de la descente testiculaire.

2. Les testicules

Les testicules, glandes génitales du mâle, sont logés dans les bourses en région inguinale et ont une double fonction : une fonction gamétogène (production des spermatozoïdes) et une fonction endocrine (production des hormones sexuelles).

a. Caractères généraux, conformation et moyens de fixité

Les testicules ne prennent leurs caractères définitifs qu'à l'époque de la puberté, qui a lieu entre 19 et 21 mois chez l'étalon (AMANN, 2011).

A la naissance, ces glandes sont de petite taille et ne s'accroissent que fort peu durant la première année de vie. Au moment où s'établit la sécrétion spermatique, elles subissent un développement rapide pour atteindre leur dimension et leurs caractères définitifs.

Chez un étalon de taille moyenne, chaque testicule mesure environ 9-11 centimètres de long, 6-7 cm de haut et 5-6 cm d'un côté à l'autre ; mais les variations raciales et individuelles sont importantes (BARONE, 1956).

Par son bord libre et mobile, chaque testicule repose sur le fond de la cavité vaginale. Son bord supérieur, uni à l'épididyme, est attaché au mésorchium ; il s'agit d'un repli du péritoine qui unit la glande à la paroi postérieure de la vaginale. Ce mésorchium porte le cordon testiculaire, volumineux pédoncule composé de deux parties : le cône vasculaire et le conduit déférent, tous deux recouverts par la lame viscérale de la tunique vaginale (BARONE, 2001).

La figure 2 ci-après illustre la conformation et les moyens de fixité du testicule.

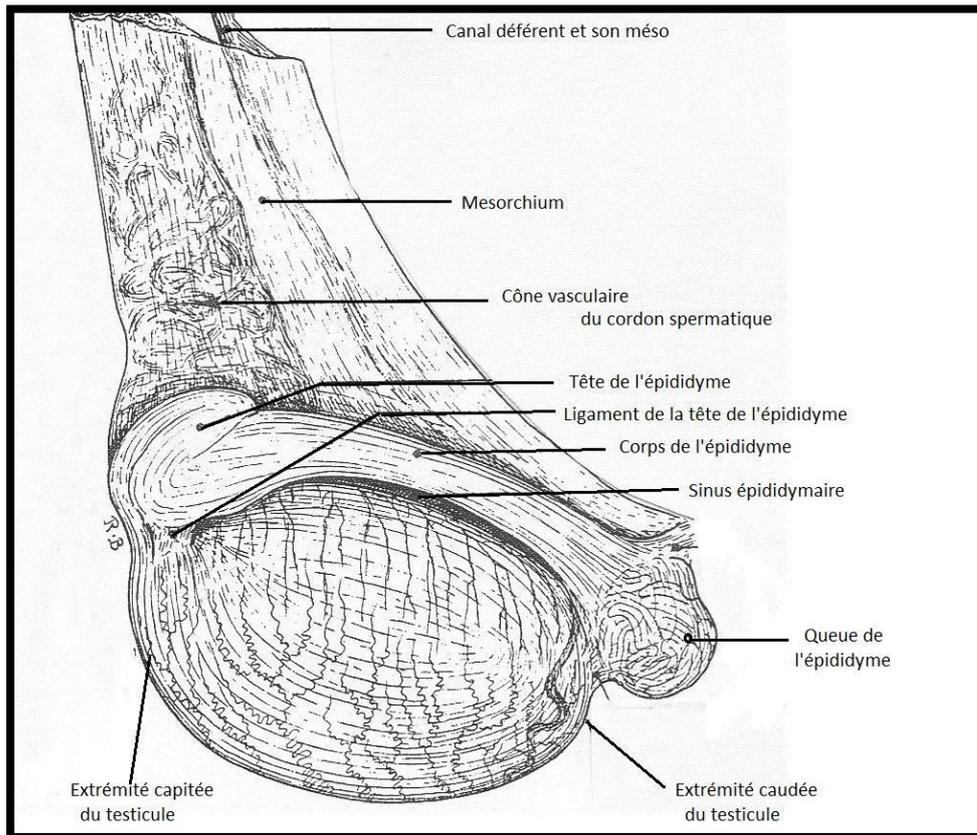


Figure 2: Testicule et épидидyme gauches du cheval. Conformation et moyen de fixité.

b. Structure du testicule

La structure histologique de la glande testiculaire comprend : un revêtement séreux, une charpente fibreuse (tunique albuginée) et un parenchyme ; pour revue voir BARONE (2001).

Le revêtement séreux est une portion de la lame viscérale de la tunique vaginale ; il est continu avec le revêtement de l'épididyme et des mésos. Il est également très adhérent à la tunique albuginée.

La tunique albuginée est une membrane fibreuse épaisse et blanchâtre, creusée de canalicules dans lesquels courent des vaisseaux. Elle constitue ainsi autour du testicule une sorte de coque continue dont la face profonde forme des cloisons qui subdivisent en lobules le tissu propre du testicule. Les cloisons convergent vers un axe conjonctif épais présent à l'extrémité capitèe du testicule ; il s'agit du *mediastinum testis*.

Le parenchyme testiculaire correspond à la partie non capsulaire du testicule.

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

Entre les tubes séminifères, l'espace est comblé par une trame conjonctivo-vasculaire dans laquelle sont disséminées les cellules interstitielles, encore appelées cellules de Leydig. Ces cellules sont notamment à l'origine de la sécrétion d'une hormone sexuelle : la testostérone (ROGER, 2009). La figure 3 représente de manière schématique la structure du testicule et de l'épididyme de l'étalon.

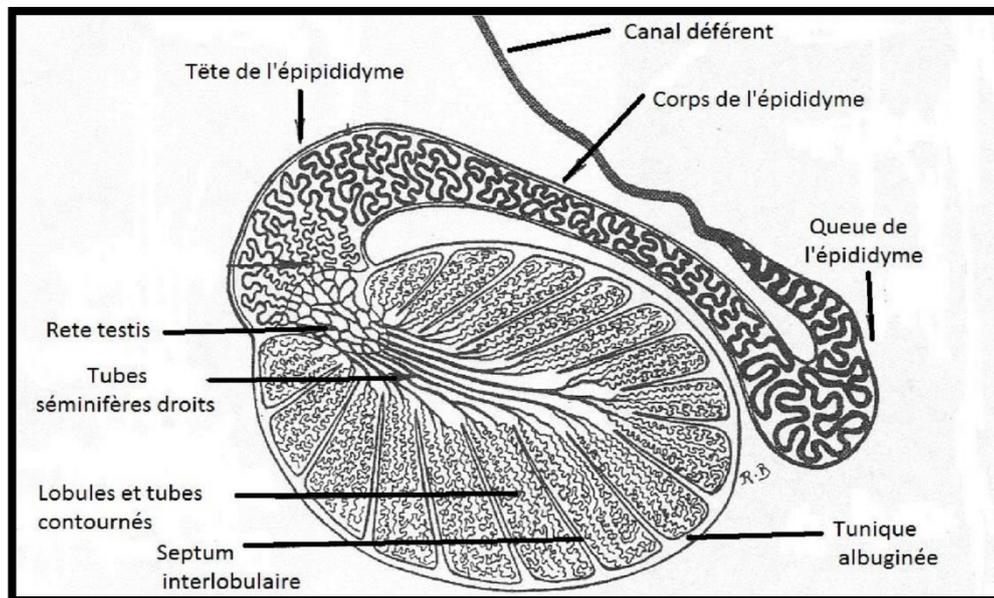


Figure 3: Schéma de la conformation interne du testicule et de l'épididyme.

3. Les voies spermatiques

Les voies d'excrétion du sperme ou voies spermatiques s'étendent des testicules jusqu'au sinus uro-génital.

Les premiers segments de ces voies sont constitués par les tubes droits, le *rete testis* et les canalicules efférents, précédemment décrits dans l'étude des testicules (Cf. I. A. 2. b.). Puis ces voies spermatiques se poursuivent par un long conduit qui présente deux segments nettement différenciés :

la partie proximale, l'épididyme, et la partie distale, le canal déférent. Ce dernier va jusqu'à l'urètre, qui représente le sinus uro-génital. Dans sa partie terminale, le canal déférent présente

des dépendances glandulaires, dont la principale est la glande vésiculaire ou glande séminale. Pour revue, voir BARONE (2001).

a. L'épididyme

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

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

b. Le canal déférent

Le canal déférent fait suite au conduit épидидymaire et s'étend jusqu'à la portion pelvienne de l'urètre, au niveau de laquelle il s'abouche par le conduit éjaculateur, en même temps que la vésicule séminale correspondante.

Le canal déférent chemine tout d'abord avec le cordon testiculaire, puis travers l'anneau vaginal. Il vient ensuite caudalement dans la région du bassin, passe au-dessus de la vessie et se rapproche du canal déférent issu du deuxième testicule avant de s'aboucher à l'urètre. Ce trajet permet de définir quatre portions : testiculaire, inguinale, abdominale et pelvienne. Le canal déférent présente un calibre régulier sur toute sa longueur excepté dans sa portion terminale, pelvienne : ce renflement est désigné sous le terme d'ampoule du canal déférent. (BARONE, 2001 ; ROGER, 2009).

L'organisation structurale du canal déférent permet l'acheminement du liquide élaboré par la glande génitale tout le long du conduit jusqu'au canal uro-génital (BARONE, 1956).

c. Les glandes vésiculaires

Les glandes vésiculaires sont deux formations glandulaires allongées situées dorsalement à la vessie et annexées à la terminaison du canal déférent. Chacune de ces glandes débouche dans l'urètre par l'orifice éjaculateur, qu'elle constitue avec la terminaison du canal déférent correspondant.

Ces glandes produisent notamment du fructose, source énergétique pour les spermatozoïdes (BARONE, 2001).

La figure 4 ci-dessous illustre de manière schématique la disposition des voies spermatiques.

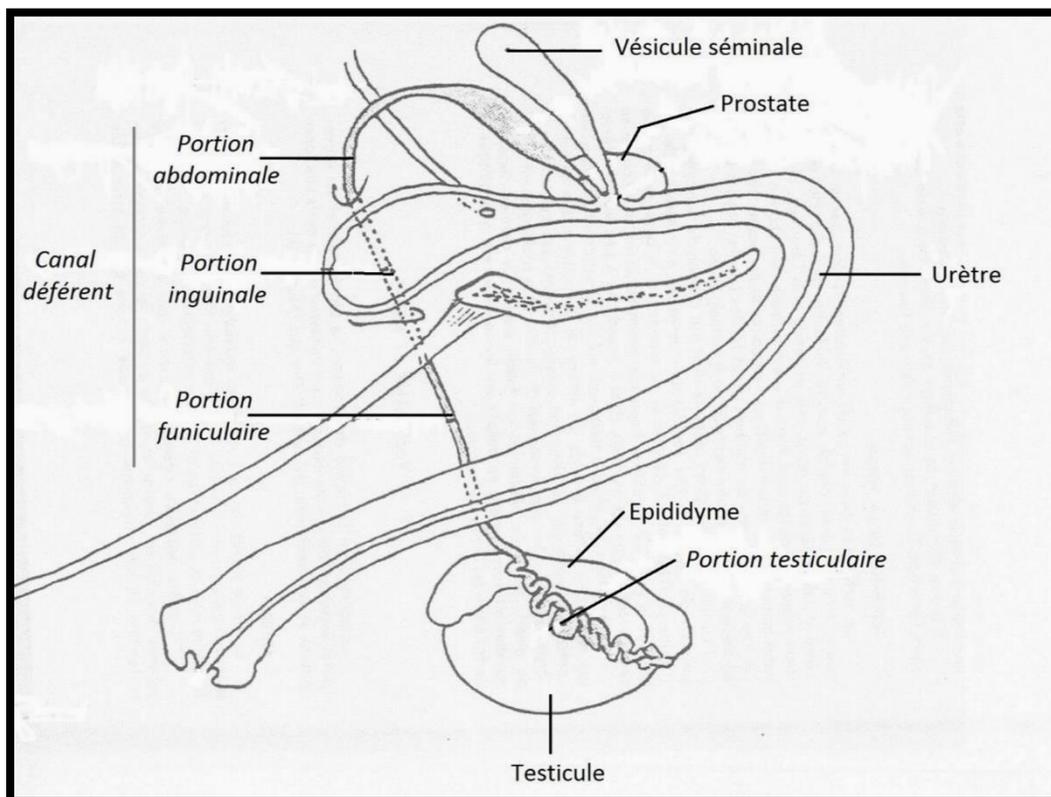


Figure 4: Schéma de l'aspect médial du canal déférent droit de l'étalon. (BARONE, 2001)

4. L'urètre du mâle (canal uro-génital)

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

a. Caractère généraux

De part son trajet, l'urètre du mâle peut être divisé en deux portions. La première, la plus proximale, est dite intra-pelvienne : elle est dépourvue de formations érectiles mais présente des glandes annexes importantes. La deuxième, distale, est dite extra-pelvienne ou pénienne et, au contraire de la portion précédente, elle est entourée de tissu érectile mais dépourvue de glandes annexes. Chez un cheval de taille moyenne, la longueur totale de l'urètre est de 60 à 70 centimètres, dont 10 à 15 seulement appartiennent à la portion pelvienne (BARONE, 2001).

Conformation intérieure

La portion intra-pelvienne de l'urètre est limitée par deux rétrécissements : le premier, proximal, correspond au col de la vessie et le second, caudal, correspond à l'isthme de l'urètre. Ces deux rétrécissements délimitent une partie plus large appelée fosse prostatique, au niveau de laquelle se trouvent les orifices éjaculateurs, dans lesquels s'abouchent en commun les canaux déférents et les vésicules séminales. C'est également au niveau de la fosse prostatique que se trouvent les orifices des canaux excréteurs de la prostate.

La portion pénienne comporte à son origine les orifices excréteurs des glandes bulbo-urétrales, encore appelées glandes de Cowper (BARONE, 2001 ; ROGER, 2009).

La figure 5 ci-après représente de manière schématique la disposition générale de l'urètre et de ses glandes annexes.

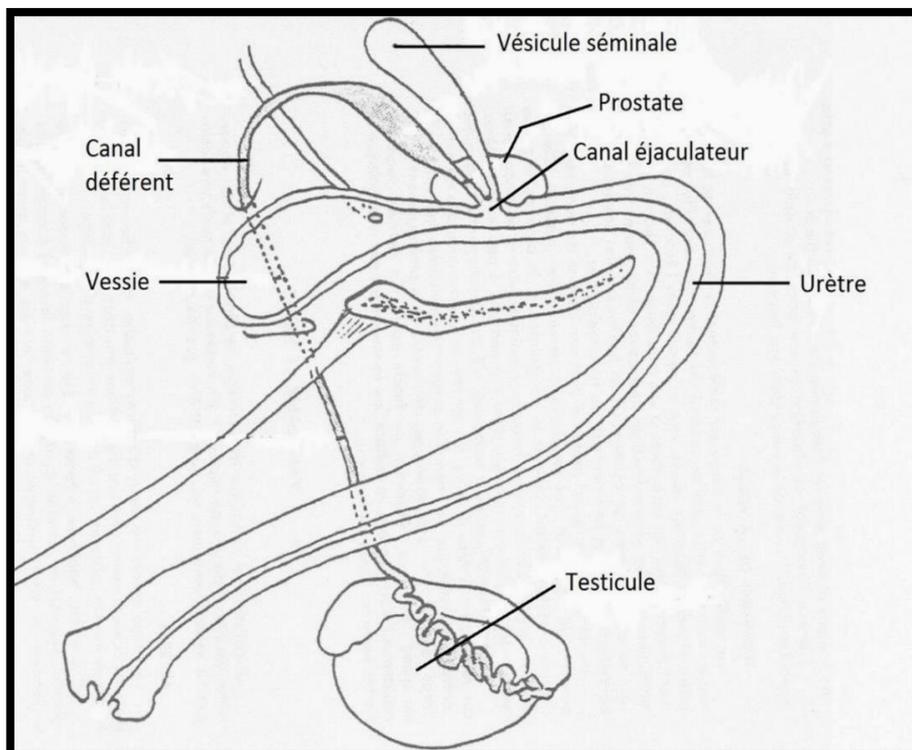


Figure 5: Schéma de l'aspect médial de l'urètre droit de l'étalon. (BARONE, 2001)

Le conduit urétral est constitué d'une muqueuse doublée en certains endroits par un tissu érectile et enveloppée par une couche musculaire. Le tissu érectile de la paroi urétrale, dans sa portion pénienne (corps spongieux de l'urètre) présente des éléments vasculaires sont très développés et peuvent accumuler une grande quantité de sang. La couche musculaire est constituée de fibres musculaires striées circulaires, dont la contraction joue un rôle dans la miction et l'éjaculation (ROGER, 2009).

b. Glandes annexées à l'urètre

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

PROSTATE

La prostate est une glande impaire volumineuse située à cheval sur le col vésical.

Elle résulte en fait de l'agglomération de glandules multiples, unies par un stroma commun, mais débouchant par des conduits distincts (10 à 20 de chaque côté, chez le Cheval) dans la partie initiale de l'urètre. [...] De teinte grisâtre et d'aspect rugueux, la prostate est aplatie dorso-ventralement, étirée transversalement et élargie à ses extrémités. On peut lui distinguer une partie moyenne et deux lobes latéraux (BARONE, 2001).

GLANDES BULBO-URETRALES ou DE COWPER

Elles forment une paire de corps globuleux, de consistance ferme et de texture plus dense que la prostate. Chacune d'elles est longue de 4 à 6 centimètre et large de 2 à 3 centimètres chez l'animal entier. Elles sont situées en avant et au-dessus de l'arcade ischiale et couvertes par leur muscle compresseur, qui leur donne une teinte rougeâtre. [...] Leur structure est assez comparable à celle de la prostate (BARONE, 2001).

c. Formations érectiles annexées à l'urètre

Ces formations érectiles correspondent à des lacunes sanguines entourées par une enveloppe conjonctive. Lors d'un afflux sanguin au niveau de ces lacunes, l'augmentation de pression cavitaire déforme l'organe, le pénis, et le rigidifie (ROGER, 2009). La portion pénienne de

l'urètre est associée à quatre formations érectiles qui déterminent la conformation et le fonctionnement du pénis : les deux corps caverneux du pénis, le corps spongieux de l'urètre et le corps spongieux du gland ; pour revue, voir BARONE (2001).

CORPS CAVERNEUX DU PENIS

Le corps caverneux est la formation érectile la plus développée ; elle forme avec son homologue la partie principale du pénis et supporte les autres constituants de l'organe. Il est formé à l'origine par deux parties latérales, qui restent distinctes chez de nombreux Mammifères, mais qui fusionnent précocement chez le cheval, chez lequel les traces de sa nature double ne sont perceptibles qu'au niveau de la racine du pénis (BARONE, 1956). Les corps caverneux sont donc généralement décrits ensemble, comme une formation unique, impaire et symétrique.

Le corps caverneux prend son origine sur le bord caudal de l'os ischium correspondant et son extrémité libre plonge dans le corps spongieux du gland, dont elle reste toujours parfaitement délimitée (BARONE, 2001).

L'érection est commandée par le système nerveux autonome mais son mécanisme repose essentiellement sur l'existence de ce réseau vasculaire.

CORPS SPONGIEUX DE L'URETRE

Ce tissu érectile peut être considéré comme une différenciation de la sous-muqueuse de l'urètre.

Il existe sous une forme rudimentaire dans la portion pelvienne de l'urètre et prend toute son importance dans la portion pénienne. Sa structure est tout à fait semblable à celle du corps caverneux (BARONE, 2001).

CORPS SPONGIEUX DU GLAND

Cette formation érectile occupe l'extrémité libre du pénis, où elle entoure l'extrémité du corps caverneux. Elle est très développée chez les équidés et se prolonge à la face dorsale du corps caverneux sur une dizaine de centimètres au-dessus du gland, formant ainsi le processus dorsal du gland. Le tissu érectile du corps spongieux du gland est comparable à celui du corps spongieux de l'urètre ; ses cavernes sont seulement plus vastes et dilatables, sauf à la jonction des deux formations (BARONE, 2001).

5. La verge ou pénis

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

a. Caractères généraux

Les principaux composants du pénis ont déjà été décrits (Cf. I. A. 4. c.). Il s'agit du corps caverneux, du corps spongieux de l'urètre et du corps spongieux du gland, qui sont des formations érectiles annexées à la portion pénienne de l'urètre. Ils sont complétés par des fascias, des muscles et un tégument ; pour revue, voir BARONE (2001).

Les muscles du pénis sont au nombre de trois. Le muscle bulbo-spongieux est un muscle impair, strié et appartient au corps spongieux de l'urètre. Le muscle ischio-caverneux est aussi un muscle strié mais pair et il couvre la racine du pénis correspondante. Il joue un rôle important lors de l'érection en comprimant les vaisseaux et la racine du pénis. Enfin, le muscle rétracteur du pénis est un muscle pair, formé de fibres musculaires lisses et de fibres élastiques. Ce muscle permet de ramener le pénis dans sa position de repos, après l'érection (BARONE, 2001).

La partie libre de la verge est entièrement revêtue par un **tégument** mince et généralement pigmenté.

Les figures 6 et 7 ci-après représentent la structure interne du pénis chez le cheval.

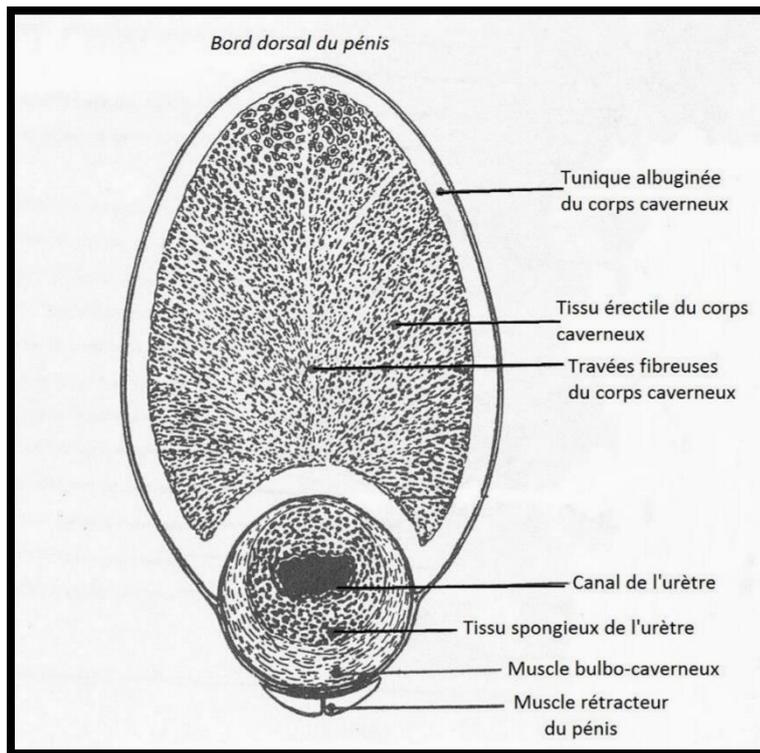


Figure 6: Coupe transversale du pénis du Cheval, au niveau de la partie moyenne du pénis. (BARONE, 2001)

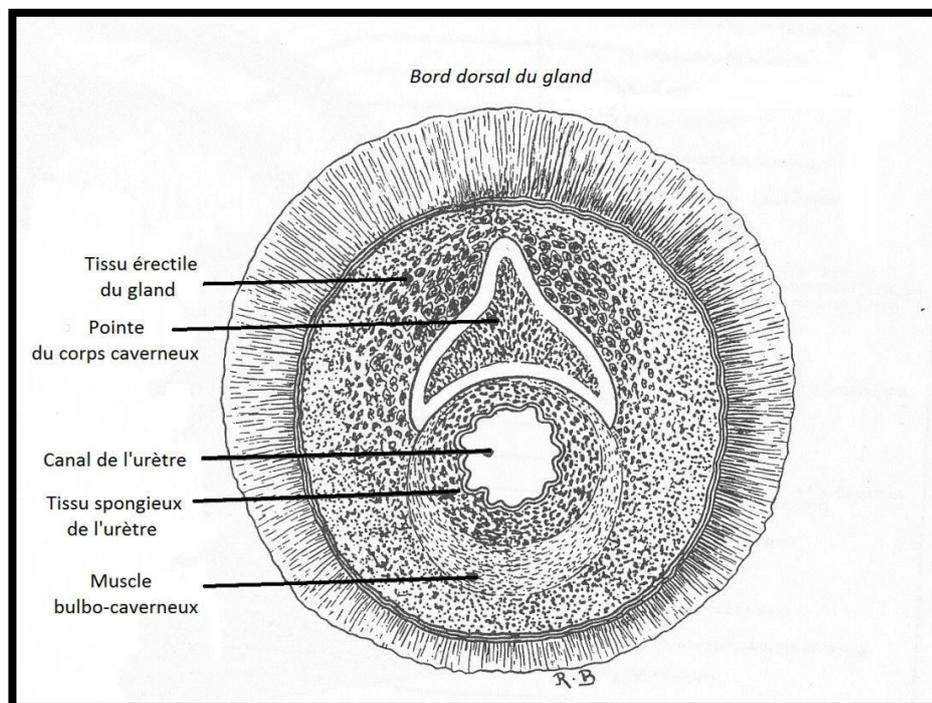


Figure 7: Coupe transversale du pénis du Cheval, en arrière de la couronne du gland (le gland isolé est vu par derrière). (BARONE, 2001)

b. Vascularisation et innervation

La constitution complexe du pénis, sa physiologie et ses importantes variations de volume, liées au mécanisme de l'érection, imposent aux vaisseaux et aux nerfs une topographie complexe ; pour revue, voir BARONE (2001).

Le pénis est vascularisé par plusieurs artères dont l'artère profonde du pénis et l'artère dorsale du pénis ; qui longe la face dorsale de l'organe. Ces artères font suite à l'artère honteuse interne après sa sortie de la cavité pelvienne et assurent l'irrigation des corps caverneux. Les terminaisons de l'artère honteuse externe, dont l'artère crâniale du pénis, assurent quant à elle, l'irrigation du gland.

Les veines du pénis sont volumineuses ; elles constituent un important plexus le long du bord dorsal de l'organe. Ce plexus dorsal s'étend jusqu'aux racines du pénis sous la forme de deux gros troncs flexueux, largement anastomosés entre eux. Ce plexus est drainé par deux systèmes, l'un antérieur, qui se jette dans la veine fémorale, et l'autre postérieur, qui aboutit à la veine honteuse BARONE (2001).

La figure 8 ci-dessous illustre l'organisation vasculaire de la verge chez l'étalon.

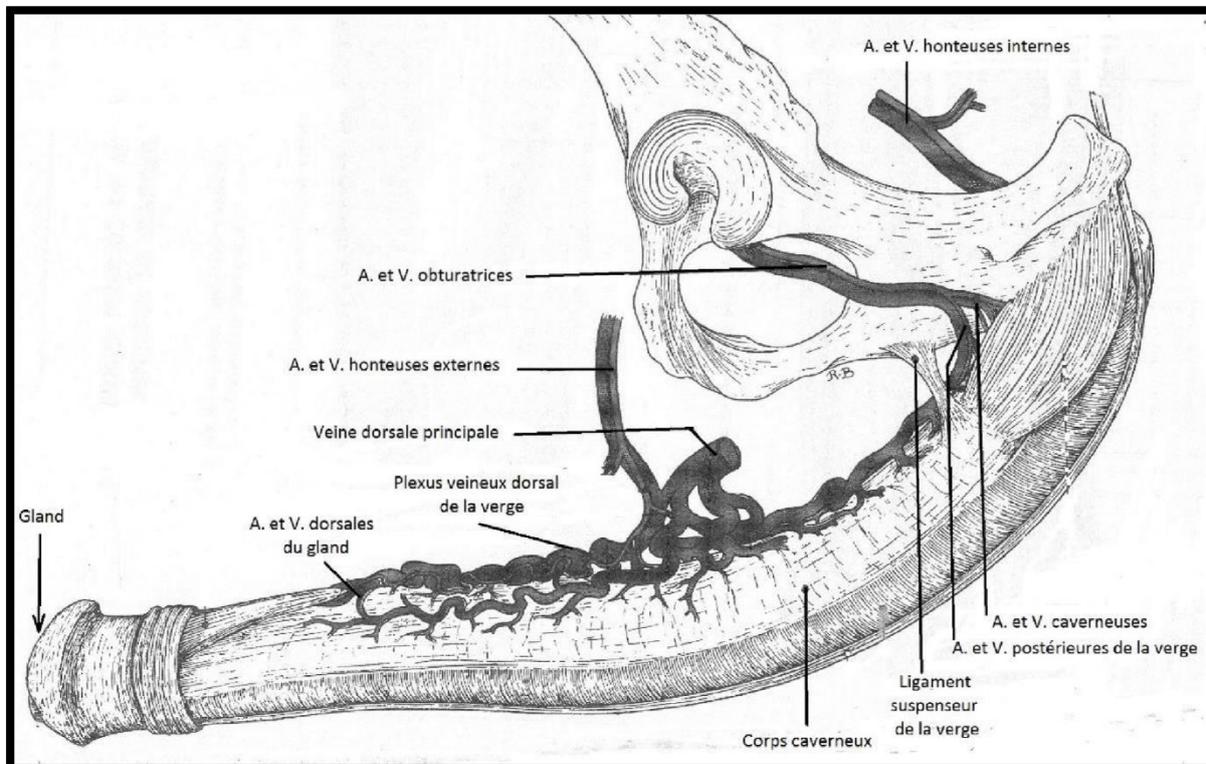


Figure 8: Vascularisation de la verge chez l'étalon. A. : artère, V. : veine. (BARONE, 2001)

Le pénis est innervé par le nerf honteux et par le plexus pelvien ou hypogastrique. Sur la face dorsale du pénis, le nerf honteux se continue par le nerf dorsal du pénis. Ce nerf comporte, entre autres, des fibres sympathiques qui vont au corps caverneux et au corps spongieux du pénis de même qu'au tissu érectile du gland (BARONE, 1956).

c. Le fourreau ou prépuce

Le fourreau est constitué de deux lames tégumentaires, une externe et une interne, raccordées l'une à l'autre au niveau de l'anneau préputial. Entre ces deux lames, se trouve un plan conjonctivoélastique très lâche. La lame externe se compose de la peau, peu différente de celle des régions voisines, notamment le scrotum. Sur sa face ventrale, on peut observer le raphé du fourreau.

La lame interne correspond à une peau modifiée, plus mince et pourvue de poils très fins et courts chez les équidés. Cette lame interne présente des glandes sébacées particulières, les glandes préputiales, qui sécrètent un produit appelé le smegma préputial (BARONE, 1956).

La figure 9 représente la conformation du prépuce chez les Equidés.

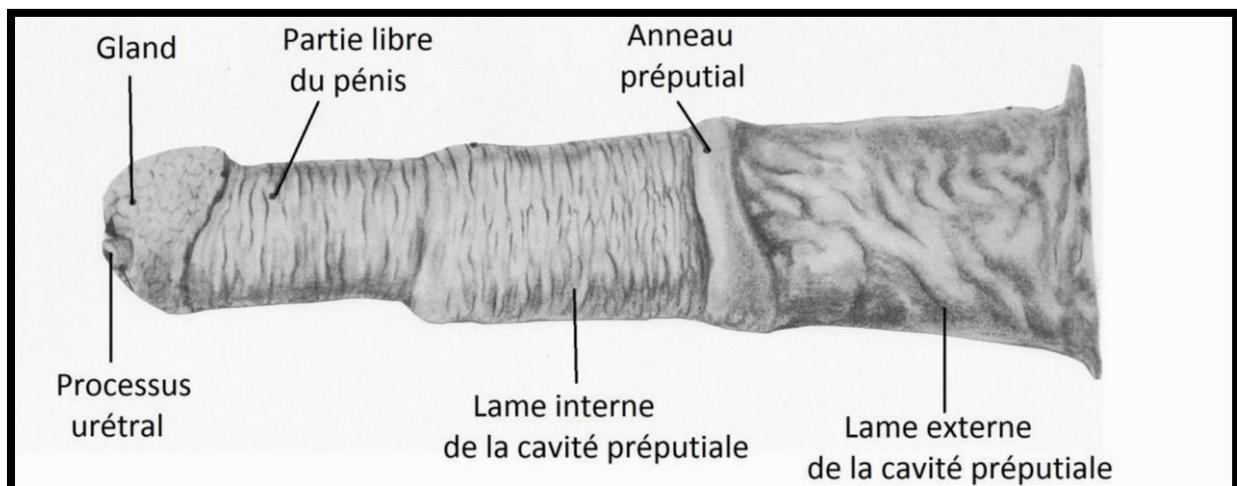


Figure 9: Partie libre du pénis et prépuce du Cheval. (CONSTANTINESCU, 2010)

II. Physiologie de la reproduction chez l'étalon

Des notions simples de physiologie de la reproduction chez l'étalon sont détaillées dans ce chapitre afin de rappeler le rôle des différents éléments composant l'appareil génital et de comprendre les mécanismes qui sous-tendent les interactions entre ces éléments.

Nous allons aborder la spermatogénèse et ses spécificités chez l'espèce équine, la régulation endocrine de la reproduction et enfin la puberté chez l'étalon.

1. La spermatogénèse et ses spécificités chez l'espèce équine

La spermatogénèse débute au moment de la puberté, qui survient entre 15 et 21 mois d'âge chez l'étalon (AMANN, 2011).

L'épithélium spermatogène, situé au niveau des tubules séminifères, est constitué par l'ensemble des cellules dérivées des gamétocytes (cellules à l'origine des spermatogonies) et qui interviennent dans les différentes étapes de la spermatogénèse : spermatogonies, spermatocytes primaires, spermatocytes secondaires et spermatides (AMANN, 1993).

La durée de la spermatogénèse est d'environ 57 jours chez l'étalon (AMANN, 2011). Ainsi, lors de dommages testiculaires (causés par une augmentation de la température ou l'administration d'hormones stéroïdiennes par exemple), un délai de 2 mois minimum est requis pour retrouver une spermatogénèse normale.

Etapes de la spermatogénèse

La spermatogénèse se déroule au sein des tubules séminifères des testicules. Trois grandes étapes sont nécessaires pour passer d'une spermatogonie à un spermatozoïde : la spermatocytogénèse, la méiose et la spermiogénèse (AMANN, 1993).

La spermatocytogénèse dure 19,4 jours chez l'étalon. Elle est caractérisée par une phase de multiplication (par mitoses) et de différenciation des spermatogonies, ce qui aboutit à la formation des spermatocytes. La phase de multiplication cellulaire assure également le renouvellement des spermatogonies, nécessaire au maintien d'un nombre suffisant de cellules souches (LITTLE et HOLYOAK, 1992).

La deuxième étape, qui fait intervenir le phénomène de méiose, dure également 19,4 jours chez l'étalon. Dans un premier temps, cette étape se caractérise par l'échange de matériel génétique entre les chromosomes homologues des spermatocytes primaires. Ensuite, les deux divisions successives de la méiose produisent les spermatides haploïdes (AMANN, 1993).

