

Congélation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives

PONTHIER J.^{1,3}, VAN DEN BERGHE F.¹, PARRILLA-HERNANDEZ S.^{1,3}, HANZEN C.², DELEUZE S.^{1,3}

¹ Pathologie de la Reproduction des Animaux de Compagnie et Equidés, Clinique des Animaux de Compagnie et des Equidés,

² Thériogénologie des Ruminants, Clinique des Animaux de Production, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, bâtiment B41, Boulevard de Colonster, 20, 4000 Liège, Belgique ;

³ Linalux – Mont-Le-Soie, Centre européen du Cheval, 5590 Ciney, Belgique.

Correspondance : Dr J. Ponthier – Email : Jerome.Ponthier@ulg.ac.be

RÉSUMÉ : Le but de cette revue est de décrire les techniques de congélation de la semence équine. Un rappel résumera la formation du spermatozoïde dans le testicule, son anatomie et sa physiologie en insistant sur les structures lésées pendant le processus de congélation et décongélation. Les techniques de congélation du sperme seront ensuite résumées dans différentes espèces et comparées avec celles utilisées pour la semence équine. Les critères actuels de qualité seront définis pour le sperme avant et après congélation en insistant sur la mobilité totale, progressive et les différentes définitions de ces concepts dans la littérature. Les autres méthodes d'analyse comme la cytométrie de flux seront présentées ainsi que leurs intérêts cliniques. Les prochains développements et progrès dans le domaine de la congélation seront enfin envisagés : la prédiction de la qualité du sperme congelé à partir du sperme frais, l'amélioration des dilueurs et la lutte contre les formes activées de l'oxygène.

1. INTRODUCTION

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

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

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

Face à ces faits, la recherche s'oriente actuellement dans plusieurs direc- tions. Une première approche vise à optimiser le milieu de congélation (ou *extender*) (Vidament *et al.*, 2001 ; 2005 ; Squires, 2005 ; Morrell, 2006 ; Pillet *et al.*, 2008 ; 2010). La recherche s'intéresse aussi aux méthodes de des- cence en température, pour diminuer les lésions cellulaires dues au froid (Nawroth *et al.*, 2002 ; Isachenko *et al.*, 2003 ; 2005). Une autre approche est la détermination de l'origine des lé- sions subies par le spermatozoïde lors de la congélation. Actuellement, les formes activées de l'oxygène (FAO) (*reactive oxygen species*), des com- posés hautement réactifs interagissant avec différentes molécules, sont parti-

culièrement mises en cause en andro- logie humaine et vétérinaire (Wang *et al.*, 1997a ; Ball *et al.*, 2001 ; Aitken et Baker, 2004 ; Morrell, 2006).

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

2. NOTIONS DE CRYOBIOLOGIE

La congélation des cellules a pour but de réduire leur métabolisme cellulaire au maximum afin d'augmenter leur durée de conservation. Cependant, l'exposition des cellules au froid leur fait courir trois types de danger : le choc thermique qui entraîne la déna- turation de certaines protéines, la cris- tallisation intracellulaire qui provoque

des lésions des organelles et la déshydratation intracellulaire qui entraîne la dénaturation de certaines protéines et l'accumulation de composés toxiques (Graham, 2011).

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

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

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

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

Le spermatozoïde est une cellule contenant relativement peu d'eau par rapport aux autres cellules, ce qui limite la formation de glace intracellulaire, mais l'expose aussi rapidement aux dangers liés à la déshydratation cellulaire et à la dénaturation des protéines. La connaissance de l'anatomie et de la physiologie du spermatozoïde permet de comprendre quelles structures sont sensibles aux effets de la congélation.

3. SPERMATOZOÏDES, SPERMATOGENÈSE, CAPACITATION ET FÉCONDATION

3.1. Le spermatozoïde

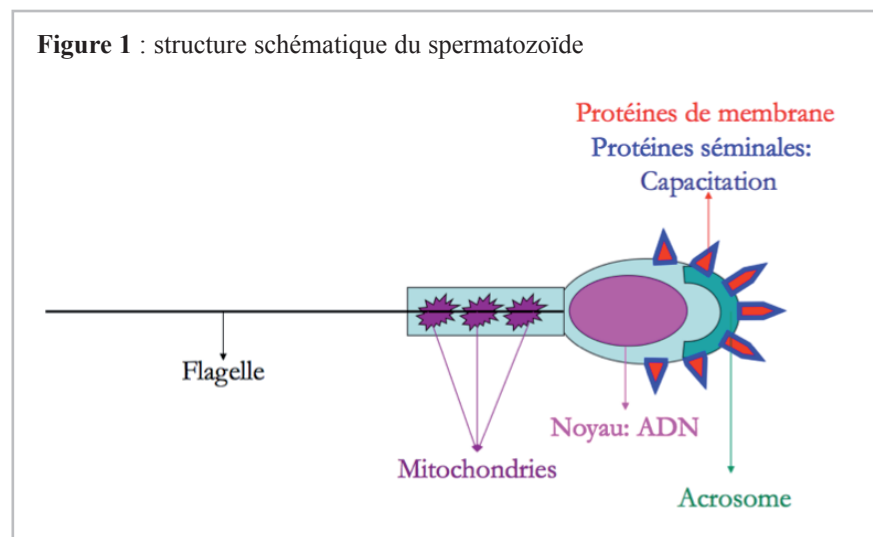
Le spermatozoïde transporte l'information génétique dans le tractus génital femelle et la délivre à l'intérieur de l'ovocyte. Afin d'accomplir cette mission, le spermatozoïde est hautement différencié. La taille et la forme du spermatozoïde varient entre espèces (Senger, 2005). Chez l'étalon, il mesure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

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

spécifiques sont fixées (Senger, 2005 ; Lopez *et al.*, 2007 ; Boerke *et al.*, 2008 ; Gadella, 2008b). De nature lipidique, la membrane peut être modifiée par le milieu où se trouve le spermatozoïde avec lequel des échanges sont possibles, comme par exemple avec le cholestérol (Moore *et al.*, 2005a ; Oliveira *et al.*, 2010). Chez le cheval, le bovin et l'homme, la membrane est sensible aux dommages causés par la congélation (Barthelemy *et al.*, 1990 ; Blotner *et al.*, 2001 ; Bollwein *et al.*, 2008). Les FAO semblent induire des lésions de la membrane lipidique lors du processus de congélation chez l'homme (Wang *et al.*, 1997c), le bovin (Köss *et al.*, 2007) et le cheval (Neild *et al.*, 2005 ; Ortega Ferrusola *et al.*, 2009a), même si des modèles de production *in vitro* de FAO n'ont pas augmenté la peroxydation des membranes du spermatozoïde équin (Baumber *et al.*, 2000).

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

Figure 1 : structure schématique du spermatozoïde



réactions acrosomiales prématurées (Barthelemy *et al.*, 1990 ; Schembri *et al.*, 2002).

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

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

3.2. De la spermatogenèse à l'éjaculation

Dans le testicule équin, la formation d'un spermatozoïde dure 57 jours (Senger, 2005 ; Amann et Graham, 2011). Les spermatogonies sont situées le long de la membrane basale des tubes séminifères. Au cours de leur différenciation, elles vont être conduites vers la lumière de ces tubes par les cellules de Sertoli (Senger, 2005).

