

**CONGELATION DU SPERME DANS L'ESPECE EQUINE :
ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES.**

**EQUINE SEMEN FREEZING:
STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES.**

Jérôme PONTHER, DVM, M. Sc., Diplomate ECAR (Equine)

Pathologie de la Reproduction des Animaux de Compagnie et Equidés, Clinique des Animaux de Compagnie et des Equidés, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULg Université de Liège, 20 Boulevard de Colonster, B41, B-4000 Liège (Sart-Tilman), Belgique
LINALUX - Mont Le Soie, Centre Européen du cheval, 18 Rue des Champs Elysées, B-5590, Ciney, Belgique

Correspondance : Jerome.Ponthier@ulg.ac.be

INTRODUCTION ET ENJEUX

Depuis vingt ans, la congélation du sperme a permis de diffuser la génétique des étalons. Les congélations effectuées en dehors des saisons sportives permettent d'inséminer de nombreux juments pendant que les étalons concourent dans des lieux éloignés. Les éleveurs ont en permanence accès à des doses d'insémination sans risques sanitaires. Cependant, malgré une bonne qualité de sperme frais, 20% des éjaculats équins ne supportent pas la congélation (Vidament, 2005). Le but de cette présentation est de revoir la physiologie du spermatozoïde et d'en discuter les implications dans le contexte de la congélation. Les améliorations des techniques de congélation présentes ou à venir seront aussi évoquées.

SPERMATOZOÏDE, SPERMATOGENESE, CAPACITATION ET FECONDATION DE LA SPERMATOGENESE A L'EJACULATION

Dans le testicule, les spermatogonies sont situées le long de la membrane basale des tubes séminifères et vont migrer vers la lumière de ces tubes au cours de leur différenciation (Amann, 1993; Senger, 2005). Au cours de la phase de prolifération, les spermatogonies se divisent par mitoses pour renouveler les cellules souches et produire des spermatogonies B et des spermatocytes I. Ensuite, les deux divisions méiotiques les feront passer au stade spermatocyte II et spermatide (Senger, 2005). La phase de différenciation va ensuite permettre aux spermatides d'acquérir leur forme et leurs fonctions (Senger, 2005). Dans le testicule équin, la formation d'un spermatozoïde dure 57 jours (Senger, 2005).

Le spermatozoïde séjourne transite 12 jours dans l'épididyme (Amann, 1993; Amann and Graham, 1993). Durant ce transit, la membrane de la tête va être recouverte de protéines et de carbohydrates indispensables à la capacitation (Amann, 1993; Senger, 2005; Gadella et al., 2008). Dans la tête de l'épididyme, les spermatozoïdes sont immobiles, infertiles et une gouttelette cytoplasmique proximale est présente (Amann, 1993; Senger, 2005). Dans le corps de l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité et leur fertilité (Senger, 2005). Chez le cheval, les spermatozoïdes récoltés dans l'épididyme peuvent être congelés (Braun et al., 1994). Dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes sont fertiles et la gouttelette cytoplasmique est distale (Amann, 1993; Braun et al., 1994; Senger, 2005).

Seuls les spermatozoïdes présents dans la partie distale de l'épididyme sont éjaculés. Lors des préliminaires sexuels, ils sont envoyés jusqu'à l'urètre pelvien où ils seront stockés avant l'éjaculation (Amann, 1993; Senger, 2005). Le plasma séminal est produit par l'épididyme, les glandes séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales (Amann, 1993). La membrane cytoplasmique de la tête va être recouverte par des protéines et des carbohydrates du plasma séminal (Gadella et al., 2008).

Le sperme équin est naturellement grisâtre et filamenteux quand la fraction gel (glandes bulbo-urétrales) n'est pas filtrée (Pickett, 1993a). Le volume de l'éjaculat d'un étalon est compris entre 60 et 100ml, mais dépend de l'âge, de la saison, de la fréquence des récoltes et de l'excitation (Magistrini et al., 1987; Sieme et al., 2004). Un étalon éjacule en moyenne 11 milliards de spermatozoïdes, selon la fréquence et la répétition des récoltes. La concentration moyenne en spermatozoïdes est de 288 millions par ml.

