

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2022 - Thèse n° 007

**UTILISATION D'UN GRADIENT DE DENSITÉ SUR
LA SEMENCE D'ÉTALON LORS D'INFERTILITÉ**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 10 juin 2022
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

PABIOU Margot

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2022 - Thèse n° 007

**UTILISATION D'UN GRADIENT DE DENSITÉ SUR
LA SEMENCE D'ÉTALON LORS D'INFERTILITÉ**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 10 juin 2022
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

PABIOU Margot

Liste des enseignants

Mme	ABITBOL	Marie	Professeur
M.	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Mme	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Mme	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Mme	BECKER	Claire	Maître de conférences
Mme	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Mme	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
M.	BENOIT	Etienne	Professeur
M.	BERNY	Philippe	Professeur
Mme	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
M.	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
M.	BRUTO	Maxime	Maître de conférences Stagiaire
M.	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
M.	BUFF	Samuel	Professeur
M.	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
M.	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
M.	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Mme	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
M.	CHABANNE	Luc	Professeur
Mme	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
M.	CHAMEL	Gabriel	Maître de conférences
M.	CHETOT	Thomas	Maître de conférences Stagiaire
Mme	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Maître de conférences
Mme	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
Mme	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Mme	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
M.	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences
M.	GALIA	Wessam	Maître de conférences
M.	GILLET	Benoit	AERC
Mme	GILLOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
M.	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Mme	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Mme	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
Mme	JOSSON-SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
M.	JUNOT	Stéphane	Professeur
M.	KODJO	Angeli	Professeur
Mme	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Mme	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Mme	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Mme	LE GRAND	Dominique	Professeur
Mme	LEBLOND	Agnès	Professeur
Mme	LEDOUX	Dorothée	Maître de conférences
M.	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Mme	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences
M.	LEGROS	Vincent	Maître de conférences
M.	LEPAGE	Olivier	Professeur
Mme	LOUZIER	Vanessa	Professeur
M.	LURIER	Thibaut	Maître de conférences Stagiaire
M.	MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences Stagiaire
M.	MARCHAL	Thierry	Professeur
Mme	MOSCA	Marion	Maître de conférences
M.	MOUNIER	Luc	Professeur
Mme	PEROZ	Carole	Maître de conférences
M.	PIN	Didier	Professeur
Mme	PONCE	Frédérique	Professeur
Mme	PORTIER	Karine	Professeur
Mme	POUZOT-NEVORET	Céline	Maître de conférences
Mme	PROUILLAC	Caroline	Professeur
Mme	REMY	Denise	Professeur
Mme	RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
M.	ROGER	Thierry	Professeur
M.	SAWAYA	Serge	Maître de conférences
M.	SCHRAMME	Michael	Professeur
Mme	SERGENTET	Delphine	Professeur
M.	TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Mme	VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
M.	VIGUIER	Eric	Professeur
Mme	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	Chargé d'enseignement contractuel
M.	ZENNER	Lionel	Professeur

Remerciements

A Madame le Professeur Muriel DORET-DION

De l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine de Lyon,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ma thèse, pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail,

Hommages respectueux.

A Madame le Docteur Anne-Cécile LEFRANC-POHL,

De Vetagro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et m'avoir fait l'honneur d'encadrer ce travail,

Pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide précieuse tout au long de l'élaboration de ce travail,

Mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Jean-Luc Cadoré,

De Vetagro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,

Pour avoir accepté de prendre part au jury de cette thèse,

Mes sincères remerciements.

Sommaire

I.	Généralités sur la reproduction des étalons.....	21
A.	L'appareil reproducteur de l'étalon	21
1.	Régulation hormonale de la fonction testiculaire.....	22
2.	Les testicules	23
a)	Les enveloppes des testicules	24
b)	Le parenchyme testiculaire	25
(1)	Les cellules de Leydig	26
(2)	Les cellules de Sertoli	26
c)	Le cordon spermatique	26
d)	La spermatogénèse	27
(1)	La spermatocytogénèse	28
(2)	La méiose.....	29
(3)	La spermiogénèse.....	29
3.	L'épididyme	30
4.	Les glandes sexuelles accessoires	31
a)	La prostate.....	32
b)	Les vésicules séminales	32
c)	Les glandes bulbo-urétrales	32
d)	Les ampoules.....	32
5.	Les conduits spermatiques.....	32
6.	Le pénis.....	33
7.	La maturation des spermatozoïdes.....	34
a)	La capacitation	35
b)	La réaction acrosomique	35
B.	La collecte de la semence.....	36
1.	Examen de l'étalon	36
a)	Anamnèse et commémoratifs.....	36
b)	Examen clinique général	37
c)	Examen de l'appareil reproducteur	37
2.	Collecte de la semence.....	40
a)	Le vagin artificiel.....	40