Au cours de la spermatocytogenèse, ou phase de prolifération, les spermatogonies se divisent par mitoses pour arriver au stade spermatogonie B ou renouveler le stock de cellules souches. Les spermatogonies B subissent une division mitotique pour passer au stade spermatocyte I. Le stade spermatocyte II sera atteint

après la première division méiotique (réductionnelle) et la seconde division méiotique (équationnelle) les amènera au stade spermatide (Senger, 2005 ; Amann, 2011). La différenciation ou spermiogenèse va ensuite permettre aux spermatides d'acquies leur forme et leurs fonctions (Senger, 2005 ; Amann, 2011). Elle se divise en 4 étapes : la phase de Golgi (formation de l'acrosome par l'appareil de Golgi), la phase de chapeau (élongation de l'acrosome autour du noyau et début de l'organisation du flagelle), la phase acrosomale (allongement du cytoplasme et du noyau), la phase de maturation (mise en place du flagelle et du manchon de mitochondries de la pièce intermédiaire) (Senger, 2005 ; Amann, 2011).

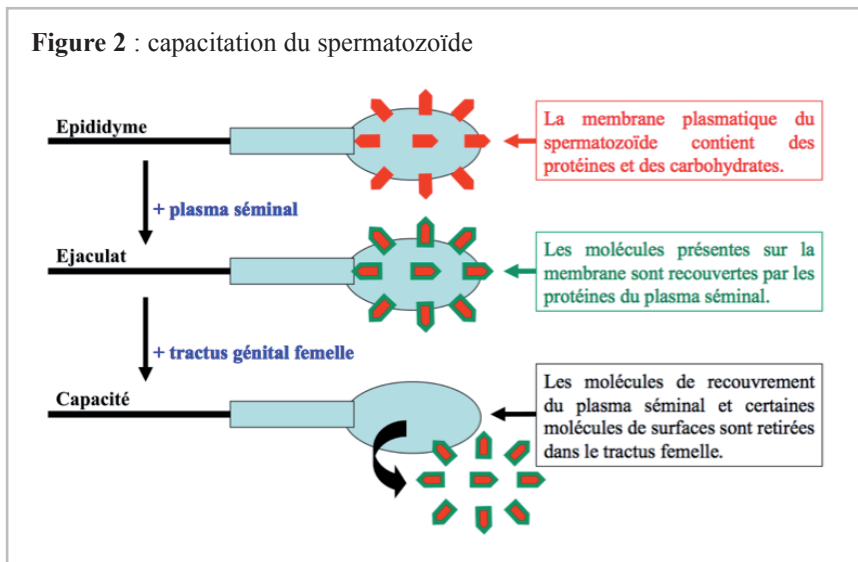
La différenciation terminée, lors de la spermiation, le spermatide est libéré dans le tube séminifère par les cellules de Sertoli. Les tubes séminifères se collectent dans le *rete testis*, puis dans les canaux efférents avant d'entrer dans l'épididyme (Amann, 2011). Le spermatozoïde équin séjourne au minimum 4,1 jours dans l'épididyme (Senger, 2005 ; Amann, 2011), où des modifications physiologiques et morphologiques vont avoir lieu. Durant ce transit, des protéines et des glucides indispensables à la capacitation vont être inclus à la surface de la membrane de la tête (Senger, 2005 ; Lopez *et al.*, 2007 ; Gadella, 2008b). Le liquide présent à l'entrée de l'épididyme va presque entièrement être réabsorbé et il sera ensuite remplacé par une sécrétion de la partie distale de l'épididyme (Senger, 2005 ; Amann, 2011). Dans la tête de l'épididyme, les spermatozoïdes ne sont ni mobiles, ni fertiles et une gouttelette cytoplasmique proximale est présente (Senger, 2005 ; Amann, 2011). La progression des spermatozoïdes dans l'épididyme ne dépend pas de leur mobilité propre, mais de mouvements de l'épithélium ciliaire et de l'activité musculaire lisse de la paroi (Senger, 2005 ; Suarez, 2006). Dans le corps de l'épididyme, les spermatozoïdes acquies leur mobilité. L'apparition de la mobilité fait suite à l'absorption de carnitine au niveau de la tête de l'épididyme (Senger, 2005 ; Amann, 2011). À ce stade, la gouttelette cytoplasmique se trouve sur l'extrémité distale de la pièce intermédiaire (Braun *et al.*, 1994) et les spermatozoïdes peuvent se lier à l'ovocyte et sont capables de féconder un ovocyte (Sostaric *et al.*, 2008a).

Chez l'humain (Hutchon *et al.*, 1998 ; Bachtell *et al.*, 1999), le chien (Martins *et al.*, 2009) et le cheval (Braun *et al.*, 1994 ; Bachtell *et al.*, 1999), les spermatozoïdes récoltés dans l'épididyme peuvent être congelés. Dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes sont capables de féconder un ovocyte, cet endroit servant de réservoir (Senger, 2005).

Seuls les spermatozoïdes présents dans la partie distale de l'épididyme sont éjaculés. Les préliminaires sexuels provoquant une libération d'ocytocine, les contractions des muscles lisses vont amener les spermatozoïdes jusqu'à l'urètre pelvien où ils seront stockés avant l'éjaculation (Senger, 2005). Le plasma séminal est produit chez l'étalon par l'épididyme, l'ampoule du canal déférent, les glandes séminales, qui produisent la grande majorité du plasma séminal, la prostate et les glandes bulbo-urétrales (Senger, 2005). Dans le plasma séminal, la membrane cytoplasmique de la tête va être recouverte par des protéines et des glucides du plasma séminal (Lopez *et al.*, 2007 ; Gadella, 2008b ; Gadella *et al.*, 2008). La dilution du milieu épididymaire par le plasma séminal va aussi lever l'inhibition de la mobilité des spermatozoïdes (Senger, 2005).

3.3. Capacitation du spermatozoïde et fécondation

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

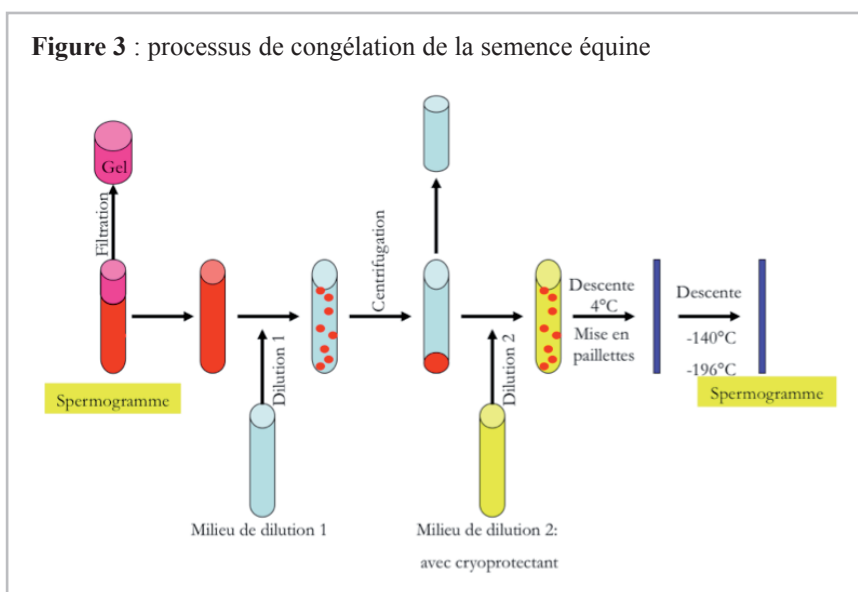


Dans l'oviducte, les mouvements du spermatozoïde augmentent et ne sont plus linéaires. Le spermatozoïde va s'arrimer à des composants spécifiques de la zone pellucide (ZP3) grâce à des zones de liaison présentes sur sa tête (Senger, 2005 ; Amann et Graham, 2011) ; la fixation va activer la réaction acrosomiale.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

4. TECHNIQUES DE CONGÉLATION DU SPERME

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

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



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

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

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

est faible, mais elle nécessite du temps et entraîne de grandes pertes en spermatozoïdes et donc une diminution de la production de paillettes par éjaculat.