LE SPERMATOZOÏDE

Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée pour accomplir sa mission: transporter l'information génétique dans le tractus génital femelle et la délivrer à l'intérieur de l'ovocyte. Morphologiquement, le spermatozoïde des mammifères est divisé en deux parties (Senger, 2005) : la tête : comprenant l'acrosome et le noyau cellulaire et la queue ou flagelle : comprenant la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale.

La membrane cytoplasmique constitue la barrière avec le milieu extérieur. La membrane cytoplasmique du spermatozoïde n'est pas homogène mais est divisée en de nombreux microdomaines (mosaïque) où des protéines spécifiques sont fixées (Gadella, 2008a). De nature lipidique, elle peut être modifiée par le milieu avec lequel des échanges sont possibles (Ricker et al., 2006; Gadella, 2007; 2008b). Elle est sensible aux dommages causés par la congélation et des Formes Activées de l'oxygène (FAO) (Brinsko et al., 2003; Neild et al., 2003; Neild et al., 2005).

Classiquement, la tête est décrite comme comprenant trois parties : l'acrosome, le noyau et le chapeau nucléaire (Senger, 2005). La capacitation du spermatozoïde dans le tractus génital femelle va provoquer une élimination des protéines de la membrane et une réorganisation des territoires de la membrane (Gadella, 2008b). L'acrosome est une vésicule située à l'avant du noyau qui permet la lyse de la zone pellucide grâce à des enzymes hydrolytiques (Senger, 2005). La congélation provoque des

lésions de l'acrosome (Blottner et al., 2001; Schembri et al., 2002; Thomas et al., 2006). Le noyau comprend le matériel génétique mâle et représente donc le message à délivrer. Chez le cheval, la présence de FAO, lors du processus de congélation (Wang et al., 1997), entraîne la fragmentation de l'ADN du noyau (Baumber et al., 2003; Baumber et al., 2005).

La queue est décrite comme comprenant trois parties : la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. La pièce intermédiaire est élargie par des mitochondries disposées en hélice autour de l'hélice fibreuse qui recouvre l'axonème central (Amann and Graham, 1993; Senger, 2005). Chez le cheval, il a été montré que la congélation provoque une diminution de l'activité mitochondriale (Schober et al., 2007). La pièce principale est composée de l'axonème central. La pièce terminale ne comprend que la fin des fibres de flagelle (Amann and Graham, 1993; Senger, 2005).

TECHNIQUES DE CONGELATION DU SPERME

Chez le cheval (Figure 1), le sperme est récolté à l'aide d'un vagin artificiel. La fraction gel est extraite par filtration. Après un spermogramme, le sperme est dilué une première fois (premier extender, sans glycérol). Les tubes sont ensuite centrifugés à température ambiante (Vidament et al., 2000) et le surnageant est éliminé. L'utilisation des milieux coussin a permis d'augmenter le pourcentage de récupération des spermatozoïdes après centrifugation : ces milieux permettent d'augmenter l'accélération et le temps de centrifugation sans provoquer de lésions du spermatozoïde (Waite et al., 2008; Hoogewijs et al., 2010). Lors de la seconde dilution, le second extender contenant l'agent cryoprotecteur est ajouté pour obtenir la concentration désirée (Vidament et al., 2005). La première descente en température équilibre la température du sperme à 4°C pendant 75 minutes. Le sperme est ensuite conditionné en paillettes de 0,5ml. Les paillettes sont refroidies jusque -140°C dans des vapeurs d'azote avec une pente variant entre -40°C et -60°C par minute (selon l'extender utilisé), avant d'être immergées dans l'azote liquide. Pour décongeler, les paillettes sont trempées pendant 30 secondes dans un bain-marie à 37°C (Vidament, 2005). Une paillette est ensuite testée par un spermogramme classique avant la commercialisation.