La spermiogénèse dure 18,6 jours chez l'étalon. Elle se caractérise par l'acquisition de fonctions : à la fin de cette étape, les spermatides sont complètement différenciées. Elles sont alors nommées spermatozoïdes quand elles quittent l'épithélium spermatogène (AMANN, 1993). La figure 10 représente de manière schématique les étapes de la spermatogénèse.

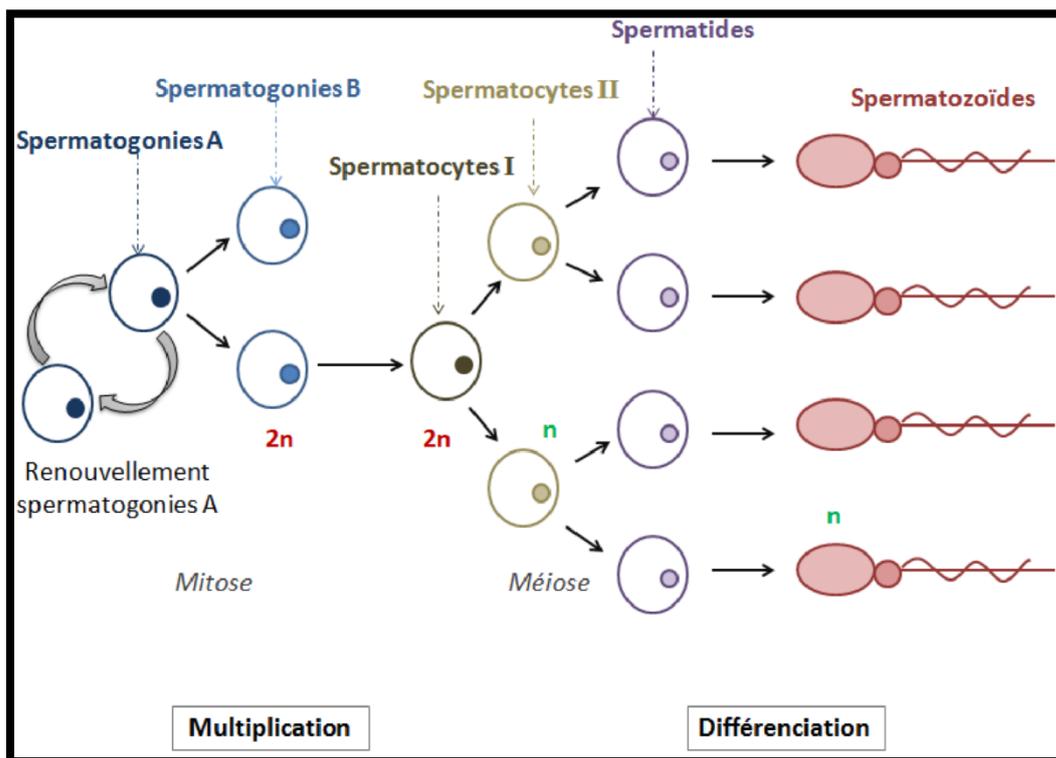


Figure 10: Etapes de la spermatogénèse. (d'après AMANN, 2011)

Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli sont des cellules de soutien qui reposent sur la lame basale des tubules séminifères. L'activité des cellules de Sertoli est sous la dépendance de la FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*), hormone hypophysaire et la testostérone, sécrétée par les cellules de Leydig (AMANN, 2011).

Le nombre de cellules de Sertoli présentes dans un testicule conditionne le nombre de spermatozoïdes que peut produire ce testicule. Les cellules de Sertoli se multiplient seulement

au cours de la vie fœtale et de la première année de vie de l'individu et leur nombre est caractéristique de l'espèce (AMANN, 2011).

Chaque cellule de Sertoli est reliée aux cellules adjacentes via des jonctions intercellulaires particulières (des jonctions serrées notamment), ce qui délimitent deux compartiments au sein du tubule séminifère :

- le compartiment basal est le siège de la spermatocytogénèse ; il contient les spermatogonies et les spermatocytes primaires ;
- le compartiment adluminal contient les spermatocytes secondaires, les spermatides et les spermatozoïdes.

La barrière ainsi constituée, appelée barrière hémato-testiculaire, sépare les spermatides et les spermatozoïdes de la circulation générale sanguine et lymphatique, et donc des cellules de l'immunité. Ceci est essentiel, car les spermatides et spermatozoïdes, cellules haploïdes, présentent des caractéristiques antigéniques reconnues comme étrangères par le système immunitaire de l'étalon. Lorsque cette barrière ne remplit pas son rôle, des anticorps antispermiques peuvent se développer et être responsables d'une orchite auto-immune et donc d'une stérilité (LITTLE et HOLYOAK, 1992 ; AMANN, 1993).

Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont localisées dans le tissu interstitiel, en dehors des tubes séminifères, et à proximité des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Leur rôle principal est la synthèse et la sécrétion d'hormones stéroïdiennes. Ces hormones vont participer à la régulation de l'activité de l'épithélium spermatogène, de l'axe hypothalamo-hypophysaire et des glandes sexuelles accessoires (AMANN, 1993).

Les hormones stéroïdiennes sécrétées par les cellules de Leydig sont : la testostérone, l'androstènedione, l'androstènediol, la dihydrotestostérone, la 3 alpha-androstanédiol et la 3 bêtaandrostanédiol, l'œstrone, l'œstradiol et la progestérone. Bien que les cellules de Leydig sécrètent plus d'œstrogènes que de testostérone chez l'étalon, la testostérone constitue l'hormone stéroïdienne avec la plus grande importance physiologique dans la régulation de la fonction de reproduction (AMANN, 2011).

Les cellules de Leydig sécrètent de manière continue un taux basal d'hormones stéroïdiennes. Mais de manière périodique, la sécrétion de testostérone peut être stimulée : la concentration sanguine de testostérone est alors 2 à 4 fois plus élevée par rapport à la concentration basale.

Notamment, la LH (*luteinizing hormone*), sécrétée par l'adénohypophyse, stimule la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig (AMANN, 2011).

La figure 10 ci-après illustre la relation spatiale entre les différents éléments constituant les tubes séminifères (cellules de la lignée germinale, cellules de Sertoli, cellules de Leydig, ...).

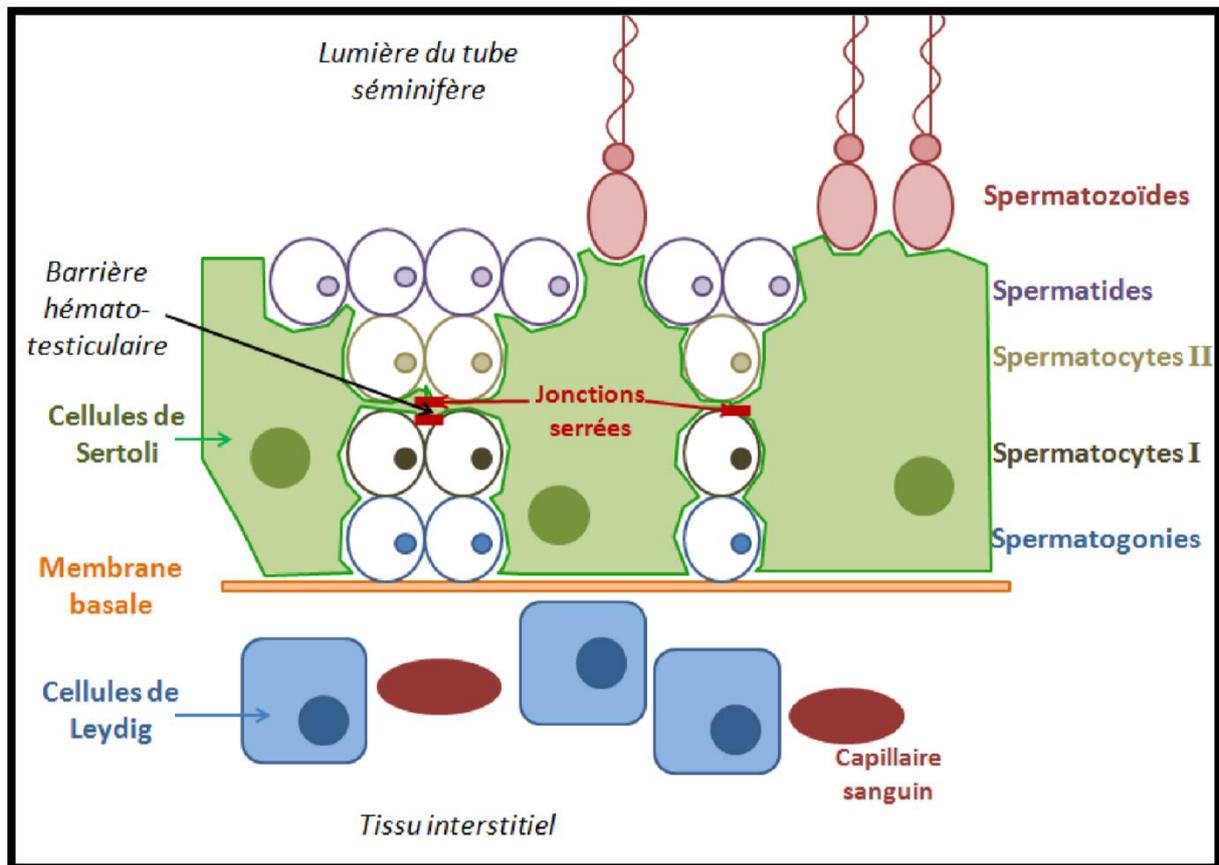


Figure 11: Schéma illustrant l'organisation cellulaire des tubes séminifères. (d'après AMANN, 2011)

Lors de leur libération dans la lumière des tubules séminifères, les spermatozoïdes ne sont pas fonctionnels, ni fertiles. Ils subissent lors de leur trajet dans les voies génitales mâles toute une série de changements nécessaires à l'acquisition de l'ensemble de leurs fonctions. Lors de cette phase dite de maturation, les spermatozoïdes acquièrent notamment leur mobilité et leur pouvoir fécondant.

2. La régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez l'étalon

La fonction des organes de l'appareil génital est contrôlée par le système neuroendocrinien. Ce système comprend notamment l'hypothalamus et l'hypophyse. Les testicules ne sont pas des glandes neuroendocrines mais contiennent des cellules neuroendocrines dispersées. Ces cellules sécrètent des hormones en réponse à des signaux chimiques : les cellules de Leydig par exemple assurent la production puis la libération de testostérone en réponse à la sécrétion de LH (*luteinizing hormone*) par l'adénohypophyse.

a. L'axe hypothalamo-hypophysaire

Sous l'effet de certains stimuli neuronaux, l'hypothalamus synthétise et sécrète des hormones dites *releasing hormones*, c'est-à-dire qui vont entraîner à leur tour la sécrétion d'hormones par leurs organes/cellules cibles. La GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*) est l'hormone sécrétée par l'hypothalamus qui est impliquée dans le contrôle de l'activité de reproduction. Elle va agir sur l'adénohypophyse via des récepteurs spécifiques (AMANN, 2011).

L'**hypophyse ou glande pituitaire**, localisée à la base du crâne, est en relation avec l'hypothalamus via des vaisseaux portes. Cette glande est formée de deux parties : le lobe antérieur correspond à l'adénohypophyse et le lobe postérieur correspond à la neurohypophyse.

Sous l'action de la GnRH, l'adénohypophyse produit deux hormones impliquées dans la fonction de reproduction : la Luteinizing Hormone (LH) et la Follicule-Stimulating Hormone (FSH). Ces hormones sont dites gonadotropes car elles ont une action directe sur les ovaires et les testicules. Chez le mâle par exemple, elles vont stimuler la production d'hormones stéroïdiennes et de spermatozoïdes au niveau des testicules (AMANN, 2011).

La neurohypophyse synthétise différents neuropeptides dont l'ocytocine. L'ocytocine agit notamment sur les muscles lisses en stimulant leurs contractions. Chez le mâle, l'ocytocine stimule la contractilité des voies vectrices des spermatozoïdes : au moment de l'éjaculation, la libération d'ocytocine par la neurohypophyse stimule la contraction des muscles lisses au niveau de la queue de l'épididyme, permettant ainsi leur progression dans les voies génitales mâles (FILIPPI *et al.*, 2002).

b. Les hormones testiculaires

Les principales hormones testiculaires sont les hormones stéroïdiennes sexuelles. Elles sont synthétisées et sécrétées chez l'étalon par les cellules de Leydig, localisées dans le tissu interstitiel. Elles se divisent en trois familles : les androgènes, les œstrogènes et les progestagènes. Des hormones glycoprotéiques sont également synthétisées au sein du testicule, par les cellules de Sertoli, situées au niveau de l'épithélium séminifère. Il s'agit notamment de l'inhibine et l'activine.

Les **androgènes** (**testostérone**, **androstènedione**, **androstènediol**, **dihydrotestostérone**, ...) ont de multiples rôles, aussi bien au niveau du parenchyme testiculaire qu'au niveau d'organes périphériques (AMANN, 1993).

Le testicule sécrète également des **œstrogènes** : l'**œstrone**, l'**œstradiol** et l'**estriol**. L'étalon produit une quantité d'œstrogènes plus importante par rapport aux autres espèces de mammifères. Les œstrogènes agissent par rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (ROSER, 2011).

L'**inhibine** et l'**activine** appartiennent toutes les deux à la superfamille des *Transforming Growth Factors- beta*. Ces deux protéines ont à la fois des fonctions endocrines, paracrines et autocrines (ROSER, 2011).

L'inhibine est une hormone glycoprotéique sécrétée par les cellules de Sertoli, au niveau des testicules, chez le mâle. Elle agit sur l'adénohypophyse et inhibe la synthèse et la sécrétion de la FSH par un mécanisme de rétrocontrôle négatif (ROSER, 2011).

L'activine est également une hormone glycoprotéique sécrétée par les cellules de Sertoli. Le rôle de l'activine n'a pas encore été totalement élucidé chez l'étalon. Cependant, chez les autres espèces domestiques, la FSH semble stimuler la synthèse et la sécrétion d'activine au niveau des cellules de Sertoli et l'activine semble agir au niveau de l'adénohypophyse sur la sécrétion de la FSH, via un mécanisme de rétrocontrôle négatif (ROSER, 2011).

Ces différentes hormones (androgènes, œstrogènes, inhibine et activine) interviennent dans le contrôle hormonal de la fonction de reproduction, de part leurs actions sur l'axe hypothalamohypophysaire.

c. La régulation de la fonction de reproduction

Chez la grande majorité des espèces mammifères, dont les équidés, l'activité sexuelle normale est sous le contrôle du fonctionnement dynamique de l'axe hypothalamo-hypophysio-testiculaire.

Des stimuli environnementaux tels que la photopériode régulent la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus ; le taux plasmatique de GnRH contrôle la synthèse et la sécrétion de LH et FSH par l'adénohypophyse et les hormones gonadotropes (LH et FSH) régulent la production des androgènes, œstrogènes, protéines et autres facteurs locaux sécrétés par les testicules. Finalement, les androgènes, œstrogènes et hormones glycoprotéiques (inhibine, activine) testiculaires exercent des rétrocontrôles négatifs sur l'hypothalamus et l'hypophyse (ROSER, 2011).

La figure 12 représente de manière schématique et synthétique les contrôles hormonaux impliqués dans la fonction de reproduction chez l'étalon.

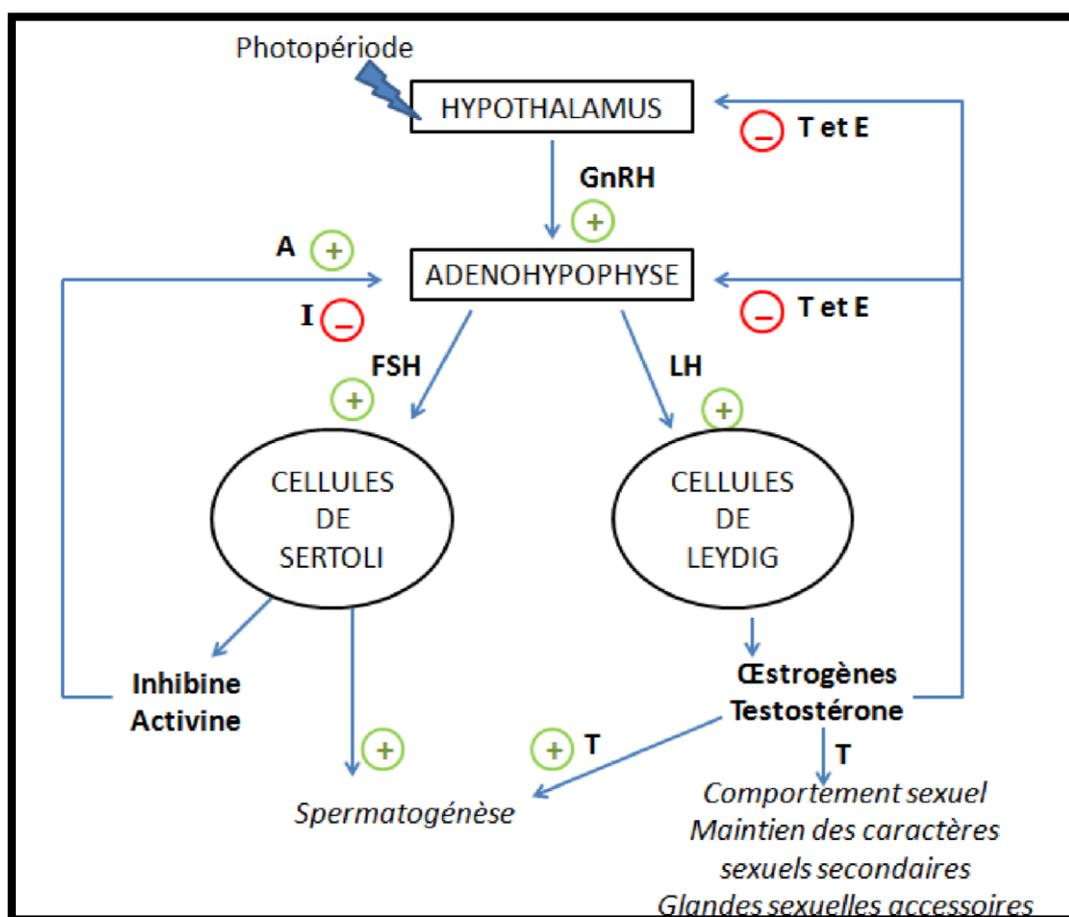


Figure 12: Schéma de la régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez l'étalon. A : activine ; E : œstrogènes ; I : inhibine ; T : testostérone. (d'après AMANN, 2011)

En conclusion, la fonction de reproduction repose sur un équilibre hormonal fragile. L'injection d'hormones chez l'étalon (notamment des anabolisants stéroïdiens) peut donc se révéler dangereuse et altérer de manière profonde la fonction reproductrice de l'individu.

3. La puberté chez l'étalon

Chez l'étalon, la puberté se définit comme le moment à partir duquel l'individu est capable de prendre part avec succès dans l'acte de reproduction. Elle a lieu entre 19 et 21 mois dans l'espèce équine (AMANN, 2011).

Pour AMANN (2011), la puberté se définit comme le moment où le premier éjaculat de l'étalon contient 50 millions de spermatozoïdes dont plus de 10% est motile. Dans une étude portant sur 15 jeunes étalons, la puberté s'est produite à environ 83 semaines mais 11 étalons sur 15 ont atteint la puberté à l'âge de 90 semaines.

A la naissance, les testicules de l'étalon contiennent des cellules indifférenciées, des gonocytes (cellules précurseurs des spermatogonies et des cellules de Sertoli) ainsi que très peu de cellules de Leydig fonctionnelles. La période qui suit, dite période infantile, est caractérisée par une absence de sécrétion d'hormones gonadotropes par l'adénohypophyse, par une faible production d'hormones stéroïdiennes par les cellules de Leydig et par une diminution du nombre de gonocytes. Il n'y a pas non plus de spermatogénèse. Cette période dure plus de 6 mois chez l'étalon ; puis se mettent en place des changements qui préparent l'individu pour la puberté : on parle de période prépubère. Le moment où ces changements interviennent est variable selon les individus et semblent être influencés par la race et la saison de naissance de l'individu (AMANN, 2011).

La période prépubère est caractérisée par des modifications au niveau de l'axe hypothalamohypophysaire. Vers 9 mois d'âge, les concentrations plasmatiques en FSH et en LH augmentent. Vers 12 mois, les testicules augmentent de taille et se développent rapidement.

Quelques mois plus tard, ils commencent à produire des spermatozoïdes. La production de testostérone par les cellules de Leydig augmente également pendant cette période et peut être facilement mise en évidence grâce à une prise de sang à partir de 19 mois d'âge (AMANN, 2011).

Ces changements culminent au moment de la puberté, quand l'étalon produit des spermatozoïdes fertiles. Suite à la puberté, une période de maturité sexuelle permet à l'étalon d'acquies sa capacité reproductrice maximale via une augmentation de la taille des testicules, une augmentation de la production journalière de spermatozoïdes et un développement des réserves spermatiques (AMANN, 2011).

Chapitre

II

Chapitre II : Le sperme de l'étalon

I. Le sperme de l'étalon : de la production à la fécondation

Le sperme est composé des spermatozoïdes, du fluide testiculaire et des sécrétions des glandes annexes. Il est éliminé par le méat urinaire lors de l'éjaculation, à raison d'une moyenne de 100 (20 à 300) cm³ de sperme par éjaculat en moyenne.

1 – Aspect externe et composition

1.1 – Aspect externe

1.1.1 – Volume

L'éjaculat de l'étalon est composé de deux fractions majeures : une fraction liquide (contenant la majorité des spermatozoïdes) et une fraction gélatineuse. Si le tube collecteur dispose d'un filtre, le volume de la fraction liquide peut être lu directement sur ce tube collecteur. Par contre, le volume de la fraction gélatineuse doit être établi à partir de la portion retenue par le filtre. Certains étalons ont des éjaculats complètement dépourvus de gel

1.1.2 – Couleur et consistance

La couleur normale de l'éjaculat équin est grisâtre à blanchâtre selon la concentration en spermatozoïdes. Cette couleur peut devenir rose, rougeâtre ou rouge vif lorsque le sperme contient du sang (hémospermie). Une couleur jaunâtre peut signaler la présence d'urine (urospermie) ou de pus (pyospermie). L'éjaculat est homogène et de consistance aqueuse sauf lorsqu'il contient une partie de la fraction gélatineuse. Il peut paraître trouble



Figure 13: aspect du sperme d'étalon après centrifugation

1.2 – Composition chimique

La composition chimique du sperme est la suivante :

- Eau (80%)
- matière organique (6%)
- Ions (calcium, phosphate...)
- lipides
- glucides (fructose)
- albumines et globulines
- bases aminées

2 – Spermatogénèse et spermiogénèse

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

2.1 – Spermatogénèse

La spermatogénèse commence dans les testicules, en tout premier lieu dans les tubes séminifères. Elle se met en route après la puberté sous l'action de la LH (Luteinising Hormone) sur les cellules de Leydig et de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) sur les cellules de Sertoli .

La lignée germinale mâle est constituée de deux types de spermatogonies : les spermatogonies de type A (cellules souches) et les spermatogonies de type B (cellules qui s'engagent dans la spermatogénèse) issues de ces dernières. Les spermatogonies de type B se divisent pour entrer en prophase méiotique et devenir des spermatocytes I. Ces dernières passent ensuite de la région périphérique du tube séminifère à la région centrale par dissociation transitoire des jonctions serrées entre les cellules de Sertoli. Une première division de méiose permet le passage de spermatocytes I en spermatocytes II. Ensuite, une seconde division de méiose conduit à la formation des spermatides.

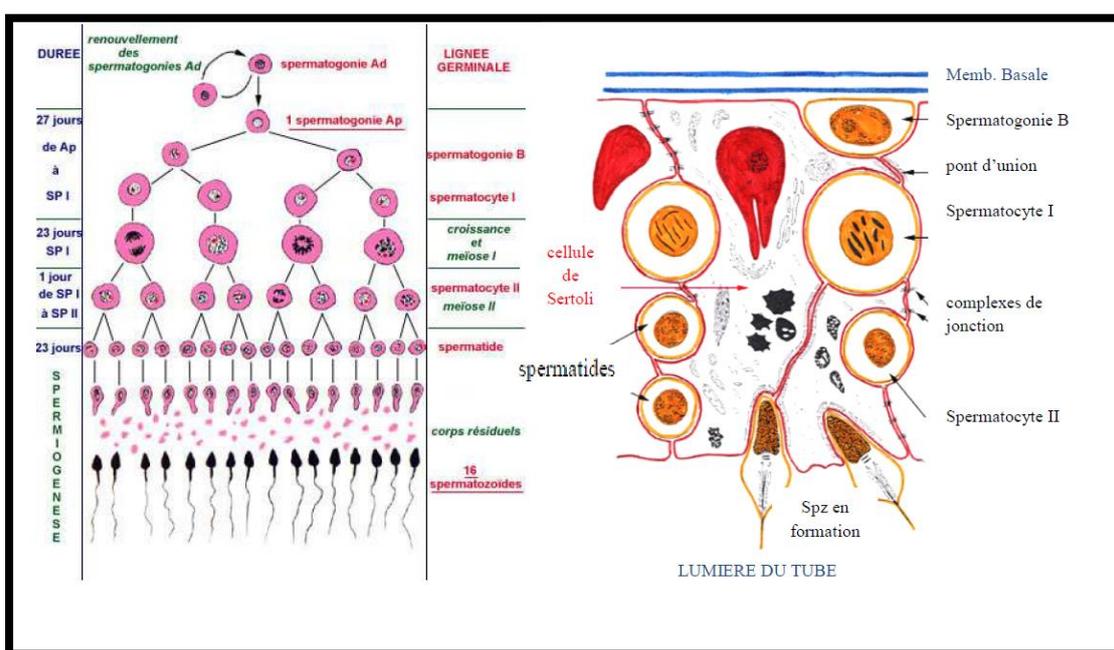


Figure 14: la spermatogénèse (d'après Nicole Vacheret)

La transition entre spermatogonie et spermatocyte I est marquée par une légère phase d'accroissement qui correspond à des synthèses d'ARN. La plupart de ces ARNm sont transcrits en prophase méiotique et traduits au stade spermatide ou spermatozoïde. Il s'agit d'ARNm codant des protéines intervenant en particulier dans la mobilité du spermatozoïde ou dans la reconnaissance de l'ovule par le spermatozoïde.

Durant les étapes correspondantes au spermatocyte II et à la spermatide, il y a encore des synthèses d'ARNm qui sont traduits encore un peu plus tardivement lors de la transformation en spermatozoïde : il s'agit d'ARNm de tubuline, de protamines...

Chez l'étalon, la spermatogénèse permet de produire 16×10^6 spermatozoïdes par jour par gramme de testicule.

2.2 La spermiogénèse

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

- une condensation nucléaire : les histones riches en lysine sont éliminées et remplacées par des protamines, protéines basiques de faible poids moléculaire riches en arginine et cystéine. Le nucléole disparaît, les ARNm nucléaires sont éliminés et le noyau se déshydrate : l'ensemble du noyau devient une masse compacte d'hétérochromatine.

- la formation de l'acrosome : il se forme progressivement par confluence de vésicules golgiennes ; il y a d'abord mise en place d'une vésicule arrondie, la vésicule proacrosomiale, qui se positionne à l'opposé de l'appareil cinétique et donne la vésicule acrosomiale puis l'acrosome. Il continue à grossir par apport de vésicules golgiennes ; puis il s'étale sur la partie supérieure du noyau et finit par coiffer complètement le noyau.

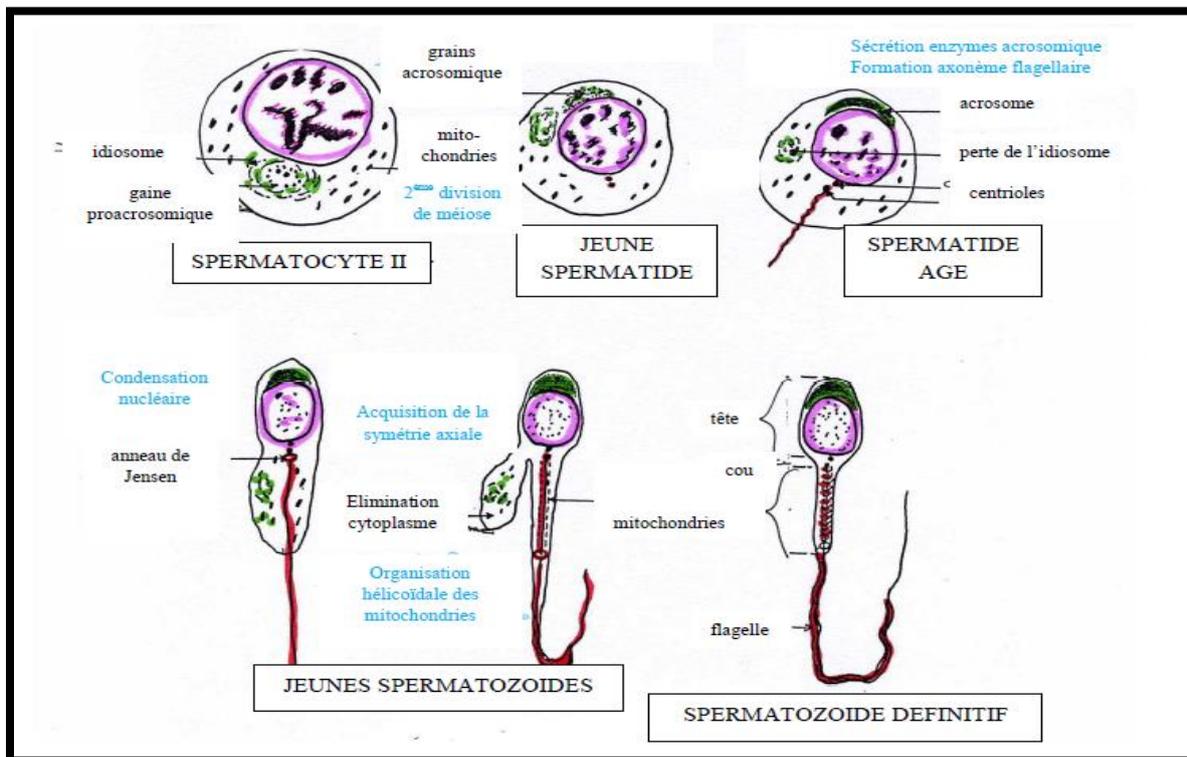


Figure 15: formation de l'acrosome au cours de la spermiogénèse

- la différenciation de l'appareil cinétique : le complexe centriolaire, voisin de la vésicule proacrosomiale, migre à l'opposé du noyau. Le centriole proximal se positionne dans une invagination de la membrane nucléaire tandis que le centriole distal induit la polymérisation d'un axonème. Les mitochondries s'organisent en un manchon à la base de l'axonème.

- l'élimination du cytoplasme excédentaire : l'essentiel du cytoplasme est d'abord éliminé et phagocyté par les cellules de Sertoli, et seule une goutte de cytoplasme persiste à la base du flagelle qui sera éliminée lors du passage dans l'épididyme.

Les spermatozoïdes, au sortir du testicule, n'ont pas encore la capacité de féconder un ovule. Ils vont séjourner dans l'épididyme et subir encore une série de transformations. Lorsqu'ils quittent les testicules, ils sont dilués dans le liquide séminal sécrété par les voies génitales et les glandes annexes, puis stockés temporairement dans les vésicules séminales.

2.3 – Facteurs d'altération de la formation des spermatozoïdes

2.3.1 – Déficits gonadotropes

Ils correspondent à l'absence de stimulation hormonale du testicule par absence de sécrétion des gonadotrophines. Le plus souvent le déficit porte à la fois sur la sécrétion de LH et de FSH avec déficit de stimulation des deux fonctions testiculaires.

2.3.2 – Troubles primitifs de la spermatogénèse

Ils représentent une situation beaucoup plus fréquente, mais pour lesquels les mécanismes physiopathologiques sont moins clairement compris. Le phénomène

Pathologique initial semblerait siéger au niveau du testicule lui-même.

L'examen histologique d'une biopsie du parenchyme testiculaire permet de reconnaître divers types d'altérations morphologiques des tubes séminifères (lieu de production des spermatozoïdes).

- l'hypospermatogénèse : le nombre des tubes séminifères et des cellules germinales est diminué.
- le blocage de la spermatogénèse au stade de spermatocyte I, de spermatocyte II ou de spermatide.

- l'aplasie germinale : absence totale de cellules de la lignée germinale (cellules souches des spermatozoïdes).
- la scléro-hyalinose : l'architecture histologique du testicule est remaniée avec des tubes séminifères atrophiques d'épaisseur réduite et des aspects de hyalinose et de fibrose.

Diverses anomalies se trouvent associées à des troubles de la spermatogénèse:

- anomalies chromosomiques (délétion du bras long du chromosome Y)
- varicocèle (dilatation des veines du cordon spermatique)
- cryptorchidie : il est probable qu'une altération constitutionnelle du testicule induise un trouble de la descente testiculaire pendant la vie intra-utérine et se manifeste aussi plus tard dans la vie par un trouble de la spermatogénèse.
- pathologie infectieuse génitale ou générale (orchite ourlienne)
- altération ischémique ou traumatique du testicule
- effets de substances toxiques et d'agents physiques (radiations, chimiothérapies, maladies fébriles)
- hyperthermie
- sous-nutrition

3 – Structure du spermatozoïde

Le spermatozoïde assure trois fonctions successives : le transport du contenu chromosomique mâle jusqu'au gamète femelle, la pénétration du génome mâle dans le gamète femelle et la fusion des deux noyaux gamétiques (ou caryogamie) aboutissant au zygote .

3.1 – La tête

Le cytoplasme est très peu présent et l'essentiel de l'espace est occupé par le noyau et l'acrosome. Le noyau présente exclusivement de l'hétérochromatine, qui est particulièrement condensée grâce à des protéines particulières : les protamines. Il s'agit de protéines riches en arginine et cystéine capables d'établir entre elles des ponts disulfures. Sous cette forme la chromatine est également protégée contre les altérations possibles lors du stockage ou lors du transfert dans les voies génitales femelles. L'acrosome est une poche limitée par une membrane. A l'avant, la membrane est accolée contre la membrane plasmique et à l'arrière, la membrane épouse la forme du noyau. Son contenu est riche en enzymes protéolytiques [figure 15].

3.2 – La région intermédiaire

Le cou comporte deux centrioles : le centriole proximal, bien individualisé et situé derrière le noyau et le centriole distal, incorporé à la base de l'axonème. La pièce intermédiaire comporte l'axonème dans sa partie centrale entourée d'un faisceau de fibres et d'un manchon de mitochondries. Ces dernières sont le reflet d'un métabolisme aérobie et assurent une production importante d'ATP (Adénosine Tri Phosphate) utilisée dans le fonctionnement de l'axonème. Chez les mammifères l'approvisionnement énergétique, en l'absence de toute réserve intracellulaire, est assuré par le liquide séminal (sous forme de fructose) [figure 9].