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

Le glycérol est l'agent cryoprotecteur le plus utilisé pour congeler du sperme. Alors que les spermatozoïdes humains (Agarwal, 2000), bovins (Baracaldo, 2007) et canins (Farstad, 1998) supportent des concentrations en glycérol entre 6 et 8 % du volume total, la concentration chez le cheval ne devrait idéalement pas dépasser les 3,5 % du volume total (Vidament, 2005 ; Vidament *et al.*, 2005). Récemment, un milieu de congélation ne contenant que 2,5 % de glycérol a été développé et donne de très bons résultats de fertilité observée (Pillet *et al.*, 2008 ; 2011). Un autre milieu de congélation ne contenant que 1 % de glycérol est également disponible et donne de bons résultats de qualité de sperme (Alvarenga *et al.*, 2005). Cependant, ce milieu de congélation contient aussi des amides qui interviennent dans la cryopréservation, portant la concentration totale en agent cryoprotecteur total à 5 % (Alvarenga *et al.*, 2005). Le volume de milieu de congélation nécessaire pour atteindre la concentration finale désirée dans les paillettes est ajouté (Vidament, 2005).

Le premier palier de la descente en température consiste à équilibrer la température du sperme à 4°C pendant 75 minutes (Vidament *et al.*, 2000). Le sperme est ensuite conditionné en paillettes de 0,5 ml (Vidament *et al.*, 2000). Les paillettes sont refroidies

dans un congélateur électronique qui envoie des vapeurs d'azote pour atteindre -140°C, avec une pente variant, selon le milieu de congélation utilisé, entre -20°C et -60°C par minute (Alvarenga *et al.*, 2005 ; Pillet *et al.*, 2008). Les paillettes sont ensuite immergées et stockées dans l'azote liquide (-196°C). Pour les décongeler, les paillettes sont immergées pendant 30 secondes dans un bain-marie à 37°C (Vidament, 2005). Deux paillettes de chaque lot sont ensuite analysées avant la commercialisation.

5. DÉTERMINATION DE LA QUALITÉ DU SPERME ÉQUIN

5.1. Concentration en spermatozoïdes

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

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

Lors du processus de congélation, le culot cellulaire obtenu après centrifugation peut être plus ou moins dilué avec le milieu de congélation. La

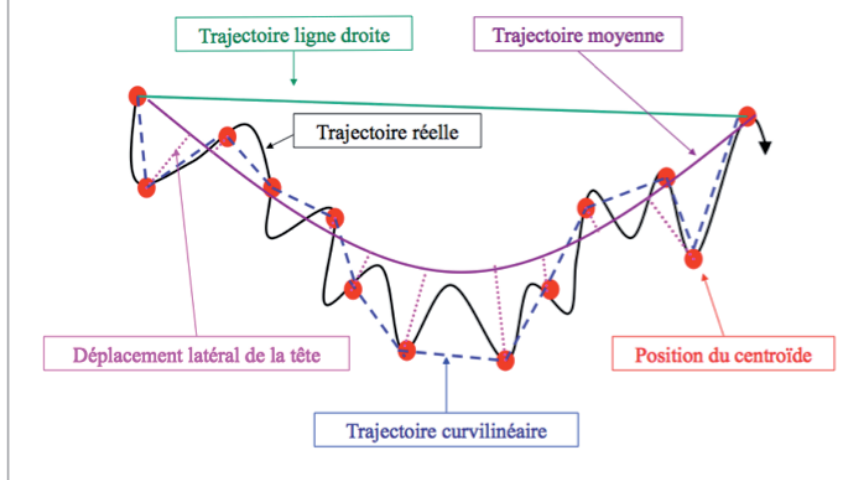
concentration du sperme congelé dépend donc des options de commercialisation choisies lors de la production, mais aussi de la contrainte technique imposée par le milieu de congélation. En effet, si l'on utilise des milieux de congélation contenant de basses concentrations en agent cryoprotecteur, il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

5.2. Mobilité des spermatozoïdes

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

Les méthodes CASA (*computer assisted sperm analysis*) ont permis de standardiser les examens de mobilité totale et progressive dans un même laboratoire et de caractériser le sperme au moyen de plusieurs paramètres définis à la figure 4 et dans le tableau I. Cependant, le matériel d'analyse et les réglages de ces machines n'étant pas standardisés entre laboratoires, il est difficile de comparer les analyses entre des différents centres (Hoogewijs *et al.*, 2011). En effet, ni les vitesses minimales, ni les trajectoires, ni le type de lame et le milieu de dilution utilisés pour l'analyse de mobilité ne

Figure 4 : trajectoires analysées par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (*computer assisted semen analyser, CASA*).



sont définis. L'absence d'un protocole standardisé implique malheureusement de grandes variations dans les résultats d'analyse et donc dans les qualités de sperme commercialisé.

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

totale doit approcher les 50 % (Amann et Graham, 2011). Cependant, dans le sperme frais comme dans le congelé, la mobilité totale est peu prise en compte : les doses sont idéalement définies à partir du nombre de spermatozoïdes progressifs.

La mobilité progressive est définie comme le pourcentage de spermatozoïdes dont la vitesse de la courbe moyenne (*velocity average path*, VAP) est supérieure à 10-15 mm/s avec une rectitude (STR) (rapport de la vitesse linéaire (VSL) sur la vitesse de la courbe moyenne (VAP)) égale à 100 % (Amann et Graham, 2011). Vidament (2005) a défini dans ses conditions d'analyse la mobilité progressive comme la proportion de spermatozoïdes avec une VAP supé-

rieure à 40 $\mu\text{m/s}$ et une rectitude (STR) supérieure à 80 %. D'autres décrivent la mobilité progressive comme étant une VAP supérieure à 30 $\mu\text{m/s}$ et une rectitude (STR) supérieure à 50 % (Brinsko *et al.*, 2003). Idéalement, la mobilité progressive du sperme frais équin est supérieure à 50-60 % (Amann et Graham, 2011).