DETERMINATION DE LA QUALITE DU SPERME EQUIN

Les haras nationaux décrivent une dose de sperme congelé comme contenant plus de 140×10^6 spermatozoïdes progressifs (Vidament, 2005) alors que la World Breeding Federation en demande 250×10^6 . La mobilité progressive dans le sperme congelé doit être supérieure à 35%. Pour atteindre ces objectifs, les contrôles qualité suivant sont mis en place. Selon que le producteur veut définir sa dose de sperme congelé comme étant de 8 paillettes ou de 4 paillettes, il devra, après centrifugation adapter la concentration aux normes fixées, respectivement 100 ou 200×10^6 spermatozoïdes par ml (Vidament et al., 1997; Samper, 2001; Vidament, 2005).

MOBILITE

Les méthodes C.A.S.A. (Computer Assisted Sperm Analysis) permettent de standardiser les examens de mobilité totale et progressive (voir Figure 2, Tableau I). Cependant, le matériel d'analyse (lames) et les réglages de ces machines n'étant pas standardisés, il est difficile de comparer les analyses entre des centres différents (Hoogewijs et al., 2011). La mobilité totale est le pourcentage de spermatozoïdes dont la VAP (Velocity Average Path) est supérieure à 10-15µm/s (Amann and Graham, 1993) ou supérieure à 20µm/s (Vidament, 2005). Après décongélation, la mobilité totale doit approcher les 50% (Vidament, 2005). La mobilité progressive a été initialement définie comme une vitesse est supérieure à 10-15µm/s avec une linéarité égale à 100% (Amann and Graham, 1993). Vidament a défini la mobilité progressive comme une vitesse supérieure à 40µm/s et une linéarité supérieure à 80% (Vidament, 2005). Les chercheurs texans décrivent quant à eux la mobilité progressive comme étant une vitesse supérieures à 30µm/s et une linéarité supérieure à 50% (Brinsko et al., 2003).

EXAMENS MICROSCOPIQUES APRES COLORATION

Diverses colorations, dont le kit rapide Diff-Quick[®], permettent d'observer la morphologie des spermatozoïdes. La proportion de spermatozoïdes anormaux doit être inférieure à 35% (Pickett, 1993b). Les anomalies primaires sont le signe d'une dysfonction de la spermatogenèse tandis que les anomalies secondaires sont l'expression d'erreurs de récolte ou de conservation du sperme (Amann and Graham, 1993; Senger, 2005). L'examen au Diff-Quick[®] permet aussi d'identifier les cellules somatiques provenant de la désquamation du tractus génital ou d'origine inflammatoire.

La nigrosine traverse la membrane des spermatozoïdes morts et les colore (Bjorndahl et al., 2003). Normalement, cette mesure rejoint le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (vivants), soit 50% après décongélation.

NOUVEAUX CONTROLES DE QUALITES

La mobilité n'est pas la seule fonction du spermatozoïde et d'autres paramètres sont actuellement étudiés : l'intégrité de l'acrosome (Neild et al., 2003), l'intégrité de l'ADN (Baumber et al., 2003; Baumber et al., 2005), la fonction mitochondriale (Baumber et al., 2000; Schober et al., 2007), l'intégrité membranaire (Neild et al., 2003) et les indices morphométriques (Gravance et al., 1997). La cytométrie de flux permet de standardiser ces examens avec des sondes marquant différenciellement (selon leur statut indemne ou endommagé) les principales parties du spermatozoïde (Varner, 2008).

RESULTATS, LIMITES ET PERSPECTIVES EN REPRODUCTION EQUINE

PREDICTION DE LA CONGELABILITE

En médecine humaine, plusieurs marqueurs de la congélabilité ont été étudiés. Chez l'homme, la fluidité des membranes (Giraud et al., 2000), la concentration en glutathion et l'expression des gènes de la Glutathion Peroxydase (GPx) 1 et 4 (Meseguer et al., 2004) sont des marqueurs de la congélabilité du sperme humain. La coloration du spermatozoïde frais à l'Annexine V, un marqueur d'intégrité membranaire, influence négativement la qualité du sperme après congélation (Sion et al., 2004). Chez le cheval, la congélabilité du sperme ne peut être pronostiquée à partir des tests de routine. Récemment, les marqueurs apoptotiques visualisés en cytométrie de flux dans le sperme frais ont été corrélés à une mauvaise qualité de sperme après décongélation (Ortega-Ferrusola et al., 2009).