3.3 – Le flagelle

Le flagelle est la formation locomotrice qui permet d'amener le contenu chromosomique mâle jusqu'au gamète femelle. La pièce principale est constituée de neuf faisceaux de fibres denses ainsi que d'une gaine protéique fibreuse périphérique. La pièce terminale n'est constituée que de l'axonème enfermé dans la membrane plasmique [figure 16].

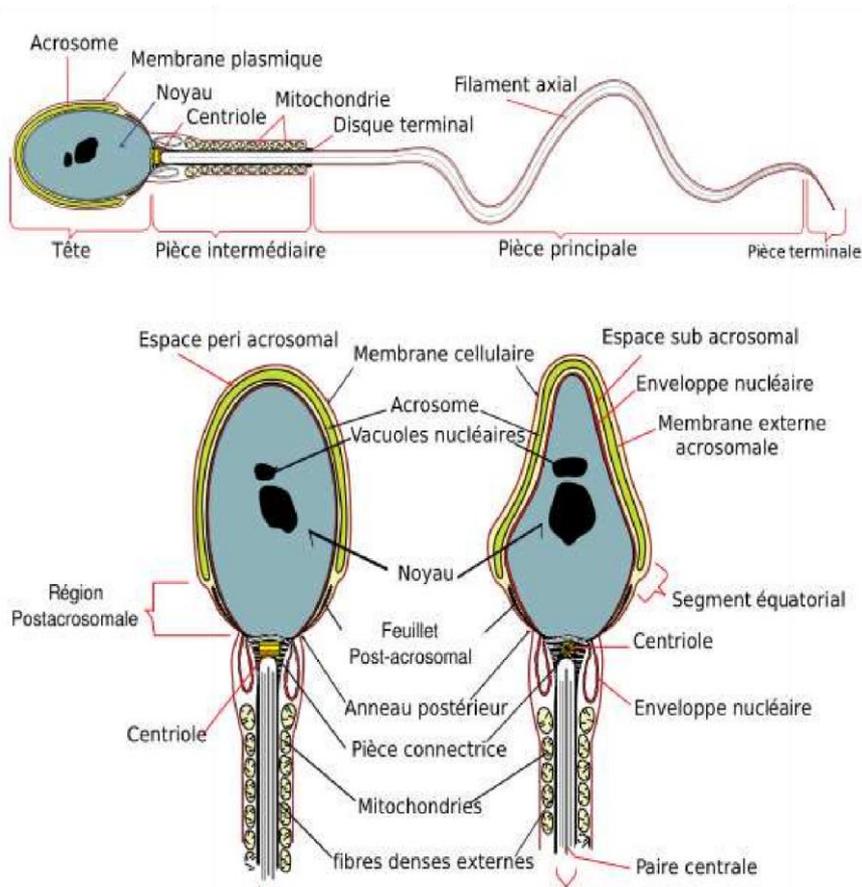


Figure 16 : structure d'un spermatozoïde (d'après Mariana Riuiz)

4 – Devenir des spermatozoïdes

4.1 – La maturation dans l'épididyme

Au niveau de l'épididyme, plusieurs modifications se produisent :

- la condensation de la chromatine se poursuit par augmentation des ponts disulfures
- l'hélice mitochondriale achève sa mise en place ; parallèlement, le spermatozoïde acquiert la capacité de se déplacer suivant une trajectoire rectiligne
- la membrane plasmique est remaniée dans sa composition lipidique et protéique ; les protéines qui interviennent dans la reconnaissance du gamète femelle lors de la fécondation se mettent en place
- l'acrosome prend sa forme définitive, et des sécrétions de l'épididyme neutralisent les enzymes de l'acrosome évitant toute agression des voies génitales mâle ou femelle en cas de lyse de spermatozoïdes.

4.2 – La remontée des voies génitales femelles

Les spermatozoïdes remontent les voies génitales femelles grâce à leur mobilité propre et grâce aux contractions du tractus génital. Une source d'énergie extracellulaire, constituée de glycine, est nécessaire.

4.2.1 - La capacitation

Les spermatozoïdes subissent la capacitation dans les voies génitales femelles : ils achèvent leur maturation et acquièrent leur pouvoir fécondant. Des enzymes protéolytiques produites par les voies génitales femelles libèrent les sites de reconnaissance de l'ovocyte, jusque-là masqués lors du passage dans l'épididyme. Des remaniements membranaires interviennent, en particulier la diminution du ratio cholestérol/phospholipide qui rend la membrane plasmique très instable et rend possible l'exocytose de l'acrosome .

4.2.2 - La sélection des spermatozoïdes : l'origine des pertes

Seules quelques centaines de spermatozoïdes arrivent dans la partie antérieure de l'oviducte. Les pertes ont plusieurs causes : le milieu vaginal acide défavorable aux spermatozoïdes et la glaire cervicale sécrétée par le col de l'utérus qui n'est favorable aux spermatozoïdes qu'au moment de l'ovulation [2, 5].

4.3 – La fécondation

4.3.1 – La traversée de la couronne radiée

Les cellules en expansion autour de l'oocyte entrent en contact avec les spermatozoïdes et les amènent au contact de l'aire pellucide. La traversée de la couronne radiée ne peut se faire que lorsque les spermatozoïdes sont capités. La présence de hyaluronidases membranaires sur le spermatozoïde facilite l'insertion de ce dernier entre ces cellules qui sont « soudées » entre elles par un ciment riche en acide hyaluronique. De plus, la pénétration des spermatozoïdes à travers cette barrière cellulaire folliculaire est facilitée par la dissociation partielle du ciment intercellulaire sous l'action de l'enzyme sécrétée par la paroi antérieure de l'oviducte [2, 5, figure 17].

4.3.2 – L'adhésion à la membrane pellucide : fixation initiale

Le contact se fait initialement par la région apicale du spermatozoïde, puis le spermatozoïde augmente progressivement la surface de contact en se couchant sur la zone pellucide. La reconnaissance des gamètes se réalise par l'intermédiaire des glycoprotéines de la zone pellucide (ZP) et de protéines de surface du spermatozoïde (protéines CRISP ou cysteine-rich secretory proteins, P34H, zonadhésines, spermadhésines) [2, 5, figure 17].

4.3.3 – La réaction acrosomique

La réaction acrosomique se produit suite à la fixation du spermatozoïde sur la membrane pellucide. Il y a fusion progressive de la membrane plasmique et de la membrane acrosomique externe du spermatozoïde. Ceci donne lieu à la formation de « fenestration » au travers desquelles le contenu de l'acrosome est libéré.

Le contrôle de la réaction acrosomique est dépendant de la capacitation, par redistribution des protéines, modification de la composition lipidique (augmentation du taux de phosphatidylcholine, diminution du taux de lysophosphatidylcholine, chute du rapport cholestérol/phospholipides) et intervention du calcium.

L'exocytose de l'acrosome conduit à la mise à nu de la membrane acrosomique interne qui entre alors en contact avec l'aire pellucide. De nouvelles interactions moléculaires ont alors lieu entre la membrane acrosomique interne et l'aire pellucide : c'est la fixation secondaire [2, 5, figure 17].

4.3.4 – La traversée de l'aire pellucide

Le spermatozoïde qui a effectué la réaction acrosomique traverse l'aire pellucide plus ou moins obliquement. A la suite de la capacitation, le spermatozoïde acquiert une mobilité renforcée qualifiée d'hypermobilité : la forte poussée du flagelle et le mouvement cisailant de la tête permettent une pénétration mécanique du spermatozoïde au sein de la zone pellucide. Cependant cette mobilité n'est pas suffisante en elle-même pour assurer la traversée, et nécessite la libération des enzymes (hyaluronidase et acrosine) par l'acrosome pour « déstabiliser » la membrane pellucide et faciliter ainsi le passage du spermatozoïde [2, 5, figure 17].

4.3.5 – La pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte

Le spermatozoïde entre en contact avec les microvillosités de l'ovocyte qui s'allongent, et emprisonnent le spermatozoïde et le maintiennent pendant la fusion. Le cytoplasme de l'ovocyte englobe le noyau du spermatozoïde et la région antérieure dans sa globalité. Le flagelle est en règle générale incorporé mais dégénère rapidement [2, 5, figure 17].

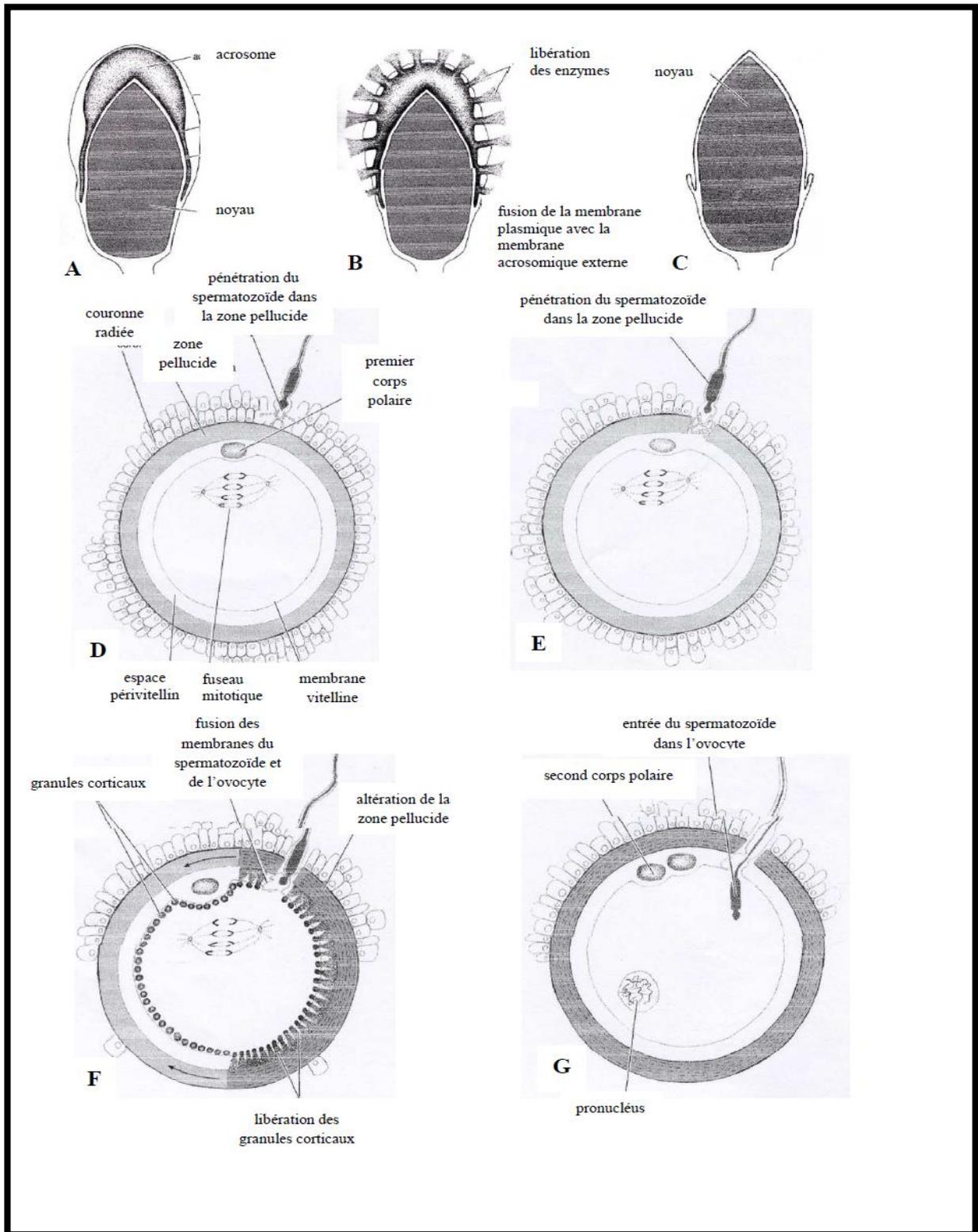


Figure 17 : la fécondation :

A+B+C = modifications structurales de la tête spermatique lors de la réaction acrosomique
D+E+F+G = différentes étapes de la fécondation

Chapitre

III

Chapitre III : Le traitement de la semence équine

Le traitement de la semence équine

1 – Prélèvement de sperme d'étalon

Le prélèvement de sperme est une phase essentielle lors de l'analyse de la semence. Il devra être fait dans les meilleures conditions de sécurité et d'efficacité avec comme objectif principal de ne pas détériorer la qualité de la semence [4].

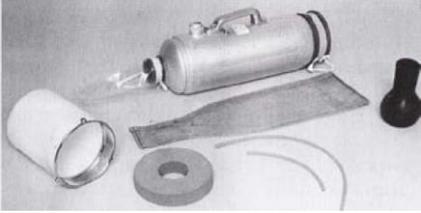
1.1 – Le vagin artificiel

Un vagin artificiel permet de récolter la semence de l'étalon dans des conditions optimales de temps et de sécurité. Le principe d'un vagin artificiel est d'obtenir une « chambre » simulant les conditions de température, de pression et de lubrification du vagin de la jument.

1.1.1 – Choix du vagin artificiel

Le choix du vagin artificiel et sa préparation conditionnent l'efficacité et la qualité de la semence récoltée. De nombreux modèles de vagins artificiels sont disponibles, et présentent des particularités qui sont à privilégier selon les besoins spécifiques de l'étalon, le mode de traitement de semence, et la préférence du manipulateur. Les paramètres à prendre en compte lors de l'achat d'un vagin artificiel sont le prix d'achat, le coût d'entretien et d'utilisation, la longévité, le poids, la capacité à garder la température adéquate pendant une durée plus ou moins longue et la quantité de sperme « perdu » à chaque récolte du fait de la configuration [4, tableau 1].

Table 1 : les différents types de vagins artificiels

 <p>(d'après IMV technologies)</p>		 <p>(d'après IMV technologies)</p>
<p>Vagin de type Missouri</p>	<p>Vagin de type Japonais</p>	<p>Vagin de type Colorado ou INRA</p>
<p>Constitué d'un étui de cuir et d'un manchon formé d'une double paroi délimitant la chambre à eau et raccordé à un cône en caoutchouc sur lequel peut être fixé un flacon récupérateur.</p>	<p>Constitué d'un étui en aluminium, d'un manchon en caoutchouc, d'un sachet de récupération du sperme, d'un pot isolant entourant ce dernier et d'un coussinet de rembourrage.</p>	<p>Constitué d'un étui de plastique rigide, de deux manchons en caoutchouc formant la chambre à eau, d'un flacon de récupération et d'une enveloppe protectrice.</p>

1.1.2 – Préparation du vagin artificiel

Immédiatement avant le prélèvement de sperme, il convient de remplir la chambre à eau du vagin artificiel avec de l'eau à 45-50°C [figure 18]. La pression à l'intérieur du vagin artificiel rempli d'eau doit être ajustée pour fournir un contact uniforme et étroit tout autour du pénis, sans gêner la pénétration ou la dilatation de la verge à l'intérieur de l'instrument. La totalité du pénis est introduite dans le vagin artificiel au moment de la première poussée copulatrice pour permettre au gland de se dilater à l'extrémité du vagin artificiel et éviter ainsi une éjaculation dans l'instrument qui entrainerait un contact prolongé de l'éjaculat avec les parois chaudes du manchon. La température et la pression du vagin artificiel doivent être maintenues relativement constantes pendant le prélèvement pour obtenir un résultat optimal en termes de stimulation de l'éjaculation et de récupération de spermatozoïdes. Les trois paramètres essentiels de la récolte de sperme sont donc le modèle de vagin, la température et le volume d'eau [3, 4].



Figure 18: préparation d'un vagin artificiel de type Missouri (mise en place du manchon de protection à usage unique à l'intérieur et remplissage d'eau)

Avant le prélèvement, la surface interne du vagin artificiel est lubrifiée avec un lubrifiant stérile et non spermicide. Le récipient de récupération du sperme est placé à température corporelle pendant la durée du prélèvement et de l'acheminement de l'échantillon jusqu'au laboratoire, ceci afin d'éviter d'éventuels chocs thermiques. Il est également préférable de protéger la semence de la lumière [4].

Afin d'augmenter le nombre de spermatozoïdes récupérés et réellement utilisables à chaque prélèvement, un filtre à sperme est placé à l'entrée du récipient de récupération de l'éjaculat. Il permet de séparer la partie liquide de l'éjaculat, qui renferme les spermatozoïdes, de la partie épaisse et gélatineuse, le gel, qui correspond à la dernière fraction de l'éjaculat. Les filtres en nylon sont plus intéressants que les filtres en polyester car ils piègent moins les spermatozoïdes. Le filtre contenant le gel doit être retiré immédiatement du flacon pour éviter tout écoulement dans la partie spermatique [3, 4].

1.1.3 – Entretien du vagin artificiel

Toutes les parties du vagin entrant en contact avec la semence ne doivent pas être spermicides. Tout ce qui n'est pas à usage unique doit être parfaitement nettoyé, débarrassé de tout résidu de produit chimique, puis séché, et si possible stérilisé entre chaque utilisation. Les savons et les désinfectants ne doivent pas être employés sur les manchons de caoutchouc des vagins artificiels car les traces résiduelles ont un fort risque d'être spermicides. Immédiatement après utilisation, les manchons de caoutchouc doivent être lavés à l'eau chaude, placés dans des bains d'alcool pendant 30 minutes à 24 heures afin de les désinfecter, puis laissés à l'air pour sécher dans une enceinte ou un meuble à l'abri de la poussière. Tous les manchons en latex peuvent être stérilisés dans des vapeurs d'oxyde d'éthylène pourvu qu'ils soient ensuite laissés à l'air au minimum 48 à 72 heures. Il est préférable d'utiliser du matériel à usage unique stérile et non toxique pour éviter toute contamination chimique des éjaculats ou la transmission de maladies infectieuses d'un étalon à l'autre. Il existe notamment des manchons plastiques très souples et très fins, munis ou non d'une poche de recueil pour le sperme, à usage unique et dont les dimensions sont adaptées à chaque type de vagin artificiel [figure 19].

Cela permet d'effectuer des prélèvements de sperme dans des conditions d'hygiène et de propreté maximale sans risque de toxicité chimique pour les spermatozoïdes. Malheureusement, certains étalons refusent le prélèvement avec ces manchons et préfèrent le contact avec les parois de caoutchouc [3, 4].

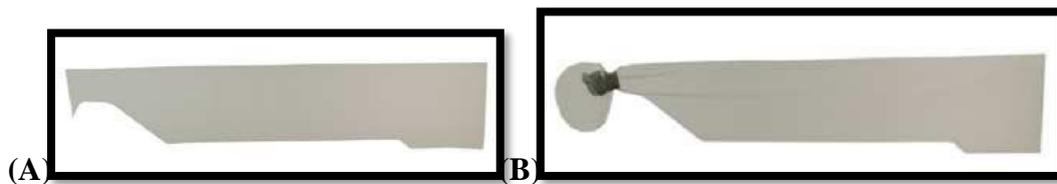


Figure 19: manchons plastiques (capotes) pour vagin de type Missouri sans (A) ou avec (B) poche de recueil (d'après IMV-technologies)

1.2 – Caractéristiques du mannequin

Un mannequin [figure 20] permet d'inciter l'étalon à reproduire les gestes de l'accouplement. L'étalon va monter sur le mannequin comme il le ferait sur une jument puis le pénis est introduit dans le vagin artificiel afin de récolter le sperme au moment de l'éjaculation. Les différents éléments souhaitables au niveau d'un mannequin sont [4]:

- une hauteur réglable, avec une hauteur moyenne légèrement plus faible que la taille moyenne de la race des étalons prélevés
- une largeur et/ou un volume suffisants pour permettre à l'étalon d'agripper fermement le mannequin entre ses antérieurs (la largeur totale incluant le rembourrage conseillée est de 56 à 61 cm)
- un rembourrage adéquat avec une surface externe résistante, non abrasive et facilement nettoyable
- un pied central pour éviter des lésions des pieds ou des membres postérieurs de l'étalon au moment du prélèvement du sperme
- une installation dans un local avec une large surface dégagée de tout obstacle et avec à proximité un travail ou un endroit pour placer la jument souffleuse
- un sol non glissant et homogène



Figure 20: mannequin de récolte

La plupart des étalons acceptent sans difficulté de chevaucher un mannequin. Les étalons novices peuvent éventuellement nécessiter un conditionnement initial en plaçant une jument en œstrus le long du mannequin. L'étalon est alors autorisé à renifler la jument pardessus le mannequin afin de stimuler sa libido et son comportement de chevauchement. L'étalon est ensuite détourné pour le faire monter sur le mannequin. Lorsqu'ils sont correctement conçus et installés, les mannequins améliorent considérablement l'efficacité et la sécurité des prélèvements [3, 4].

2 – Techniques générales de manipulation de la semence

Immédiatement après le prélèvement, la semence est rapidement transportée au laboratoire pour réduire les risques d'altération liée à l'action de la lumière ou à un choc thermique (température ambiante trop froide ou trop chaude). Tout le matériel entrant en contact avec la semence, ainsi que les milieux de dilutions, doivent être préalablement chauffés à température corporelle [figure 14]. Lorsqu'il n'y a pas de filtre de semence placé lors du prélèvement au niveau de l'entrée du récipient de recueil une filtration de l'échantillon au travers d'un filtre non toxique doit être immédiatement réalisée, afin d'éliminer le gel et les débris. La partie gélatineuse du sperme peut également être éliminée par aspiration avec une seringue mais la perte en spermatozoïdes est alors en général plus importante [4].



Figure 21 : cuve pour bain-marie contenant le milieu de dilution et les récipients allant accueillir le sperme, à température corporelle (36.8°C)

La concentration en spermatozoïdes, le volume, la couleur de la fraction sans gel de l'éjaculat et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles progressifs sont ensuite déterminées. L'ensemble des caractéristiques de l'éjaculat est enregistré sur des fiches d'évaluation de l'éjaculat qui sont archivées ou stockées sous forme de fichiers informatiques. Le sperme est dilué dans un milieu adapté quelques minutes après la récolte afin de maintenir au maximum la viabilité des spermatozoïdes. Si la semence n'est pas stockée plus de une ou deux heures (à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière), une dilution de un volume de sperme pour un ou deux volumes de dilueur est en général correcte. Il est également possible de placer

le dilueur chauffé à 37°C directement dans le flacon de récolte fixé au vagin artificiel pour assurer une protection et des éléments nutritifs aux spermatozoïdes dès l'éjaculation. Cette méthode est rarement nécessaire, excepté pour quelques étalons dont le plasma séminal semble réduire la mobilité et la durée de survie des spermatozoïdes [3, 4].

Pour mesurer de manière fiable la concentration de l'échantillon, le dilueur utilisé doit être transparent si la mesure est faite à l'aide d'un spectrophotomètre ou d'un densimètre. Sinon la mesure est soit effectuée manuellement à l'aide d'une cellule hématimétrique, soit déterminée à partir d'une goutte de sperme frais non dilué [3, 4].

Les dilueurs de semence augmentent la durée de survie des spermatozoïdes et sont le plus souvent à base de lactose ou de lait. L'ajout d'antibiotiques favorise l'élimination des bactéries qui contaminent de manière systématique les échantillons de sperme au moment du prélèvement. Les antibiotiques les plus couramment employés sont le sulfate de polymixine B (concentration de 200 à 1000 UI/mL), la pénicilline cristalline (100 à 1500 UI/mL), le sulfate de gentamicine (100 à 1000 µg/mL), le sulfate d'amikacine (100 à 1000 µg/mL) et la ticarcilline (100 à 1000 µg/mL). Lorsque la gentamicine ou l'amikacine sont utilisées, il faut ajouter dans le dilueur du bicarbonate sodique afin d'ajuster le pH du milieu. Un pH variant entre 6,6 et 7,2 est optimal pour conserver la mobilité des spermatozoïdes tout en évitant une capacitation prématurée. L'association pénicilline G potassium (1000 UI/mL) et sulfate d'amikacine (1000 µg/mL) dans un dilueur à base de lait conserve la mobilité des spermatozoïdes dans des conditions optimales tout en offrant une activité antibactérienne à large spectre [4].

3 – Evaluation macroscopique de la semence

L'évaluation de la semence doit être réalisée de manière méthodique et minutieuse par une personne expérimentée et dans un laboratoire correctement équipé.

Le volume de la fraction sans gel, la couleur et l'aspect macroscopique sont notés [figure 13]. La mesure du volume est utile pour calculer le nombre total de spermatozoïdes contenus dans l'éjaculat et se fait généralement à l'aide d'une éprouvette graduée de 100 ml. Le volume de l'éjaculat varie en fonction de la saison (plus faible en hiver qu'en été) et en fonction du temps de préparation de l'étalon (une stimulation sexuelle prolongée augmente le volume sans modifier le nombre de spermatozoïdes). L'évaluation macroscopique de l'aspect et de la couleur de l'éjaculat permet de détecter la présence éventuelle de sang, d'urine ou de pus dans l'éjaculat [3, 4].

Le pH de la fraction sans gel du sperme peut être mesuré rapidement à l'aide d'un papier pH, mais il est préférable d'utiliser un pH-mètre précis. Le pH doit être mesuré dès que possible après la récolte pour éviter le biais dû aux produits issus du métabolisme des spermatozoïdes. Le pH normal du sperme d'étalon varie entre 7,2 et 7,7. Il subit des variations physiologiques selon la saison, la fréquence des éjaculations et la concentration. Un pH supérieur à 7,7 indique souvent une infection ou une inflammation de l'appareil génital interne, une contamination par de l'urine ou un autre produit alcalin tel que le savon ou une éjaculation incomplète. Le pH peut également être affecté par la méthode de récolte et par le type de lubrifiant éventuellement utilisé. Les changements de pH et d'osmolarité provoqués par l'urospermie ont un effet négatif sur la mobilité des spermatozoïdes [3, 4].

4 – Détermination de la concentration en spermatozoïdes

La mesure de la concentration en spermatozoïdes de l'échantillon permet de calculer le nombre total de spermatozoïdes de l'éjaculat. Elle se réalise selon trois techniques principales : la cellule hématimétrique, le spectrophotomètre et le compteur électronique de particules [3, 4].

4.1 – Utilisation de la cellule hématimétrique

Il s'agit de la méthode la moins chère pour déterminer la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat et consiste en un comptage direct des spermatozoïdes observés individuellement. L'utilisation de la cellule hématimétrique (cellule de Thoma [figure 15] ou cellule de Malassez) est assez fiable lorsque la dilution (en général au 1/100^{ème}) est faite de façon précise à l'aide d'une pipette de dilution pour le comptage des leucocytes et des plaquettes (l'Unopette system®).

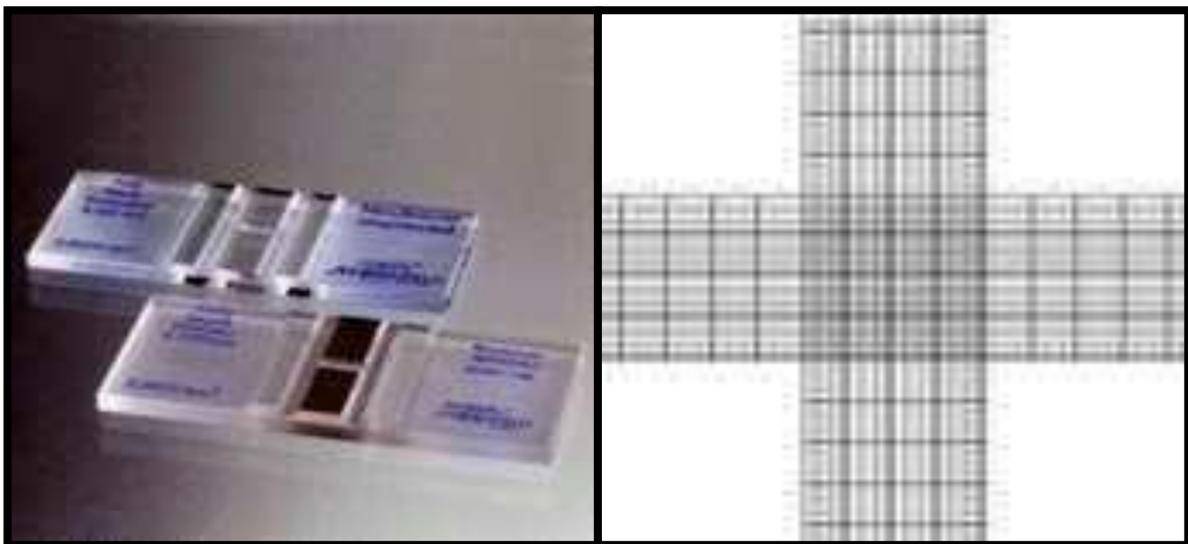


Figure 22: cellules de Thoma (d'après les laboratoires Fiers) : les spermatozoïdes présents dans les grands carrés sont comptés.

Les étapes de la préparation sont les suivantes [3, 4] :

- Après avoir bien agité l'échantillon, le sperme est aspiré par capillarité jusqu'à la graduation 1.

- La pipette est ensuite remplie jusqu'à la graduation 100 avec une solution formolée.

- La semence ainsi diluée est mélangée en retournant la pipette puis placée au niveau des deux chambres des cellules de Toma (après avoir éliminé les cinq premières gouttes). La lame est laissée à sédimenter pendant 5 à 10 minutes avant de commencer le comptage.

- La concentration est calculée à partir du nombre de spermatozoïdes comptés dans les carrés de la cellule [figure 23] ; seuls les spermatozoïdes dont la tête se trouve à l'intérieur des carrés sont comptés. Il est parfois nécessaire de varier le taux de dilution pour faciliter le comptage, en l'augmentant à $1/200^{\text{ème}}$ pour les éjaculats très concentrés ou en le diminuant à $1/50^{\text{ème}}$ pour les éjaculats très dilués. Il est préférable de faire un comptage dans un carré de chaque côté de la chambre de la cellule hématimétrique et de calculer la moyenne des deux, puis de multiplier ce nombre par un million pour connaître le nombre de spermatozoïdes par millilitre. Si ces deux comptages sont très différents, il est conseillé de reprendre toute la procédure depuis la dilution dans la pipette et de refaire le comptage. De nombreux laboratoires réalisent leurs comptages sur un nombre bien plus important de carrés, afin d'avoir une mesure plus juste.

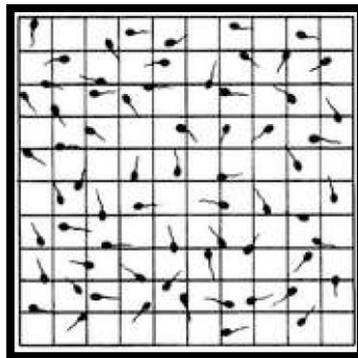


Figure 23 : représentation de l'image obtenue lors de l'observation des spermatozoïdes sur une cellule de Thoma (d'après Milian Swiss)

4.2 – Utilisation du spectrophotomètre

L'acquisition d'un spectrophotomètre [figure 24] est justifiée pour les praticiens spécialisés ou les grands haras, surtout quand l'insémination artificielle est utilisée. Cette technique est basée sur la corrélation entre la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et sa concentration. Les spectrophotomètres peuvent être plus ou moins sophistiqués et doivent être calibrés pour le sperme d'étalon. La courbe standard est généralement établie à l'aide de dilutions sériées d'un échantillon donné dont la concentration est calculée à l'aide d'une cellule hématimétrique. L'appareil est calibré pour une utilisation avec une lumière d'une longueur d'onde de 550 nm. Un réétalonnage régulier des appareils est nécessaire. L'estimation de la concentration en spermatozoïdes d'un éjaculat par mesure de la densité optique doit être considérée comme assez juste et utilisable en routine pour la préparation de doses d'insémination, mais pouvant être soumise à des biais de mesure [3, 4].



Figure 24: photomètre AccuRead®(d'après IMV technologies)

4.3 – Utilisation du compteur de particules

La concentration du sperme peut être déterminée à l'aide d'un appareil comptant des particules de taille connue (« Coulter counter » tels que le SpermCue®, le modèle 10 sperm counter® ou le Micro-Reader®). Cette méthode est surtout utilisée dans les laboratoires de recherche. Les analyseurs informatisés de la semence sont capables de donner la concentration de l'échantillon lorsque le volume utilisé est précis et l'appareil bien calibré [3, 4].

4.4 – Détermination du nombre total de spermatozoïdes par éjaculat

Le nombre total de spermatozoïdes de l'éjaculat, calculé en multipliant son volume par la concentration, est un paramètre important pour évaluer la fertilité d'un étalon. Il est soumis à des variations saisonnières, mais dépend également de nombreux facteurs tels que la fréquence des prélèvements et donc des éjaculations, l'âge, la taille des testicules, le rendement de la fonction de spermatogenèse (c'est-à-dire la quantité de spermatozoïdes produits par unité de poids de testicule), la quantité de spermatozoïdes contenus dans le réservoir extragonadique que constitue la queue de l'épididyme, et les différentes affections génitales possibles. Le nombre total de spermatozoïdes dans un éjaculat d'un étalon mature est en général compris entre 4 et 12 milliards. Chez les étalons pour lesquels un faible nombre de spermatozoïdes est dénombré dans l'éjaculat, il est conseillé de chercher à évaluer la production spermatique journalière (DSO ou « Daily Sperm Output »). Pour cela, un prélèvement de sperme quotidien est réalisé pendant 7 à 10 jours de suite avec une mesure du nombre total de spermatozoïdes dans chacun des éjaculats. Une fois que la réserve extragonadique en spermatozoïdes s'est stabilisée (4 jours pour les étalons ayant de petits testicules et 5 à 6 jours pour ceux ayant de gros testicules), il est possible d'estimer la DSO en faisant la moyenne du nombre de spermatozoïdes des éjaculats recueillis pendant 3 jours consécutifs. Lors d'une utilisation régulière comme reproducteur, l'étalon devrait ainsi pouvoir éjaculer chaque jour ce nombre de spermatozoïdes. Cette production quotidienne de spermatozoïdes par les testicules varie en fonction de la saison, de l'âge, de la taille des testicules, et de la présence ou non de troubles de la fonction testiculaire [3, 4].

5 – Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes

L'évaluation de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes est une étape indispensable lors de l'examen de la semence. La mobilité des spermatozoïdes reflète généralement la viabilité de l'ensemble des spermatozoïdes d'un éjaculat et une corrélation positive (mais non absolue) existe entre la mobilité et la fertilité [figure 25].