(1) Modèle Missouri	40
(2) Modèle japonais (Nishikawa)	41
(3) Modèle Colorado.....	41
(4) Modèle Polonais.....	42
b) Préparation du matériel	42
c) Collecte du sperme.....	43
3. Examen de la semence récoltée.....	44
a) Evaluation brute de la qualité du sperme.....	45
b) Evaluation de la concentration en spermatozoïdes.....	45
c) Mesure du pH séminal	46
d) Evaluation de la motilité des spermatozoïdes	47
e) Evaluation de la morphologie des spermatozoïdes	47
4. Dilution de la semence pour la conservation.....	48
a) Dilueur	49
b) Conservation de la semence fraîche	49
c) Conservation de la semence refroidie	49
d) Conservation de la semence congelée.....	50
C. Composition de la semence d'étalon.....	52
1. Le plasma séminal	53
2. Les spermatozoïdes.....	53
D. Les indicateurs de performance de la reproduction chez l'étalon	54
1. Calcul de la fertilité d'un étalon	54
a) La fertilité par cycle	55
b) La fertilité par saison	55
c) La fertilité apparente.....	56
d) Les autres indicateurs.....	56
2. Les outils d'aide à l'analyse de la fertilité de la semence	57
a) Analyse assistée par ordinateur de la motilité des spermatozoïdes	57
b) Analyse de la morphologie des spermatozoïdes par microscopie électronique .	58
c) Analyse des spermatozoïdes par fluorescence et cytométrie en flux	59
d) Analyse de l'intégrité de la membrane plasmique par un test de gonflement hypo-osmotique	59
e) Analyse de l'état de capacitation des spermatozoïdes.....	60
f) Analyse de l'intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes.....	60

g)	Evaluation du degré de condensation et de l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes	61
h)	Analyse des composants du plasma séminal	61
i)	Autres analyses.....	61
E.	Causes d'infertilité de l'étalon	62
1.	Contamination de la semence.....	62
a)	Hémospermie	62
b)	Urospermie.....	63
c)	Pyospermie.....	64
d)	Agents pathogènes dans le tractus génital	64
(1)	Les bactéries.....	65
(2)	Les virus.....	65
(3)	Les parasites	66
(4)	Les champignons.....	66
2.	Anomalies de production des spermatozoïdes.....	66
a)	Traumatisme physique	66
b)	Infections systémiques et maladies infectieuses	67
c)	Inflammation locale.....	67
(1)	Orchite.....	67
(2)	Epididymite.....	67
d)	Anomalies endocriniennes	68
e)	Azoospermie et hypoospermie	68
f)	Dysfonctionnement acrosomique.....	68
g)	Chromatine spermatique anormale.....	69
h)	Tumeur des testicules	69
3.	Les causes d'infertilité liées à l'étalon.....	69
a)	Incapacité de monter sur la jument et de la pénétrer	69
b)	Traumatismes psychologiques et faible libido.....	69
c)	Anomalies congénitales	70
d)	Anomalies d'acheminement des spermatozoïdes	70
(1)	Les tumeurs des organes génitaux externes.....	70
(2)	Obstruction des voies spermatiques.....	70
e)	L'âge de l'étalon	71
F.	Les effets du stress oxydatif sur la semence.....	71