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

Tableau I : définitions des trajectoires et des paramètres étudiés par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (*computer assisted semen analyser, CASA*)

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

Tableau II : classification de la qualité des doses de sperme congelé proposée par Vidament (2005)

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

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

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

5.3. Examens microscopiques après coloration

L'inactivation du sperme (typiquement au formol) suivi de l'examen en microscopie à contraste de phase permet de déterminer la morphologie des spermatozoïdes sur la lame. Diverses colorations, dont le kit rapide Diff-Quick®, permettent aussi d'observer la morphologie des spermatozoïdes. Chez l'étalon, la proportion de spermatozoïdes anormaux doit être inférieure à 35 % (Amann et Graham, 2011). Les anomalies primaires, comme les anomalies de la tête ou de la pièce intermédiaire, sont le signe d'une dysfonction de la spermatogénèse tandis que les anomalies secondaires, comme les anomalies de la queue ou les gouttelettes distales sont

l'expression d'erreurs de récolte (par exemple, le suremploi de l'étalon, qui mène à l'apparition de gouttelettes cytoplasmiques distales par manque de maturation épидидymaire) ou d'erreurs de conservation du sperme comme un choc thermique (Pickett, 1993 ; Amann et Graham, 2011). Les analyseurs automatiques de sperme permettent aussi d'analyser la morphologie mais les résultats diffèrent encore trop souvent des observations à l'examen visuel (Gravance *et al.*, 1997). L'examen au Diff-Quick® permet en outre d'identifier les cellules d'origine inflammatoire ou les cellules somatiques provenant de la desquamation du tractus génital.

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

5.4. Nouveaux contrôles de qualité

Les contrôles de qualité actuels reposent sur le postulat qu'un spermato-

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

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

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

6. RÉSULTATS, LIMITES ET PERSPECTIVES EN REPRODUCTION ÉQUINE

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

6.1. Prédiction de la congélabilité

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

En médecine humaine, plusieurs marqueurs de la congélabilité ont été étudiés. L'élastase, une enzyme contenue dans les neutrophiles est un marqueur de l'inflammation du tractus génital mais pas de la congélabilité (Mania-Pramanik *et al.*, 2004 ; Eggert-Kruse *et al.*, 2008). Le HOST (*hypo-osmotic swelling test*), un test évaluant l'intégrité de la membrane plasmique basé sur l'entrée d'eau dans le spermatozoïde en milieu hypo-osmotique, ne semble pas corrélé aux caractéristiques observées après décongélation (Chan *et al.*, 1990 ; Volpes *et al.*, 1992). Cependant, des résultats inverses ont été obtenus lors d'une étude postérieure (Aribarg *et al.*, 1995). La fluidité des membranes est un marqueur de la congélabilité du sperme humain (Giraud *et al.*, 2000). Plus récemment, l'intégrité et la symétrie membranaire ont été déterminées par une technique simple de marquage du spermatozoïde frais à l'annexine V, détectable en cytométrie de flux (Sion

et al., 2004). Le marquage des spermatozoïdes frais par l'annexine V est négativement corrélé à la qualité du sperme après congélation (Sion *et al.*, 2004). La concentration en glutathion et l'expression des gènes de la glutathion peroxydase (GPx) 1 et 4, enzymes réduisant l'activité des FAO, sont un pronostic de la congélabilité du sperme humain (Meseguer *et al.*, 2004), mais le dosage d'ARN messagers spécifiques à la GPx est difficilement utilisable en pratique quotidienne. L'intégrité membranaire et le statut antioxydant semblent donc jouer un rôle déterminant dans le processus de congélation et sur la qualité du sperme congelé. Actuellement, les causes et implications physiopathologiques de ces marqueurs observées dans le sperme frais sur la qualité du sperme congelé sont inconnues et leur utilisation reste empirique. De plus, même si ces facteurs de congélabilité sont établis chez l'humain, ils sont difficilement accessibles pour les centres zootechniques.

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

après décongélation était mauvaise (Ortega Ferrusola *et al.*, 2009b), permettant de prédire la congélabilité. Les études par coloration spécifique des organites du spermatozoïde sont en plein essor, mais actuellement, peu de centres zootechniques disposent de ce matériel et ces analyses manquent aussi d'harmonisation entre équipes.

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

6.2. Amélioration de la technique de congélation

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

L'étape de refroidissement et d'équilibration à 4°C a été étudiée chez le cheval. Par exemple, la centrifugation à 4°C semble diminuer la qualité du sperme après décongélation si on la compare à celle effectuée 25°C (Vidament *et al.*, 2000 ; Knop *et al.*, 2005). Il a aussi été montré qu'après une centrifugation à 25°C, le refroidissement à 4°C pendant 12 heures avant la congélation pouvait être bénéfique pour la mobilité en décongélation (Crockett *et al.*, 2001). L'allongement de la phase d'équilibration de la température à 4°C semble donc permettre une meilleure survie des spermatozoïdes à la congélation.

Les courbes de congélation sont aussi discutées : diverses modifications des vitesses de descente en température et des paliers de descente ont été testées. En se basant sur des propriétés physico-chimiques du spermatozoïde comme la taille, le volume et la composition des membranes cellulaires, les courbes théoriques de descentes en température obtenues chez l'humain et le béliar sont supérieures à -100°C/min (Curry *et al.*, 1994), ce qui entrainerait en pratique une destruction de la plupart des spermatozoïdes. De nouveaux modèles mathématiques prennent en compte l'osmolarité, la concentration en agent cryoprotecteur et les températures de formation de glace intracellulaire

(Devireddy *et al.*, 2002 ; Thirumala *et al.*, 2003 ; Woelders et Chaveiro, 2004). La vitesse optimale sans agent cryoprotecteur semble être de $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$, alors qu'en présence de cryoprotecteur, elle est de $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ chez le cheval et le chien (Devireddy *et al.*, 2002 ; Thirumala *et al.*, 2003 ; Woelders et Chaveiro, 2004). Ces modèles mathématiques incluant les données physico-chimiques du spermatozoïde et de son milieu sont actuellement mis en place pour tenter de définir des courbes de descente en température spécifiques à chaque type de sperme (Devireddy *et al.*, 2002 ; Thirumala *et al.*, 2003 ; Woelders et Chaveiro, 2004).

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

6.3. Amélioration des milieux de congélation

Le choix du milieu de congélation chez l'étalement est critique pour la production de paillettes équinnes. Plusieurs facteurs interviennent : la concentration et la nature de l'agent cryoprotecteur ainsi que les caractéristiques physico-chimiques du milieu. Actuellement, les milieux de dilution du sperme équin sont classiquement préparés avec du lait ou des protéines micellaires de lait et différentes proportions de jaune d'œuf et de glycérol (Vidament *et al.*, 2001).

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

selon l'espèce : chez l'homme : 7,5 % (Agarwal, 2000) ; chez le bovin : 7 % (Baracaldo, 2007) et entre 6 et 8 % chez le chien (Farstad, 1998). Chez le cheval, la concentration maximale est de 3,5 % (Vidament *et al.*, 2005). La toxicité du glycérol réside dans son faible passage à travers les membranes cellulaires, entraînant un choc osmotique pour le spermatozoïde (Ball et Vo, 2001 ; Squires *et al.*, 2004). Le spermatozoïde du cheval et du porc supportant très mal les variations osmotiques, des agents cryoprotecteurs traversant plus facilement les membranes ont été étudiés (Squires *et al.*, 2004). Le DMSO a été étudié chez le cheval, mais le sperme était de moindre qualité après décongélation (Ball et Vo, 2001). Les propriétés cryoprotectrices de certains lipides, les phosphatidylcholines (Ricker *et al.*, 2006), d'agents protéiques (Prathalingam *et al.*, 2006) et de certaines amines (Squires *et al.*, 2004 ; Alvarenga *et al.*, 2005) et de la glutamine (Khlifaoui *et al.*, 2005) ont donné de bons résultats de qualité après décongélation. Les amines ont déjà partiellement remplacé le glycérol dans certains milieux de congélation commerciaux équinns comme le BotuCryo® (Alvarenga *et al.*, 2005).