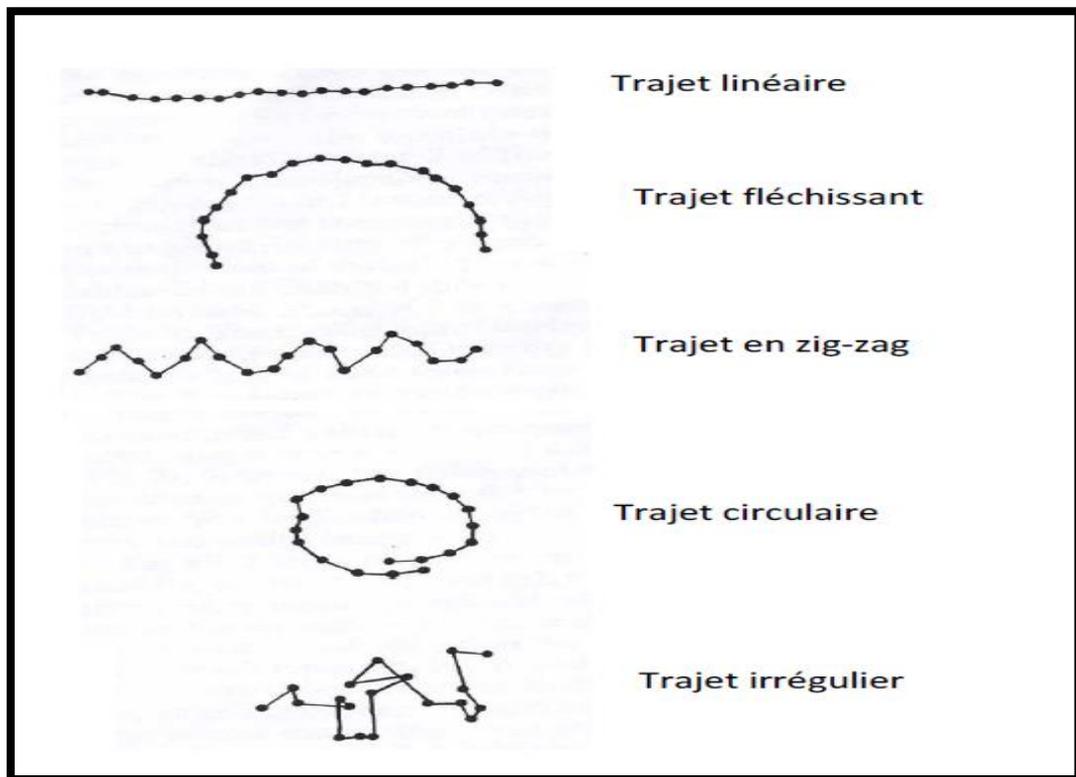


Figure 25: représentation de cinq types de trajets de spermatozoïdes équins

5.1 – Méthode classique

5.1.1 - Dilution

La mobilité des spermatozoïdes est d'abord évaluée au niveau de la semence « pure » (non diluée) afin de déterminer un éventuel effet délétère du dilueur de semence sur la semence : elle apporte une indication de la performance des spermatozoïdes dans leur milieu naturel. Elle peut cependant être difficile à évaluer lors de concentration spermatique élevée de par l'agglutination de spermatozoïdes sur la lame de verre. La mobilité des spermatozoïdes est ensuite évaluée après dilution de la semence dans un dilueur adapté [tableau 2]. La fiabilité et la répétabilité de cette évaluation sont ainsi généralement nettement améliorées. Il est préférable d'effectuer une dilution à une concentration définie (par exemple 20 millions de spermatozoïdes par millilitre) à l'aide d'un dilueur de semence identique afin de limiter les biais d'observation [3, 4].

Table 2: description des dilueurs de semence couramment employés

NOMS	Composition
Dilueur de Kenney	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mélanger du lait écrémé en poudre (2,4 g) avec du glucose (4,9 g) dans 92 mL d'eau déminéralisée. 2. Ajouter de la pénicilline G cristalline (150 000 UI) et du sulfate de streptomycine cristallin (150 000 µg) ou du sulfate de gentamicine (100mg) mélangé dans 2 mL d'une solution de bicarbonate de sodium à 7,5%.
Dilueur au lait écrémé	<ol style="list-style-type: none"> 1. Chauffer 100 mL de lait écrémé non supplémenté à 92-95°C pendant 10 minutes au bain-marie. 2. Refroidir. 3. Ajouter du sulfate de polymyxine B (100 000 UI). <p>PS : aux Etats-Unis il n'y a pas de lait UHT d'où cette préparation ; en France le lait UHT demi-écrémé est fréquemment employé.</p>
Dilueur « crem-gel »	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dissoudre 1,3 g de gélatine non parfumée dans 10 mL d'eau stérile déminéralisée. Stériliser. 2. Chauffer un mélange moitié crème moitié lait à 92-95°C pendant 2 à 4 minutes au bain-marie. Enlever l'écume en surface. 3. Mélanger 10 mL de la solution de gélatine avec 90 mL de la préparation laitcrème. Refroidir. 4. Ajouter de la pénicilline G cristalline (100 000 UI) et du sulfate de streptomycine (100 000 µg) et du sulfate de polymyxine B (20 000 UI).

5.1.2 – Evaluation visuelle

L'évaluation visuelle de la mobilité des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante [figure 26] et comporte une estimation de [3, 4] :

- la **mobilité totale**, à savoir le pourcentage de spermatozoïdes mobiles
- du pourcentage de **spermatozoïdes fléchants**, à savoir de spermatozoïdes présentant une trajectoire linéaire rapide
- la **vitesse des spermatozoïdes** : une note est attribuée (0=immobiles à 4=rapides)

Ainsi, un échantillon dont la mobilité serait notée 75/70(4) correspond à un éjaculat dont 75% des spermatozoïdes sont mobiles, 70% fléchants et avec une vitesse de déplacement rapide. Les pourcentages de spermatozoïdes fléchants et rapides sont souvent considérés comme étant les meilleurs critères d'analyse de la mobilité pour prédire la capacité fécondante du sperme [3, 4].

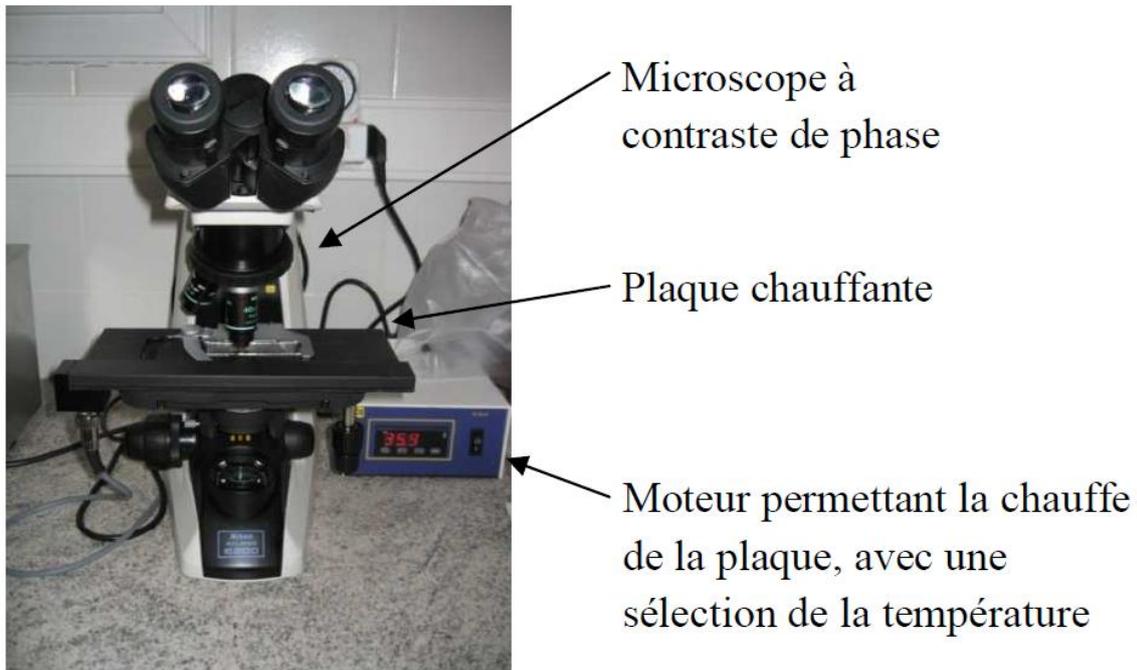


Figure 26: microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante

5.1.3 – Conservation de la semence

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 (DUSSEAU, 1963 ; MAGISTINI, 1990).

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

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

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

La vitesse du refroidissement doit être contrôlée et adaptée à la température de conservation. Pour la conservation à +4°C, une descente initiale de - 0,3°C par min est idéale soit 10 heures pour passer de +37°C à +4°C. Palmer (1984) utilise du lait écrémé ajouté d'antibiotiques comme dilueur. L'insémination doit être faite dès les 10 heures qui suivent la collecte (MAGISTINI, 1990)

5.2 – Autres méthodes

5.2.1 – Diversité des autres méthodes

Diverses techniques ont été développées afin d'obtenir un résultat sécurisé et objectif, sans biais : la microphotométrie à intervalles de temps réguliers, la vidéomicrographie reconstruite image par image, la spectrophotométrie ou l'analyse d'images automatisées. Ces méthodes sont cependant considérées comme étant fastidieuses et trop coûteuses pour être utilisées en routine [9].

5.2.2 – Description du système d'analyse d'images automatisées (CASA : computer-assisted spermatozoal analysis)

Le système d'analyse automatisée CASA est actuellement en place dans plusieurs laboratoires de référence afin d'estimer objectivement les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes. Il permet de visualiser et de numériser des images successives, de traiter et d'analyser les données et de fournir ensuite des informations exactes, précises et significatives sur la cinématique de cellules individuelles permettant d'apporter des données statistiques sur la population moyenne de cellules [10].

Ces analyseurs automatiques de mobilité fournissent un très grand nombre de mesures objectives sur les caractéristiques de mobilité des spermatozoïdes [4, 11]:

- le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (MOT : Total Spermatozoal Motility)
- le pourcentage de mobilité progressive (PMOT : Progressive Spermatozoal Mobility)
- le pourcentage de spermatozoïdes fléchants (dont la trajectoire a des caractéristiques supérieures à une vitesse et une linéarité de mouvement prédéfinie)
- l'amplitude de mouvements latéraux de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement (ALH : Amplitude of Lateral Head Displacement)
- la vitesse moyenne de déplacement linéaire (VSL : Straight-Line Velocity)
- la vitesse curviligne (VCL : Curvilinear Velocity) c'est-à-dire la vitesse mesurée sur la distance totale parcourue
- la fréquence des rythmes de croisements des trajectoires (BCF : Beat Cross Frequency)
- la moyenne de déplacements angulaires (MAD : Mean Angular Displacement).

5.2.3 – Systèmes CASA actuels

Aujourd'hui, les systèmes employés sont le système IVOS®, le système SM-CMA et le « Hobson Sperm Tracker ». Le système IVOS® a été développé en 1992 par HamiltonThorn. Il présente les innovations suivantes : un éclairage stroboscopique par illumination de diode pour produire des images nettes et plus précises, un système d'enregistrement pour favoriser le suivi de l'analyse du sperme, une classification automatisée des mouvements des spermatozoïdes et l'utilisation facultative d'une illumination fluorescente et d'un fluorochrome de l'ADN spermatique afin de distinguer les cellules de tout autre objet ambigu. Le système SM-CMA a été développé dans le début des années 90. Il est le seul système à pouvoir détecter la pièce intermédiaire du spermatozoïde pour déterminer si l'objet immobile est bien un spermatozoïde intact ou pour distinguer la trajectoire propre à deux cellules qui se croisent ou se trouvent dans une région floue et incertaine. Le « Hobson Sperm Tracker » a été introduit dans le milieu des années 90 [10].

L'analyse informatique des spermatozoïdes est principalement réservée au monde de la recherche où la standardisation, l'exactitude et la précision sont des conditions indispensables à l'obtention de mesures expérimentales. L'intérêt de l'utilisation d'un l'analyseur CASA dans un environnement commercial, comme un hôpital vétérinaire ou un centre de reproduction en équine, est sa capacité à recueillir des résultats objectifs sur la mobilité. Une incertitude existe cependant encore sur la relation entre la fertilité et les valeurs obtenues par le CASA.

Par ailleurs ces instruments permettent de sélectionner des caractéristiques diverses (fréquence et durée des prises d'images, valeur seuil démarquant la présence de mouvement, progression des mouvements, mesures de vitesse, taille et luminosité des têtes des spermatozoïdes) afin d'optimiser la capture des spermatozoïdes et de minimiser celle d'objets inertes. Chaque manipulation est importante pour améliorer la précision et la répétabilité des mesures données par les laboratoires [12, 13].

5.2.4 – Résultats des études employant les systèmes CASA

Une étude a comparé deux systèmes CASA différents : le « CellSoft Automated Semen Analyzer », qui utilise un microscope externe pour prendre des images des spermatozoïdes, et le « HTM-2000 Motility Analyzer », constitué de son propre système d'optiques qui enregistre les images sur un support vidéo lu ensuite par un microscope externe équipé d'une caméra. Le pourcentage de cellules mobiles est apparu statistiquement différent entre les deux analyseurs, bien que ces valeurs étaient plus comparables entre elles qu'en utilisant la méthode

d'estimation subjective. La vitesse curviligne est également apparue différente avec les deux appareils car ils ne localisent pas le centre de la tête spermatique au même endroit. De même, la détermination de la linéarité et l'estimation de la concentration spermatique étaient différents. Cette étude fait donc ressortir des différences dans l'analyse des mouvements des spermatozoïdes entre deux analyseurs automatisés de marques différentes ainsi qu'avec l'estimation subjective. Une certaine prudence reste donc de mise lors de l'interprétation de tels résultats [11].

Le HTMA (Hamilton-Thorn motility analyzer), qui consiste en une analyse thermostatique d'un échantillon de sperme, est une technique fiable et répétable pour les mesures de MOT, PMOT, VCL et VSL du sperme d'étalon. Il est considéré comme meilleur que la vidéomicrographie pour l'analyse des variables de vitesse. Les éléments susceptibles d'entraîner des variations sont : les différents opérateurs, la variation de température ambiante ou les délais entre deux prises d'images. Le principal inconvénient de cette technique est le fort pourcentage d'erreurs dues à l'interprétation des trajectoires (comme deux trajectoires qui se croisent par exemple) [7].

5.2.5 – Avenir ?

Certains systèmes CASA sont équipés d'optiques fluorescentes, option nommée « Viadent » permettant la détection de colorants comme celui de l'ADN SYBR-14. Il s'agit d'une méthode rapide, précise et objective d'évaluation de la viabilité et de la mobilité de la semence [8]. Des études ultérieures devront déterminer si la valeur prédictive de la mobilité spermatique peut être améliorée par cette méthode [11].

6 – Etude morphologique des spermatozoïdes

6.1 – Diversité des méthodes possibles

L'étude de la morphologie des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope avec un objectif à immersion au grossissement x1000. Les microscopes à lumière directe peuvent être utilisés pour examiner les frottis de semence à condition que les colorants utilisés soient appropriés [4].

6.1.1 – Les différents colorants

Les colorants cytologiques classiques à usage multiple, comme le Wright's, le Giemsa, l'hématoxyline-éosine, sont utilisés pour mettre en évidence les cellules germinales ou somatiques sur les frottis de sperme. Ils permettent une coloration différentielle des différentes parties du spermatozoïde et une identification d'autres éléments cellulaires telles que les bactéries ou les leucocytes. Une modification de la coloration Giemsa/Wright est disponible dans le commerce et permet la coloration de frottis en quelques secondes par passage des lames dans trois solutions différentes : solution de fixation, solution d'éosine Y et solution de bleu de méthylène [3, tableau 3].

Les colorants de fond, comme l'éosine-nigrosine ou l'encre d'Inde, sont les colorants les plus largement employés de par leur facilité d'utilisation. Une goutte de sperme et une goutte de colorant sont mélangées sur la lame avant d'être étalées pour obtenir un frottis qui est séché à l'air puis observé au microscope avec objectif à immersion. La visualisation des détails de la structure du spermatozoïde est considérablement améliorée par fixation des cellules dans une solution tamponnée de formol ou dans un fixatif similaire tel que le glutaraldéhyde [13], ainsi que par l'utilisation d'un montage en milieu humide avec un microscope à contraste de phase ou un microscope à contraste interférentiel. La coloration à l'éosine-nigrosine est utilisée pour l'étude morphologique des spermatozoïdes ainsi que pour la détermination du taux de spermatozoïdes vivants et morts. Ce colorant est constitué d'un mélange à parts égales d'une solution d'éosine à 5% et d'une solution de nigrosine à 10%. Les spermatozoïdes vivants apparaissent blancs alors que ceux qui sont morts sont colorés en rouge ou rose suite à la perméabilité de leur membrane à l'éosine. La coloration à l'encre de chine est une préparation permettant d'avoir un meilleur contraste entre les spermatozoïdes (blanc) et la lame (fond noir) [3].

Table 3: description des préparations de différentes colorations pour l'observation microscopique de la morphologie des spermatozoïdes

Coloration de Giemsa	<ol style="list-style-type: none"> 1. Préparer les frottis sur les lames propres dégraissées 2. Fixer les frottis par passage de 3 minutes dans la solution mère 2 fois 3. Placer dans la solution diluée au 1/20^{ème} (1 g de colorant de Jenner + 400 mL de méthanol) pendant 45 minutes 4. Passer chaque lame individuellement dans la solution d'acide acétique glacial au 1/100^{ème} 5. Rincer les lames à l'eau, les déshydrater rapidement à l'alcool absolu puis les laver au xylène 6. Observer au microscope au grossissement x 1000 sous huile d'immersion
Coloration de Wright	<ol style="list-style-type: none"> 1. Préparer les frottis de sperme et les sécher à l'air 2. Recouvrir les frottis avec 15 à 20 gouttes d'une solution de Wright pendant 1 minute 3. Ajouter 30 à 40 gouttes d'eau ou d'une solution tampon* et laisser au moins 2 minutes 4. Drainer la lame, monter et passer à l'observation microscopique <p>*Solution tampon : 0,5 g de phosphate de sodium dibasique 3,5 g de phosphate de sodium monobasique 1 litre d'eau bi-distillée</p>
Coloration à l'éosine B	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fixer le sperme en mélangeant 0,1 mL de sperme sans gel avec 0,9 mL de solution formolée tamponnée 2. Préparer les frottis en plaçant 6 µL de sperme fixé sur une lame dégraissée 3. Sécher les frottis à l'air et les maintenir à 23°C jusqu'à coloration 4. Colorer en trempant les lames dans une solution d'éosine B à 5% pendant 20 minutes 5. Observer à l'aide d'un microscope à contraste de phase, au grossissement x 400.

6.1.2 – La microscopie électronique

L'observation du spermatozoïde au microscope électronique, à transmission ou à balayage, est parfois nécessaire pour caractériser une anomalie à un plus fort grossissement que celui apporté par la microscopie optique. Cette technique offre un fort pouvoir de résolution pour l'observation des détails morphologiques et permet ainsi un examen structural approfondi. Elle a été utilisée avec succès pour identifier et décrire avec précisions les anomalies ultrastructurales au niveau de l'acrosome, de la jonction entre la tête et la pièce

intermédiaire et au niveau des microtubules de l'axonème. Le nombre de spermatozoïdes observables à l'aide de cette technique est limité d'où la nécessité que l'anomalie suspectée soit très fréquente dans l'échantillon [3]. La microscopie à balayage apporte une vision en trois dimensions des spermatozoïdes alors que la microscopie électronique à transmission permet l'observation en coupes de l'ultrastructure interne des spermatozoïdes [3, 4].

La préparation de la semence est la suivante : (1) le sperme est fixé dans une solution de glutaraldéhyde 4% - cacodylate sodium à 0.1 mol/l, à pH 7,4, contenant du sucrose 5%, pendant une heure ; (2) les échantillons sont lavés trois fois à l'aide d'une solution tampon cacodylate à 0.1 mol/L puis fixés au tétroxyde d'osmium 1% - cacodylate 0.1 mol/L pendant une heure ; (3) trois lavages avec le tampon cacodylate sont ensuite réalisés et les échantillons sont déshydratés par passage successifs dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes ; (4) l'inclusion se fait dans le Polybed 812 ND et les coupes sont montées sur une grille de nickel et colorées à l'aide d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb.

6.2 – Evaluation et classification

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont traditionnellement classées en anomalies primaires, secondaires et tertiaires. Les anomalies primaires sont considérées comme celles résultant d'une perturbation au cours de la spermatogenèse et par conséquent ayant une origine testiculaire. Les anomalies secondaires auraient pour origine des altérations au moment de leur passage dans les voies génitales excrétrices. Les anomalies tertiaires se produiraient *in vitro*, du fait d'une mauvaise technique de récolte ou d'une mauvaise manipulation au laboratoire. Un minimum de 100 spermatozoïdes doit être observé pour évaluer ces défauts de morphologie [4, 9].

A l'heure actuelle, la classification consiste à répertorier les spermatozoïdes en fonction de la localisation de l'anomalie observée : têtes détachées sans queue, têtes anormales, acrosomes en bouton, gouttelettes cytoplasmiques proximales ou distales, pièces intermédiaires pliées ou irrégulières, queues coudées ou enroulées [figure 27]. Cela permet une observation plus explicite et plus représentative de l'ensemble des spermatozoïdes tout en évitant les hypothèses plus ou moins erronées sur l'origine de tel ou tel défaut. De plus, certaines anomalies morphologiques comme le détachement de tête peuvent être primaire, secondaire, ou tertiaire d'où des erreurs d'interprétation évitées. Aussi un choc osmotique peut provoquer une coudure ou un enroulement de la queue du spermatozoïde et donc être abusivement interprété comme étant une anomalie morphologique secondaire, quand bien même il s'agit d'une anomalie tertiaire [3, 4, 9].

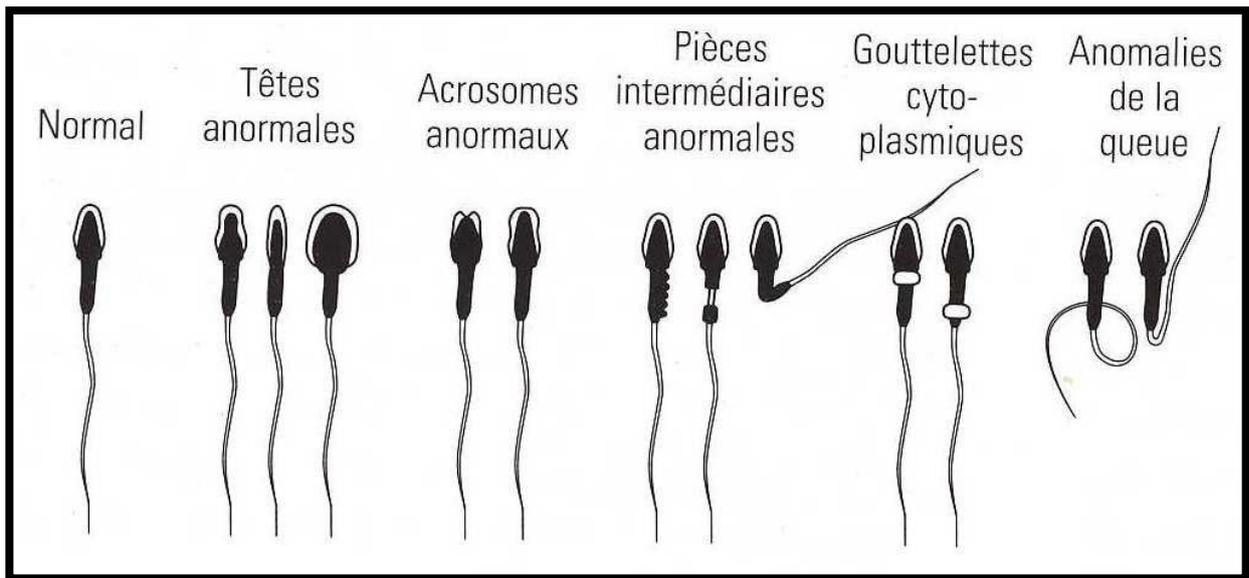


Figure 27: représentation schématique des anomalies chromosomiques possibles

6.3 – Interprétation de la qualité de la semence

L'examen morphologique fournit des informations sur les caractéristiques individuelles des spermatozoïdes. Ce renseignement est important car la semence peut posséder une bonne mobilité avec des spermatozoïdes ayant des anomalies morphologiques. De plus, un étalon peut avoir de nombreux spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques sans que cela n'ait une incidence sur la fertilité. Un certain nombre de défauts morphologiques (gouttelettes cytoplasmiques ou queues anormales) semble n'avoir que peu d'effet sur la fertilité alors que d'autres (pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement anormaux, têtes détachées, anomalies de forme de la tête, pièces intermédiaires pliées ou irrégulières, queues enroulées et cellules germinales prématurées) ont un effet délétère sur la fertilité [15].

La variation au niveau de la morphologie des spermatozoïdes au cours de la saison de monte pour un même étalon peut être importante, sans que cela n'affecte sa fertilité [15]. Ainsi, l'observation morphologique des spermatozoïdes dans le cadre de la prédiction de la fertilité d'un étalon doit être interprétée avec prudence : certains étalons peuvent avoir un grand nombre de spermatozoïdes anormaux alors que leur exploitation comme reproducteur permet d'enregistrer des taux élevés de gestations. De plus, étudier la fertilité prévisible d'un étalon sur une saison de monte à partir d'un unique prélèvement est réducteur et conduit à de

mauvaises interprétations. En général, un spermatozoïde à morphologie anormale n'exerce pas une influence directement négative sur un spermatozoïde normal. Par conséquent, le nombre total de spermatozoïdes morphologiquement normaux dans un éjaculat donne une meilleure information sur la fertilité d'un étalon que le pourcentage ou le nombre absolu de spermatozoïdes morphologiquement anormaux. En général, le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux dans un échantillon de semence est similaire au pourcentage de spermatozoïdes progressivement mobiles [4].

Table 4: caractéristiques du sperme d'étalon (spz : spermatozoïdes)

Couleur	Blanc laiteux
Volume	30 à 300 mL
Concentration	30 à 600 millions / mL
Ratio spermatozoïdes morts/vivants	6,5 :3,5
Morphologie	Plus de 65% de spz morphologiquement normaux
Mobilité	Minimum 40% de spz activement mobiles
Longévité à température ambiante	45 à 50% de spz vivants après 3 heures 10% de spz vivants après 8 heures
pH	6,9 à 7,8
Globules rouges	Moins de 5000/mL
Globules blancs	Moins de 1500/mL

Chapitre

IV

Chapitre IV : La cryoconservation

I. Définition et objectifs de la cryoconservation

A. Définition

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

La cryoconservation de la semence est réalisée dans le cadre de différents domaines : les technologies de reproduction assistée (ART), la conservation des espèces menacées ou encore dans un intérêt médical, lors d'une incapacité à reproduire ou d'un décès. Il s'agit d'une biotechnologie importante permettant d'éviter la propagation de certaines maladies sexuellement transmissibles, d'éliminer les barrières géographiques et de préserver le matériel génétique d'un animal pendant une période de temps théoriquement illimitée (Neto et al. 2014; Day et Stacey 2007).

B. Objectifs de la cryoconservation de la semence

Les biotechnologies de la reproduction ou ART (technologies de reproduction assistée) répondent à un certain nombre de demandes des filières d'élevage dans un souci de productivité. Elles incluent des techniques comme l'insémination artificielle, le transfert embryonnaire, la fécondation *in vitro*, le sexage, la cryoconservation des gamètes et embryons, le clonage et la transgénèse. Ces biotechnologies visent à amplifier la descendance des géniteurs d'élite et donc permettre une meilleure diffusion de l'acquis génétique induit par la sélection artificielle ainsi que la conservation de la biodiversité des races domestiques et des espèces sauvages notamment celles en voie d'extinction. Ces techniques jouent également un rôle dans la recherche génétique et dans la production d'animaux transgéniques.

L'insémination artificielle (IA), point clé de l'organisation et de la rentabilité en élevage, est une technique relativement ancienne, qui s'est développée dès 1950 chez les bovins laitiers.

Son utilisation à grande échelle chez d'autres espèces animales est beaucoup plus récente. Elle consiste à déposer le sperme frais, réfrigéré ou congelé, au moyen d'un instrument, au moment le plus opportun et à l'endroit le plus approprié du tractus génital femelle. La méthode offre donc un double avantage : celui, d'une part, de multiplier la capacité de reproduction des mâles et donc de contribuer à l'amélioration génétique et, d'autre part, celui de constituer un moyen préventif de lutte contre les maladies sexuellement transmissibles. Cette technique de reproduction permet de s'affranchir des distances géographiques et des difficultés d'accouplement, qu'elles soient d'origine anatomique, fonctionnelle ou comportementale.

C'est en 1952 que Polge et son équipe mirent au point la première procédure de congélation des spermatozoïdes en utilisant le glycérol comme agent cryoprotecteur, ce qui permit à l'IA de prendre un véritable essor. Aujourd'hui, l'IA avec de la semence congelée est indispensable dans le domaine de l'élevage et de la sélection et contribue à augmenter la productivité des espèces domestiques (Decuadro-Hansen 2004; Barbas et Mascarenhas 2009; Hanzen 2014).

C. Avantages et inconvénients de la cryoconservation

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

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

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

II. Les effets de la cryoconservation sur la semence

Durant la cryoconservation de la semence, les procédures de refroidissement lors de la congélation et de réchauffement lors de la décongélation, sont responsables de sévères dommages auprès des gamètes mâles, ce qui diminue leur capacité de fécondation. Ces dommages induits par le froid représentent un facteur limitant de la conservation de la semence. Le processus de cryoconservation comprend plusieurs étapes, depuis la préparation de la semence et sa dilution jusqu'à la décongélation : à chaque étape, les spermatozoïdes peuvent perdre leur capacité à fonctionner normalement.

En effet, durant le processus de congélation-décongélation, les spermatozoïdes sont exposés à un stress osmotique important et divers compartiments biochimiques et/ou anatomiques du spermatozoïde peuvent être lésés (l'acrosome, le noyau, les mitochondries, l'axonème, la membrane plasmique, etc...), altérant la longévité des spermatozoïdes et leur capacité à féconder l'ovocyte après insémination artificielle.

Ainsi, les résultats de la fécondité obtenus après insémination avec une semence congelée sont extrêmement variables. Ces variations sont dues à la technique de collecte de la semence, au dilueur choisi, à la concentration finale en spermatozoïdes, au procédé utilisé, à la combinaison dilueur-vitesse de congélation, à la technique de décongélation utilisée ainsi qu'au milieu de décongélation. De plus, il faut prendre en compte les variations individuelles de la qualité de la semence qui peuvent expliquer une plus ou moins bonne résistance des spermatozoïdes à la cryoconservation d'un individu à l'autre (Luvoni 2003 ; Schäfer-Somi et al. 2006 ; Briand-Amirat et al. 2006 ; Burgess et al. 2012 ; Dorado et al. 2011 ; Oldenhof et al. 2013).

A. Effets de la cryoconservation sur les différentes fonctions cellulaires

1. Effets sur le métabolisme cellulaire

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

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

2. Effets sur les membranes cellulaires

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

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

Il faut savoir que chaque espèce de lipide possède une température de changement de phase, c'est-à-dire une température pour laquelle les lipides passent de l'état fluide à l'état de gel. Lorsque la température devient inférieure à la température de changement de phase d'un type de lipides, tous les lipides de cette espèce se regroupent en microdomaines. Ceci est à l'origine d'une réorganisation de la membrane plasmique créant des trous entre les microdomaines de lipides et les portions fluides de membrane. Ce réarrangement des lipides membranaire induit par le froid est ce qu'on appelle le « cold shock » ou « choc induit par le froid » et il entraîne une fragilisation de la membrane voire des dommages ou des ruptures membranaires.

Lorsque la température corporelle est de nouveau atteinte après décongélation, les lipides retrouvent leur forme liquide mais la membrane plasmique ne retrouve pas son organisation initiale et reste altérée. Les conséquences des altérations membranaires sont multiples car la membrane plasmique est atteinte tout comme les membranes des organites de la cellule spermatique. Ainsi, les spermatozoïdes congelés-décongelés peuvent présenter une perte de la structure interne de l'acrosome ou des mitochondries, qui représentent les structures cellulaires les plus sensibles à la cryoconservation. Cela conduit à de sévères conséquences sur la viabilité de la cellule mais également à des dysfonctionnements dans l'activation de la mobilité ou dans la réaction acrosomique et la fécondation.

3. Effet sur le noyau et l'ADN

Le noyau du spermatozoïde peut également être altéré durant la cryoconservation. Or, la préservation de l'intégrité de l'ADN est primordiale pour l'obtention d'une descendance viable et conforme aux parents. Les spermatozoïdes endommagés sont susceptibles de produire des radicaux libres très rapidement, en particulier après congélation. Ces produits de peroxydation sont très délétères pour l'ADN et peuvent induire à la fois des cassures et des modifications de bases. Les conséquences sont dramatiques dans la mesure où le génome de la descendance, sa viabilité et la qualité de son développement sont altérés (Labbé et al. 2002 ; Luvoni 2003).

4. Les changements de type capacitation

L'une des conséquences de la déstabilisation des membranes est la réaction acrosomique prématurée qui réduit fortement la durée de vie des spermatozoïdes et leur fécondité.

La membrane du spermatozoïde subit des changements de composition durant la capacitation qui la rendent perméable aux ions calcium. Suite à l'entrée du calcium dans la cellule, la réaction acrosomique a lieu ce qui rend le spermatozoïde capable de fusionner avec l'ovocyte.

Pendant la congélation et la décongélation, les spermatozoïdes subissent des changements de type capacitation, c'est ce qu'on appelle la « cryocapacitation ». Les spermatozoïdes présentent des mouvements hyperactivés selon un schéma caractéristique avec des mouvements moins linéaires et plus vigoureux que les spermatozoïdes non capités. Les changements membranaires qui se produisent pendant le refroidissement détériorent la fonctionnalité des canaux de calcium, ce qui entraîne une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Le même mécanisme est observé lors du phénomène de capacitation et pendant la réaction acrosomique.

L'étude de Burgess et al. a évalué les effets de chaque étape du processus de cryoconservation sur la capacitation et la capacité de liaison des spermatozoïdes au tractus génital femelle. La dilution, le refroidissement et la congélation-décongélation favorisent la capacitation et diminuent la capacité de liaison des spermatozoïdes. Les effets de chaque étape semblent être cumulatifs, bien que la plus néfaste reste l'étape de congélation-décongélation.

L'état de capacitation du spermatozoïde peut être déterminé en utilisant différentes méthodes. Un indice de la capacitation est la présence des mouvements hyperactifs de la part des spermatozoïdes, estimée par observation microscopique ou à l'aide d'un système CASA. La réaction acrosomique représente un indicateur quant à l'état de capacitation du spermatozoïde car un spermatozoïde non capité ne devrait pas avoir subi de réaction acrosomique. Ainsi une autre méthode peut être utilisée pour déterminer l'état de capacitation du spermatozoïde et elle passe par la détection du statut de l'acrosome, à l'aide de la chlortétracycline, décrite dans la première partie. Enfin le dosage de la proacrosine ou de l'acrosine peut également être utilisé pour déterminer l'état de capacitation du spermatozoïde. Ces deux molécules sont libérées de façon séquentielle par l'acrosome lors de la capacitation. Dans son étude, Cortes montre que la proacrosine est activée durant le processus de congélation-décongélation des spermatozoïdes canins et qu'elle constitue donc un bon indicateur de l'intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes congelés-décongelés (Luvoni 2003; Rota et al. 2006; Cortes et al. 2006; Pea Mar nez 2004; Burgess et al. 2012).