AMELIORATION DES EXTENDERS

Actuellement, les extenders équinés sont préparés avec du lait ou des protéines micellaires de lait, du jaune d'œuf et du glycérol (Pillet et al., 2010). Cependant, la nature et la concentration des milieux est discutée.

Le glycérol est l'agent cryoprotecteur classiquement utilisé. Chez le cheval, la concentration maximale est de 3,5% (Vidament et al., 2005), ce qui est bas, comparativement aux autres espèces. Le diméthyl sulfoxyde a été testé chez le cheval, mais le sperme était de moindre qualité après décongélation (Squires et al., 2004). Les phosphatidylcholines, des lipides utilisés comme cryoprotecteurs, ont montré de bons résultats en décongélation chez le cheval (Ricker et al., 2006). Le remplacement du glycérol par des agents protéiques (Prathalingam et al., 2006) ou à base d'acides aminés (Alvarenga et al., 2005) a donné des résultats encourageants et ces derniers sont déjà incorporés dans des milieux commerciaux comme le Botu Cryo® (Alvarenga et al. 2005).

Pour des raisons financières, les extenders utilisés en Médecine Vétérinaire sont majoritairement d'origine animale. Leur amélioration vise à adapter leur contenu en ions, protéines, hydrates de carbones et lipides afin d'assurer aux spermatozoïdes un base nutritionnelle et de les protéger des effets de la congélation et de l'oxydation. La membrane cytoplasmique pouvant intégrer des molécules hydrophobes, la composition lipidique de l'extender est déterminante (Gadella, 2007). Par exemple, l'ajout de cholestérol a amélioré la qualité du sperme après décongélation (Moore et al., 2005). D'autres études ont permis de séparer et de déterminer la concentration idéale en Low Density Lipoproteins du plasma de jaune d'œuf (Pillet et al., 2010). En andrologie humaine, les extenders ne contiennent souvent plus de protéines animales, mais des études avec des extenders sans protéines animales ont résulté en une qualité inférieure de sperme réfrigéré chez l'étalon (Woelders et al., 2007).

AMELIORATION DE LA TECHNIQUE DE CONGELATION

Lors de la première descente en température, la centrifugation à 4°C semble diminuer la qualité du sperme après décongélation si l'on compare à celle effectuée 25°C (Vidament et al., 2000). Les vitesses de congélation sont remises en cause : en se basant sur les propriétés physico-chimiques du spermatozoïde, les courbes théoriques sont supérieures à -100°C/min (Curry et al., 1994), ce qui, en pratique, entraînerait une destruction de la plupart des spermatozoïdes. La vitesse optimale en présence de cryoprotecteur est de -60°C/min (Devireddy et al., 2002). Actuellement, des modèles mathématiques prenant en compte l'osmolarité, la concentration en agent cryoprotectant et les températures de formation de glace intracellulaire sont établis pour créer des courbes de descente en température spécifiques.

La vitrification est une technique de congélation avec des descentes en température plus rapide mais dans un milieu très riche en agent cryoprotecteur (Bagchi et al., 2008). Les concentrations recommandées pour ces protocoles sont trop élevées pour le sperme équin.