Actuellement, en médecine vétérinaire, les milieux de congélation utilisent des composés d'origine animale comme le lait ou le jaune d'œuf pour des raisons économiques et de disponibilité. L'étude de leur formulation vise à adapter leur contenu en protéines, glucides et lipides afin d'assurer aux spermatozoïdes une base nutritionnelle et de protéger les membranes des effets de la congélation. Par exemple, de manière anecdotique, l'effet de l'addition de jaune d'œuf de canard a amélioré la qualité après décongélation par rapport au jaune d'œuf de poule (Clulow *et al.*, 2007). D'autres études se sont penchées sur les facteurs nécessaires à la congélation : la membrane cytoplasmique pouvant intégrer des molécules hydrophobes, la composition lipidique du milieu de congélation est déterminante (Gadella, 2007). Cependant, la vitesse et la proportion des échanges lipidiques entre le milieu et la membrane cytoplasmique du spermatozoïde doivent être pris en compte (Gadella, 2007). Par exemple, l'ajout de cholestérol au premier milieu de congélation a amélioré la qualité du sperme après décongélation (Moore *et al.*, 2005a).

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

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

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

6.4. Implication des formes activées de l'oxygène

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

L'origine des FAO dans le sperme est multiple : chez l'humain, la voie

de production dite intrinsèque correspond à la production endogène par le spermatozoïde et la voie extrinsèque correspond à la production de FAO par les cellules inflammatoires, principalement les neutrophiles (Henkel *et al.*, 2005). La voie extrinsèque semble être la principale source de FAO dans le sperme humain (Henkel, 2005). Récemment, une voie alternative, liée aux débris cellulaires présents dans le sperme, a été mise en évidence chez l'étalon (Ponthier *et al.*, 2008 ; 2010a ; 2010b ; 2012) : la myéloperoxydase (MPO), une enzyme produite par les neutrophiles, est présente dans le sperme, et elle est associée aux débris cellulaires présents dans le sperme en l'absence de neutrophiles. Sa concentration dans le sperme congelé influence négativement les paramètres de qualité après la décongélation (Ponthier *et al.*, 2008 ; 2010a ; 2010b ; 2012).

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

Alors que les effets antioxydants à large spectre se révèlent variables et parfois décevants, les études récentes

sur des inhibiteurs spécifiques de la MPO comme le resveratrol et la curcumine ont quant à eux montré des effets positifs sur la qualité du sperme humain, ovin et porcin après décongélation (Jang *et al.*, 2009 ; Branco *et al.*, 2010 ; Bucak *et al.*, 2010), indiquant qu'une inhibition ciblée des sources de FAO pourrait améliorer la situation.

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

7. CONCLUSIONS

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

permettrait de garantir la qualité des doses commercialisées.

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

SUMMARY

EQUINE SEMEN FREEZING: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES.

Aim of this paper is to review equine semen freezing procedures. Spermatozoa formation inside the testis, spermatozoa anatomy and physiology will be summarized, highlighting structures and/or functions impaired during freezing/thawing process. New freezing procedures will be detailed and discussed. Current quality standards will be defined for fresh and thawed semen with a special attention on total and progressive motilities and different definitions of these parameters in literature. New ways of semen analysis (such as flow cytometry) will be discussed for their scientific and clinical implications. Future developments and progress in freezing methods will be exposed, such as prediction of post-thaw semen quality on fresh semen basis, improvement of freezing extenders and prevention of reactive oxygen species effects.

BIBLIOGRAPHIE

AGARWAL A. Semen banking in patients with cancer: 20-year experience. *Int. J. Androl.*, 2000, **23** : Suppl 2, 16-19.

AITKEN R.J., BAKER M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2004, **16**, 581-588.

AKINOLA L.A., ASHIRU A.O. Effect of cryoprotective media and freezing techniques on human semen preservation. *West Afr. J. Med.*, 1993, **12**, 166-169.

ALVARENGA M.A., PAPA F.O., LANDIM-ALVARENGA F.C., MEDEIROS A.S. Amides as

cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim. Reprod. Sci.*, 2005, **89**, 105-113.

AMANN R.P. Physiology and endocrinology. In : McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. (Eds), *Equine reproduction*. 2nd edition. Wiley-Blackwell : Oxford, 2011, 881-908.

- AMANN R.P., GRAHAM J.K. Spermatozoal function. In : McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. (Eds), Equine reproduction. 2nd edition. Wiley-Blackwell : Oxford, 2011, 1053-1085.
- AMIRAT L., TAINTURIER D., JEANNEAU L., THORIN C., GERARD O., COURTENS J.L., ANTON M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 2004, **61**, 895-907.
- ARIBARG A., SUKCHAROEN N., CHANPRASIT Y., NGEAMVIJAWAT J. Prediction of post-thaw sperm motility and sperm cryosurvival rate using the pre-freeze sperm parameters. *J. Med. Assoc. Thai.*, 1995, **78**, 474-480.
- BACHTELL N.E., CONAGHAN J., TUREK P.J. The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 1999, **14**, 3048-3051.
- BAGCHIA., WOODS E.J., CRISTER J.K. Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. *Expert Rev. Med. Devices*, 2008, **5**, 359-370.
- BALL B.A., VO A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.*, 2001, **22**, 1061-1069.
- BALL B.A., VO A.T., BAUMBER J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 508-515.
- BARACALDO M.I. Steps for freezing bovine semen: from semen collection to the liquid nitrogen tank. [en ligne] (2007) Adresse URL : http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2007/baracaldo_et_at_2007.pdf, consulté le 02/04/2014.
- BARTHELEMY C., ROYERE D., HAMMAHAH S., LEBOS C., THARANNE M.J., LANSAC J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Arch. Androl.*, 1990, **25**, 29-40.
- BAUMBER J., BALL B.A., GRAVANCE C.G., MEDINA V., DAVIES-MOREL M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.*, 2000, **21**, 895-902.
- BAUMBER J., BALL B.A., LINFOR J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am. J. Vet. Res.*, 2005, **66**, 772-779.
- BAUMBER J., BALL B.A., LINFOR J.J., MEYERS S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J. Androl.*, 2003, **24**, 621-628.
- BECCAGLIA M., ANASTASI P., CHIGIONI S., LUVONI G.C. Tris-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. *Reprod. Domest. Anim.*, 2009, **44**, 345-349.
- BITTMAR A., KOSINIAK K. The role of selected biochemical components of equine seminal plasma in determining suitability for deep-freezing. *Arch. Vet. Pol.*, 1992, **32**, 17-29.
- BJORNDAHL L., SODERLUND I., KVIST U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum. Reprod.*, 2003, **18**, 813-816.
- BLOM E., BIRCH-ANDERSEN A. The ultrastructure of a characteristic spermhead-defect in the boar: the SME-defect. *Andrologia*, 1975, **7**, 199-209.
- BLOTTNER S., WARNKE C., TUCHSCHERER A., HEINEN V., TORNER H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim. Reprod. Sci.*, 2001, **65**, 75-88.
- BOERKE A., TSAI P.S., GARCLAGILN., BREWIS I.A., GADELLA B.M. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology*, 2008, **70**, 1188-1196.
- BOLLWEIN H., FUCHS I., KOESS C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, 2008, **43**, 189-195.
- BRANCO C.S., GARCEZ M.E., PASQUALOTTO F.F., ERDTMAN B., SALVADOR M. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 2010, **60**, 235-237.
- BRAUN J., SAKAI M., HOCHI S., OGURI N. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology*, 1994, **41**, 809-818.
- BRINSKO S.P., BLANCHARD T.L., RIGBY S.L., LOVE C.C., VARNER D.D. Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. *Theriogenology*, 2003, **59**, 735-742.
- BREININGER E., BEORLEGUI N.B., O'FLAHERTY C.M., BECONI M.T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameter in cryopreserved boar