B. Effets des différentes étapes de cryoconservation sur les spermatozoïdes

Chaque étape du processus de congélation, de la dilution jusqu'à la congélation proprement dite, peut avoir des effets néfastes sur la survie du spermatozoïde et être à l'origine de la diminution de la fécondité.

1. Effet de l'ajout de l'agent cryoprotecteur

L'ajout de l'agent cryoprotecteur, tel que le glycérol, a pour but d'améliorer la survie des cellules en augmentant la concentration totale en solutés dans le milieu extérieur ce qui diminue la quantité de glace formée quelle que soit la température. Dans un premier temps, l'ajout de l'agent cryoprotecteur expose la cellule à un environnement hypertonique ce qui entraîne initialement une déshydratation cellulaire. Suite à la pénétration de l'agent cryoprotecteur à l'intérieur de la cellule lors de l'étape d'équilibration, la cellule retrouve sa taille normale. Lors du retrait de l'agent cryoprotecteur, le volume cellulaire varie encore une fois et cela peut s'avérer néfaste pour la survie du spermatozoïde. D'après Loomis, le retrait semblerait plus néfaste que l'ajout du cryoprotecteur sachant que les dommages engendrés dépendent à la fois de la taille de la cellule et de la perméabilité de sa membrane aux agents cryoprotecteurs.

La différence entre la composition de la membrane en fonction de l'espèce peut être responsable d'une différence de perméabilité membranaire à l'eau et aux cryoprotecteurs. L'augmentation de la perméabilité au cryoprotecteur, par altération de la composition membranaire ou par utilisation de cryoprotecteurs alternatifs, améliore la survie des spermatozoïdes à la congélation. En effet, les cryoprotecteurs pénétrants tels que le glycérol et le diméthylsulfoxyde (DMSO) augmentent la perméabilité à l'eau de la membrane, ce qui permet aux cellules de continuer à se déshydrater et donc d'éviter la formation de glace intracellulaire (Eilts 2005b; Day et Stacey 2007; Loomis et Graham 2008; Barbas et Mascarenhas 2009; Oldenhof et al. 2013).

2. Conséquences de l'étape de congélation proprement dite et de décongélation

Les solutés sont capables de traverser la membrane plasmique par simple diffusion ou par transport actif. Par simple diffusion, les solutés s'équilibrent de part et d'autre de la membrane de manière à ce que leur concentration soit identique dans le milieu extracellulaire et dans le milieu intracellulaire. Le mouvement de ces solutés suit donc le gradient de concentration du

soluté. Les fluides, en revanche, sont soumis à la pression osmotique. Leur mouvement dépend de la concentration des solutés qui ne peuvent pas traverser la membrane. Lorsque les fluides sortent de la cellule, le volume de celle-ci diminue et la cellule se déshydrate alors que lorsqu'ils rentrent, la cellule gonfle ce qui entraîne un risque de rupture membranaire.

Pendant la **congélation**, suite au stress osmotique engendré, la cellule subit des changements de volume qui peuvent être mortels s'ils dépassent ses limites osmotiques.

Durant la phase de refroidissement, la glace se forme initialement dans le milieu extracellulaire ce qui entraîne la formation d'un gradient osmotique entre le milieu intracellulaire isotonique et la fraction non congelée du milieu extracellulaire où l'on retrouve la majorité du dilueur de congélation. Cela provoque un mouvement de l'eau hors de la cellule et donc sa déshydratation, afin de maintenir l'équilibre entre les concentrations de solutés intra- et extracellulaires.

En fonction de la vitesse de refroidissement, l'eau intracellulaire traverse la membrane jusque dans le milieu extracellulaire et rejoint la phase solide ou alors elle se transforme en glace directement à l'intérieur de la cellule. La vitesse à laquelle les cellules se refroidissent détermine, à la fois, l'étendue et la durée de la déshydratation. Si la vitesse de refroidissement est trop rapide, la sortie d'eau hors de la cellule n'est pas suffisante et la glace se forme à l'intérieur de la cellule, ce qui peut entraîner des ruptures membranaires à l'origine de la mort de la cellule. En revanche, si la vitesse est trop lente, cela limite la formation de cristaux intracellulaires mais la cellule se déshydrate de façon excessive et peut alors être exposée à des concentrations en solutés à l'origine de changements irréversibles de la structure de la membrane plasmique, une dénaturation des protéines et une désorganisation des structures internes de l'axonème.

Ainsi, la vitesse de congélation doit être initialement lente afin de permettre à l'eau de quitter la cellule par osmose et ainsi prévenir la formation de glace intracellulaire, puis rapide pour éviter une déshydratation cellulaire trop importante. Le cryoprotecteur présent dans le dilueur offre une protection aux cellules par rapport à la formation de glace en augmentant la fraction d'eau non gelée (Thirumala et al. 2003; Eilts 2005b; Rota et al. 2006; Oldenhof et al. 2013).

Pendant la **décongélation**, le processus inverse se produit, et les spermatozoïdes sont exposés à des conditions hypotoniques. Le gonflement des spermatozoïdes suite à l'absorption de l'eau provoquée par le stress hypotonique est plus préjudiciable que la déshydratation engendrée lors

du stress hypertonique, surtout après la cryoconservation en raison de la quantité accrue en espèces réactives de l'oxygène fragilisant les membranes.

Ainsi, pour décongeler la semence, une vitesse rapide est préférable de façon à prévenir la recristallisation de l'eau intracellulaire présente dans le spermatozoïde. Les spermatozoïdes décongelés à des vitesses rapides sont exposés moins longtemps aux solutés concentrés ainsi qu'aux cryoprotecteurs et la restauration de l'équilibre intra- et extracellulaire est plus rapide que lors d'une décongélation lente (Barbas et Mascarenhas 2009; Oldenhof et al. 2013).

La capacité des spermatozoïdes à survivre à une exposition à de basses températures dépend en grande partie de la perméabilité hydraulique de la membrane et de la capacité à faire face aux changements de phases de la membrane induits par la température ainsi qu'aux réorganisations des microdomaines. Ce qu'on appelle le « cold shock » s'explique par le fait qu'un refroidissement rapide, en dessous de la température de transition de phase de la membrane, provoque un réarrangement des lipides et des protéines dans les membranes des spermatozoïdes. Ceci conduit à des membranes endommagées, qui deviennent perméables à l'eau et aux principaux ions, ce qui entraîne une motilité anormale et une mort prématurée du spermatozoïde. Alors que les spermatozoïdes de nombreuses espèces (y compris les bovins et les chevaux) sont sensibles aux dommages du choc dû au froid, le sperme d'autres espèces (les humains et les poulets par exemple) n'y est pas. Une raison de cette différence de sensibilité au « cold shock » entre espèces est probablement la différence de composition lipidique des membranes des spermatozoïdes. Si le taux de cholestérol est suffisamment élevé, la membrane ne subira pas de transition de phase jusqu'à l'état de gel. Ce taux élevé en cholestérol explique pourquoi les spermatozoïdes humains sont plus résistants au choc induit par le froid que ceux des étalons ou des taureaux.

Par conséquent, l'intérêt premier des protocoles de congélation-décongélation de la semence est d'assurer un bon « réveil » des spermatozoïdes en prévenant la formation de glace et en réduisant les dommages cellulaires pouvant survenir avant, pendant et après le processus de congélation-décongélation (Briand-Amirat et al. 2006; Loomis et Graham 2008; Oldenhof et al. 2013).

III. Les différentes étapes de la cryoconservation de la semence

De sa récolte jusqu'à son stockage au froid, la semence passe par de nombreuses étapes constituant le processus de cryoconservation et dont il existe de nombreuses variantes en fonction des centres de reproduction. Ces différentes étapes seront décrites dans cette partie.

La qualité du sperme et la fertilité après décongélation sont influencées par plusieurs facteurs, à savoir les caractéristiques individuelles de chaque animal, le type de dilueur utilisé, la courbe de congélation, le type de conditionnement, la durée et la température de décongélation, la technique utilisée pour le retrait du plasma séminal, la concentration en spermatozoïdes par doses et la technique d'insémination utilisée (Neto et al. 2014).

A. Récolte et évaluation de la semence

Il existe de nombreuses techniques de récolte de la semence mais chaque espèce possède une technique privilégiée. Ces techniques ont déjà été décrites précédemment mais rappelons que la technique la plus utilisée dans les espèces bovine et équine est celle du vagin artificiel ; pour l'espèce canine la récolte par masturbation manuelle est la plus souvent pratiquée et enfin, dans le cas de l'espèce féline, on préférera l'électro-éjaculation sous anesthésie générale.

Après la récolte, le sperme est analysé afin de déterminer ses caractéristiques (concentration en spermatozoïdes, mobilité...). Dans l'espèce équine, le sperme est filtré immédiatement après la récolte pour extraire la fraction gel du sperme, une sécrétion filamenteuse des glandes annexes (Ponthier et al. 2014).

Pour obtenir un éjaculat plus concentré, il est possible d'intervenir sur les conditions de collecte en limitant les sources d'excitation du mâle ou en collectant « à vagin ouvert » pour ne garder que la première fraction, la plus riche en spermatozoïdes, mais cela ne suffit parfois pas. Une alternative consiste à effectuer une première dilution au tiers, puis à centrifuger la semence, et à remettre en suspension le culot de spermatozoïdes dans un plus petit volume de dilueur (BarrierBattut 2013).

B. Les techniques de séparation des différentes phases du sperme

La semence est composée d'une population hétérogène de spermatozoïdes viables et non viables suspendus dans les sécrétions des différentes glandes accessoires. La semence peut également contenir d'autres cellules (leucocytes, cellules épithéliales, érythrocytes, cellules germinales immatures) et des contaminants (urine, bactéries, virus). Les spermatozoïdes anormaux ou morts ainsi que les autres cellules ou contaminants ont un effet toxique sur les

spermatozoïdes vivants et réduisent par conséquent la fertilité d'un éjaculat. C'est pourquoi des techniques de séparation du sperme sont utilisées. Par ailleurs, elles permettent de concentrer les spermatozoïdes en enlevant le plasma séminal avant la réfrigération ou la congélation de la semence. Enfin, elles permettent la sélection d'une population enrichie en spermatozoïdes viables (Loomis 2006 ; Anzar et Graham 1994).

La technique utilisée en routine pour séparer le plasma séminal des spermatozoïdes est la centrifugation. D'autres techniques de séparation du sperme sans centrifugation ont été développées, elles seront également décrites dans ce paragraphe.

1. La centrifugation

a. L'intérêt de la centrifugation :

In vivo, le plasma séminal présente plusieurs rôles. Il permet l'activation des spermatozoïdes au sein de l'épididyme et leur transport jusqu'au site de dépôt de la semence dans le tractus génital femelle. Le plasma séminal protège les spermatozoïdes dans les voies génitales de la femelle et joue également un rôle de médiateur durant la réponse inflammatoire induite après la copulation. Les protéines contenues dans le plasma séminal protègent sélectivement les spermatozoïdes vivants de la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles et favorisent l'élimination des spermatozoïdes morts. Il est également rapporté que certains composants du plasma séminal, appelés facteurs de décapacitation, préviendraient la capacitation des spermatozoïdes. Enfin, le plasma séminal posséderait un pouvoir antioxydant élevé sur les spermatozoïdes, notamment chez le cheval (Labbé et al. 2002; Loomis 2006; Morrell et al. 2014).

Cependant, de nombreuses études ont décrit la présence de plasma séminal comme préjudiciable pour les spermatozoïdes lors d'un stockage à des températures basses ou lors de cryoconservation de la semence, quelle que soit l'espèce. En effet, le plasma séminal représente une source d'espèces réactives de l'oxygène dont la quantité augmenterait lors d'un stockage au froid et qui s'avèreraient néfastes pour les spermatozoïdes. La semence est donc centrifugée afin de minimiser les effets délétères du plasma séminal sur la qualité de la semence et d'augmenter la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat, notamment chez les espèces, comme le cheval, où le sperme est relativement peu concentré (Ponthier et al. 2014; Heutelbeck et al. 2015; Sieme et al. 2015).

De plus, les bactéries présentes au niveau du tractus génital externe du mâle et dans la semence peuvent être transmises à la femelle et être à l'origine d'affections utérines voire d'infertilité.

En conséquence, des antibiotiques sont ajoutés en routine aux dilueurs mais certains peuvent présenter des effets négatifs sur la qualité du sperme et sont inefficaces en dessous de 15°C. Certaines études, telles que celle de Guimarães et son équipe sur l'espèce équine, ont montré que la centrifugation avant la cryoconservation permet une diminution de la charge microbienne totale de façon significative (Guimarães et al. 2015).

b. La méthode de centrifugation : force et durée

Directement après récolte, la semence est diluée avec un dilueur primaire à 37°C, ce qui permet de protéger les spermatozoïdes. Les tubes sont ensuite placés dans la centrifugeuse et le choix de la force ainsi que de la durée de centrifugation dépend du protocole utilisé. Ensuite, le surnageant est enlevé, de façon très précautionneuse, suffisamment rapidement mais sans provoquer de turbulences, sous peine de perdre une grande partie des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes du culot sont alors remis en suspension dans une quantité appropriée de dilueur (Barrier-Battut 2013).

De nombreuses études se sont accordées pour dire que la durée et la force de centrifugation optimale, c'est-à-dire causant le moins de dommages possibles, était de 600xg pendant 10 minutes (Barrier-Battut 2013; Neto et al. 2013).

Rijsselaere et son équipe ont étudié quatre vitesses de centrifugations : 180xg, 720xg, 1620xg et 2880xg pendant cinq minutes, sur de la semence canine. Ils ont trouvé que la perte en spermatozoïdes dans le surnageant est moins importante pour les trois vitesses les plus importantes et que les deux dernières vitesses entraînent une atteinte de l'intégrité membranaire. Ils en ont déduit que le meilleur compromis entre une vitesse suffisamment rapide pour ne pas laisser trop de spermatozoïdes dans le surnageant et une vitesse n'altérant pas l'intégrité membranaire est une vitesse de **720xg** pendant **cinq minutes** (Rijsselaere et al. 2002).

Hoogewijs et son équipe ont étudié l'impact de la centrifugation sur la semence équine réfrigérée ou congelée. Ils ont utilisés différents protocoles de centrifugations dont le protocole standard de 600 xg pendant 10 minutes et d'autres protocoles : 600xg, 1200xg, 1800xg et 2400xg pendant cinq minutes. Ils ont montré que la perte de spermatozoïdes dans le surnageant était plus importante avec le protocole standard et que celle-ci peut être réduite par une augmentation de la force de centrifugation à **1800xg** ou **2400xg** et une diminution de la durée de centrifugation à **cinq minutes** sans changement apparent dans la qualité de la semence, ce qui permet d'augmenter le nombre de doses d'insémination par éjaculat. Ils ont également observé que la centrifugation n'avait aucun impact sur l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes (Hoogewijs et al. 2010).

Parfois, les centres de collecte de semence ne sont pas équipés pour congeler la semence. Dans ce cas, la semence peut être envoyée dans une structure spécialisée pour une congélation différée après un stockage à 5°C pendant 24 heures. Heutelbeck et son équipe ont tenté d'évaluer si la sélection du sperme par une centrifugation directement après la récolte permet l'obtention d'un meilleur taux de survie lorsque la congélation est différée. Ils ont trouvé que lorsque la congélation est réalisée après un jour de stockage réfrigéré, une centrifugation réalisée juste après la collecte donne de meilleurs résultats (pourcentage de spermatozoïdes avec une membrane intacte plus élevée après décongélation) par rapport à une centrifugation réalisée juste avant la cryoconservation (Heutelbeck et al. 2015).

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Sieme, qui montre que réaliser la centrifugation juste après la récolte de semence permet l'obtention de pourcentages plus élevés de spermatozoïdes avec une membrane intègre après décongélation (Sieme et al. 2015).

c. Les alternatives à la méthode de centrifugation classique:

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

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

Sachant que les étalons ne sont pas sélectionnés en fonction de la qualité de leur semence ou de leur fertilité, ils représentent une espèce d'application particulièrement intéressante de ces techniques de sélection pour améliorer la qualité et le potentiel de cryoconservation des éjaculats de faible qualité. De même, l'espèce féline est une bonne espèce d'application de ces techniques de sélection étant donné la prévalence élevée de la tératospermie. Le but de ces techniques est de concentrer la semence tout en enlevant les spermatozoïdes anormaux ou morts qui pourraient affecter la fertilité (Loomis 2006).

i. La centrifugation sur « coussin »:

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

Initialement, de l'EDTA était utilisé mais il a rapidement été remplacé par le iodixanol qui s'est avéré plus efficace. Plusieurs « coussins » existent sur le marché mais ils sont tous constitués d'un liquide visqueux constitué d'une solution d'iodixanol à introduire délicatement

dans le fond du tube contenant déjà la semence (exemple du MaxiFreeze® de chez IMV technologies, France ou du CushionFluid® de chez Minitube, Allemagne) (Figure 28). L'ajout de ces milieux « coussins » permet d'augmenter l'accélération de la centrifugeuse ainsi que le temps de centrifugation (jusqu'à 1000 xg pendant 20 minutes au lieu de 600 xg pendant 10 minutes sans milieu « coussin ») sans provoquer de lésions des spermatozoïdes. Le « coussin » amortit les chocs sur les spermatozoïdes, ceux-ci restant à l'interface coussin/dilueur, au lieu d'être plaqués au fond du tube par la force centrifuge. Ils sont également « englués » par la viscosité du liquide, ce qui empêche leur remontée dans le surnageant. Il y a donc moins de perte de spermatozoïdes après la centrifugation, ce qui peut être intéressant pour optimiser le nombre de paillettes de sperme congelé produites par des mâles « petits producteurs ». Le nombre total de spermatozoïdes récupérés après centrifugation serait plus élevé que lors d'une centrifugation standard (90 % des spermatozoïdes récupérés au lieu de 60 % avec le protocole de centrifugation n'utilisant pas les milieux « coussins ») ce qui permet un nombre de paillettes produites par éjaculat plus important (Barrier-Battut 2013; Ponthier et al. 2014; Sieme et al. 2015).



Figure 28: Exemple de « coussin » de centrifugation MaxiFreeze® de chez IMV Technologies et CushionFluid® de chez Minitube

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

ii. La méthode de filtration :

L'équipe de recherche de l'université de Botucatu, au Brésil, a développé un filtre permettant de concentrer les spermatozoïdes et éliminer une grande partie du plasma séminal sans centrifugation. Ce filtre, appelé Sperm Filter®, est utilisé dans l'espèce équine et se présente sous la forme d'une coupelle ronde d'environ 10 cm de diamètre, dont le fond est formé par une membrane poreuse (pores de 2 μ m) (Figure 29).



Figure 29: Filtre Sperm Filter® (Barrier-Battut, 2013)

Après avoir dilué le sperme pur, la suspension de spermatozoïdes est versée dans cette coupelle placée au-dessus d'une boîte de Pétri, le tout étant maintenu sur une platine chauffante à 36°C. On imprime ensuite des mouvements de rotation lente au filtre, de manière à ce que le plasma séminal et le dilueur passent à travers les pores, les spermatozoïdes restant au-dessus du filtre. Lorsqu'il ne reste qu'une petite quantité de liquide au-dessus du filtre, elle est récupérée dans un récipient préalablement réchauffé à 36°C, et le filtre est rincé à l'aide d'une petite quantité de dilueur, afin de bien récupérer tous les spermatozoïdes. Cette technique est très efficace, mais présente deux inconvénients : la durée nécessaire pour la filtration de 5 à 10 minutes et le coût de 80 euros par filtre, réutilisable une dizaine de fois pour le même étalon, après rinçage à l'eau distillée stérile, et séchage à 37°C entre deux utilisations (Barrier-Battut 2013).

Neto a réalisé une étude dans laquelle il compare la filtration (filtre composé d'une membrane synthétique hydrophile) à une centrifugation standard (600 xg pendant 10 minutes). Avant et après congélation, aucune différence n'est observée entre les deux méthodes concernant les paramètres cinétiques de la semence ainsi que l'intégrité membranaire. Ainsi, le filtre utilisé ne cause aucun dommage aux spermatozoïdes et aucune différence n'a été observée entre la semence fraîche et la semence filtrée au niveau des différents paramètres étudiés. De plus, le taux de récupération des spermatozoïdes s'avère plus élevé lors de la filtration par rapport à la

centrifugation. Neto conclue donc que le SpermFilter® est aussi efficace que la centrifugation et qu'il présente l'avantage d'une perte moins importante en spermatozoïdes (Neto et al. 2013).

2. Les autres techniques de séparation de la semence

a. La centrifugation sur gradient de densité :

La centrifugation sur gradient de densité est une technique basée sur la séparation des spermatozoïdes en sub-populations en fonction de leur densité. Les gradients de densité sur lesquels est centrifugé le sperme sont préparés à l'aide de colloïdes, constitués de particules de silicates, placés dans un tube de centrifugation soit sous forme de monocouche (Androcoll-E® ou Equipure® Bottom Layer uniquement) soit sous formes de plusieurs couches de colloïde de densité différente (Equipure® TopLayer et Equipure® Bottom Layer). Les colloïdes utilisés sont différents en fonction de l'espèce (Loomis 2006; Barrier-Battut 2013).

Le sperme dilué est déposé sur le colloïde dans un tube conique de 15 ml, puis l'ensemble est centrifugé à 300 xg pendant 20 minutes. Durant la centrifugation, le plasma séminal, les éventuels débris et les particules de dilueur (jaune d'œuf, glycérol, etc.), ainsi que les bactéries, sont piégés dans les interfaces du gradient, tandis que seuls les spermatozoïdes traversent le colloïde pour former un culot au fond du tube (Figure 38). Ils sont ainsi « lavés ». Une certaine sélection des spermatozoïdes s'opérerait également. Plusieurs publications ont montré que les spermatozoïdes mobiles et sans anomalie morphologique étaient majoritairement entraînés dans le culot de centrifugation, tandis qu'un certain nombre de spermatozoïdes immobiles, anormaux, ou présentant des altérations de la chromatine, restaient piégés dans le colloïde (Barrier-Battut 2013).

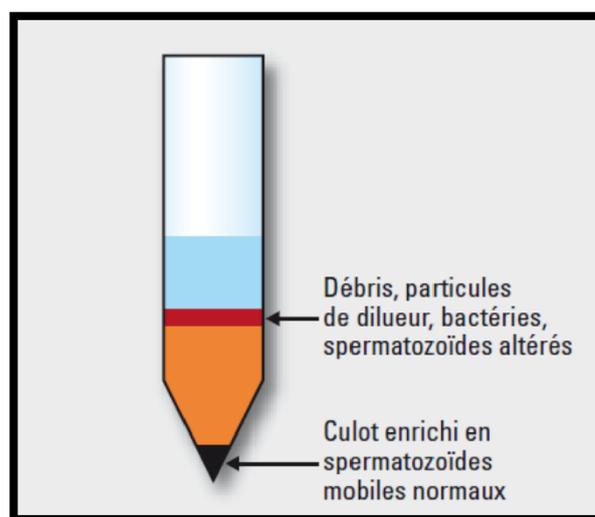


Figure 30: Lavage et sélection des spermatozoïdes après centrifugation sur colloïde monocouche (BarrierBattut, 2013)

Afin d'optimiser la sélection des spermatozoïdes, il faut prendre quelques précautions. Le colloïde doit être placé d'abord au fond du tube, puis la semence diluée est ensuite rajoutée précautionneusement au-dessus, de façon à obtenir une interface franche entre le colloïde et la semence. De même, il ne faut pas déposer un volume trop élevé de semence ou un nombre trop élevé de spermatozoïdes par tube car cela peut être à l'origine d'une diminution du rendement. Il est préférable d'utiliser des tubes de 15 ml, avec un minimum de 3 ml de colloïde pour 1000 millions de spermatozoïdes. Pour les grands volumes de semence peu concentrée, Androcoll E® a une formulation spécifique permettant d'utiliser jusqu'à 15 ml de sperme et 15 ml de colloïde, en tube de 50 ml (Figure 31). Pour les spermés très peu concentrés et de faible qualité, il est possible de combiner la filtration sur SpermFilter®, puis la centrifugation sur colloïde. Cela permet une première concentration de l'éjaculat, et donc une réduction du volume déposé sur le colloïde. La concentration optimale avant dépôt sur le colloïde est située autour de 100 millions de spermatozoïdes par millilitre (Barrier-Battut 2013).

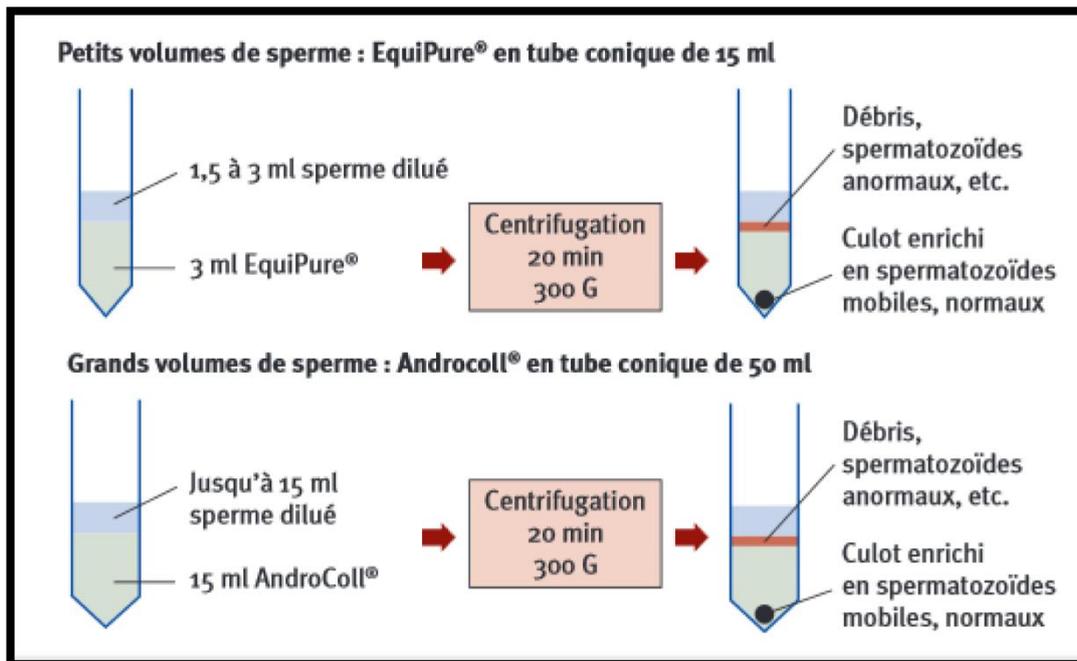


Figure 31: Lavage et sélection des spermatozoïdes par centrifugation sur colloïde monocouche en fonction du volume de sperme (Barrier-Battut, 2013)

Cette technique permettrait un enrichissement de la semence en spermatozoïdes de bonne qualité par élimination des spermatozoïdes défectueux. La centrifugation sur gradient de densité peut être réalisée à deux moments clés :

- immédiatement après la récolte, dans le but de sélectionner les spermatozoïdes les plus aptes à supporter la réfrigération ou la congélation ;

- après la conservation, afin d'augmenter le pourcentage de spermatozoïdes mobiles dans les doses d'insémination. Cependant ce tri s'accompagne d'une diminution du nombre de spermatozoïdes (Barrier-Battut 2013).

Les principaux inconvénients de cette technique sont qu'elle nécessite du temps, son coût élevé, sachant que le gradient n'est pas réutilisable, ainsi que son faible rendement. Ce rendement varie selon la qualité initiale du sperme, ce qui s'explique aisément : si les spermatozoïdes de mauvaise qualité sont éliminés, le nombre de spermatozoïdes restant utilisables ne peut qu'être largement inférieur au nombre initial, et ceci d'autant plus que l'échantillon initial est de mauvaise qualité. Il est donc légitime de s'interroger sur l'intérêt d'une telle sélection, par rapport à une insémination avec un nombre plus élevé de spermatozoïdes totaux (Barrier-Battut 2013 ; Ponthier et al. 2014).

Dans l'étude de Dorado et al. L'intérêt de la centrifugation sur gradient de densité monocouche type Androcoll sur la sélection de spermatozoïdes canins de bonne qualité est étudié. Il est observé, qu'après décongélation, les spermatozoïdes centrifugés avec le gradient de densité présentent de meilleurs paramètres attestant la qualité, tels que les caractéristiques de mobilité (Dorado et al. 2013).

De même, Chatdarong compare l'efficacité d'un simple lavage avec la centrifugation sur gradient de densité monocouche avant la congélation sur des spermatozoïdes de chats issus de l'épididyme. Il montre que la centrifugation sur gradient de densité améliore la qualité des spermatozoïdes épидидymaires félins avec un pourcentage plus élevé de spermatozoïdes morphologiquement normaux, une meilleure intégrité membranaire et de la chromatine. La centrifugation sur gradient de densité permet également le retrait des contaminants cellulaires que l'on retrouve habituellement dans les échantillons de semence issue de l'épididyme (érythrocytes, leucocytes, bactéries, débris cellulaires) (Chatdarong et al. 2010).

Heutelbeck et son équipe ont voulu montrer l'efficacité de la centrifugation sur gradient de densité pour la sélection d'un sperme avec un meilleur taux de survie, lorsque la congélation est différée. Deux types de gradients de densité ont été utilisés : un monocouche et un contenant deux couches de densité différente et ils ont tous deux été comparés à une centrifugation standard. Les résultats obtenus ont montré une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux et mobiles avec un taux plus élevé de membrane et de chromatine intact, comparé à une centrifugation standard ou une dilution simple. De plus, lorsque la congélation est réalisée après 24 heures de stockage réfrigéré, une centrifugation réalisée juste après la collecte donne de meilleurs résultats par rapport à une centrifugation réalisée juste

avant la cryoconservation. Ainsi, la centrifugation sur gradient de densité permet la sélection d'un sperme de meilleure qualité comparé à une centrifugation standard (Heutelbeck et al. 2015).

b. La technique de « swim-up »:

La technique de « swim-up » est la plus simple pour séparer les spermatozoïdes mobiles des non mobiles et des débris cellulaires car elle permet la sélection des spermatozoïdes selon leur mobilité et leur capacité à nager hors du plasma séminal.

La technique de swim-up peut être réalisée de deux façons :

➤ La technique de « swim up directe » :

L'échantillon de semence en entier est divisé en fractions de 1 millilitre dans des tubes de centrifugation. 1,3 millilitre du milieu de culture est alors déposé au-dessus de la semence dans chaque tube de façon très précautionneuse. Les tubes sont ensuite placés dans un incubateur, à 37°C pendant 30-60 minutes. Les tubes sont inclinés d'environ 45° afin d'augmenter la surface de contact entre la semence et le milieu de culture et d'améliorer le transfert des spermatozoïdes du plasma séminal jusqu'au milieu de culture. Après l'incubation, les tubes sont remis à la verticale et 1 millilitre de surnageant est retiré par aspiration à l'aide d'une pipette.

➤ La technique de « swim up indirecte » :

La semence est divisée en fractions de 1 millilitre dans chaque tube, le milieu est ajouté et après la centrifugation, le surnageant est retiré. Le culot récupéré est remis en suspension puis 1,3 millilitre de milieu est ajouté précautionneusement et les tubes sont alors placés dans l'incubateur pendant 30 à 60 minutes à 3°C avec une inclinaison de 45°. Après la migration des spermatozoïdes, le volume de semence nécessaire à l'IA est récupéré.

La centrifugation lors de la méthode directe a lieu après la migration des spermatozoïdes, c'est-à-dire après la séparation des spermatozoïdes normaux avec les leucocytes et les spermatozoïdes morts. Ce sont généralement eux qui produisent des espèces réactives de l'oxygène après la centrifugation ainsi la méthode de swim up directe est la méthode préférentielle par rapport à la méthode indirecte pour sélectionner les spermatozoïdes (Ilaria 2011).

En théorie, cette technique mime la sélection des spermatozoïdes réalisée au sein du tractus génital femelle. Pour les bovins, on ajoute de l'acide hyaluronique dans le milieu de culture car des glycosaminoglycanes sont retrouvés dans le tractus génital de la vache.

La technique de swim-up permet une récupération de spermatozoïdes dont le pourcentage de mobilité et d'intégrité membranaire est plus élevé. Le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux ainsi que le pourcentage de mobilité obtenus seraient plus élevés suite à la technique de swim-up comparée à un simple lavage. Cependant, ce procédé ne permet pas de réduire la fréquence des modifications de type capacitation ou réaction acrosomiale. L'inconvénient majeur de ce procédé est qu'il est à l'origine d'un faible rendement et qu'il engendre des petits volumes. Il n'est donc pas toujours employé et reste plutôt privilégié dans le cas de fécondation *in vitro* (Loomis 2006; Luvoni 2006; Chatdarong et al. 2010).

C'est une technique également employée dans l'espèce féline où la tératospermie est particulièrement répandue. En effet, la technique du « swim-up » apparaît comme une méthode de choix pour sélectionner les spermatozoïdes normaux, aptes à féconder mais il faut savoir qu'elle ne permet pas de s'affranchir complètement de la tératospermie puisque des anomalies plus fines, notamment membranaires, persistent et mettent en péril la réaction acrosomiale ainsi que la capacitation (Howard et al. 1990).

c. L'intérêt de l'étape de centrifugation

La centrifugation est réalisée dans le but de retirer le plasma séminal de la semence, cependant l'intérêt de cette étape est de plus en plus controversé. Auparavant, il était mesure courante de retirer entièrement le plasma séminal car celui-ci avait été décrit comme néfaste pour les spermatozoïdes durant la cryoconservation. Son retrait permettait une meilleure survie des spermatozoïdes pendant le stockage au froid et réduisait les altérations de la chromatine (Morrell et al. 2014).

Dans l'étude de Brinsko, la centrifugation et le retrait du plasma sont bénéfiques pour les semences d'étalon dont l'éjaculat présente une faible tolérance à la réfrigération, particulièrement lorsque l'échantillon est conservé plus de 24 heures. Ces étapes limiteraient la perte de mobilité des spermatozoïdes après 48 heures de stockage au froid, chez les étalons dont la semence possède une faible aptitude à supporter la réfrigération (Brinsko et al. 2000).

Cependant, certains auteurs rapportent que l'absence de plasma séminal pendant la cryoconservation serait à l'origine de la faible conservation de la mobilité. Ils conseillent donc

d'éviter les protocoles incluant un retrait complet du plasma séminal et proposent de conserver une petite fraction de plasma séminal après centrifugation, de l'ordre de 5 à 20% du volume final.