IMPLICATION DES FORMES ACTIVEES DE L'OXYGENE (FAO)

Depuis quelques années, la recherche en andrologie se focalise sur les FAO. Ces molécules hautement réactives ont des effets délétères sur la mobilité progressive, l'intégrité des membranes et

l'ADN du spermatozoïde (Wang et al., 1997; Baumber et al., 2000; Baumber et al., 2003). La production de ces molécules apparaît augmenter lors du passage à 4°C avant congélation (Wang et al., 1997). L'origine des FAO est multiple : la voie intrinsèque correspond à la production endogène par le spermatozoïde et la voie extrinsèque est la majeure contributrice à la production de FAO du sperme par les cellules inflammatoire, principalement les neutrophiles (Henkel et al., 2005). Récemment, une voie alternative a été mise en évidence chez l'étalon : la myéloperoxidase (MPO), une enzyme des neutrophiles, est présente dans le sperme, mais elle semble être liée au débris cellulaires présents dans le sperme (Ponthier et al., 2010a). Sa concentration dans le sperme congelé influence négativement sa mobilité après la décongélation (Ponthier et al., 2010a; Ponthier et al., 2010b). Les traitements anti-oxydants à large spectre comme les vitamine E et C ont donné des résultats contradictoires chez le cheval et l'humain. Des études récentes sur des inhibiteurs spécifiques de la MPO comme le resveratrol et la curcumine ont quant à eux montré des effets positifs sur la qualité du sperme après décongélation (Jang et al., 2009; Branco et al., 2010; Bucak et al., 2010), indiquant l'intérêt d'une inhibition ciblée des sources de FAO.

CONCLUSIONS

Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée dont la fonction est de transporter et de délivrer le message génétique mâle dans le tractus génital femelle. Le spermatozoïde assure plusieurs missions : déplacement, protection du matériel génétique et pénétration du gamète femelle.

La conservation du sperme demande la mise au point de critères standardisés permettant de déterminer les lésions subies lors du conditionnement. Cependant, les critères d'appréciation des spermatozoïdes sont arbitraires : actuellement, seules la mobilité et la viabilité sont prises en compte et les critères de définition ne sont pas harmonisés. De plus, la capacité du gamète mâle à apporter un matériel génétique en bon état au sein du gamète femelle n'est pas déterminée lors des analyses de routine.

Dans l'avenir, l'amélioration des techniques de conservation du sperme reposera sur plusieurs points. Le diagnostic des lésions subies par le spermatozoïde lors des processus de conservation doit être affiné et les méthodes de prévention adaptées. De plus, l'amélioration des propriétés physico-chimiques des milieux de congélation devrait permettre de mieux nourrir le spermatozoïde et de prévenir les lésions de congélation ou d'oxydation, le tout en évitant l'emploi de composants potentiellement toxiques pour le spermatozoïde.

BIBLIOGRAPHIE

- Alvarenga, M.A., Papa, F.O., Landim-Alvarenga, F.C., Medeiros, A.S., 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci* 89, 105-113.
- Amann, R.P., 1993. Physiology and endocrinology, In: McKinnon A.O., V.J.L. (Ed.), *Equine Reproduction*, Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 658-685.
- Amann, R.P., Graham, J.K., 1993. Spermatozoal function, In: McKinnon, A.O., Voss, J.L. (Eds.), *Equine Reproduction*, Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 715-745.
- Bagchi, A., Woods, E.J., Critser, J.K., 2008. Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. *Expert Rev Med Devices* 5, 359-370.
- Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V., Davies-Morel, M.C., 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl* 21, 895-902.
- Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., 2005. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res* 66, 772-779.
- Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., Meyers, S.A., 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* 24, 621-628.
- Bjorndahl, L., Soderlund, I., Kvist, U., 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod* 18, 813-816.
- Blottner, S., Warnke, C., Tuchscherer, A., Heinen, V., Torner, H., 2001. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim Reprod Sci* 65, 75-88.
- Branco, C.S., Garcez, M.E., Pasqualotto, F.F., Erdtman, B., Salvador, M., 2010. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology* 60, 235-237.

Braun, J., Sakai, M., Hochi, S., Oguri, N., 1994. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology* 41, 809-818.

Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Rigby, S.L., Love, C.C., Varner, D.D., 2003. Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. *Theriogenology* 59, 735-742.