1.	Définition : Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	71
2.	La production d'espèces réactives de l'oxygène.....	71
a)	La production normale	71
b)	Les productions excédentaires.....	72
3.	Les effets des espèces réactives de l'oxygène sur les spermatozoïdes	73
a)	Les effets bénéfiques des espèces réactives de l'oxygène sur les spermatozoïdes	73
b)	Les effets négatifs du stress oxydatif sur les spermatozoïdes	73
G.	Amélioration de la fertilité des étalons.....	75
1.	Utilisation d'antioxydants dans la semence.....	75
2.	Adaptation du régime alimentaire	75
3.	Insémination en corne utérine profonde.....	76
4.	Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI)	76
5.	Collecte de sperme fractionnée	77
6.	Gestion de l'étalon âgé avec déclin de la capacité de reproduction	78
7.	Utilisation de dilueurs de semence adaptés	79
II.	Utilisation de la centrifugation en gradient de densité pour la sélection de spermatozoïdes de différentes espèces	81
A.	Chronologie de l'utilisation de la centrifugation en gradient de densité	81
B.	Fonctionnement des gradients de densité	83
1.	Principe.....	83
2.	Composition des gradients de densité.....	84
a)	Propriétés des gradients de densité	84
b)	Gradients continus et discontinus.....	84
3.	Utilisation pour la sélection des spermatozoïdes	85
a)	La sélection naturelle des spermatozoïdes	85
b)	La densité des spermatozoïdes	85
c)	Elimination des spermatozoïdes anormaux.....	86
d)	Echantillons obtenus	86
(1)	Séparation des spermatozoïdes en fonction de leur qualité	86
(2)	Séparation des spermatozoïdes du reste de l'éjaculat	86
4.	Exemple du Percoll® (Cytiva, Etats Unis).....	87
a)	Composition	87
b)	Utilisation pour la séparation des spermatozoïdes	88

C. Description de l'utilité de la centrifugation en gradient de densité pour les semences de différentes espèces	89
1. Chez l'homme.....	89
a) Etat des lieux de la fertilité masculine	89
b) Les causes d'infertilité chez l'homme	89
(1) Les défauts détectés lors de l'analyse du sperme.....	89
(2) Les défauts de l'ADN des spermatozoïdes	89
c) La centrifugation en gradient de densité chez l'homme	91
(1) Circonstances d'utilisation	91
(2) Objectifs de cette technique	91
(3) Les autres objectifs de cette méthode.....	92
(4) Les inconvénients de cette méthode	92
d) Exemples de méthodes de centrifugation en gradient de densité.....	93
e) Comparaison de plusieurs techniques utilisées.....	93
(1) Comparaison de la composition de deux gradients.....	93
(2) Comparaison du nombre de couches des gradients.....	94
(3) Comparaison du volume de sperme traité	94
f) Autres méthodes de sélection des spermatozoïdes	94
(1) Méthode de pré-incubation de la semence.....	95
(2) La méthode du potentiel zéta	95
(3) Méthode de tri magnétique cellulaire activé.....	95
(4) Méthode de gonflement hypo-osmotique.....	96
(5) La méthode des complexes cumulus oophorus.....	96
g) Comparaison de différentes méthodes de sélection des spermatozoïdes.....	96
2. Chez le taureau.....	97
a) La fertilité des taureaux	97
b) Evaluation de la fertilité des taureaux	98
c) Amélioration de la fertilité de la semence de taureau	98
(1) La méthode de centrifugation en gradient de densité	98
(2) Autres méthodes.....	99
d) Inconvénients de la centrifugation en gradient de densité.....	99
3. Chez le bélier et le bouc	100
a) La fertilité des béliers	100
b) La sélection des spermatozoïdes de béliers et de boucs par centrifugation en gradient de densité	100

III. Utilisation de la centrifugation en gradient de densité pour la sélection des spermatozoïdes dans l'espèce équine	103
A. Historique de l'intervention de l'homme dans la reproduction équine	103
1. L'insémination artificielle	103
a) Historique de l'insémination artificielle	103
b) Les avantages de l'insémination artificielle	103
2. Historique des techniques d'amélioration de la qualité du sperme.....	104
B. Utilisation de la centrifugation en gradient de densité	104
1. Protocole	104
a) Le choix du protocole et du matériel	105
b) Les gradients de densité poly-couches	106
c) Les gradients de densité monocouche.....	107
2. Les différents gradients de densité utilisés en espèce équine	108
a) AndroColl-E® (Minitube, Allemagne)	108
b) EquiPure® (Nidacon, Suède).....	109
c) Percoll® (Cytiva, Etats Unis)	109
d) Cellsep® (Larex, Etats Unis)	110
e) Fraction V® (Sigma Aldrich, Suisse)	110
f) RediGrad® (GE Healthcare, Suède)	110
3. Effet de la centrifugation en gradient de densité sur la semence d'étalon.....	110
a) Neutralité des gradients de densité.....	110
b) Conservation de la semence améliorée	111
(1) Cryoconservation de la semence	111
(i) Effets de la cryoconservation sur la semence.....	111
(ii) Les bénéfices de la centrifugation en gradient de densité avant la cryoconservation	111
(iii) Les bénéfices de la centrifugation en gradient de densité après la cryoconservation	112
(2) Conservation réfrigérée de la semence	113
(i) Effet de la conservation réfrigérée sur les spermatozoïdes	113
(ii) Les bénéfices de la centrifugation en gradient de densité sur la conservation réfrigérée des spermatozoïdes	113
c) Elimination du plasma séminal	114
(1) Le rôle du plasma séminal.....	114
(2) Les effets négatifs du plasma séminal.....	114