De même, chez la jument, il a été montré que la présence de plasma séminal dans la dose d'insémination serait nécessaire à l'obtention d'une fertilité optimale, par activation des molécules régulatrices de la réponse immune (Loomis 2006; Morrell et al. 2014).

La cryoconservation induit des changements au niveau de la membrane plasmique, ce qui équivaut à une capacitation partielle du spermatozoïde. Cette capacitation prématurée résulte de la perte en lipides de la membrane lors de la congélation-décongélation mais également de la perte des facteurs de décapacitation, contenus dans le plasma séminal, après la centrifugation. Ainsi, l'ajout de plasma séminal empêche une capacitation prématurée et favorise la conversion des spermatozoïdes capités à l'état décapité, permettant ainsi à la semence congelée d'être fertile pendant une plus longue période.

L'étude de Moore montre que le plasma séminal présente un faible effet, que ce soit positif ou négatif, sur la mobilité et la viabilité de la semence d'étalon congelée, si les spermatozoïdes sont congelés directement après l'ajout du plasma séminal. Cependant, si la semence est incubée avec des quantités importantes de plasma séminal (jusqu'à 20%), pendant de longues périodes avant la congélation, la survie des spermatozoïdes lors de la congélation est compromise. Il est notable de remarquer que le plasma séminal congelé séparément puis ajouté à la semence décongelée juste avant l'insémination augmenterait la fertilité des spermatozoïdes en les protégeant de l'environnement utérin (Moore et al. 2005).

De nombreuses controverses existent quant à l'ajout d'un plasma séminal hétérologue après centrifugation à la place du plasma séminal du mâle prélevé.

D'après Moore, lorsque les spermatozoïdes d'étalon présentent une faible mobilité postdécongélation (inférieure à 20%) et qu'ils sont supplémentés avec le plasma séminal d'un autre étalon produisant de la semence avec de forts taux de survie à la congélation, on retrouve un plus grand nombre de spermatozoïdes qui survivent à la cryoconservation. Il rapporte l'existence de composants dans le plasma séminal qui protégeraient les membranes des spermatozoïdes pendant la congélation et la quantité de ces composants serait différente en fonction de l'étalon, ce qui expliquerait la capacité des spermatozoïdes de certains étalons à survivre plus ou moins bien à la congélation (Moore et al. 2005).

Morrell est plus modéré dans la conclusion de son étude. Il a comparé l'effet de l'ajout d'un plasma séminal hétérologue après une centrifugation sur gradient de densité par rapport à l'ajout

du plasma séminal de l'étalon prélevé. La centrifugation sur colloïdes a été choisie car elle permet de retirer la totalité du plasma séminal ainsi que les protéines du plasma séminal situées à la surface des spermatozoïdes. Il a conclu que d'importantes variations sont observées concernant l'interaction entre le plasma séminal et les spermatozoïdes et que cela dépend de l'origine du plasma séminal mais également de celle des spermatozoïdes. Enfin, il remarque que si la supplémentation en plasma séminal est réalisée, il est préférable de la faire directement avant insémination plutôt qu'avant le stockage (Morrell et al. 2014).

Korochkina et son équipe obtiennent des résultats mitigés lors de l'ajout de plasma séminal à des spermatozoïdes canins issus de l'épididyme. Ils notent une augmentation de la mobilité chez les spermatozoïdes frais mais le plasma séminal semble avoir un effet néfaste sur l'intégrité de la chromatine après le processus de congélation-décongélation (Korochkina et al. 2014).

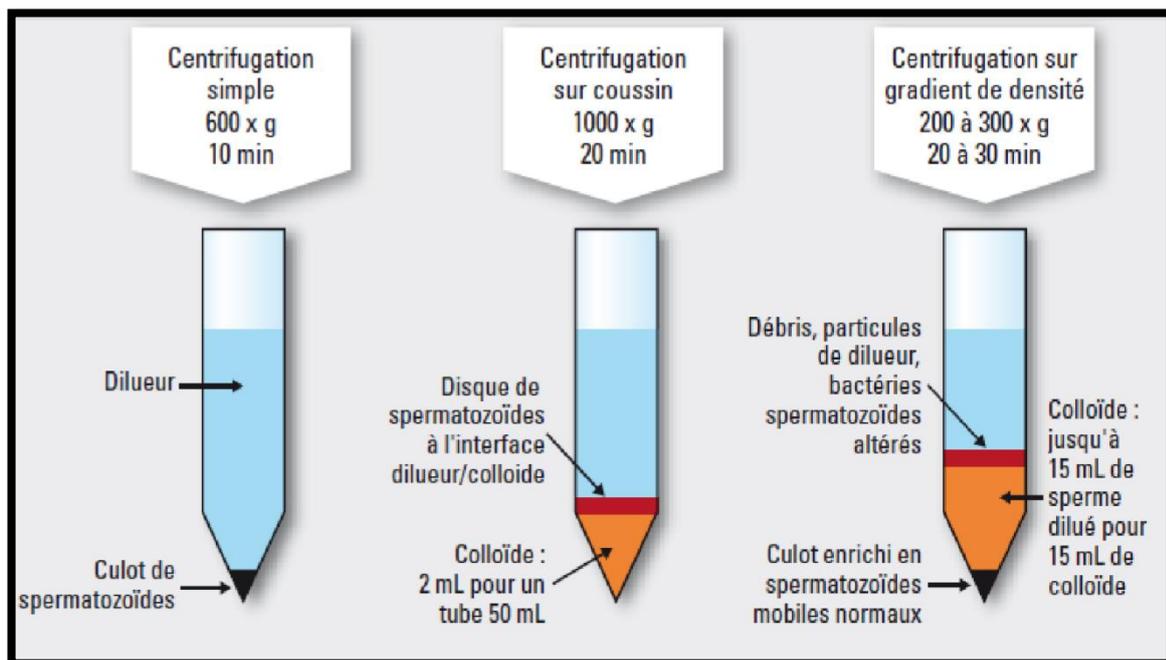


Figure 32: Les différentes techniques de centrifugation de la semence : intérêts et inconvénients (BarrierBattut, 2013)

Table 5: Avantages et inconvénients des différentes techniques de centrifugation (d'après : Barrier-Battut, 2013)

	Centrifugation simple (absence de colloïde)	Centrifugation sur coussin	Centrifugation sur gradient de densité
Points positifs	- Elimine une grande partie du plasma séminal -> intérêt lorsqu'il est toxique - Concentre les spermatozoïdes	- Empêche la remontée des spermatozoïdes dans le surnageant -> pas de pertes à la centrifugation - Pas de culot -> limite les chocs mécaniques sur les spermatozoïdes	- « Lave » les spermatozoïdes des impuretés, particules de dilueur... - Elimine une partie des spermatozoïdes de mauvaise qualité
Points négatifs	-Pertes de spermatozoïdes dans le surnageant (minimum 10%) - Choc mécaniques éventuels	- Coût	- Coût - Diminution importante du nombre de spermatozoïdes

C. La dilution

Une fois le culot riche en spermatozoïdes obtenu après l'étape de centrifugation, il est dilué avec le milieu de congélation. Ce milieu de congélation également appelé dilueur, permet de conserver la semence en gardant les propriétés fécondantes des spermatozoïdes. Il permet également d'ajuster la concentration en spermatozoïdes dans les paillettes.

Le dilueur doit posséder plusieurs propriétés afin d'améliorer la survie des spermatozoïdes. Il doit être isotonique à la semence afin d'éviter les chocs osmotiques, avoir un pH compatible à la survie des spermatozoïdes, posséder un pouvoir tampon, une osmolarité appropriée, avoir une action stabilisatrice et protectrice des membranes, contenir des substances nutritives telles que des sucres et posséder un pouvoir antioxydant et antibactérien. Il doit également être facile à préparer, à conserver et à utiliser (Barbas et Mascarenhas 2009; Hanzen 2014).

Le rôle du dilueur est d'aider à la stabilisation de la membrane des spermatozoïdes. Pendant la congélation, la cellule subit des changements de volume qui peuvent être mortels s'ils dépassent les limites osmotiques de la cellule. La glace se forme initialement dans le milieu extracellulaire et entraîne la sortie d'eau de la cellule d'où sa déshydratation. L'ajout de dilueur, et notamment des agents cryoprotecteurs qu'il contient, modifie la perméabilité de la membrane à l'eau, ce qui limite les variations de volume et le stress osmotique (Eilts 2005b; Rota et al. 2006).

1. La composition du dilueur

Il n'existe aucun consensus quant à l'existence d'une composition de dilueur idéale. Mais, il existe de nombreux dilueurs commercialisés ou fabriqués par les unités de reproduction et dont la composition varie plus ou moins. En règle générale, les dilueurs contiennent des agents cryoprotecteurs dont le rôle est d'augmenter la survie des spermatozoïdes. On retrouve des cryoprotecteurs qui pénètrent les cellules tels que le glycérol et des cryoprotecteurs qui restent dans le milieu extracellulaire tels que des protéines ou des sucres. On retrouve également d'autres composés dans les dilueurs comme par exemple des antibiotiques, des sels ou encore des détergents (Barbas et Mascarenhas 2009; Ponthier et al. 2014; Pojprasath et al. 2011).

Les cryoprotecteurs non pénétrants:

Les cryoprotecteurs non pénétrants agissent uniquement dans le milieu extracellulaire. Ils agissent comme solutés en diminuant la température de congélation du milieu et en prévenant la formation de glace, et possèdent également la propriété de protéger les membranes des spermatozoïdes.

Actuellement, en médecine vétérinaire, les milieux de congélation utilisent des composés d'origine animale comme le lait ou le jaune d'œuf pour des raisons économiques et de disponibilité. L'étude de leur formulation vise à adapter leur contenu en protéines, glucides et lipides afin d'assurer aux spermatozoïdes une base nutritionnelle et de protéger les membranes des effets de la congélation. Chez le cheval, on retrouve plutôt des dilueurs à base de lait ou de composants du lait (exemple du lactose), contrairement aux milieux utilisés chez le bovin et le chien dont la base est un milieu Tris-fructose (le Tris étant une solution tampon).

Le lait constitue le composant de base de nombreux dilueurs. Il permet un apport en phosphates, citrates et sucres aux spermatozoïdes, possède un pH proche de celui du sperme et reste facile à préparer et peu cher. Du jaune d'œuf est, en règle générale, ajouté au milieu de congélation chez toutes les espèces.

La membrane cytoplasmique pouvant intégrer des molécules hydrophobes, la composition lipidique du milieu de congélation est déterminante. Cependant, la vitesse et la proportion des échanges lipidiques entre le milieu et la membrane cytoplasmique du spermatozoïde doit être prise en compte. Par exemple, l'ajout de cholestérol au premier milieu de congélation améliore la qualité du sperme après décongélation (Ponthier et al. 2014; Hanzen 2014).

Le jaune d'œuf est l'un des composants les plus employés dans les dilueurs. Il assure la protection des membranes des spermatozoïdes lors de la congélation grâce aux phospholipides qu'il contient.

Dans son étude, Jiménez a comparé l'efficacité de différents dilueurs sur la qualité de la semence féline après congélation-décongélation. Il a comparé dans un premier temps, trois dilueurs issus du commerce mais non destinés à la semence féline : un dilueur à base de Tris et de jaune d'œuf (Triladyl®), un dilueur sans jaune d'œuf (AndroMed®) et un milieu à base de lait écrémé et de jaune d'œuf (Gent®). Dans une seconde expérience, il a comparé cette fois le Triladyl® avec deux dilueurs spécifiquement préparés pour la conservation de semence féline. En croisant les deux expériences, Jiménez a conclu que le Triladyl®, dilueur à base de jaune d'œuf, permet l'obtention de la mobilité et du pourcentage d'intégrité membranaire les plus élevés et qu'il représente une bonne alternative pour la dilution de semence féline lors d'un processus de cryoconservation (Jiménez et al.2013).

Cependant, l'utilisation du jaune d'œuf présente certaines limites. Etant un composant d'origine animale, il représente un risque potentiel de contamination bactérienne de la semence. De plus, des manipulations sont nécessaires avant son utilisation, ce qui est peu pratique et relativement chronophage. Enfin, le jaune d'œuf est un produit extrêmement complexe dont la composition varie entre individus et qui contient des composants qui inhiberaient la respiration des spermatozoïdes et par conséquent réduiraient leur mobilité. Pour toutes ces raisons, il est intéressant d'isoler et de produire l'élément cryoprotecteur du jaune d'œuf de poule (Briand-Amirat et al. 2006).

Des études ont permis de séparer les fractions du jaune d'œuf par centrifugation chez les bovins et chez le chien. L'efficacité du jaune d'œuf est attribuée à la présence de LDL (*low density lipoproteins*) qui adhèrent à la membrane du spermatozoïde et forment un film représentant une interface entre les acides gras et l'eau. Les LDL privilégient ainsi l'entrée de phospholipides et de cholestérol dans la membrane cellulaire ce qui protège le spermatozoïde du choc induit par le froid. Dans l'étude de Varela Junior, il est montré les LDL peuvent remplacer le jaune d'œuf dans la composition du dilueur Tris-glucose pour la congélation de la semence car elles sont à l'origine d'une amélioration de la mobilité et de l'intégrité membranaire. La concentration la plus efficace serait de 8% (Varela Junior et al. 2009). De même, Briand-Amirat et son équipe ont montré, dans l'espèce bovine, qu'un dilueur à 8% de LDL issues du jaune d'œuf donne après congélation-décongélation plus de spermatozoïdes mobiles qu'un dilueur témoin (Optidyl®) contenant 20% de jaune d'œuf (BriandAmirat et al. 2006).

Chez le cheval, des essais utilisant le plasma de jaune d'œuf qui contient les LDL ont montré de bons résultats en termes de fertilité alors que la mobilité après décongélation n'était pas augmentée, illustrant bien les limites de l'évaluation de la mobilité comme critère de fertilité. De même, l'utilisation de liposomes a été évoquée. Les liposomes, composés de lipides, possèdent une activité protectrice envers les spermatozoïdes durant le processus de congélation et ils présentent l'avantage d'être définis précisément en termes de composition et de structure. Ils représentent donc un outil intéressant pour investiguer les mécanismes de cryoconservation. Parmi les phospholipides testés par Pillet, les liposomes E-80 se sont révélés être les plus protecteurs et ils préservent l'intégrité membranaire de façon similaire au jaune d'œuf (Pillet et al. 2011, 2012).

Dans son étude, Bencharif a comparé l'efficacité de trois dilueurs sur la qualité de la semence de chien lors du processus de congélation. Deux des dilueurs contenaient du jaune d'œuf et le troisième contenait des LDL. Le dilueur contenant les LDL permettait l'obtention de pourcentages en mobilité ainsi que des caractéristiques de mouvement aussi bons voire meilleurs que ceux obtenus avec les dilueurs de référence contenant le jaune d'œuf entier. Il semblait donc avoir les mêmes qualités cryoprotectrices et ce dilueur à base de LDL est commercialisé sous le nom de CANIXL Freeze® et ne requiert aucune préparation préliminaire, ce qui réduit considérablement l'éventualité d'une contamination bactérienne (Bencharif et al. 2010).

D'autres composés ont été testés afin de remplacer le jaune d'œuf, qui n'est pas pratique d'utilisation.

Le ratio cholestérol/phospholipides de la membrane plasmique représente le facteur principal déterminant le maintien de la fluidité et de la stabilité membranaire durant la réfrigération. Une forte concentration en cholestérol entraîne une réduction de la température à laquelle la transition de phase se produit, ce qui réduit les dommages causés à la structure de la membrane plasmique. Le sperme des espèces dont le taux de cholestérol de la membrane est élevé, telles que le lapin ou le chien, présente une plus grande résistance au processus de cryoconservation.

Hartwig a testé l'influence du CLC (*cholesterol-loaded cyclodextrin*), qui est un oligosaccharide possédant une interface hydrophile et une autre hydrophobe, permettant d'augmenter la solubilité des composés hydrophobes tels que le cholestérol. Ainsi, la supplémentation en CLC lors du processus de réfrigération permet de modifier la composition en lipides de la membrane plasmique et donc d'accroître sa résistance aux faibles températures. Les résultats ont montré une action cryoprotectrice puissante du CLC sur les spermatozoïdes d'étalons, avec une augmentation du taux de fertilité de 42% chez les étalons classés parmi les

« bad coolers » (c'est-à-dire qui présentent une semence dont la qualité post-décongélation est mauvaise) (Hartwig et al. 2014).

L'étude des échanges lipidiques, de la fixation des protéines et des effets du froid sur la membrane doit encore être approfondie. Le jaune d'œuf reste la base de la majorité des dilueurs aujourd'hui mais la fraction contenant les LDL du jaune d'œuf est de plus en plus utilisée.

L'utilisation de milieux de congélation sans protéines d'origine animale est en cours de développement, cependant ces milieux doivent rester économiquement viables pour avoir un réel intérêt en reproduction et les premiers essais réalisés avec du sperme réfrigéré sont particulièrement décevants. On retrouve par exemple Bioxcell® ou BullxCell® chez IMV technologies qui ne contiennent pas de protéine animale et qui sont utilisés pour la dilution finale de la semence bovine (Ponthier et al. 2014; Barbas et Mascarenhas 2009).

Les cryoprotecteurs pénétrants :

Les cryoprotecteurs pénétrants ont de nombreux effets. Ils entraînent des réarrangements lipidiques et protéiques de la membrane cellulaire ce qui induit une augmentation de la fluidité membranaire, une modulation du niveau de déshydratation cellulaire et une meilleure survie à la cryoconservation. De même, ils remplacent une partie de l'eau intracellulaire et se lient à l'eau restante ce qui limite la formation de glace à l'intérieur de la cellule (mais également à l'extérieur). Le cryoprotecteur idéal possède un faible poids moléculaire, une grande solubilité dans l'eau et une toxicité minimale.

Le glycérol représente le cryoprotecteur le plus utilisé pour la plupart des espèces animales. Il possède une action à la fois intra- et extracellulaire. Il pénètre à l'intérieur des spermatozoïdes et modifie la configuration des cristaux de glace qui s'y forment en les rendant plus arrondis, ce qui diminue le risque de perforation des membranes. Dans le milieu extracellulaire, le glycérol, dont la température de congélation est plus basse que celle de l'eau, se fixe aux molécules d'eau. Il diminue ainsi le seuil de congélation de l'eau extracellulaire et permet de limiter le gradient osmotique et de ralentir la vitesse de déshydratation des spermatozoïdes.

Cependant, le glycérol possède également des effets néfastes et peut s'avérer toxique pour les spermatozoïdes, ce qui pourrait être à l'origine de la faible mobilité observée après décongélation et du faible taux de fécondité. La toxicité du glycérol réside dans son faible passage à travers les membranes cellulaires, entraînant un choc osmotique pour le spermatozoïde mais aussi dans l'altération de la membrane par dénaturation des protéines (Barbas et Mascarenhas 2009 ; Ponthier et al. 2014; Alvarenga et al. 2005).

L'utilisation du glycérol correspond donc à un compromis entre ses effets cryoprotecteurs et ses effets toxiques, d'où l'importance de l'utiliser à la bonne concentration. La concentration optimale en glycérol dans le milieu de congélation est variable selon l'espèce : les spermatozoïdes bovins et canins supportent des concentrations en glycérol entre 6 et 8% du volume total alors que pour les spermatozoïdes d'étalon, plus sensibles aux variations osmotiques, la concentration ne devrait idéalement pas dépasser les 3,5 % du volume total. Récemment, un milieu de congélation ne contenant que 2,5 % de glycérol a été développé et de très bons résultats de fertilité ont été observés (Barbas et Mascarenhas 2009; Ponthier et al. 2014).

D'autres agents cryoprotecteurs traversant plus facilement les membranes ont été étudiés. Parmi eux, l'éthylène glycol et le diméthylsulfoxyde (DMSO) possèdent tous deux un poids moléculaire plus faible que le glycérol, leur conférant ainsi une plus grande perméabilité cellulaire. Ils entrent donc plus rapidement dans la cellule que le glycérol et causent ainsi moins de variations osmotiques. Cependant, le DMSO s'est révélé moins efficace que le glycérol et n'est plus utilisé de nos jours (Eilts 2005b).

Dans son étude, Rota a comparé l'effet de l'ajout de 5% de glycérol ou de 5% d'éthylène glycol au dilueur lors d'un processus de cryoconservation de semence canine. Les résultats montrent une mobilité plus élevée en présence d'éthylène glycol pendant la première heure après décongélation. Au-delà de 60 minutes, aucune différence n'est observée entre les deux cryoprotecteurs (Rota et al. 2006). De même, d'autres études démontrent que l'éthylène glycol protège les spermatozoïdes d'étalon de façon similaire au glycérol (Alvarenga et al. 2005; Squires et al. 2004).

Enfin, de récentes études ont montré que l'ajout d'**amides** améliorerait la qualité de la semence après décongélation chez les étalons dont le sperme présentait une faible aptitude à la congélation. C'est l'exemple du Botu-Crio®, un dilueur pour étalon contenant du glycérol et du méthylformamide comme cryoprotecteurs, capable de maintenir la viabilité et la fécondité des spermatozoïdes équinés qu'ils soient éjaculés ou prélevés au niveau de l'épididyme (Neto et al. 2014; Melo et al. 2008).

En effet, les amides présentent un poids moléculaire plus faible que le glycérol, probablement à l'origine d'un stress osmotique moins important et donc d'une résistance accrue du spermatozoïde au processus de cryoconservation. Dans son étude, Alvarenga conclut que les amides tels que le méthylformamide, le diméthylformamide ou le diméthylacétamide, protègent les spermatozoïdes d'étalons des dommages induits par la cryoconservation et que cette protection est d'autant plus remarquable chez les étalons dont la semence est fortement

dénaturée par la congélation en présence de glycérol. De même, il semblerait que les propriétés spermicides que l'on retrouve avec le glycérol chez la jument soient moins marquées lors de l'utilisation d'amides, ce qui est à l'origine d'une amélioration de la fécondité (Alvarenga et al. 2005).

D'après l'étude de Squires, les amides présenteraient une protection similaire à celle du glycérol tout en causant moins de dommages cellulaires que le glycérol (Squires et al. 2004). Ainsi, les amides représenteraient une bonne alternative à l'utilisation du glycérol en tant qu'agents cryoprotecteurs pénétrants lors de la congélation de la semence. Mais d'après Melo et al., c'est l'association du glycérol à de faibles concentrations avec un amide qui donnerait les meilleurs résultats. Le méthylformamide serait, d'après son étude, l'amide le plus efficace sans doute car il possède le poids moléculaire le plus faible (Melo et al. 2007).

Les substances tampon :

Le métabolisme des spermatozoïdes engendre une acidification du milieu extracellulaire, ce qui s'avère toxique pour les spermatozoïdes eux-mêmes. Des substances tampon sont donc ajoutées dans les dilueurs afin de maintenir le pH le plus proche possible de la neutralité.

Le tri-hydroxy-méthyl-aminométhane ou Tris correspond au tampon le plus employé dans les dilueurs, le plus souvent en association avec de l'acide citrique. Il s'agit d'un composé soluble dans l'eau qui se comporte comme une base faible (Luvoni et al. 2003).

Le jaune d'œuf et le lait possèdent également un pouvoir tampon, mais qui reste limité.

Les substances nutritives :

Le jaune d'œuf et/ou le lait contiennent une partie des substances nutritives employées dans les dilueurs. Cependant, afin de fournir suffisamment d'énergie aux spermatozoïdes, des sucres sont couramment rajoutés.

En plus d'être des substrats énergétiques, les sucres jouent également un rôle de cryoprotecteurs non pénétrants et contribuent à la protection des spermatozoïdes contre les dommages induits par le stress osmotique et la formation de cristaux de glace dans les cellules. Ils interagissent avec les phospholipides de la membrane plasmique et diminuent la température de transition entre l'eau liquide et la glace ce qui permet une augmentation de la survie des spermatozoïdes lors de la cryoconservation. Parmi les monosaccharides présents naturellement dans le plasma séminal, le glucose et le fructose ont été les plus utilisés dans les dilueurs. Il faut toutefois noter que le glucose et le fructose sont métabolisés par des voies différentes par les

spermatozoïdes fraîchement éjaculés (Oldenhof et al. 2013 ; Barbas et Mascarenhas 2009 ; Ponglowhapan et al. 2004).

Le glucose et le fructose exercent une forte influence sur la mobilité et les types de mouvement des spermatozoïdes canins sachant que le fructose est capable de maintenir une meilleure mobilité que le glucose. La consommation du glucose par les spermatozoïdes canins s'avère plus importante que celle du fructose lorsque les deux sucres sont présents en quantité équivalente dans un mélange, indiquant une préférence pour le glucose de la part des spermatozoïdes (Ponglowhapan et al. 2004).

Cependant, dans l'étude de Jimenez, aucune différence n'est mise en évidence quant à la qualité de la semence de chat après cryoconservation, que le dilueur contienne du glucose ou du fructose (Jiménez et al. 2013).

Un effet cryoprotecteur plus important pour les monosaccharides plutôt que pour les disaccharides serait rapporté lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec le Tris. Le tréhalose, un dissaccharide, quant à lui, augmente la fluidité de la membrane avant la congélation, ce qui procure aux spermatozoïdes une plus grande résistance contre les dommages entraînés par le processus de congélation/décongélation.

Dans leur étude, Yildiz et al. ont comparé l'influence de différents sucres sur la mobilité, la viabilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes durant le processus de congélation. Les sucres ajoutés au dilueur étaient soit des monosaccharides (fructose, glucose, galactose, xylose), des disaccharides (lactose, tréhalose, maltose, sucrose) ou des trisaccharides (raffinose). Les résultats obtenus montrent que la supplémentation du dilueur en sucres influence la qualité du sperme après la décongélation et que les paramètres influencés dépendent du type de sucre utilisé. En effet, les disaccharides semblent réduire la mortalité ainsi que le pourcentage de dommages de l'acrosome alors que les monosaccharides améliorent la mobilité (Yildiz et al. 2000).

Pojprasath et son équipe ont comparé la qualité du sperme d'étalon congelé avec un dilueur contenant du glucose, du fructose ou du sorbitol. Le sorbitol est un alcool présentant une structure similaire à celle du glycérol et ayant la capacité de stabiliser la membrane en condition de stress oxydatif. De plus, le sorbitol agit comme source énergétique et peut être converti en fructose. Ils ont démontré qu'un dilueur contenant du sorbitol peut être utilisé lors de cryoconservation de sperme équin et que la qualité du sperme après décongélation semble meilleure que lors de l'utilisation de glucose ou de fructose. En effet, les résultats concernant

la mobilité et la viabilité sont meilleurs dans les 10 minutes suivant décongélation puis ils deviennent similaires après 2 à 4 heures d'incubation (Pojprasath et al. 2011).

Les antibiotiques:

Des antibiotiques peuvent être ajoutés au milieu de dilution afin de lutter contre la prolifération bactérienne, le sperme n'étant pas stérile et le dilueur constituant un bon milieu de culture. En général, la streptomycine et la pénicilline sont employées à la dose respectivement de 1000 UI et d'un mg par ml de dilueur. Ces antibiotiques sont bien tolérés par les spermatozoïdes, ce qui n'est pas le cas de tous les antibiotiques, certains pouvant être particulièrement toxiques pour le spermatozoïde (Hanzen 2014).

Les additifs:

De nombreux additifs sont expérimentés dans le cadre de l'amélioration des protocoles de conservation. Des produits comme des antioxydants, des détergents, des stimulants de la mobilité, des substances capacitanes, ont été testés et donnent des résultats variables.

i. Le sodium-dodécyl sulfate (SDS)

Il s'agit d'un détergent anionique dont la propriété est de solubiliser les protéines. C'est le principe actif présent dans l'Equex STM paste®, l'Equex pasta® et l'Orvus ES paste® qui ont été introduits dans la composition des dilueurs de congélation. Le mécanisme d'action du SDS n'est pas encore totalement élucidé. Il semblerait qu'il stabilise les membranes, protège l'intégrité de l'acrosome et prévienne les changements de type capacitation.

Dans l'étude de Peña et Linde-Forsberg, l'effet de l'ajout d'Equex STM Paste® à un dilueur Tris a été évalué sur la survie des spermatozoïdes canins après décongélation. Les résultats obtenus montrent que l'ajout d'Equex STM Paste® possède un effet bénéfique sur la mobilité, l'intégrité membranaire et acrosomiale ainsi que sur la longévité des spermatozoïdes après décongélation. Cet ajout serait également responsable d'une diminution des mouvements d'hyperactivité, observés lors de la capacitation. La thermorésistance des spermatozoïdes augmente de façon significative et l'effet protecteur de l'Equex semble plus prononcé lorsque les spermatozoïdes sont exposés à l'Equex immédiatement avant la congélation plutôt que lorsqu'ils y sont exposés lors de la période d'équilibration. Enfin, une hypothèse avancée par les auteurs est que l'effet du SDS pourrait être dû à une action dans le milieu extracellulaire telle que la modification de la structure tertiaire des lipoprotéines du jaune d'œuf (Peña et Linde-Forsberg 2000b).

Schäfer-Somi et son équipe ont comparé l'effet de deux dilueurs, l'un avec Equex STM Paste® et l'autre sans, sur la qualité de la semence canine après décongélation. Leur étude montre que les dommages membranaires sont moins prononcés lorsque l'Equex STM Paste® est présent dans le dilueur d'où un effet bénéfique de la présence de SDS dans le dilueur de congélation (Schäfer-Somi et al. 2006).

Axnér et son équipe ont testé l'ajout d'Equex STM Paste® dans le dilueur lors de la congélation de spermatozoïdes félines. Les résultats montrent que l'ajout d'Equex STM Paste® au dilueur de congélation protège l'intégrité de l'acrosome pendant le processus de congélation-décongélation mais réduit la longévité des spermatozoïdes dans les 6 heures après la décongélation (Axnér et al. 2004). De même, dans l'étude de Luvoni, l'ajout d'Equex STM Paste® permettait une meilleure protection de l'intégrité de l'acrosome mais la viabilité était négativement affectée par la présence du SDS après une incubation à 38°C pendant 6 heures (Luvoni 2006).

Bien que les différentes études ne s'accordent pas sur l'effet bénéfique du SDS, il est tout de même de plus en plus utilisé dans les dilueurs, à une concentration variant de 0,5 à 1%.

ii. Les antioxydants

La peroxydation des lipides membranaires semble être un facteur majeur impliqué dans la qualité de la semence. La sensibilité de la membrane vis-à-vis des dommages oxydatifs est due à son contenu élevé en acides gras polyinsaturés et à une déficience en enzymes protectrices. Ces acides gras donnent à la membrane la fluidité dont elle a besoin pour réaliser la fusion lors de la fécondation. Ces molécules sont également vulnérables face aux espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS, en petite quantité, améliorent la fonction spermatique mais produites en grande quantité, elles deviennent préjudiciables pour la cellule. L'ajout d'un antioxydant au dilueur de congélation pourrait réduire l'impact du stress oxydatif et ainsi améliorer la qualité de la semence après décongélation.

Labbé a étudié les effets de certaines molécules antioxydantes sur la mobilité des spermatozoïdes d'étalon et sur le taux de malondialdéhyde (MDA). Lors de la peroxydation des lipides, le MDA est l'un des peroxydes majoritairement produits. Il peut être évalué par la mesure d'un complexe coloré formé lors de la réaction avec l'acide thiobarbiturique. Différentes molécules antioxydantes ont été étudiées : l'ergothionéine, la taurine, la vitamine E et l'acide xanthurénique. Seule l'ergothionéine a amélioré significativement la mobilité des spermatozoïdes après 6 heures de conservation à 37°C (Labbé et al. 2002).

Dans leur étude, Neagu et al. ont évalué l'effet de l'ajout d'un antioxydant, le butylhydroxytoluène ou BHT à un dilueur lors de la congélation de semence canine. Ils ont obtenu comme résultat une augmentation significative de l'intégrité membranaire post-décongélation en présence de BHT. Cette étude montre donc un effet protecteur de la supplémentation en antioxydant sur les membranes des spermatozoïdes canins (Neagu et al. 2010).

Luvoni a évalué l'effet de l'ajout de taurine au dilueur utilisé pour la congélation de spermatozoïdes félines épидидymaires. La taurine, un antioxydant aux propriétés osmo-régulatrices, est un acide aminé présent dans le tractus génital de nombreux mammifères. Elle est trouvée en concentration élevée dans le spermatozoïde, le plasma séminal et le fluide épидидymaire des chats domestiques. L'ajout de taurine au milieu de congélation a permis une amélioration de la mobilité quelle que soit la concentration ajoutée (25 ou 50 mmol). Cependant, la taurine semblait avoir un effet pro-capacitant car, en sa présence, on obtient une proportion élevée de spermatozoïdes (>90%) possédant les caractéristiques d'une réaction acrosomiale à la coloration. Cet effet pro-capacitant de la taurine pourrait expliquer l'augmentation observée de la mobilité par l'apparition de mouvements hyperactifs des spermatozoïdes capités mais entraînerait alors une diminution de la longévité des spermatozoïdes (Luvoni 2006).

Ponthier rapporte que l'incorporation au sperme de molécules antioxydantes à large spectre comme la vitamine E ou la vitamine C a donné des résultats contradictoires. Chez le cheval, l'ajout de vitamine E dans le sperme congelé n'a pas amélioré la mobilité après décongélation alors que chez le chien, la vitamine E a augmenté la viabilité des spermatozoïdes après décongélation. Un autre antioxydant, l'acide ascorbique ou vitamine C, n'a pas engendré de résultats positifs sur le sperme frais de donneurs humains sains (Ponthier et al. 2014).

iii. Les stimulants de la mobilité

Les différentes caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes peuvent être significativement stimulées par l'ajout de caféine, de pentoxifylline ou de 2'-deoxyadenosine. Ces composées présentent un effet dose-dépendant sur la mobilité et produisent un état hyperactif du spermatozoïde sans diminution de la mobilité pendant une période d'incubation de 6 heures à 37°C. Leur ajout permettrait une réduction d'environ 10% de la perte de mobilité par rapport à la valeur avant congélation (Luvoni 2006).

2. Le nombre d'étapes

Dans la plupart des protocoles de cryoconservation, la semence est diluée en une seule étape alors que d'autres protocoles mentionnent une dilution en deux étapes. En une seule étape, le dilueur est ajouté une fois juste après la récolte de semence ou avant la phase d'équilibration. Dans le cas d'une dilution en plusieurs étapes, la moitié du volume final en dilueur, sans glycérol, est ajoutée avant l'équilibration et la deuxième fraction de dilueur, contenant le glycérol, est ajoutée juste avant la congélation de façon à ce que le glycérol en concentration importante n'exerce pas d'effet néfaste sur les spermatozoïdes pendant la période d'équilibration (Barbas et Mascarenhas 2009; Peña et Linde-Forsberg 2000b).