Bucak, M.N., Sariozkan, S., Tuncer, P.B., Sakin, F., Atessahin, A., Kulaksiz, R., Cevik, M., 2010. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Res.* 89, 24-30.

Curry, M.R., Millar, J.D., Watson, P.F., 1994. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. *Biol Reprod* 51, 1014-1021.

Devireddy, R.V., Swanlund, D.J., Olin, T., Vincente, W., Troedsson, M.H., Bischof, J.C., Roberts, K.P., 2002. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol Reprod* 66, 222-231.

Gadella, B.M., 2007. Gamete Membran Biology: What is Required for Mammalian Fertilization and How is this challenged during Gamete Processing? *Reproduction in Domestic Animals* 42, 63.

Gadella, B.M., 2008a. The Assembly of a Zona Pellucida Binding Protein Complex in Sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 12-19.

Gadella, B.M., 2008b. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science* 107, 229-236.

Gadella, B.M., Tsai, P.S., Boerke, A., Brewis, I.A., 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol* 52, 473-480.

Giraud, M.N., Motta, C., Boucher, D., Grizard, G., 2000. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 15, 2160-2164.

Gravance, C.G., Champion, Z., Liu, I.K., Casey, P.J., 1997. Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. *Anim Reprod Sci* 47, 149-155.

Henkel, R., Kierspel, E., Stalf, T., Mehnert, C., Menkveld, R., Tinneberg, H.R., Schill, W.B., Kruger, T.F., 2005. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 83, 635-642.

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

Hoogewijs, M., Rijsselaere, T., De Vlieghe, S., Vanhaesebrouck, E., De Schauwer, C., Govaere, J., Thys, M., Hoflack, G., Van Soom, A., de Kruif, A., 2010. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology* 74, 118-126.

Jang, H.Y., Kim, Y.H., Cheong, H.T., Kim, J.T., Park, I.C., Park, C.K., Yang, B.K., 2009. Curcumin Attenuates Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress on Semen Characteristics during In Vitro Storage of Boar Semen. *Reproductive and Developmental Biology* 33, 99-105.

Magistrini, M., Chanteloube, P., Palmer, E., 1987. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *J Reprod Fertil Suppl* 35, 127-133.

Meseguer, M., Garrido, N., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J., 2004. Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *J Androl* 25, 773-780.

Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K., 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51, 241-249.

Neild, D.M., Brouwers, J.F., Colenbrander, B., Aguero, A., Gadella, B.M., 2005. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 72, 230-238.

Neild, D.M., Gadella, B.M., Chaves, M.G., Miragaya, M.H., Colenbrander, B., Aguero, A., 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59, 1693-1705.

Ortega-Ferrusola, C., Garcia, B.M., Gallardo-Bolanos, J.M., Gonzalez-Fernandez, L., Rodriguez-Martinez, H., Tapia, J.A., Pena, F.J., 2009. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 114, 393-403.

Pickett, B.W., 1993a. Factors affecting sperm production and output, In: McKinnon A.O., V.J.L. (Ed.), *Equine Reproduction*, Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 689-704.