(3)	L'élimination du plasma séminal par la centrifugation en gradient de densité.....	115
d)	Qualité des spermatozoïdes supérieure	115
(1)	Élimination des spermatozoïdes anormaux.....	115
(2)	Amélioration de la viabilité des spermatozoïdes	116
(3)	Amélioration de la motilité	116
(4)	Amélioration de l'intégrité de l'ADN.....	117
e)	Élimination des contaminants.....	118
(1)	L'urine.....	118
(2)	Le sang.....	118
(3)	Les bactéries.....	119
(4)	Les spermatozoïdes défectueux.....	120
(5)	Les leucocytes.....	120
(6)	Les parasites	120
(7)	Les virus.....	120
f)	Augmentation de la fertilité	121
g)	Perspectives.....	122
4.	Choix du gradient de densité	122
C.	Utilisation peu courante de la centrifugation en gradient de densité sur la semence équine.....	124
1.	Facteur économique	124
a)	Coût des gradients.....	124
b)	Coût du travail	124
c)	Rendement faible	125
2.	Toxicité pour les spermatozoïdes	125
a)	Effets de la centrifugation	125
b)	Retrait du plasma séminal.....	125
c)	Contamination métabolique	125
d)	Toxicité du Percoll® (Cytiva, Etats Unis).....	126
3.	Les autres méthodes de séparation des spermatozoïdes.....	126
a)	Les différentes méthodes.....	126
(1)	Lavage du sperme et centrifugation coussinée	127
(2)	La méthode swim-up.....	128
(3)	La filtration sur laine de verre ou sur des billes de verre	129
(4)	Le tri microfluidique	130
(5)	Filtration à travers des membranes hydrophiles synthétiques	130

(6) Autres	131
b) Utilisation de ces méthodes dans le cas d'un étalon hypofertile	131
c) Comparaison des différentes méthodes	131
(1) Comparaison du coût, de la difficulté et du temps des différentes méthodes	131
(2) Comparaison de la qualité des spermatozoïdes obtenus	132
(3) Comparaison du rendement	133
D. Utilisation future de la centrifugation en gradient de densité	133
E. Ethique	133
F. Sujet controversé	134

Table des figures

Figure 1 : Schéma de la disposition des organes reproducteurs de l'étalon	22
Figure 2 : Schéma de la régulation de la production d'hormone chez l'étalon	23
Figure 3 : Vue latérale du testicule droit d'un étalon	24
Figure 4 : Coupe transversale d'un tube séminifère : organisation cellulaire	25
Figure 5 : Schéma de l'irrigation du testicule	27
Figure 6 : Schéma du déroulement de la spermatogénèse	28
Figure 7 : Schéma des étapes de la spermiogénèse	30
Figure 8 : Schéma présentant les glandes accessoires sexuelles de l'étalon (vue dorsale de la partie pelvienne de l'appareil reproducteur)	31
Figure 9 : Schéma de l'abouchement des différents conduits d'acheminement du sperme au niveau de l'urètre pelvien et de la partie caudale de la vessie de l'étalon (parties anatomiques fendues et ouvertes ventralement)	33
Figure 10 : Schéma de l'organisation structurelle de l'extrémité du pénis de l'étalon sur une coupe médiane	34
Figure 11 : Schéma des modifications de la membrane plasmatique des spermatozoïdes au cours de la capacitation	35
Figure 12 : Schéma de la réaction acrosomique après fixation des récepteurs spermatiques sur les récepteurs de la zone pellucide	36
Figure 13 : Photo des organes génitaux externes normaux d'un étalon adulte	37
Figure 14 : Photo illustrant la technique de mesure des testicules d'étalon à l'aide d'un compas d'épaisseur	38
Figure 15 : Schéma explicatif de la position de la sonde échographique afin d'obtenir une mesure de la largeur (1), de la hauteur (2) et de la longueur (3) du testicule par une échographie transcrotal	39
Figure 16 : Image d'échographie transcrotale obtenue pour la mesure de la largeur (1), de la hauteur (2) et de la longueur (3) d'un testicule d'étalon	39
Figure 17 : Photo d'un vagin artificiel modèle Missouri	40
Figure 18 : Photo d'un vagin artificiel modèle japonais	41
Figure 19 : Photo d'un vagin artificiel Colorado, modèle CSU	42
Figure 20 : Photo d'un vagin artificiel modèle polonais	42
Figure 21 : Photo de la collecte d'un étalon au sol	43
Figure 22 : Photo de la collecte d'un étalon sur mannequin	43
Figure 23 : Photo d'un éjaculat d'étalon	44
Figure 24 : Photo de la grille d'un hémacytomètre	45
Figure 25 : Photo d'un densimètre	46
Figure 26 : Photo d'un pH mètre	47
Figure 27 : Photo d'un spermatozoïde d'étalon à partir d'une goutte de sperme coloré à l'éosine nigrosine et observé avec un microscope optique à l'immersion	48
Figure 28 : Dessins de spermatozoïdes ayant une morphologie normale ou anormale	48
Figure 29 : Photo du dilueur de semence commercial INRA 96	50
Figure 30 : Photo d'une paillette de semence congelée de 0,5 mL	51