- semen. *Theriogenology*, 2005, **63**, 2126-2135.
- BROTHERTON J. Cryopreservation of human semen. *Arch. Androl.*, 1990, **25**, 181-195.
- BUCAK M.N., SARIOZKAN S., TUNCER P.B., SAKIN F., ATESSAHIN A., KULAKSIZ R., CEVIK M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Res.*, 2010, **89**, 24-30.
- CHAN S.Y., CRAFT I.L., CHAN Y.M., LEONG M.K., LEUNG C.K. The hypoosmotic swelling test and cryosurvival of human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1990, **5**, 715-718.
- CLULOW J.R., MAXWELL W.M., EVANS G., MORRIS L.H. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Aust. Vet. J.*, 2007, **85**, 232-235.
- CORMIER N., SIRARD M.A., BAILEY J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.*, 1997, **18**, 461-468.
- CROCKETT E.C., GRAHAM J.K., BRUEMMER J.E., SQUIRES E.L. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology*, 2001, **55**, 793-803.
- CURRY M.R., MILLAR J.D., WATSON P.F. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. *Biol. Reprod.*, 1994, **51**, 1014-1021.
- DAELS P.F. New techniques of artificial insemination in the mare. In : Belgian Equine Practitioners Society (Ed.), Proceedings de la 20^e journée d'étude de la Belgian Equine Practitioners Society, Bruxelles, 5 novembre 2003, 2003.
- DEFOIN L., GRANADOS A., DONNAY I. Analysing motility parameters on fresh bull semen could help to predict resistance to freezing: a preliminary study. *Reprod. Domest. Anim.*, 2008, **43**, 606-611.
- DEVIREDDY R.V., SWANLUND D.J., OLIN T., VINCENTE W., TROEDSSON M.H., BISCHOF J.C., ROBERTS K.P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol. Reprod.*, 2002, **66**, 222-231.
- EDMOND A.J., TEAGUE S.R., BRINSKO S.P., COMERFORD K.L., WAITE J.A., MANCILL S.S., LOVE C.C., VARNER D.D. Effect of density-gradient centrifugation on quality and recovery rate of equine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008, **107**, 318-318.
- EGGERT-KRUSE W., ZIMMERMANN K., GEISSLER W., EHRMANN A., BOIT R., STROWITZKI T. Clinical relevance of polymorphonuclear (PMN-) elastase determination in semen and serum during infertility investigation. *Int. J. Androl.*, 2008, **32**, 317-329.
- EROKHIN A.S., EVTUKH V.P. Effects of Dry Soya-Lecithin (Sternpur PC) on survival of boar spermatozoa after cooling and freezing. *Reprod. Domest. Anim.*, 2007, **42** : Suppl 2, 88.
- ESTEVEZ S.C., SPAINE D.M., CEDENHO A.P., SROUGI M. Effects of the technique of cryopreservation and dilution/centrifugation after thawing on the motility and vitality of spermatozoa of oligoasthenozoospermic men. *Int. Braz. J. Urol.*, 2003, **29**, 133-140.
- EVENSON D., JOST L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci.*, 2000, **22**, 169-189.
- FARSTAD W. Mating and Artificial Insemination in the dog. In : Simpson G., England G., Harvey M. (Eds), Manual of small animal reproduction and neonatology. British Small Animal Veterinary Association : Cheltenham, 1998, 95-104.
- GADELLA B.M. Gamete membrane technology: What is required for mammalian fertilization and how is this challenged during gamete processing? *Reprod. Domest. Anim.*, 2007, **42** : Suppl 2, 62-63.
- GADELLA B.M. The assembly of a zona pellucida binding protein complex in sperm. *Reprod. Domest. Anim.*, 2008a, **43**, 12-19.
- GADELLA B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008b, **107**, 229-236.
- GADELLA B.M., TSAI P.S., BOERKE A., BREWIS I.A. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int. J. Dev. Biol.*, 2008, **52**, 473-480.
- GILMORE J.A., LIU J., WOODS E.J., PETER A.T., CRITSER J.K. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum. Reprod.*, 2000, **15**, 335-343.
- GIRAUD M.N., MOTTA C., BOUCHER D., GRIZARD G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 2000, **15**, 2160-2164.
- GLANDER H.J., SCHALLER J., LADUSCH M. Eine einfache Methode zur Separierung von frischen und kryokonservierten Humanspermien mittels einer Dextran-Visotrast-Dichtegradientenzentrifugation. *Zentralbl. Gynakol.*, 1990, **112**, 91-97.
- GRAHAM K.J. Principles of cryopreservation. In : McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. (Eds), Equine reproduction.