- Pickett, B.W., 1993b. Reproductive Evaluation of the stallion, In: McKinnon A.O., V.J.L. (Ed.), *Equine Reproduction*, Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 755-768.
- Pillet, E., Duchamp, G., Batellier, F., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M., 2010. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*.
- Ponthier, J., de la Rebiere de Pouyade, G., Desvals, M., Spalart, M., Franck, T., Serteyn, D., Deleuze, S., 2010a. Is neutrophil elastase associated with myeloperoxidase concentration and post-thawing parameters in equine frozen semen? *Anim Reprod Sci* 121S, S200-S202.
- Ponthier, J., Franck, T., Dettelleux, J., Mottart, E., Serteyn, D., Deleuze, S., 2010b. Association between Myeloperoxidase Concentration in Equine Frozen Semen and Post-Thawing Parameters. *Reprod Domest Anim* 45, 811-816.
- Prathalingam, N.S., Holt, W.V., Revell, S.G., Mirczuk, S., Fleck, R.A., Watson, P.F., 2006. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology* 66, 1894-1900.
- Ricker, J.V., Linfor, J.J., Delfino, W.J., Kysar, P., Scholtz, E.L., Tablin, F., Crowe, J.H., Ball, B.A., Meyers, S.A., 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol Reprod* 74, 359-365.
- Samper, J.C., 2001. Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Anim Reprod Sci* 68, 219-228.
- Schembri, M.A., Major, D.A., Suttie, J.J., Maxwell, W.M., Evans, G., 2002. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Reprod Fertil Dev* 14, 225-233.
- Schober, D., Aurich, C., Nohl, H., Gille, L., 2007. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology* 68, 745-754.
- Senger, P.L., 2005. Pathways to pregnancy and parturition, Pullman,.
- Sieme, H., Katila, T., Klug, E., 2004. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 61, 769-784.
- Sion, B., Janny, L., Boucher, D., Grizard, G., 2004. Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa. *Int J Androl* 27, 108-114.
- Squires, E.L., Keith, S.L., Graham, J.K., 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62, 1056-1065.
- Thomas, A.D., Meyers, S.A., Ball, B.A., 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 65, 1531-1550.
- Varner, D.D., 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70, 448-462.
- Vidament, M., 2005. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 89, 115-136.
- Vidament, M., Dupere, A.M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P., Palmer, E., 1997. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48, 907-917.
- Vidament, M., Ecot, P., Noue, P., Bourgeois, C., Magistrini, M., Palmer, E., 2000. Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 54, 907-919.
- Vidament, M., Vincent, P., Yvon, J.M., Bruneau, B., Martin, F.X., 2005. Glycerol in semen extender is a limiting factor in the fertility in asine and equine species. *Anim Reprod Sci* 89, 302-305.
- Waite, J.A., Love, C.C., Brinsko, S.P., Teague, S.R., Salazar, J.L., Jr., Mancill, S.S., Varner, D.D., 2008. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology* 70, 704-714.
- Wang, A.W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D.J., Loughlin, K.R., 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49, 921-925.
- Woelders, H., Zuidberg, C.A., Hiemstra, S.J., 2007. Fresh storage and cryopreservation of stallion semen. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 71.

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Processus de congélation de la semence équine