Figure 31 : Photo de paillettes de semence congelée placées dans de la vapeur d'azote liquide	51
Figure 32 : Photo de la mise en place d'une paillette de semence congelée dans une cuve d'azote liquide.....	52
Figure 33 : Schéma d'un spermatozoïde.....	54
Figure 34 : Photo du système d'analyse des spermatozoïdes assistée par ordinateur CASA .	57
Figure 35 : Photo d'un spermatozoïde équin obtenu par microscopie électronique.....	58
Figure 36 : Photo de spermatozoïdes équins avec l'acrosome intact (en vert) colorés avec des colorants fluorescents et observés au microscope à fluorescence	59
Figure 37 : Schéma des changements morphologiques des spermatozoïdes ayant subi un stress hypoosmotique	60
Figure 38 : Photo d'un éjaculat d'étalon hémospérmiq ue	63
Figure 39 : Photo d'un éjaculat d'étalon contenant du pus.....	64
Figure 40 : Schéma des dommages causés aux spermatozoïdes par le stress oxydatif	74
Figure 41 : Schéma d'un utérus de jument montrant les sites d'inséminations classique et profonde.....	76
Figure 42 : Photo de la cellularité (A), des images obtenues par le système d'analyse des spermatozoïdes CASA (B) et des images obtenues au microscope optique au grossissement x 1000 (C) des différentes fractions d'un éjaculat d'étalon atteint de vésiculite sémin	78
Figure 43 : Schéma de la séparation d'un mélange de particules lors de la centrifugation en gradient de densité. Les particules sont placées au-dessus du gradient (A) puis, lors de la centrifugation lente et courte, elles sédimentent en fonction de leur taille (B), puis, lors d'une centrifugation plus longue, elles sédimentent en fonction de leur densité (C)	83
Figure 44 : Photo d'un tube contenant le résultat de la centrifugation en gradient de densité bicouche (EquiPure® (Nidacon, Suède)) d'un échantillon de sperme d'étalon.....	87
Figure 45 : Photo de l'observation du Percoll® (Cytiva, Etats Unis) au microscope électronique	87
Figure 46 : Diagramme de présentation des résultats d'une étude montrant le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes après différents traitements de sperme	97
Figure 47 : Photo d'un tube contenant un gradient de densité monocouche (Androcoll O) surmontée de semence de bélier avant (a) et après (b) la centrifugation	101
Figure 48 : Schéma de la disposition des spermatozoïdes avant et après la centrifugation en gradient de densité bi-couche.....	106
Figure 49 : Schéma d'un protocole d'utilisation du gradient de densité AndroColl-E® (Minitube, Allemagne) monocouche sur la semence équine	108
Figure 50 : Schéma d'un protocole d'utilisation du gradient de densité EquiPure®(Nidacon, Suède) monocouche sur la semence équine	109
Figure 51 : Schéma de la disposition des spermatozoïdes après traitement de la semence par la méthode swim-up	129
Figure 52 : Schéma du résultat de la séparation des spermatozoïdes par différentes méthodes	132