Dans leur étude, Peña et Linde-Forsberg ont comparé une dilution en une étape (avant équilibration) et une dilution en deux étapes (avant équilibration et juste avant congélation). Les résultats obtenus indiquent que la dilution en deux étapes s'avère plus efficace en terme de mobilité, d'intégrité membranaire et acrosomiale et de longévité des spermatozoïdes après décongélation, par rapport à une dilution en une seule étape (Peña et Linde-Forsberg 2000b).

En revanche, Silva n'a pas mis en évidence de différence significative entre une dilution en une ou deux étapes en ce qui concerne la mobilité, l'intégrité de l'acrosome et de la membrane, la longévité et la morphologie des spermatozoïdes après décongélation (Silva et al. 2006).

Ainsi, le choix entre une dilution en une seule étape ou en deux étapes n'est pas évident et reste sujet à discussion. Ceci peut dépendre du dilueur utilisé dont la composition varie énormément d'une étude à l'autre, notamment la concentration en glycérol.

3. Le taux de dilution ou la concentration finale en spermatozoïdes

La dilution permet d'obtenir une concentration en spermatozoïdes optimale pour la congélation. La concentration finale en spermatozoïdes dans l'échantillon dépend du choix du taux de dilution.

Chez le cheval, la concentration en spermatozoïdes dans la semence fraîche est habituellement comprise entre 150 et 300 millions de spermatozoïdes par ml. Cette concentration dépend du volume de plasma séminal émis par les glandes annexes. Ainsi, l'excitation sexuelle augmente la sécrétion des vésicules séminales, en augmentant le volume et en diminuant proportionnellement la concentration. La concentration du sperme après congélation dépend de la dilution avec le milieu de congélation et donc des options de commercialisation choisies lors de la production, mais aussi de la contrainte technique imposée par le milieu de congélation.

En effet, si les dilueurs utilisés contiennent 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. Il est conseillé d'inséminer avec des doses finales contenant au moins 400 millions spermatozoïdes (Ponthier et al. 2014).

Pour le taureau, le calcul du taux de dilution est basé sur l'obtention de doses d'insémination renfermant une concentration en spermatozoïdes zootechniquement acceptable soit 10 à 12 millions de spermatozoïdes par paillette. Estimant à 40% les pertes imputables aux processus de congélation-décongélation, il faut donc obtenir au terme de la dilution une concentration moyenne de 20 millions de spermatozoïdes par paillette de 0,25 ml. Cette valeur peut être revue à la baisse ou à la hausse en fonction de la qualité du sperme récolté (Hanzen 2014).

Dans l'espèce canine, Pe a et Linde-Forsberg ont réalisé une étude dans laquelle elles ont comparé l'effet de quatre concentrations en spermatozoïdes sur la mobilité, l'intégrité membranaire et acrosomiale après décongélation : 50, 100, 200 et 400 millions de spermatozoïdes par millilitre. Elles ont conclu que, pour les paramètres étudiés, la concentration de 200 millions de spermatozoïdes par millilitre est optimale (Peña et Linde-Forseberg 2000a).

En revanche, Veyer a obtenu de meilleurs résultats pour une concentration de 100 millions de spermatozoïdes par millilitre par rapport à une concentration de 50 ou 200 millions de spermatozoïdes par millilitre (Veyer 2002).

Enfin, dans leur étude, Okano et al. n'ont pas mis en évidence d'influence de la concentration en spermatozoïdes sur la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes après décongélation (Okano et al. 2004).

Ainsi, dans l'espèce canine, la concentration idéale en spermatozoïdes avant congélation semble donc être comprise entre 100 et 200 millions de spermatozoïdes par millilitre.

Table 6: Exemples de dilueurs du commerce (d'après: IMV technologies, Mopa Global, Minitube)

Dilueur	Composition
Laiciphos (IMV technologies)	Base de lait écrémé en poudre, antibiotiques, adjonction extemporanée de 10% de jaune d'œuf
Biociphos (IMV technologies)	Glycérol, antibiotiques, aucun produit d'origine animale
INRA 96 (IMV technologies)	Fraction purifiée des caséines de lait, sels, sucres, antibiotiques (pénicilline, gentamicine), antifongique (amphotéricine B)
Triladyl (Minitube)	Tris, acide citrique, sucre, glycérol, solution tampon, eau pure, antibiotiques (lincomycine, spectinomycine, gentamicine, tylosine), adjonction extemporanée de jaune d'œuf
AndroMed (Minitube)	Tris, phospholipides, acide citrique, sucre, antioxydant, solution tampon, glycérol, eau, antibiotiques (lincomycine, spectinomycine, gentamicine, tylosine), aucun produit d'origine animale
GentExtender (Minitube)	Glycérol, jaune d'œuf, antibiotiques
BoviPro Cryoguard (MOPA Global)	Tris, jaune d'œuf
Canipro ApX2 Freeze (MOPA Global)	Glycerol, antioxydant

D. L'équilibration

1. Définition

L'étape d'équilibration correspond à une réfrigération préalable de la semence à +4°C avant la congélation proprement dite. Elle fait suite à l'étape de centrifugation et est réalisée directement après l'ajout du glycérol. Certains auteurs rapportent que cette étape permettrait aux cryoprotecteurs, notamment le glycérol, de pénétrer dans la cellule. Cependant, lors d'une dilution en deux étapes, il est rapporté que le glycérol est ajouté après l'étape d'équilibration ce qui pose la question de l'intérêt d'une telle étape.

Okano et al. (2004) et Silva et al. (2006) n'ont pas montré de différence entre l'ajout du glycérol une à plusieurs heures avant ou juste avant la congélation. Okano suggèrent que l'étape d'équilibration permettrait des remaniements membranaires ainsi que le passage membranaire d'ions, à l'origine d'une meilleure résistance à la congélation (Silva et al. 2006; Okano et al. 2004).

2. Durée de l'équilibration

Le temps nécessaire de maintien de la semence à 4°C avant la congélation, c'est-à-dire la durée de l'étape d'équilibration, est sujette à discussion. Cette durée influencerait la qualité de la semence et sa fertilité après décongélation. Le temps d'équilibration couramment utilisé varie entre 1 et 3 heures (Gérard et al. 2008).

Luvoni rapporte un temps d'équilibration de seulement 20 minutes à +5°C. (Luvoni et al. 2003). Dans l'étude d'Okano et al., différents temps d'équilibration allant de 0 à 26 heures ont été testés et les meilleurs résultats après décongélation ont été obtenus pour un temps d'équilibration de 2 à 3 heures. Ils suggèrent cependant que ce temps d'équilibration peut être raccourci à 1 heure voire ne pas exister si il est précédé d'un temps de refroidissement de la semence dans un milieu ne contenant pas de glycérol d'au moins 3 heures à +4°C. Un deuxième dilueur contenant le glycérol est ensuite ajouté au terme de ces trois heures. Ainsi, le plus important serait d'ajouter le glycérol à +4°C et la période de refroidissement constituerait une étape essentielle pour que la température de la semence diminue suffisamment avant la congélation proprement dite (Okano et al. 2004).

3. Intérêt de l'étape d'équilibration

Au vu des précédents résultats évoqués, il est normal de se poser la question de l'intérêt de l'étape d'équilibration dans le processus de cryoconservation de la semence.

Silva et son équipe ont comparé l'influence de la température lors de l'ajout du glycérol. Les résultats montrent qu'il n'existe aucune différence en ce qui concerne la mobilité, la morphologie, l'intégrité de l'acrosome, la fonctionnalité membranaire ou encore la viabilité des spermatozoïdes, que le glycérol soit ajouté à température ambiante à 27°C ou à 4°C. Ainsi une étape de réfrigération préalable à la congélation, c'est-à-dire d'équilibration à 4°C, ne serait pas nécessaire (Silva et al. 2006).

Ponthier et al. (2014) rapportent que l'étape de refroidissement et d'équilibration à 4°C a été étudiée chez le cheval et que les résultats sont en désaccord avec l'étude précédente. En effet, il a 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 après décongélation. Une phase plus longue d'équilibration de la température à 4°C semble donc permettre une meilleure survie des spermatozoïdes à la congélation (Ponthier et al. 2014).

Kim et son équipe ont testé une méthode de congélation de la semence canine sans étape d'équilibration. Leur étude a montré que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque le glycérol est utilisé à la concentration de 5% et que les échantillons sont d'abord suspendus au-dessus des vapeurs d'azote liquide pendant 2 minutes maximum, avant d'y être plongés entièrement. En effet, une immersion directe des échantillons dans l'azote liquide n'a pas permis d'obtenir de spermatozoïdes viables après décongélation. Ainsi, un refroidissement préalable des spermatozoïdes avant la congélation proprement dite, serait bénéfique pour les caractéristiques de la semence (Kim et al. 2012).

Olaciregui a également étudié l'intérêt d'une étape d'équilibration, mais cette fois sur de la semence équine issue de l'épididyme. Il a comparé l'effet d'une exposition immédiate aux conditions de congélation après conditionnement et une exposition aux conditions de congélation précédée d'une étape de stabilisation à 4°C pendant 2 heures. Les résultats de cette étude montrent que la qualité de la semence est améliorée lorsqu'une étape de stabilisation pré-congélation est réalisée, d'où encore une fois, l'intérêt d'une étape d'équilibration (Olaciregui et al. 2014)

E. La réfrigération de la semence

1. Définition

Dans l'espèce équine et chez les carnivores domestiques, après la récolte, la semence peut être soit utilisée en tant que semence fraîche de façon extemporanée, soit réfrigérée, soit congelée pour un usage ultérieur. La réfrigération de la semence peut donc constituer soit un processus à part entière soit une des étapes du processus de cryoconservation qui correspond au refroidissement de la semence avant la congélation proprement dite, c'est-à-dire à l'étape d'équilibration. Dans ce paragraphe, la réfrigération sera considérée comme un processus à part entière.

La réfrigération permet de conserver le pouvoir fécondant du sperme pendant plusieurs jours à 4 °C. Seule est conservée pour réfrigération la fraction épидидymaire de l'éjaculat dans le cas du chien, additionnée d'un dilueur spécifique (Dumon 2007; Loomis 2006 ; Luvoni 2003).

a. Les indications de la réfrigération

Il existe différentes indications pour la réfrigération de la semence : dans le cas d'une insémination à distance lorsque les animaux sont éloignés géographiquement, lorsque la semence est de qualité médiocre ou encore lorsqu'il faut différer une insémination initialement prévue avec de la semence fraîche.

➤ Insémination à distance :

En règle générale, ce sont les femelles qui doivent rejoindre le mâle, ce qui implique parfois des déplacements longs et coûteux. Pour éviter ceci, la semence est prélevée par le vétérinaire du mâle puis expédiée par envoi accéléré au vétérinaire de la femelle, qui aura déterminé le moment optimum de l'insémination et alerté son confrère. C'est l'indication la plus classique, quelle que soit l'espèce concernée.

➤ Semence de qualité médiocre :

Dans certains éjaculats, les spermatozoïdes se retrouvent en concentration faible et leur mobilité peut s'avérer médiocre. En dehors d'une affection testiculaire ou prostatique, cela peut être le cas pour des mâles âgés, intéressants néanmoins pour leur potentiel génétique. Il est alors possible de prélever, dans la même journée ou sur deux jours, deux ou trois éjaculats. On améliore ainsi la qualité initiale de la semence en mélangeant ces fractions, la ou les deux premières fractions ayant été conservées par réfrigération. Toutefois, le sperme ainsi enrichi devra être utilisé sur place et au plus tard après le dernier prélèvement car il ne supporterait pas la conservation habituelle de la semence réfrigérée et *a fortiori* un transport éventuel.

➤ Différer une insémination :

Parfois, après l'échec d'une saillie naturelle programmée, il est fréquent que les éleveurs consulte pour demander une insémination avec de la semence fraîche. Le plus souvent, le choix de la date n'a pas été déterminé par un suivi de chaleurs correct. Si le praticien se rend compte que la femelle n'a pas encore ovulé et si le mâle n'est pas disponible dans les jours suivants, la réfrigération du sperme permettra de conserver celui-ci pendant quatre ou cinq jours au réfrigérateur sans altération de son pouvoir fécondant initial (Dumon 2007).

b. La méthode de réfrigération

Ils existent des dilueurs adaptés à la réfrigération de la semence, fournis aux praticiens par les banques de semence. Dans l'espèce canine, ils sont le plus souvent composés de Tris (hydroxyméthyl aminoéthane), d'acide citrique, de fructose auxquels sont ajoutés des antibiotiques. Dans l'espèce équine, les dilueurs de réfrigération sont, en règle générale, à base de lait, comme par exemple le milieu INRA96. Avant utilisation, il convient d'ajouter au dilueur du jaune d'œuf frais dans la proportion de 20 % de jaune d'œuf pour 80 % de dilueur.

Après avoir contrôlé la qualité de la semence par un spermogramme, la dilution doit être immédiate. Elle est réalisée à température ambiante, en ajoutant le dilueur goutte à goutte et en remuant légèrement le tube contenant la semence. Le mélange obtenu est réparti dans des tubes à hémolyse, fermés par un bouchon en matière plastique, immédiatement mis au réfrigérateur à 4 °C pendant une heure (Dumon 2007, Batellier 2001).

2. Utilisation de la semence réfrigérée

Lors d'une **insémination à distance**, le vétérinaire de la femelle effectue le suivi des chaleurs et informe le vétérinaire du mâle du moment de l'ovulation. La femelle est fécondable deux jours plus tard et pendant deux jours. Le vétérinaire du mâle prélève le sperme, effectue sa dilution et sa réfrigération ; une heure trente plus tard, il peut expédier la semence réfrigérée dans un emballage spécial (Figure 33) permettant de maintenir la température de réfrigération.



Figure 33: Exemple de boîte de transport pour semence réfrigérée (Minitube®)

À la réception du prélèvement, le vétérinaire de la femelle le laisse pendant une dizaine de minutes à température ambiante si la femelle est sur place ou le met au réfrigérateur si son usage doit être différé. Il contrôle la qualité du sperme avant l'emploi et la compare à celle fournie par le spermogramme initial. Une altération de 5 à 10 % de la motilité et de la concentration des spermatozoïdes est le maximum acceptable pour que l'insémination puisse être réalisée par voie vaginale. Si le sperme a mal supporté le transport, on préférera intervenir par voie intra-utérine généralement préconisée pour le sperme congelé.

Si le mâle donne un **éjaculat de mauvaise qualité** avec une concentration et une motilité des spermatozoïdes incompatibles avec une insémination en semence fraîche, il est possible de réaliser trois prélèvements dans la journée, de n'en conserver que les fractions épидидymaires, de diluer chacune d'elles dans un volume de dilueur correspondant au tiers du volume total à utiliser et de conserver chaque prélèvement à 4 °C. En fin de journée, les trois prélèvements sont laissés 30 minutes à la température ambiante, puis mélangés. Comme dans le cas précédent, l'insémination sera réalisée par la voie intra-utérine (Dumon 2007).

3. Avantages et inconvénients de la semence réfrigérée par rapport à la semence congelée

Lorsque la femelle est inséminée au bon moment, moins de deux jours après la réfrigération d'une semence de bonne qualité, les résultats de l'IA par la voie vaginale sont identiques à ceux obtenus à la suite d'insémination de semence fraîche : on observe de 90 à 95 % de gestation et la prolificité reste conforme à la moyenne de la race. En revanche, si la semence n'est pas initialement de bonne qualité ou si elle a mal supporté les manipulations ou le transport, il faut avoir recours à l'IA intra-utérine pour augmenter les chances de gestation et s'attendre à une prolificité plus ou moins minorée selon les caractéristiques du sperme inséminé.

L'utilisation de la semence réfrigérée, surtout dans son indication la plus classique, l'IA à distance, suppose une parfaite maîtrise de la technique par les deux vétérinaires intervenants, leur disponibilité et celle des deux éleveurs. En revanche, les services rendus aux éleveurs sont considérables car le protocole est moins lourd et moins onéreux que pour l'IA avec de la semence congelée, et les résultats obtenus sont supérieurs (Dumom 2007).

Lorsque l'on compare l'utilisation de semence congelée par rapport à de la semence réfrigérée, on note des avantages mais également des inconvénients pour chacune des méthodes.

En effet, lors d'utilisation de semences congelées, les mâles n'ont pas besoin d'être disponibles pour des collectes « à la demande », ce qui permet leur implication dans des événements sportifs au cours de la saison de reproduction pour l'espèce équine par exemple. De plus, le fait que le mâle soit malade, blessé ou décédé n'empêche pas l'insémination de la femelle avec la semence congelée, ce qui serait impossible avec de la semence réfrigérée, conservée moins longtemps. La semence congelée permet une distribution internationale et il est plus facile de prévoir l'expédition car elle peut être expédiée à l'avance et conservée jusqu'au moment optimal de l'insémination. Lors d'une cryoconservation de la semence, la totalité de l'éjaculat prélevé est traité puis stocké ce qui permet l'obtention de plusieurs doses inséminantes. En revanche, dans le cas de semence réfrigérée, le mâle est collecté pour l'insémination de la femelle et toute la semence est utilisée en une ou deux fois, ce qui représente un certain gaspillage (plus de doses inséminantes sont disponibles avec de la semence congelée). Enfin, le traitement centralisé de semences congelées par les laboratoires spécialisés entraîne moins de variabilité au niveau de la qualité de la semence par rapport à de la semence réfrigérée.

Cependant, le sperme congelé est à l'origine d'une fécondité plus faible que lors de l'utilisation de sperme réfrigéré et il demande également une expertise technique plus importante. De plus, les frais de transport d'un conteneur d'expédition de semence congelée sont plus élevés que pour un conteneur de semence réfrigérée. Enfin, l'utilisation de semence congelée entraîne des coûts de gestion de la femelle plus élevés (nécessité d'examen plus fréquents par exemple) car le sperme congelé possède une longévité moins importante que le sperme réfrigéré une fois dans le tractus génital de la femelle, c'est pourquoi une synchronisation étroite entre l'insémination et le moment de l'ovulation est nécessaire pour optimiser l'utilisation des doses (Loomis 2006).

F. Le conditionnement

1. Le support utilisé

Quelle que soit l'espèce, la semence est conditionnée juste avant d'être congelée. Le but du conditionnement est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable. Deux principaux conditionnements sont disponibles pour congeler la semence et se retrouvent dans les différentes espèces étudiées: les pastilles et les paillettes. Un troisième type de conditionnement est parfois rapporté, ce sont les ampoules qui sont à l'origine prévues pour une congélation lente mais peu souvent utilisée.

Le conditionnement en **pastilles** ou « pellets » consiste à déposer 0,1 millilitre de semence diluée dans une alvéole creusée dans un pain de glace carbonique à -79°C . Après 10 minutes de contact, les pastilles sont retirées de la glace et stockées dans des tubes en plastique identifiés et immergés dans de l'azote liquide à -196°C . Cette technique, quoique simple à réaliser, présente quelques inconvénients qui sont une identification imparfaite, l'obligation de réaliser la décongélation à l'intérieur de vapeurs d'azote, des manipulations supplémentaires et un risque accru de contamination.

La méthode la plus utilisée actuellement en France, dans de nombreuses banques de semence, est la congélation sous forme de **paillettes** ou « straws ». Les paillettes sont de fins tubes en chlorure de polyvinyle, obstrués à une de leurs extrémités par une pièce de coton. L'autre bout est libre et servira au remplissage de la paillette dont la contenance peut être de 0,25 millilitre, 0,5 millilitre ou 2,5 millilitres. Chez l'étalon, on trouve des « maxi-paillettes » de 4 à 5 millilitres. Les paillettes sont identifiées à l'aide du nom du mâle prélevé, de son numéro d'identification, du code de la race, de la date de récolte et de l'identification du centre d'insémination (Figure 34) (Loomis 2006; Hanzen 2014; Dumon 2007).



Figure 34: Identification des paillettes (Clichés CERREC)

Une fois remplies, une légère agitation des paillettes permettra de ménager une place pour l'obturation et la bulle d'air nécessaire pour permettre la dilution du sperme lors de la congélation. Le bouchage peut s'effectuer manuellement ou être automatisé, comme c'est plus fréquemment le cas actuellement. Il est réalisé au moyen de poudre d'alcool polyvinylique qui, une fois humide, se transforme en gel ou par sertissage (Loomis 2006; Hanzen 2014; Dumon 2007).

2. Le volume de semence dans l'échantillon

Certains auteurs se sont intéressés à l'influence de la **contenance des paillettes** sur la qualité de la semence après décongélation.

Dans son étude, Veyer a comparé l'effet d'un conditionnement en paillettes de différentes tailles sur la qualité de la semence de chien après un processus de congélation. Les deux tailles de paillettes testées étaient 0,25 et 0,5 millilitre. Veyer n'a pas mis en évidence de différence significative entre l'utilisation de paillettes de 0,25 ou 0,5 millilitre sur la mobilité, la morphologie, la vitalité ou l'état de l'acrosome des spermatozoïdes après décongélation (Veyer 2002).

Nöthling et son équipe ont obtenu des résultats différents. Alors qu'aucune différence n'est observée au niveau de la mobilité des spermatozoïdes dans les 5 minutes après la décongélation, il a été montré qu'après 60 minutes post-décongélation, le conditionnement en paillettes de 0,5 millilitre améliore le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et réduit le nombre de spermatozoïdes dont l'acrosome est endommagé comparé à l'utilisation de paillettes de 0,25 millilitre (Nöthling et al. 2005).

3. La concentration en spermatozoïdes dans l'échantillon

Il semble que la **concentration** des paillettes en spermatozoïdes ait également une influence sur la qualité de la semence.

Okano et son équipe ont étudié l'effet de différentes concentrations en spermatozoïdes dans des paillettes de 0,5 millilitre sur la mobilité, la proportion d'acrosome intact et le nombre d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes après décongélation. Aucun impact n'a été mis en évidence sur ces différents paramètres lorsque les concentrations en spermatozoïdes étaient comprises entre 25 et 250 millions par millilitre. En revanche, si la concentration est trop élevée, cela peut avoir un effet néfaste sur les caractéristiques de la semence après décongélation (Okano et al. 2004).

Peña et Linde-Forsberg ont comparé quatre concentrations de spermatozoïdes : 50, 100, 200 et 400 millions de spermatozoïdes par millilitre. Leurs résultats ont montré que durant la période d'incubation suivant la décongélation, la concentration la plus faible entraîne une diminution de mobilité plus importante que pour les autres concentrations. Cependant, après trois heures d'incubation, le pourcentage d'acrosome intact est plus important pour la concentration la plus faible. En croisant les différents résultats obtenus, Peña et al. ont conclu que les caractéristiques de la semence après décongélation sont les meilleures pour une concentration en spermatozoïdes de 200 millions de spermatozoïdes par millilitre (Pena et Linde-Forsberg, 2000a).

G. La congélation

La **congélation *sensu stricto*** correspond à la mise des paillettes dans les vapeurs d'azote pendant quelques minutes puis à la plongée de celles-ci dans l'azote liquide à -196°C (Figure 35). Les paillettes et les pastilles autorisent des vitesses de congélation plus rapides que les ampoules dont le rapport surface sur volume est plus faible. La congélation est possible quelle que soit la méthode de récolte de la semence et elle est réalisée de la même façon chez toutes les espèces.



Figure 35: Paillettes dans les vapeurs d'azote liquide (Cliché CERREC, photo de gauche. Cliché UCEAR, Centre de collecte de semences bovines, photo de droite)

La congélation correspond à l'**étape critique** du processus de cryoconservation car elle est à l'origine de la majorité des altérations observées au niveau des spermatozoïdes. Biologiquement, la phase critique est comprise entre -10°C et -50°C . En effet, c'est entre ces températures que se produisent les phénomènes de cristallisation extra- puis intracellulaire et les mouvements d'ions qui en résultent. En dessous de -50°C , la vitesse de congélation aurait moins d'impact sur la semence. De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer la méthode permettant de diminuer au maximum les effets néfastes de la congélation sur les spermatozoïdes. Le paramètre le plus étudié est la **vitesse de congélation** c'est-à-dire la hauteur et la durée au-dessus des vapeurs d'azote (Hanzen 2014).

1. Influence de la vitesse de refroidissement

Le choix d'une vitesse de congélation optimale est essentiel dans le maintien de l'intégrité cellulaire car celle-ci détermine la façon dont le spermatozoïde parviendra à rester en équilibre avec le milieu extracellulaire ainsi que la formation ou non de glace intracellulaire.

Si les spermatozoïdes sont refroidis trop rapidement, l'eau intracellulaire va geler, causant ainsi la formation de glace intracellulaire délétère pour la membrane plasmique et les organites cellulaires. Cependant, si le spermatozoïde est refroidi trop lentement, la déshydratation cellulaire est excessive et le volume de la cellule se réduit trop, ce qui cause des dégâts irréversibles au niveau de la membrane plasmique et d'autres composants cellulaires, diminuant ainsi la capacité de fécondation du spermatozoïde.

Ainsi, la vitesse de congélation idéale doit être assez lente pour permettre une déshydratation suffisante de la cellule prévenant ainsi la formation de cristaux de glace intracellulaires, mais suffisamment rapide pour éviter l'exposition prolongée des spermatozoïdes aux solutés hypertoniques du milieu extracellulaire ou encore une déshydratation trop importante de la cellule conduisant à une réduction majeure du volume cellulaire (Vasconcelos Franco et al. 2014; Barbas et al. 2009).

D'après Kim, la phase de refroidissement des paillettes au dessus des vapeurs d'azote avant immersion complète est indispensable. En effet, dans son étude, il a testé deux méthodes de congélation : une immersion directe dans l'azote liquide ou des temps allant de une, deux, trois à dix minutes au dessus des vapeurs d'azote avant immersion complète. L'immersion directe dans l'azote liquide n'a pas permis l'obtention de spermatozoïdes mobiles. La phase de refroidissement dans les vapeurs d'azote avant immersion permettait une amélioration de la mobilité, de la viabilité et de l'intégrité membranaire. Au-delà de 2 minutes, on notait une augmentation du pourcentage d'intégrité de l'acrosome et de la membrane mais également une augmentation du taux d'anomalies morphologiques. Ainsi, une phase de refroidissement des paillettes au dessus des vapeurs d'azote liquide d'une durée de 2 minutes semble la plus appropriée (Kim et al. 2012).

De façon à limiter les effets du choc thermique et de la cristallisation intracellulaire, la maîtrise de la vitesse de refroidissement de la semence est essentielle et dépend de la technique utilisée. Les différentes études réalisées sur le sujet montrent qu'une vitesse de refroidissement relativement lente donne de meilleurs résultats qu'une vitesse plus rapide (Peña et Linde-Forsberg 2000b; Nöthling et Shuttleworth 2005).

En effet, d'après Luvoni, un refroidissement rapide de $-14^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 25°C à 0°C serait plus préjudiciable pour la morphologie et l'intégrité des spermatozoïdes qu'un refroidissement lent à $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Il rapporte également qu'une vitesse de congélation appropriée aux spermatozoïdes de chat serait de $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de $+5^{\circ}\text{C}$ à -80°C avant immersion dans l'azote liquide. Mais il a été récemment démontré qu'une **vitesse plus lente** de $-3,85^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de $+5^{\circ}\text{C}$ à -40°C avant immersion donnait de meilleurs résultats avec une mobilité plus importante et moins d'anomalies morphologiques (Luvoni 2006).

De même, Rota et son équipe ont comparé une congélation rapide et une congélation lente. La congélation rapide consiste à placer les paillettes 4 cm au-dessus de la surface de l'azote liquide pendant dix minutes avant de les plonger dans l'azote liquide. La méthode lente consiste à utiliser un

« congélateur programmable » dans lequel la vitesse de congélation varie : elle est de $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre 5°C et -10°C puis de $-8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre -10°C et -60°C . Les paillettes sont ensuite plongées dans l'azote liquide. D'après les résultats obtenus, la **congélation lente** augmente significativement la mobilité des spermatozoïdes après décongélation ainsi que le pourcentage de spermatozoïdes ayant une membrane intègre (Rota et al. 2005).

Dans une étude plus récente, Vasconcelos Franco et son équipe ont comparé trois vitesses de congélation différentes pour la cryoconservation de spermatozoïdes équins, notamment entre 5°C et -15°C : lente à 5°C par minute, modérée à 10°C par minute et rapide à 20°C par minute. Quel que soit le dilueur utilisé, le pourcentage de spermatozoïdes viables le plus élevé a été retrouvé pour une vitesse de congélation lente ($5^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Ainsi, les spermatozoïdes semblent plus résistants aux dommages créés par la congélation lorsqu'une **vitesse lente** est utilisée (Vasconcelos Franco et al. 2014).

Dans l'espèce équine, Neuhauser a comparé deux méthodes de congélation rapide et lente en utilisant soit un congélateur programmable, soit un container Styrofoam® rempli d'azote liquide, sur de la semence équine issue de l'épididyme. Lorsque la semence était refroidie dans le congélateur programmable, entre 20°C et 4°C la vitesse était soit de $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (vitesse lente) soit de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (vitesse rapide). Ensuite, la vitesse était de $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à -140°C . Si le container Styrofoam® était utilisé, la semence était placée à 5 cm au-dessus de l'azote liquide pendant 20 minutes soit immédiatement après le conditionnement à température ambiante (vitesse rapide) soit après équilibration à 4°C pendant 150 minutes (vitesse lente). L'utilisation du container Styrofoam® avec une vitesse de congélation rapide a été à l'origine du plus faible pourcentage de spermatozoïdes viables observé. Ainsi, d'après les résultats, la congélation dans les vapeurs d'azote pourrait être une alternative au congélateur programmable

seulement si elle est associée à une période prolongée de refroidissement (Neuhauser et al. 2014).

Après l'étape d'équilibration qui permet un refroidissement préalable de la semence à la température de 4°C, les paillettes peuvent être refroidies dans un congélateur programmable qui permet d'atteindre -140°C, avec une pente variant, selon le milieu de congélation utilisé, entre -20°C et -60°C par minute. Les paillettes sont ensuite immergées dans l'azote liquide à -196°C.

Dans l'étude de Schäfer-Somi, un congélateur programmable (congélation en 3 étapes) était comparé avec un container Styrofoam® (congélation en 4 étapes) par rapport à la qualité de la semence canine après décongélation. Les résultats ont prouvé que la congélation à l'aide du congélateur programmable est à l'origine de meilleurs résultats en ce qui concerne la viabilité et la mobilité par rapport au container Styrofoam® (Schäfer-Somi et al. 2006).

De façon à améliorer les techniques de congélation, diverses modifications des vitesses de descente en température et des paliers de descente ont été testées. L'osmolarité et la concentration en agent cryoprotecteur du dilueur ainsi que les températures de formation de glace intracellulaire sont prises en compte. D'après l'étude de Ponthier, la vitesse optimale sans agent cryoprotecteur semble être de -30°C/min, alors qu'en présence de cryoprotecteur, elle serait de -60°C/min chez le cheval et le chien ce qui peut paraître contradictoire étant donné le rôle de protection joué par le cryoprotecteur lors du refroidissement et qui devrait donc permettre l'utilisation de vitesse de refroidissement plus importante. Des modèles mathématiques incluant les données physicochimiques 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 (Ponthier et al. 2014).

Dans l'étude de Sieme, on retrouve les mêmes valeurs en ce qui concerne la vitesse de congélation. En effet, après ajout du dilueur de congélation contenant l'agent cryoprotecteur, il rapporte une vitesse de congélation optimale de -40 à -60°C par minute. Cette vitesse constituerait un compromis entre une vitesse rapide à l'origine de la formation de glace intracellulaire et une vitesse plus lente associée à une déshydratation importante de la cellule. Pour obtenir une telle vitesse de refroidissement, il faut placer les paillettes à une distance définie entre 2,5 et 5 cm audessus de l'azote liquide pendant 20 minutes puis les plonger totalement dans l'azote liquide (Sieme et al. 2015).

Ainsi certaines études obtiennent une meilleure qualité de la semence lors de l'utilisation de vitesses de congélation plus rapide que celles couramment utilisées. C'est le cas de l'étude de Barbas qui rejoint les résultats des deux études citées précédemment et dans laquelle la

congélation à des vitesses rapides variant de -15°C à $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a permis l'obtention d'une survie satisfaisante des spermatozoïdes après congélation/décongélation (Barbas et Marscareñas 2009).

La vitesse de congélation dépend également du dilueur utilisé. En effet, lors de l'utilisation d'amides en tant qu'agents cryoprotecteurs remplaçant le glycérol, un refroidissement rapide serait préférable étant donné la différence de perméabilité et de poids moléculaire entre le glycérol (poids moléculaire de 92) et les amides (méthylformamide : 59 et diméthylformamide : 73).

Alvarenga a testé quatre protocoles de congélation : deux protocoles sans réfrigération préalable et deux avec réfrigération préalable. Ensuite une vitesse rapide de $-70^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou modérée de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a été testée. Il a été observé une meilleure mobilité ainsi qu'un pourcentage de membrane intacte plus important lorsqu'il y avait une étape de réfrigération préalable. Ensuite, les résultats montrent que les spermatozoïdes d'étalons devraient être congelés à une vitesse de $-70^{\circ}\text{C}/\text{min}$ dans un dilueur contenant des amides (Alvarenga et al. 2005).

Les différents résultats obtenus dans les différentes études citées prouvent que de plus amples études sont nécessaires à la mise au point d'une vitesse de refroidissement optimum pour la congélation du sperme. On considérera dans l'état actuel des recherches, que si un congélateur programmable n'est pas utilisé, il est alors suffisant de suspendre les paillettes à 4 ou 5 cm au-dessus de l'azote liquide, puis de les immerger une fois la température de -50°C atteinte.

2. Influence de la position des paillettes

Lors de la congélation, les paillettes peuvent être placées soit verticalement soit horizontalement dans les vapeurs d'azote liquide (Figure 36). Certains auteurs suggèrent qu'il serait préférable de placer les paillettes horizontalement sans toutefois obtenir de différence significative entre les deux positions possibles (Peña et Linde-Forseberg 2000b).

En ce qui concerne la hauteur des paillettes au-dessus de la surface de l'azote liquide, Nöthling et Shuttleworth ont comparé une hauteur de 3,5 cm et une hauteur de 8 cm au-dessus de l'azote liquide. Ces deux hauteurs n'entraînent pas de différence en ce qui concerne la mobilité et les anomalies de l'acrosome. Cependant, il semblerait que la hauteur interagisse avec la température de décongélation et la hauteur de 8 cm au-dessus de l'azote liquide couplée à une température de décongélation de 70°C au bain-marie pendant 5 secondes donne les meilleurs résultats (Nöthling et Shuttleworth 2005).