- 2nd edition. Wiley-Blackwell : Oxford, 2011, 2959-2963.
- GRAVANCE C.G., CHAMPION Z., LIU I.K., CASEY P.J. Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. *Anim. Reprod. Sci.*, 1997, **47**, 149-155.
- HENKEL R. The impact of oxidants on sperm function. *Andrologia*, 2005, **37**, 205-206.
- HENKEL R., KIERSPEL E., STALF T., MEHNERT C., MENKVELD R., TINNEBERG H.R., SCHILL W.B., KRUGER T.F. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil. Steril.*, 2005, **83**, 635-642.
- HOLT W.V. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1997, **9**, 309-319.
- HOOGEWIJS M., DE VliegHER S., DE SCHAUWER C., GOVAERE J., SMITS K., HOFLACK G., DE KRUIF A., VAN SOOM A. Validation and usefulness of the sperm quality analyzer V equine for equine semen analysis. *Theriogenology*, 2011, **75**, 189-194.
- HOOGEWIJS M., RIJSSELAERE T., DE VliegHER S., VANHAESEBROUCK E., DE SCHAUWER C., GOVAERE J., THYS M., HOFLACK G., VAN SOOM A., DE KRUIF A. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology*, 2010, **74**, 118-126.
- HOSSAIN A.M., OSUAMKPE C.O. Sole use of sucrose in human sperm cryopreservation. *Arch. Androl.*, 2007, **53**, 99-103.
- HUTCHON S., THORNTON S., HALL J., BISHOP M. Frozen-thawed epididymal sperm is effective for intracytoplasmic sperm injection: implications for the urologist. *Br. J. Urol.*, 1998, **81**, 607-611.
- IRVINE D.S., TWIGG J.P., GORDON E.L., FULTON N., MILNE P.A., AITKEN R.J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J. Androl.*, 2000, **21**, 33-44.
- ISACHENKO E., ISACHENKO V., KATKOV, II, DESSOLE S., NAWROTH F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod. Biomed. Online*, 2003, **6**, 191-200.
- ISACHENKO E., ISACHENKO V., KATKOV, II, RAHIMI G., SCHONDORF T., MALLMANN P., DESSOLE S., NAWROTH F. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum. Reprod.*, 2004, **19**, 932-939.
- ISACHENKO V., ISACHENKO E., MONTAG M., ZAEVA V., KRIVOKHARCHENKO I., NAWROTH F., DESSOLE S., KATKOV, II, VAN DER VEN H. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online*, 2005, **10**, 350-354.
- JANG H.Y., KIM Y.H., CHEONG H.T., KIM J.T., PARK I.C., PARK C.K., YANG B.K. Curcumin attenuates hydrogen peroxide induced oxidative stress on semen characteristics during in vitro storage of boar semen. *Reprod. Dev. Biol.*, 2009, **33**, 99-105.
- JOHANSSON C.S., MATSSON F.C., LEHN-JENSEN H., NIELSEN J.M., PETERSEN M.M. Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin-nigrosin stain. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008, **107**, 325-326.
- KARESKOSKI A.M., REILAS T., SANKARI S., ANDERSSON M., KATILA T. Composition of fractionated stallion ejaculates. *Anim. Reprod. Sci.*, 2005, **89**, 228-230.
- KHLIFAOU M., BATTUT I., BRUYAS J.F., CHATAGNON G., TRIMECHEA., TAINTURIER D. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology*, 2005, **63**, 138-149.
- KNOP K., HOFFMANN N., RATH D., SIEME H. Evaluation of slow cooling after centrifugation and glycerol addition at 22 degrees C versus direct freezing of semen in stallions with good and poor sperm longevity. *Anim. Reprod. Sci.*, 2005, **89**, 299-302.
- KOBAYASHI T., KANEKO S., HARA I., PARK Y.J., SATO H., OHNO T., NOZAWA S. Concentrating human sperm before cryopreservation. *Andrologia*, 1991, **23**, 25-28.
- KÖSS C., JANETT F., BOLLWEIN H. Effects of different extenders on production of reactive oxygen species and lipid peroxidation of cryopreserved bovine sperm. *Reprod. Domest. Anim.*, 2007, **42** : Suppl 2, 80.
- KUTZLER M.A. Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 2005, **64**, 747-754.
- LEEB H., RENNHOFFER G. Ueber die Beurteilung der Vitalität menschlicher Spermien mit der Eosin-Nigrosin-Färbung nach Blom. *Wien. Med. Wochenschr.*, 1954, **104**, 877-878.
- LINDE-FORSBERG C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 1991, **21**, 467-485.
- LOOMIS P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 2006, **22**, 663-676.
- LOPEZ M.L., OLEA N., RETAMAL C.A. Post-testicular changes in the density and distribution of intramembrane particles of stallion sperm surface domains. *Anim. Reprod. Sci.*, 2007, **100**, 204-210.

- MAGISTRINI M., CHANTELOUBE P., PALMERE. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1987, **35**, 127-133.
- MANIA-PRAMANIK J., POTDAR S.S., VADIGOPPULA A., SAWANT S. Elastase: a predictive marker of inflammation and/or infection. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2004, **18**, 153-158.
- MARTINS M.I., PADILHA L.C., SOUZA F.F., LOPES M.D. Fertilizing capacity of frozen epididymal sperm collected from dogs. *Reprod. Domest. Anim.*, 2009, **44**: Suppl 2, 342-344.
- MESEGUER M., GARRIDO N., SIMON C., PELLICER A., REMOHI J. 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.*, 2004, **25**, 773-780.
- MICHAEL A., ALEXOPOULOS C., PONTIKI E., HADJIPAVLOU-LITINA D., SARATSIS P., BOSCOS C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 2007, **68**, 204-212.
- MILLER D. Spermatozoal RNA as reservoir, marker and carrier of epigenetic information: implications for cloning. *Reprod. Domest. Anim.*, 2007, **42** : Suppl 2, 2-9.
- MOORE A.I., SQUIRES E.L., GRAHAM J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 2005a, **51**, 241-249.
- MOORE A.I., SQUIRES E.L., GRAHAM J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 2005b, **63**, 2372-2381.
- MORRELL J.M. Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod. Domest. Anim.*, 2006, **41**, 63-67.
- NAWROTH F., ISACHENKO V., DESSOLE S., RAHIMI G., FARINA M., VARGIU N., MALLMANN P., DATTENA M., CAPOBIANCO G., PETERS D., ORTH I., ISACHENKO E. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo Letters*, 2002, **23**, 93-102.
- NEILD D.M., BROUWERS J.F., COLENBRANDER B., AGUERO A., GADELLA B.M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 2005, **72**, 230-238.
- NIJS M., OMBELET W. Cryopreservation of human sperm. *Hum. Fertil. (Camb.)*, 2001, **4**, 158-163.
- NUNEZ-MARTINEZ I., MORAN J.M., PENA F.J. Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *Int. J. Androl.*, 2007, **30**, 182-189.
- OLIVEIRA C.H., VASCONCELOS A.B., SOUZA F.A., MARTINS-FILHO O.A., SILVA M.X., VARAGO F.C., LAGARES M.A. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010, **118**, 194-200.
- ORTEGA FERRUSOLA C., GONZALEZ FERNANDEZ L., MORRELL J.M., SALAZAR SANDOVAL C., MACIAS GARCIA B., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., TAPIA J.A., PENA F.J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*, 2009a, **138**, 55-63.
- ORTEGA FERRUSOLA C., GARCIA B.M., GALLARDO BOLANOS J.M., GONZALEZ FERNANDEZ L., RODRIGUEZ MARTINEZ H., TAPIA J.A., PENA F.J. Apoptotic markers can be used to forecast the freezability of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 2009b, **114**, 393-403.
- PASQUALOTTO F.F., SHARMA R.K., NELSON D.R., THOMAS A.J., AGARWAL A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil. Steril.*, 2000, **73**, 459-464.
- PAZ G., YOGEV L., GOTTREICH A., ROTEM R., YAVETZ H., HOMONNAI Z.T. The use of an electric freezer in human semen banking. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1991, **38**, 141-144.
- PEGG D.E. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Hum. Fertil. (Camb.)*, 2005, **8**, 231-239.
- PENA A., LINDE-FORSBERG C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 2000, **54**, 859-875.
- SQUIRES E.L., PICKETT B.W. Factors affecting sperm production and output. In : McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. (Eds), Equine reproduction. 2nd edition. Wiley-Blackwell : Oxford, 2011, 689-704.
- PICKETT B.W. Reproductive evaluation of the stallion. In : McKinnon A.O., Voss J.L. (Eds), Equine reproduction. Williams & Wilkins : Philadelphia, 1993, 755-768.
- PILLET E., BATELLIER F., DUCHAMP G., FURSTOSS V., LE VERN Y., KERBOEUF D., DESHERCES S., SCHMITT E., MAGISTRINI M. High fertility rates with stallion sperm cryopreserved in INRA96 based extender are not predicted by in vitro parameters. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008, **107**, 339-340.