Table des tableaux

Tableau 1 : Effet de la sélection des spermatozoïdes par le gradient de densité EquiPure® (Nicadon, Suède) sur la conservation de la semence	111
Tableau 2 : Comparaison des valeurs de motilité des spermatozoïdes d'un étalon fertile et d'un étalon subfertile avant et après la centrifugation en gradient de densité.....	115
Tableau 3 : Comparaison de différents paramètres des spermatozoïdes sélectionnés par plusieurs gradients de densité utilisés dans l'espèce équine.....	121

Liste des abréviations

ABP : androgen binding protein
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ATP : adénosine triphosphate
CASA : Computer Assisted Semen Analysis
cm : centimètres
DSO : Daily Sperm Output
EHV1 : Herpès Virus Equin de type 1
FIV : fécondation *in vitro*
FSH : Follicle Stimulating Hormone
g : gramme
G : force centrifuge
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
HN : Haras nationaux
ICSI : Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes
INRA : Institut National de Recherche Agronomique
LH : Luteinizing Hormone
mL : millilitre
mm : millimètres
mOsm : milliosmoles
pH : potentiel hydrogène
PVP : polyvinylpyrrolidone
SCSA : Sperm Chromatin Structure Assay
UHT : ultra haute température
VT : volume testiculaire
°C : degré Celsius
µm : micromètre

Introduction :

Les étalons reproducteurs sont sélectionnés en fonction de leur génétique, leur performance et leur conformation, et non pas en fonction de leur capacité de reproduction. Ainsi certains étalons reproducteurs présentent des problèmes de fertilité, pour lesquels des méthodes sont mises en œuvre pour les améliorer. Cela implique la récolte et le traitement de la semence. En effet, parmi les différentes techniques de mise à la reproduction possibles (monte naturelle, en main ou en liberté, et insémination artificielle avec de la semence fraîche, réfrigérée ou congelée), et sous réserve de suivre la réglementation des studbooks propres à chaque race, seule l'insémination artificielle permet d'envisager des techniques d'amélioration de la qualité de la semence. En 2012, 56 % des juments de sport mises à la reproduction ont été inséminées. De 1990 à aujourd'hui, l'insémination artificielle s'est beaucoup développée (15 % de l'ensemble des saillies en 1990 à plus de 40 % en 2020) et les méthodes de traitement de la semence équine se sont également améliorées afin de produire des semences de qualité supérieure.

Dans des conditions naturelles, une sélection des spermatozoïdes se fait dans le tractus génital femelle avec une première élimination des spermatozoïdes immobiles, des débris et du plasma séminal. Cette sélection s'effectue lorsque les spermatozoïdes traversent la glaire cervicale puis la jonction utéro-tubale. Lors de leur remontée, les spermatozoïdes vont par ailleurs subir un phénomène de capacitation pour pouvoir ensuite féconder l'ovocyte dans l'oviducte. Ces phénomènes vont contribuer à l'acheminement des spermatozoïdes les plus fertiles sur le lieu de la fécondation. Afin d'améliorer la fertilité, de nombreuses méthodes ont été développées. L'une d'entre elles consiste à reproduire ce phénomène de sélection des spermatozoïdes en laboratoire. Il s'agit de la centrifugation en gradient de densité, développée initialement chez l'homme, puis appliquée progressivement à d'autres espèces. Ce procédé est particulièrement utile pour améliorer la fertilité de mâles peu fertiles. Son utilisation peut, par ailleurs, être intéressante pour conserver la semence dans le cadre de l'insémination artificielle.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer les bénéfices de cette méthode lors de son utilisation dans l'espèce équine.

Cette étude bibliographique présente dans une première partie des rappels sur l'appareil reproducteur, la semence et la fertilité de l'étalon. Dans une seconde partie, la méthode de sélection des spermatozoïdes par centrifugation en gradient de densité chez différentes espèces est décrite et développée dans une troisième partie pour son utilisation chez l'espèce équine.