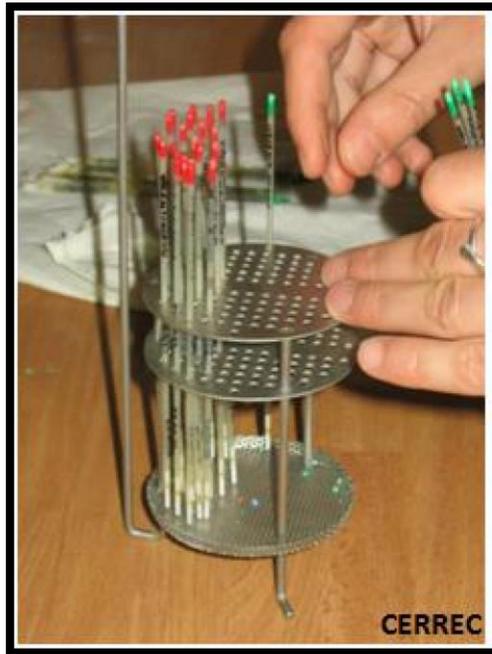


Figure 36: Positionnement vertical des paillettes (Cliché CERREC)

Lors d'un conditionnement en pastilles (ou pellets), la technique de congélation implique de déposer à l'aide d'une pipette les gouttes de semence dans des indentations de 3 millimètres de diamètres découpées dans un bloc de neige carbonique. Après un intervalle de temps de 3 minutes, le bloc est retourné, plongeant ainsi les boulettes dans l'azote liquide (Luvoni et al. 2003).

3. La vitrification

La vitrification est une technique de cryopréservation utilisant des descentes en température plus rapides. Elle consiste en une brusque mise en contact du sperme avec l'azote liquide sans refroidissement préalable. Elle évite la formation de cristaux de glace qui peuvent être dangereux pour la cellule et ses organites. La vitrification ne requiert pas de matériel de congélation onéreux et ne prend que quelques secondes. Une vitrification classique nécessite une forte proportion de cryoprotecteurs pénétrants dans le milieu pouvant être à l'origine d'altérations chimiques et de chocs osmotiques néfastes voire létales pour les spermatozoïdes. En utilisant la technique de vitrification utilisée en humaine, les résultats obtenus concernant le taux de survie des spermatozoïdes chez les espèces domestiques sont très faibles voire nuls. L'échec de la vitrification des spermatozoïdes peut être expliqué par leur grande sensibilité aux fortes concentrations en cryoprotecteurs ainsi que par leur faible tolérance aux variations osmotiques.

Bien que cette technique soit très rapide, les résultats incertains quant à la qualité du sperme obtenue en font une technique encore peu employée de nos jours (Barbas et Mascarenhas 2009; Day et Stacey 2007; Ponthier et al. 2014).

H. Le stockage et le transport de la semence congelée

Les paillettes, pastilles et ampoules peuvent être conservés dans l'azote liquide à -196°C pendant des mois, voire des années. Il est intéressant de noter que ce type de congélation n'altère en rien le caractère pathogène de germes tels que *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus*, *Trueperella pyogenes* ou *Listeria monocytogenes*. C'est pourquoi une période de quarantaine de 30 jours est souvent réalisée sur une paillette décongelée choisie au hasard avant la décongélation du reste des paillettes et la réalisation de l'IA. Ceci est effectué afin de s'assurer que le donneur n'était pas en incubation d'une maladie contagieuse au moment de la collecte.

Quelle que soit l'espèce, le stockage des paillettes se fait dans des cuves d'azote liquide (Figure 37) et leur transport est réalisé dans des containers cryogéniques (Figure 38) dont il existe différents modèles de capacité et de propriétés thermiques variables. Une vérification régulière du niveau d'azote de ces cuves s'impose. Par ailleurs, la température doit toujours y être inférieure à 120°C . Il est indispensable pour ce faire d'y maintenir un niveau minimal de 5 cm d'azote liquide. L'évaporation sera fonction de la fréquence d'ouverture de la cuve et du temps nécessaire au choix d'une paillette (5 à 8 secondes)(Hanzen 2014).

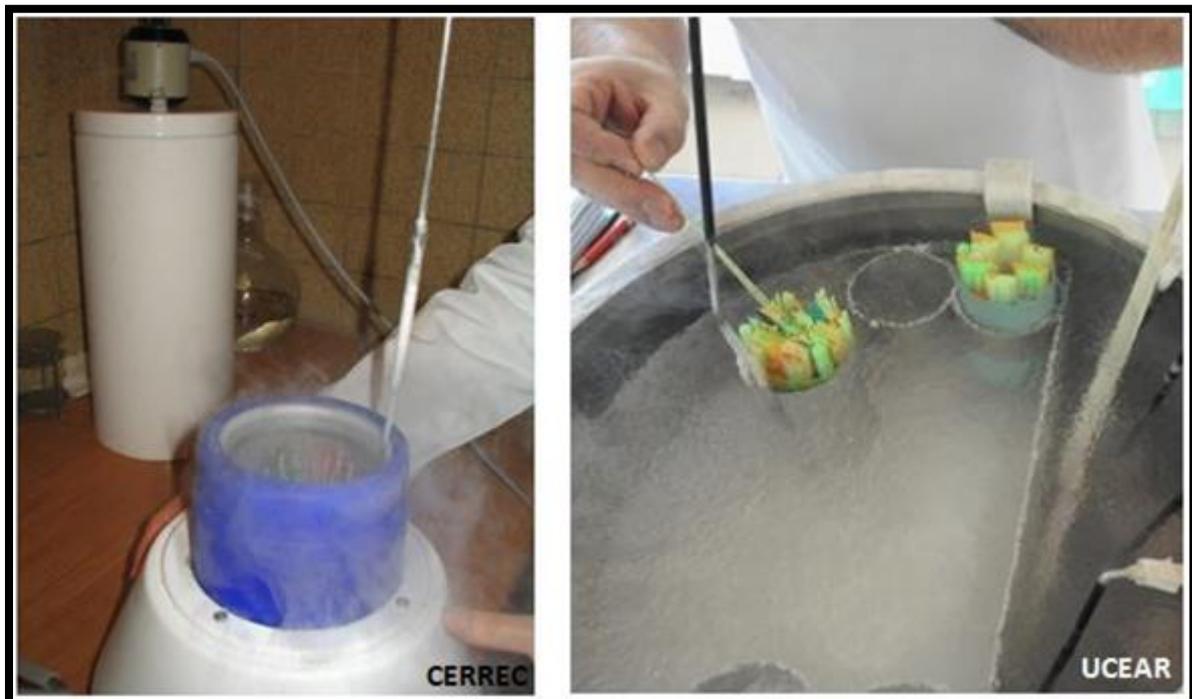


Figure 37: Stockage des paillettes dans la cuve d'azote liquide (Cliché CERREC, photo de gauche. Cliché UCEAR, Centre de collecte de semences bovine, photo de droite)



Figure 38: Stockage des paillettes dans le container de transport en polystyrène (Cliché CERREC)

I. La décongélation

1. Température de décongélation

La semence est décongelée juste avant son utilisation, lors d'une insémination artificielle le plus souvent. Quelle que soit l'espèce, la décongélation s'effectue de manière semblable à l'aide d'un bain-marie. Les paillettes sont directement transférées de l'azote liquide dans le bain-marie (Figure 47) (Ponthier et al. 2014).



Figure 39: Retrait des paillettes de la cuve d'azote liquide avant leur transfert dans le bain-marie (Cliché UCEAR, Centre de collecte de semences bovines)

Une autre méthode de décongélation de la semence consiste à vider le contenu de chaque paillette décongelée dans un volume de solution isotonique à 37-38°C et de laisser la suspension de semence à cette température pendant 5 minutes avant d'évaluer la qualité de la semence et de l'utiliser pour une IA. Cette méthode peut également être utilisée lors du conditionnement en pastilles (Peña et Linde-Forseberg 2000b ; Luvoni et al. 2003).

Enfin, il faut savoir que les ampoules peuvent être décongelées de façon plus lente, dans un bain d'eau glacée pendant environ dix minutes, avant d'utiliser directement la semence (Luvoni et al. 2003).

Une des premières études à avoir comparé des températures de décongélation a été celle de Cochran (1984). Il a comparé une décongélation à 75°C pendant 7 secondes et une décongélation à 37°C pendant 30 secondes. Il a obtenu de meilleurs résultats au niveau de la qualité de la semence avec la décongélation à 75°C pendant 7 secondes (Cochran et al. 1984).

D'autres études ont comparé différentes températures de décongélation et il a été montré, en règle générale, qu'une **décongélation rapide** donnait de meilleurs résultats en termes de survie et de mobilité des spermatozoïdes plutôt qu'une décongélation lente. De plus, Nöthling rapporte qu'une semence décongelée à 70°C montre 6,6 % d'acrosomes anormaux de moins que les spermatozoïdes d'une semence décongelée à 37°C (Peña et Linde-Forsberg 2000b; Nöthling et Shuttleworth 2005).

D'après Yu, afin de déterminer la meilleure vitesse de décongélation, il faut savoir qu'il existe une interaction entre les vitesses de décongélation et de congélation, dont dépend le taux de survie des spermatozoïdes. Dans son étude, le pourcentage de spermatozoïdes vivants maximal est obtenu lorsqu'une congélation à -10°C/min est associée à une décongélation rapide. Il rapporte également l'existence de variations individuelles entre les animaux et certains chiens possèdent une semence dont le taux de survie sera meilleur avec une décongélation lente plutôt que rapide. Il serait donc utile de réaliser des tests de protocole de congélation-décongélation pour chaque individu, afin de déterminer lequel est optimal, mais difficile à effectuer en pratique (Yu et al. 2002).

2. Le dilueur de décongélation

Un dilueur de décongélation peut être ajouté à la semence après la décongélation. L'ajout du dilueur doit se faire de façon lente afin que les spermatozoïdes ne passent pas d'un milieu hypertonique à un milieu isotonique trop rapidement, ce qui pourrait les endommager par choc osmotique. Ce dilueur de décongélation est le plus souvent composé d'une solution tampon contenant du Tris, de l'acide citrique, du glucose et des antibiotiques. La dilution réalisée permet d'ajuster le volume à introduire lors de l'insémination artificielle et permet également de diluer certains composants du milieu de congélation tel que le glycérol qui peuvent être toxiques (Peña et Linde-Forseberg 2000a).

3. Le taux de dilution

Dans son étude, Silva a comparé l'absence de dilution avec une dilution 1:4, c'est-à-dire un volume de semence pour quatre volumes de dilueur, sur la qualité de la semence canine après décongélation. Il n'a observé aucune différence en ce qui concerne la longévité des spermatozoïdes qu'il y ait dilution ou non. Ainsi, l'ajout d'un dilueur de congélation n'améliorerait pas la qualité de la semence mais permettait une augmentation du volume de la semence à inséminer sans endommager les spermatozoïdes (Silva et al. 2006).

Dans l'étude de Peña, ce sont quatre taux de dilution différents qui ont été comparés : 1:0 (correspond à une absence de dilution), 1:1, 1:2 et 1:4. Aucune différence n'est observée entre les différents taux de dilution dans les 1 à 4 heures d'incubation après décongélation. Cependant, une meilleure mobilité des spermatozoïdes était obtenue après 8 heures d'incubation lors de la dilution avec les deux taux les plus élevés, ce qui diffère des résultats obtenus par Silva (2006) (Peña et Linde-Forseberg 2000a).

Rota et al. ont étudié l'effet de l'ajout de fluide prostatique autologue (à 1:2) à la place du tampon Tris sur la longévité, les paramètres de la mobilité et le statut de l'acrosome des spermatozoïdes de chien après la décongélation. Le fluide prostatique était séparé des spermatozoïdes après centrifugation et stocké à -25°C. La semence était congelée dans des paillettes de 0,5 millilitre et décongelée au bain-marie à 38°C pendant une minute. La semence était ensuite diluée soit avec du tampon Tris soit avec le fluide prostatique autologue réchauffé à 38°C. La mobilité était initialement plus élevée dans les échantillons dilués avec du fluide prostatique mais elle diminuait jusqu'à devenir similaire à celle de la semence en présence de la solution Tris, 1 heure après la décongélation. L'ajout de fluide prostatique n'avait significativement pas d'effet sur la longévité des spermatozoïdes ni sur le statut de l'acrosome (Rota et al. 2007).

4. Le retrait des cryoprotecteurs

Les spermatozoïdes étant particulièrement sensibles aux variations osmotiques, le retrait des cryoprotecteurs doit se faire en plusieurs étapes, à l'aide d'une solution isotonique, ce qui permet de minimiser la perte de mobilité et les altérations membranaires des spermatozoïdes. La durée de cette étape dépend de la quantité de cryoprotecteur utilisée. En effet, des quantités plus élevées conduisent à une augmentation du volume cellulaire plus importante lors de la dilution dans une solution isotonique. La vitesse de diffusion du cryoprotecteur à travers la membrane entre également en compte car un taux de diffusion faible va induire une augmentation plus importante du volume cellulaire (Luvoni 2006; Loomis, Graham 2008).

Après la décongélation, et avant toute utilisation de la semence, il est recommandé d'effectuer un contrôle de qualité sur chaque éjaculat en prenant deux paillettes au hasard. Ce contrôle de qualité est réalisé à l'aide d'un spermogramme et porte sur le pourcentage et le nombre de spermatozoïdes vivants et mobiles estimés en microscopie optique ou à l'aide du système CASA. En pratique ceci n'est pas toujours réalisé car particulièrement chronophage mais un test de décongélation peut être réalisé sur une paillette de chaque éjaculat congelé par réalisation d'un test de mobilité (Ponsart et al. 2014).

CONCLUSION

L'analyse de la semence d'étalon répond à la fois à une exigence de la part des propriétaires de poulinières d'utiliser un étalon fertile pour la mise à la reproduction de leur jument, et de la part des propriétaires d'étalon de déterminer l'origine exacte de la subfertilité éventuelle de leur animal.

Les techniques utilisés sur le terrain sont bien maîtrisés mais ne permettent qu'une évaluation restreinte des paramètres de la semence (concentration, morphologie générale et mobilité des spermatozoïdes). Or certain étalon présentant des valeurs satisfaisantes tout en étant sujet à une baisse, voire a une absence de fertilité. De ce fait, les nouvelles méthodes d'évaluation de la semence trouvent leur intérêt puisqu'elles permettent d'une part de détecter une anomalie non mise en évidence par les tests de routine, et d'autres parts, de localiser précisément cette anomalie au sein des spermatozoïdes. Cependant, ces techniques ont un coût élevé et nécessitent des manipulation de maintenances et de standardisation qui les rendent difficilement applicable, a l'heure actuelle, en clientèle.

Ces dernières années l'origine génétique de certain problèmes de subfertilité chez l'étalon a était étudiée par le biais de technologies émergentes. D'autres études, destinée a amélioré la compréhension de la fertilité de l'homme, ont abordé les mécanismes moléculaires de régulation du développement et de la fonction des spermatozoïdes. Ses travaux pourraient ainsi avoir un intérêt chez l'étalon, même s'il convient de rester prudent quant à l'extrapolation de résultats d'une espèce à l'autre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- * AMANN, 2011 Physiology and Endocrinology. In: Mc KINNON AO, SQUIRES EL, VAALA WE, VARNER DD eds, Equine Reproduction, 2ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell, pp. 881-908
- * Alvarenga M.A., PAPA F.O., LANDIM-ALVARENGA F.C. et MEDEIROS A.S.L 2005
- * AMANN, 1993 Physiology and Endocrinology. In: McKINNON AO, VOSS JL eds, Equine Reproduction, 1ed., Lea & Febiger eds, Philadelphia, pp. 1137-1154
- * Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. Anim. Reprod. Sci. Vol. 89, n° 1-4, p 105-113.
- * Anzar et Graham 1994 Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. Theriogenology. Vol. 43, n° 2, p 439-449.
- * Axné E., HERMANSSON U. et LINDE-FORSBERG C. 2004 The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. Vol. 84, n° 1-2, p 179-191.
- * Barbas et Mascarenhas 2009; Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell Tissue Bank. Vol. 10, n° 1, p 49-62.
- * BARONE, 2001 Anatomie comparée des Mammifères Domestiques. Tome 4. Splanchnologie II. Appareil uro-génital, Foetus et annexes, Péritoine et topographie abdominale. 3ème Edition. Eds Vigot, Paris., 896p
- * Barrier-Battut 2013 Collecte et traitement de la semence d'étalon. Equ'idée. article 2-7
- * Batellier 2001 Advances in cooled semen technology Anim. Reprod. Sci. Vol 68. pp 181-190
- * Bencharif D., AMIRAT-BRIAND L., GARAND A., ANTON M., SCHMITT E., DESHERCES S. et al. 2010 Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL Low Density Lipoproteins. Anim. Reprod. Sci. Vol. 119, n° 3-4, p 305-313.
- * Briand-Amirat L., ANTON M., GERARD O. et TAINURIER D. 2006 Etude de la fertilité in vitro de la semence de taureau après congélation-décongélation avec les LDL du jaune d'oeuf de poule : Comparaison avec l'Optidyl®, dilueur commercial à base de jaune d'oeuf. Revue Méd. Vét. Vol. 157, n° 4, p 205-212.
- * Brinsko S.P., CROCKETT E.C. et SQUIRES E.L. 2000 Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. Theriogenology. Vol. 54, n° 1, p 129-136.
- * Brito 2007 Evaluation of Stallion Sperm Morphology. Clinical Techniques in Equine Practice. Vol. 6, n° 4, p 249-264.
- * Bruyas 2014 La reproduction chez les chevaux. In : CHASTANT-MAILLARD S. et SAINT-DIZIER M. La reproduction animale et humaine. Editions Quae. 752p.
- * Burgess C.M., CLUTTERBUCK A.L. et ENGLAND G.C.W. 2012 The effect of cryopreservation on the capacitation status and epithelial cell attachment capability of dog spermatozoa. The Veterinary Journal. Vol. 192, n° 3, p 398-402.
- * Chastant-Maillard S., REYNAUD K. et SAINT-DIZIER M.. 2014 Particularités de la reproduction chez la chienne. In: La reproduction animale et humaine. Editions Quae. 752p.

- * Chatdarong K., THUWANUT P. et MORRELL J.M. 2010 Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology*. Vol. 73, n° 9, p 1284-1292.
- * Cochran J.D., AMANN R.P., FROMAN D.P. et PICKETT B.W. 1984 Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*. Vol. 22, n° 1, p 25-38.
- * Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 107, n° 3-4, p. 331.
- * Cortes Constanza J., CODELIA Verónica A., MANOSALVA Iris, DE LANGE Johanna, DE LOS REYES Mónica et MORENO Ricardo D. 2006 Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 93, n° 1-2, p165-175.
- * Curry 2000 Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod.* Vol. n°1, p46-52.
- * Curry 2000 Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod.* Vol. 5, n°1, p46-52.
- * Day et Stacey, 2007 *Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Second Edition.* Humana Press Inc. 365p.
- * Decuadro-Hansen 2004; La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal. *Gynecol. Obstet. Fertil.* Vol. 32, n° 10, p 887-893.
- * Decuadro-Hansen 2004; La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal. *Gynecol. Obstet. Fertil.* Vol. 32, n° 10, p 887-893.
- * Dorado , J. GÁLVEZ M.J., MORRELL J.M., ALCARÁZ L. et HIDALGO M. 2013
- * Dorado et al. 2001 Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 125, n° 1-4, p 211-218. page 99
- * Dumon 2007 Insémination artificielle dans l'espèce canine: Actualités. *Bull. Acad. Vét. France.* Tome 160 - N°2
- * Dumon 2007 Insémination artificielle dans l'espèce canine: Actualités. *Bull. Acad. Vét. France.* Tome 160 - N°2
- * Eilts 2005b Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*. Vol. 64, n° 3, p 692-697.
- * Evaluation of dog semen quality after slow biological freezer or rapid nitrogen vapours freezing. *Reprod. Nutr. Dev.* Vol. 45, n° 1, pp. 29-37.
- * FILIPPI et al., 2002 Identification, localization and functional activity of oxytocin receptors in epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193, pp. 89-100
- * Fontbonne Alain, LEVY Xavier, FONTAINE Emmanuel et ROUTIER Jean-Yves. 2007 L'insémination artificielle chez les félinés. *Bull. Acad. Vét. France.* Tome 160 - N°2
- * From a QuarterHorse stallion. *Journal of Equine Veterinary Science* 1991; 11:283-286.
- * Gérard et al. 2008 Evolution des techniques de préparation de la semence et d'insémination artificielle chez les bovins. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants.* p 351-354.
- * Guimarães T., LOPES G., PINTO M., SILVA E., MIRANDA C., CORREIA M.J., DAMÁSIO L., THOMPSON G. et ROCHA A. 2015 Colloid centrifugation of fresh stallion semen before cryopreservation decreased microorganism load of frozen-thawed semen without affecting seminal kinetics. *Theriogenology*. Vol. 83, n° 2, p. 186-191.

- * Hanzen 2014 Biotechnologies: L'insémination artificielle chez les ruminants.
- * Hartwig F.P., LISBOA F.P., HARTWIG F.P., MONTEIRO G.A., MAZIERO R.R.D., FREITAS-DELL'AQUA C.P., ALVARENGA M.A., PAPA F.O. et DELL'AQUA .A.2014
- * HeutelbeckA., OLDENHOF H., ROHN K., MARTINSSON G., MORRELL J. et SIEME H . 2015 Use of Density Centrifugation for Delayed Cryopreservation of Stallion Sperm: Perform Sperm Selection Directly after Collection or after Storage? *Reprod. Domest. Anim.* Vol. 50, n°1, p. 76-83.
- * Hoogewijs M., RIJSSELAERE T., DE VliegHER S., VANHAESEBROUCK E., DE SCHAUWER C., GOVAERE J., THYS M., HOFLACK G., VAN SOOM A. et DE KRUIF A.. 2010 Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation.
- * Howard , JO GAYLE, BROWN, JANINE L., BUSH, MITCHELL, WILDT et DAVID E. 1990 Teratospermic and Normospermic Domestic Cats: Ejaculate Traits, Pituitary—Gonadal Hormones, and Improvement of Spermatozoal Motility and Morphology After Swim-Up Processing. *J. Androl.* Vol. 11, n° 3, p. 204–215.
- * Ilaria 2011 Sperm Preparation Techniques for Artificial Insemination - Comparison of Sperm Washing, Swim Up, and Density Gradient Centrifugation Methods In: MANAFI M. Artificial insemination in farm animals. InTech, Rijeka Croatia.
- * Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology.* Vol. 62, n° 8, pp. 1498-1517.
- * Jiménez E., PÉREZ-MARÍN C., VIZUETE G., MILLÁN Y. et AGÜERA E. 2013 Effect of Different Extenders on In Vitro Characteristics of Feline Epididymal Sperm During Cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* Vol. 48, n° 4, p. 665-672.
- * JohnstonS.D., ROOT KUSTRITZ M.V. et OLSON P.N.S. 2001 Canine and Feline *Theriogenology.* Saunders Company. 592p.
- * Kim S., LEE Y., YANG H. et KIM Y-J. 2012 Rapid freezing without cooling equilibration in canine sperm. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 130, n° 1-2, p. 111-118.
- * LabbéC., BLESBOIS E., LEOEUF B., GUILLOUET P., STRADAIOLI G. et MAGISTRINI M. . 2002 Technologie de la conservation du sperme chez plusieurs vertébrés domestiques: protection des lipides membranaires, intégrité du noyau et élargissement des méthodes. Congrès du Bureau des Ressources Génétiques, La Châtre FRA. Vol. 10, p. 15–17.
- * LITTLE et HOLYOAK, 1992 Reproductive anatomy and physiology of the stallion. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 8 1, pp. 1-29.
- * Loomis 2001, 2006 Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* Vol. 22, n° 3, p. 663-676.
- * Loomis 2006 Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* Vol. 22, n° 3, p. 663-676.
- * Loomis et Graham 2008 Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 105, n° 1-2, p. 119-128.
- * Luvoni 2003 Conservation of feline semen Part II: Cold-induced damages on spermatozoal fertilizing ability. *J. Feline Med. Surg.* Vol. 5, n° 5, p. 257-263.
- * Luvoni 2006Gamete cryopreservation in the domestic cat.*Theriogenology.*Vol66,n°1,p101-111

- * Luvoni G.C., KALCHSCHMIDT E., LEONI S. et RUGGIERO C. 2003 Conservation of feline semen: Part I: Cooling and freezing protocols. *J. Feline Med. Surg.* Vol. 5, n° 4, p. 203-208.
- * Mari G., BUCCI D., LOVE C.C., MISLEI B., RIZZATO G., GIARETTA E., MERLO B. et SPINACI M. 2015 Effect of cushioned or single layer semen centrifugation before sex sorting on frozen stallion semen quality. *Theriogenology.* Vol. 83, n° 6, p. 953-958.
- * Melo C.M., ZAHN F.S., MARTIN I., ORLANDI C., DELLAQUA J.A., ALVARENGA M.A. et PAPA F.O. 2007 Influence of Semen Storage and Cryoprotectant on Post-thaw Viability and Fertility of Stallion Spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* Vol. 27, n° 4, p. 171-175.
- * Melo C.M., PAPA F.O., FIORATTI E.G., VILLAVERDE A.I.S.B., AVANZI B.R., MONTEIRO G., DELLAQUA J.A., PASQUINI D.F. et ALVARENGA M.A. 2008
- * Moore A.I., SQUIRES E.L. et GRAHAM J.K. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology.* Vol. 63, n° 9, p. 2372-2381.
- * Morrell J.M., GEORGAKAS A., LUNDEHEIM N., NASH D., DAVIES MOREL M.C.G. et JOHANNISSON A. 2014 Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. *Theriogenology.* Vol. 82, n° 1, p. 176-183.
- * Neagu V.R., GARCÍA B.M., SANDOVAL C.S., RODRÍGUEZ A.M., FERRUSOLA C.O., FERNÁNDEZ L.G., TAPIA J.A. et PEÑA F.J. 2010 Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology.* Vol. 73, n° 5, p. 645-650.
- * Neto C.R., MONTEIRO G.A., SANCLER-SILVA Y.F.R., PAPA P., GUASTI P.N., RESENDE H.L., PAPA F.O., DELLAQUA JR. J.A. et ALVARENGA M.A. 2014 Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. *Journal of Equine Veterinary Science.* Vol. 1, n° 34, pp. 58-60.
- * Neto C.R., MONTEIRO G.A., SANCLER-SILVA Y.F.R., PAPA P., GUASTI P.N., RESENDE H.L., PAPA F.O., DELLAQUA JR. J.A. et ALVARENGA M.A. 2014 Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. *Journal of Equine Veterinary Science.* Vol. 1, n° 34, pp. 58-60.
- * Neto, C.R., MONTEIRO G.A., SOARES R.F., PEDRAZZI C., DELLAQUA J.A., PAPA F.O., CASTRO-CHAVES M.M. et ALVARENGA M.A. 2013 New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology.* Vol. 79, n° 7, pp. 1120-1123.
- * Neuhauser S., RHEINFELD S. et HANDLER J. 2014 Comparison of the Effects of Four Freezing Methods on Motility Characteristics, Morphology, and Viability of Postthaw Stallion Epididymal Sperm. *J. Equine Vet. Sci.* Vol. 34, n° 7, p. 882-888.
- * Nöthling J.O. et SHUTTLEWORTH R. 2005 The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology.* Vol. 63, n° 5, p. 1469-1480.
- * Okano T., MURASE T., ASANO M. et TSUBOTA T. 2004 Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *J. Vet. Med. Sci.* Vol. 66, n° 11, p. 1359-1364.
- * Olaciregui et al. 2014 M., GIL L., MONTÓN A., LUÑO V., JEREZ R.A. et MARTÍ J.I. 2014 Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology.* Vol. 68, n° 1, p. 91-95.

- * Oldenhof H., GOJOWSKY M., WANG S., HENKE S., YU C., ROHN K., WOLKERS W.F. et SIEME H. 2013 Osmotic Stress and Membrane Phase Changes During Freezing of Stallion Sperm: Mode of Action of Cryoprotective Agents. *Biol. Reprod.* Vol. 88, n° 3, p. 68-68.
- * Papa F.O., FELÍCIO G.B., MELO-OÑA C.M., ALVARENGA M.A., DE VITA B., TRINQUE C., PUOLI-FILHO J.N.P. et DELL'AQUA J.A. 2011 Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 129, n° 1-2, p.73-77.
- * Pe a Mar nez 2004
- * Peña et Linde-Forsberg 2000b Effects of equex, one or two-step dilution and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology.* Vol. 54, n° 6, p. 859-875.
- * Peña et Linde-Forseberg 2000a Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology.* Vol. 54, n° 5, p. 703-718.
- * PILLET E., DUCHAMP G., BATELLIER F., BEAUMAL V., ANTON M., DESHERCES S., SCHMITT E. et MAGISTRINI M. 2011 Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology.* Vol. 75, n° 1, p. 105-114.
- * PILLET E., LABBE C., BATELLIER F., DUCHAMP G., BEAUMAL V., ANTON M., DESHERCES S., SCHMITT E. et MAGISTRINI M. 2012 Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology.* Vol. 77, n° 2, pp. 268-279.
- * Pojprasath T., LOHACHIT C., TECHAKUMPHU M., STOUT T. et THARASANIT T. 2011 Improved cryopreservability of stallion sperm using a sorbitol-based freezing extender. *Theriogenology.* Vol. 75, n° 9, pp. 1742-1749.
- * Ponglowhapan S., ESSÉN-GUSTAVSSON B. et LINDE FORSBERG C. 2004
- * Ponsart C., JOLY C., LE GUIENNE B., BEAUJEAN N., LE BOURHIS D., GÉRARD O., MERMILLOD P. et LOCATELLI Y. 2014 Biotechnologies des gamètes et de l'embryon. In : SAINT-DIZIER M. et CHASTANT-MAILLARD S. La reproduction animale et humaine. Editions Quae. 752p.
- * Ponthier J., VAN DEN BERGHE F., PARRILLA-HERNANDEZ S., HANZEN C. et DELEUZE S. 2014 Congélation du sperme dans l'espèce équine: état des lieux et perspectives.
- * Rijsselaere T., VAN SOOM A., HOFACK G., MAES D. et DE KRUIF A.. 2002 Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology.* Vol. 62, n° 7, pp. 1292-1306.
- * ROGER, 2009 L'appareil génital mâle des Mammifères domestiques. Documents de cours de l'Unité d'anatomie, Vetagro-sup, Campus vétérinaire de Lyon, 54pp.
- * ROSER, 2011 Endocrine-Paracrine-Autocrine Regulation of Reproductive Function in the Stallion. In: Mc KINNON AO, SQUIRES EL, VAALA WE, VARNER DD eds, *Equine Reproduction*, 2ed., United Kingdom, Wiley-Blackwell, pp. 996-1014
- * Rota A., MILANI C. et ROMAGNOLI S. 2007 Effect of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen motility and sperm acrosome status. *Theriogenology.* Vol. 67, n° 3, pp. 520-525.
- * Rota A., MILANI C., CABIANCA G. et MARTINI M. 2006 Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology.* Vol. 65, n°9, pp.1848-1858
- * Rota Ada, ROTA Alessandra, MARTINI M., MILANI C. et ROMAGNOLI S. 2005

- * Schäfer-SomiS., KLUGER S., KNAPP E., KLEIN D. et AURICH C. . 2006 Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*. Vol. 66, n° 2, pp. 173-182.
- * Sieme H., OLDENHOF H., MARTINSSON G., BURGER D. et WOLKERS W.F. 2015 Equine semen cryopreservation: inter-individual variation, centrifugation processing, protective agents, and freezing protocols. *Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte*. Vol. 39, n° 1, pp.11-14.
- * Silva A.R., CARDOSO R.C.S. et SILVA L.D.M. 2006 Influence of Temperature during Glycerol Addition and Post-thaw Dilution on the Quality of Canine Frozen Semen. *Reprod. Domest. Anim.* Vol. 41, n° 1, pp. 74–78.
- * Squires E.L, KEITH S.L et GRAHAM J.K 2004 Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*. Vol. 62, n° 6, pp. 1056-1065.
- * Thirumala S., FERRER M.S., AL-JARRAH A., EILTS B.E., PACCAMONTI D.L. et DEVIREDDY R.V. 2003 Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology*. Vol. 47, n° 2, pp. 109-124.
- * Tsutsui 2006 Artificial insemination in domestic cats *Felis catus*. *Theriogenology*. Vol. 66, n° 1, pp. 122-125.
- * Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*. Vol. 81, n° 2, p. 340-346.
- * Use of single-layer centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*. Vol. 80, n° 8, p 955-962.
- * Varela Junior A.S., CORCINI C.D., ULGUIM R.R., ALVARENGA M.V.F., BIANCHI I., CORRÊA M.N., LUCIA T. et DESCHAMPS J.C. 2009 Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 115, n° 1-4, pp. 323-327.
- * Vasconcelos Franco CHAVEIRO A. et DA SILVA F.M. 2014 Effect of Freezing Rates and Supplementation of α -Tocopherol in the Freezing Extender in Equine Sperm Cryosurvival. *J. Equine Vet. Sci.* Vol. 34, n° 8, pp. 992-997.
- * Veyer 2002 Congélation de semence dans l'espèce canine : effets de la concentration en spermatozoïdes, du volume des paillettes et de la température de décongélation sur la qualité de la semence après décongélation. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, 66p.
- * Yildiz C., KAYA A., AKSOY M. et TEKELI T. 2000 Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. Vol. 54, n° 4, pp. 579-585.
- * Yu I., SONGSASEN N., GODKE R.A. et LEIBO S.P. 2002 Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*. Vol. 44, n° 1, pp. 62–78.

- * [2] Thibault C. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses 2001
- * [3] Tibary A, Bakkowy M. Reproduction equine. Tome II: l'étalon. Actes 2005
- * [4] Blanchard TL, et al. Manual of equine reproduction. 2nd edition. Mosby 2003
- * [5] Heymon Y., Vignon X. Reproduction des animaux d'élevage. Educagri 2005
- * [6] Knobil E, Neill JD. Spermatozoa. In: Encyclopedia of Reproduction. Volume 4 Pro-Z. 1999;586-596.
- * [7] Varner DD, Vaughan SD, Johnson L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoa motility. American Journal of Veterinary Research 1991;52:224-30.
- * [8] Kenney RM. Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Hastings, NE: Society of Theriogenology; 1983.
- * [9] Varner DD. Developments in stallion semen evaluation. Theriogenology 2008;70:448-62.
- * [10] Amann RP, Katz DF. Reflections on CASA after 25 years. Journal of Andrology 2004;25:317-25.
- * [11] Holt C, Holt WV, Moore HDM, Reed HCB, Curnock RM. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of *two fertility trials*. Journal of Andrology 1997;18:312-23.
- * [12] Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. A comparison of two computer-automated semen analysis instruments for the evaluation of sperm motion characteristics in the stallion. Journal of Andrology 1990;11:453-9.
- * [13] Wessel MT, Althouse GC. Validation of an objective approach for simultaneous *assessment of viability and motility of fresh and cooled equine spermatozoa*. Animal Reproduction Science 2006;94:21-2.
- * [14] Jasko DJ, Sawyer HR, Squires EL. Identification of degenerative germ cells in semen from a QuarterHorse stallion. Journal of Equine Veterinary Science 1991;11:283-286.
- * [15] Love CC, Varner DD, Thompson JA. Intra- and inter-stallion variation in sperm *morphology and their relationship with fertility*. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 2000;56:93-100.