- PILLET E., DUCHAMP G., BATELLIER F., BEAUMAL V., ANTON M., DESHERCES S., SCHMITT E., MAGISTRINI M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, 2011, **75**, 105-114.
- PONTHIER J., DE LA REBIERE DE POUYADE G., DESVALS M., SPALART M., FRANCK T., SERTEYN D., DELEUZE S. Is neutrophil elastase associated with myeloperoxidase concentration and post-thawing parameters in equine frozen semen? *Anim. Reprod. Sci.*, 2010a, **121S**, S200-S202.
- PONTHIER J., FRANCK T., DETILLEUX J., MOTTART E., SERTEYN D., DELEUZE S. Association between myeloperoxidase concentration in equine frozen semen and post-thawing parameters. *Reprod. Domest. Anim.*, 2010b, **45**, 811-816.
- PONTHIER J., DESVALS M., FRANCK T., DE LA REBIERE DE POUYADE G., SPALART M., PALMER E., SERTEYN D., DELEUZE S. Myeloperoxidase in equine semen: concentration and localization during freezing processing. *J. Equine Vet. Sci.*, 2012, **32**, 32-37.
- PONTHIER J., FRANCK T., MOTTART E., SERTEYN D., DELEUZE S. Equine frozen semen parameters in relation with total myeloperoxidase concentration. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008, **107**, 40-41.
- PONTHIER J., TEAGUE S.R., FRANCK T., DE LA REBIERE DE POUYADE G., SERTEYN D., BRINSKO S.P., LOVE C.C., BLANCHARD T.L., VARNER D.D., DELEUZE S. Effect of non-sperm cells removal with density gradient centrifugations on Myeloperoxidase concentration in post-thaw equine semen. *Theriogenology*, 2013, **80**, 1082-1087.
- PRATHALINGAM N.S., HOLT W.V., REVELL S.G., MIRCZUK S., FLECK R.A., WATSON P.F. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*, 2006, **66**, 1894-1900.
- RICKER J.V., LINFOR J.J., DELFINO W.J., KYSAR P., SCHOLTZ E.L., TABLIN F., CROWE J.H., BALL B.A., MEYERS S.A. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol. Reprod.*, 2006, **74**, 359-365.
- ROYERE D., BARTHELEMY C., HAMAMAH S., LANSAC J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum. Reprod. Update*, 1996, **2**, 553-559.
- SAID T.M., AZIZ N., SHARMA R.K., LEWIS-JONES I., THOMAS A.J., JR., AGARWAL A. Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. *Asian J. Androl.*, 2005, **7**, 121-126.
- SALAZAR J.L., HAYDEN S.S., WAITE J.A., COMERFORD K.L., EDMOND A.J., TEAGUE S.R., LOVE C.C., VARNER D.D. Effect of cryopreservation protocol on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008, **107**, 347-348.
- SAMPER J.C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2001, **68**, 219-228.
- SCHAFFER-SOMI S., KLUGER S., KNAPP E., KLEIN D., AURICH C. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, 2006, **66**, 173-182.
- SCHEMBRI M.A., MAJOR D.A., SUTTIE J.J., MAXWELL W.M., EVANS G. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2002, **14**, 225-233.
- SCHOBER D., AURICH C., NOHL H., GILLE L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 2007, **68**, 745-754.
- SENGER P.L. Pathways to pregnancy and parturition. *Current Conceptions* : Pullman, 2005, 373 p.
- SIEME H., KATILA T., KLUG E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology*, 2004, **61**, 769-784.
- SION B., JANNY L., BOUCHER D., GRIZARD G. Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 2004, **27**, 108-114.
- SOSTARIC E., AALBERTS M., GADELLA B.M., STOUT T.A.E. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008a, **107**, 237-248.
- SOSTARIC E., DIELEMAN S.J., VAN DE LEST C.H.A., COLENBRANDER B., VOS P.L.A.M., GARCIA-GIL N., GADELLA B.M. Sperm binding properties and secretory activity of the bovine oviduct immediately before and after ovulation. *Mol. Reprod. Dev.*, 2008b, **75**, 60-74.
- SQUIRES E.L. Integration of future biotechnologies into the equine industry. *Anim. Reprod. Sci.*, 2005, **89**, 187-198.
- SQUIRES E.L., KEITH S.L., GRAHAM J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 2004, **62**, 1056-1065.
- THIRUMALA S., FERRER M.S., AL-JARRAH A., EILTS B.E., PACCAMONTI D.L., DEVIREDDY R.V. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology*, 2003, **47**, 109-124.

- THOMAS A.D., MEYERS S.A., BALL B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 2006, **65**, 1531-1550.
- TORRES-BOGGINO F., SATO K., OKA A., KANNO Y., HOCHI S., OGURI N., BRAUN J. Relationship among seminal characteristics, fertility and suitability for semen preservation in draft stallions. *J. Vet. Med. Sci.*, 1995, **57**, 225-229.
- VARELA A.S., CORCINI C.D., ULGUIM R.R., ALVARENGA M.V.F., BIANCHI I., CORREA M.N., LUCIA T., DESCHAMPS J.C. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2009, **115**, 323-327.
- VARNER D.D. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, 2008, **70**, 448-462.
- VIDAMENT M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2005, **89**, 115-136.
- VIDAMENT M., DUPERE A.M., JULIENNE P., EVAÏN A., NOUE P., PALMER E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 1997, **48**, 907-917.
- VIDAMENT M., ECOT P., NOUE P., BOURGEOIS C., MAGISTRINI M., PALMER E. Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 2000, **54**, 907-919.
- VIDAMENT M., VINCENT P., YVON J.M., BRUNEAU B., MARTIN F.X. Glycerol in semen extender is a limiting factor in the fertility in asine and equine species. *Anim. Reprod. Sci.*, 2005, **89**, 302-305.
- VIDAMENT M., YVON J.M., COUTY I., ARNAUD G., NGUEKAM-FEUGANG J., NOUE P., COTTRON S., LE TELLIER A., NOEL F., PALMER E., MAGISTRINI M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim. Reprod. Sci.*, 2001, **68**, 201-218.
- VOLPES A., SAMMARTANO F., COFFARO F., GUIDA S., SCAGLIONE P., ALLEGRA A. Is it possible to use the hypoosmotic swelling test as criteria for "freezability" of human semen in an AID program? *Acta Eur. Fertil.*, 1992, **23**, 191-194.
- WAITE J.A., LOVE C.C., BRINSKO S.P., TEAGUE S.R., SALAZAR J.L., JR., MANCILL S.S., VARNER D.D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology*, 2008, **70**, 704-714.
- WANG A., FANNING L., ANDERSON D.J., LOUGHLIN K.R. Generation of reactive oxygen species by leukocytes and sperm following exposure to urogenital tract infection. *Arch. Androl.*, 1997a, **39**, 11-17.
- WANG A.W., ZHANG H., IKEMOTO I., ANDERSON D.J., LOUGHLIN K.R. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, 1997b, **49**, 921-925.
- WANG Y., SHARMA R.K., AGARWAL A. Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. *Urology*, 1997c, **50**, 409-413.
- WOELDERS H., CHAVEIRO A. Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes. *Cryobiology*, 2004, **49**, 258-271.
- WOELDERS H., ZUIDBERG C.A., HIEMSTRA S.J. Fresh storage and cryopreservation of stallion semen. *Reprod. Domest. Anim.*, 2007, **42** : Suppl 2, 71.
- ZAVOS P.M., SOFIKITIS N., TODA T., MIYAGAWA I. Improvements in qualitative characteristics of cryopreserved human spermatozoa following recovery via the SpermPrep II filtration method. *Tohoku J. Exp. Med.*, 1991, **165**, 283-290.