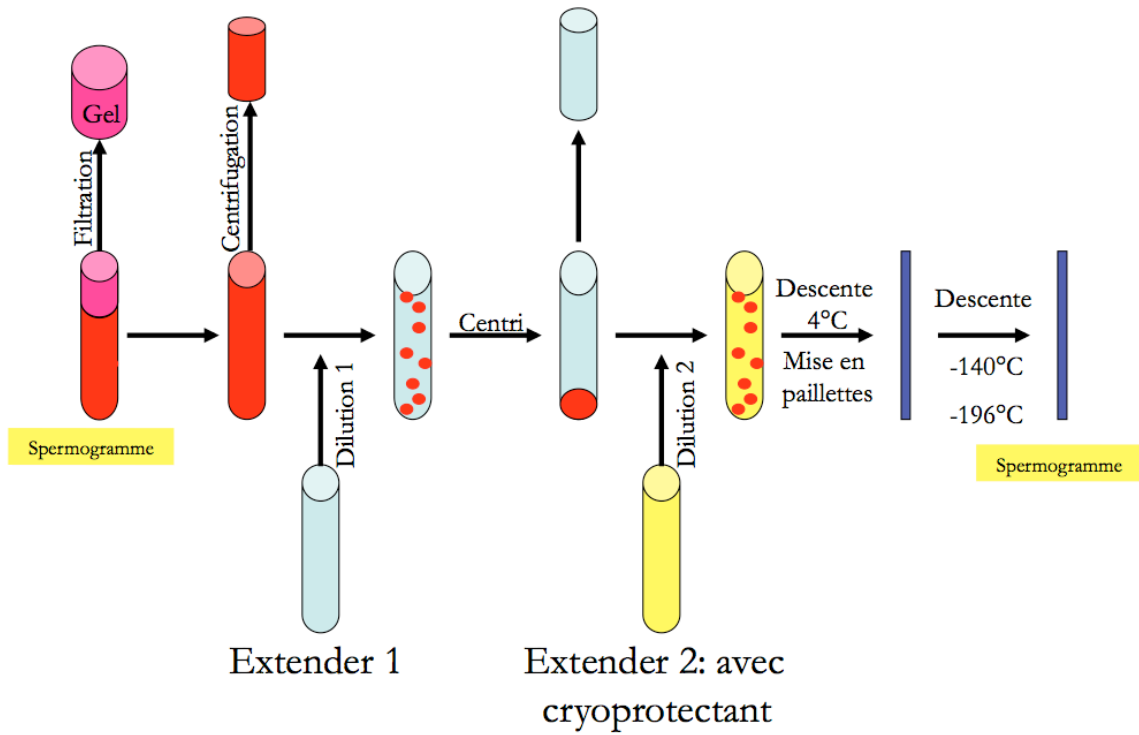


Figure 2 : Définition de la mobilité du spermatozoïde par les analyseurs automatisés de sperme

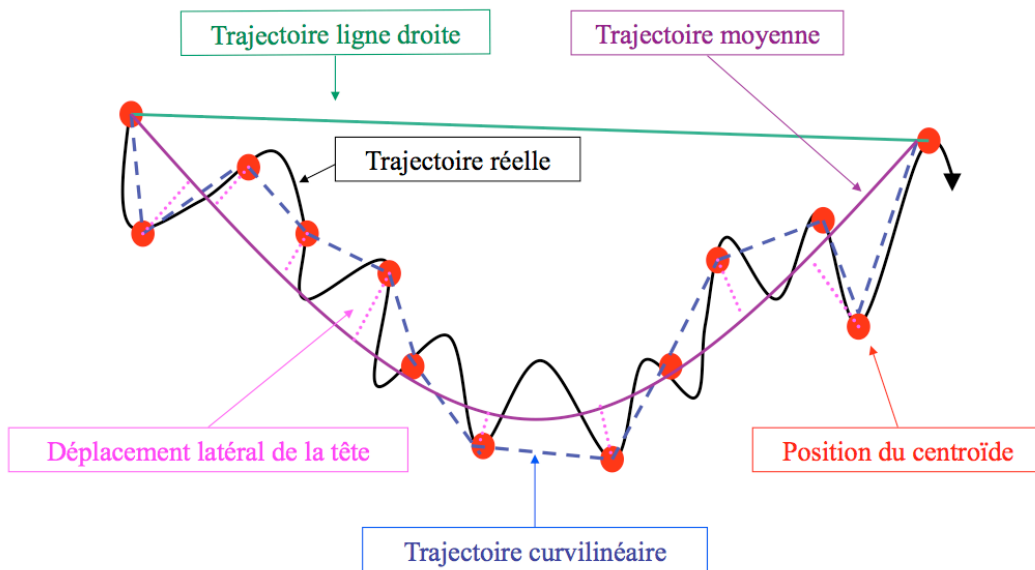


Tableau I : Définitions des trajectoires des spermatozoïdes d'après Amann et Graham (1993)

Paramètre	Abréviation	Définition
Vitesse de la trajectoire curvilinéaire	VCL (Velocity Curvilinear)	Vitesse de la trajectoire entre centroïdes dans un intervalle de temps défini
Vitesse de la trajectoire moyenne	VAP (Velocity Average Path)	Vitesse de la trajectoire lissée entre n positions du centroïde par intervalle de n temps
Vitesse de la trajectoire en ligne droite	VSL (Velocity Straightline)	Vitesse de la trajectoire entre 2 positions du centroïdes pris entre n intervalle de temps
Linéarité	LN (Linearity)	VSL/VCL
Rectitude	STR (Staightness)	VSL/VAP
Oscillation	WOB (Wobble)	VAP/VCL