I. Généralités sur la reproduction des étalons

La puberté des étalons survient à un âge variable suivant leur race mais ne peut pas survenir avant l'âge d'un à trois ans. La production de spermatozoïdes commence généralement à l'âge de 83 semaines (+/- 2.9). (67)

Cette partie présente tout d'abord l'appareil reproducteur de l'étalon ainsi que sa fonction de production de spermatozoïdes et d'hormones. Ensuite les étapes de collecte, d'évaluation et de stockage de la semence d'étalon sont abordées. Puis la composition de la semence d'étalon est présentée. Aussi les indicateurs de la fertilité de la semence sont détaillés. Ensuite, cette partie développe les causes d'infertilités de l'étalon. Puis les effets du stress oxydatif sur la semence sont étudiés. Enfin des outils permettant l'amélioration de la qualité de la semence équine sont présentés.

A. L'appareil reproducteur de l'étalon

L'appareil génital de l'étalon est composé de deux testicules, deux épидидymes, de glandes sexuelles accessoires, de conduits spermatiques et d'un pénis (figure 1). (22) (24) (79)

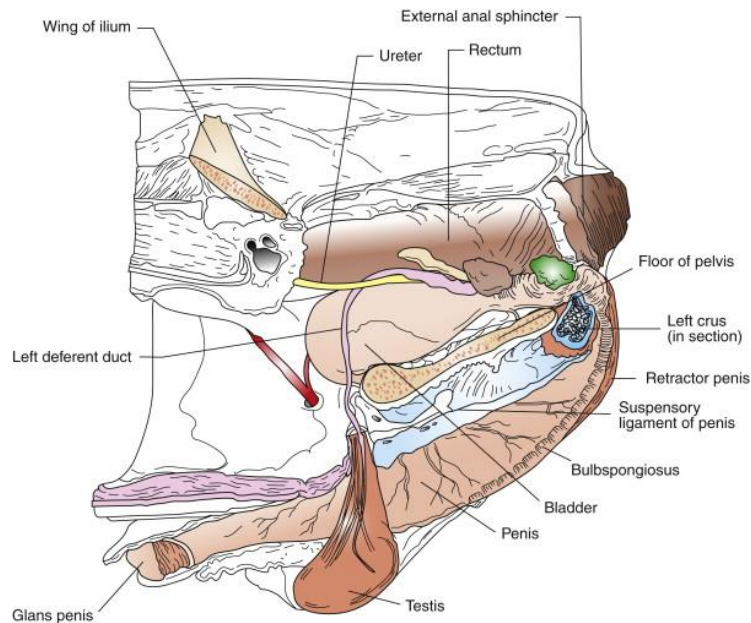


Figure 1 : Schéma de la disposition des organes reproducteurs de l'étalon
 Source : Dyce KM et al, 1987 (79)

Wing of ilium : aile de l'ilium, ureter : uretère, rectum : rectum, external anal sphincter : sphincter externe anal, floor of pelvis : plancher pelvien, left crus (in section) : pilier gauche (en section), retractor penis : muscle retracteur du pénis, suspensory ligament of penis : ligament suspenseur du pénis, bulbospongiosus : bulbospongieux, bladder : vessie, penis : pénis, testis : testicule, glans penis : gland du pénis, left deferent duct : conduit déférent gauche

L'ensemble de l'appareil génital mâle a pour rôle la production, la maturation, le stockage, et le transport des spermatozoïdes jusque dans les voies génitales femelles.

1. Régulation hormonale de la fonction testiculaire

La fonction des testicules est régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'épiphyse sécrète de la mélatonine. Cette hormone régule la sécrétion de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) par l'hypothalamus. La GnRH stimule la sécrétion de LH (Luteinizing Hormone) et de FSH (Follicule Stimulating Hormone) par l'anté-hypophyse (figure 2). (24)

La FSH stimule le développement des tubes séminifères et la spermatogénèse. Par ailleurs elle stimule la production par les cellules de Sertoli d'inhibine et de protéine de transport (ABP : Androgen Binding Protein). La LH stimule la maturation des spermatozoïdes et la synthèse d'androgènes par les cellules de Leydig. La sécrétion d'inhibine et d'androgènes entraîne un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse. (24)

Les androgènes et les œstrogènes ainsi produits régulent les cellules de Sertoli et de Leydig, ainsi que les cellules germinales et épидидymaires. Elles interviennent ainsi dans la régulation de la spermatogénèse et de la maturation des spermatozoïdes, dans la sécrétion des glandes annexes, dans le comportement sexuel de l'étalon et dans la conformation de l'étalon (développement musculaire, descente des testicules, développement de l'ossature...). (24)

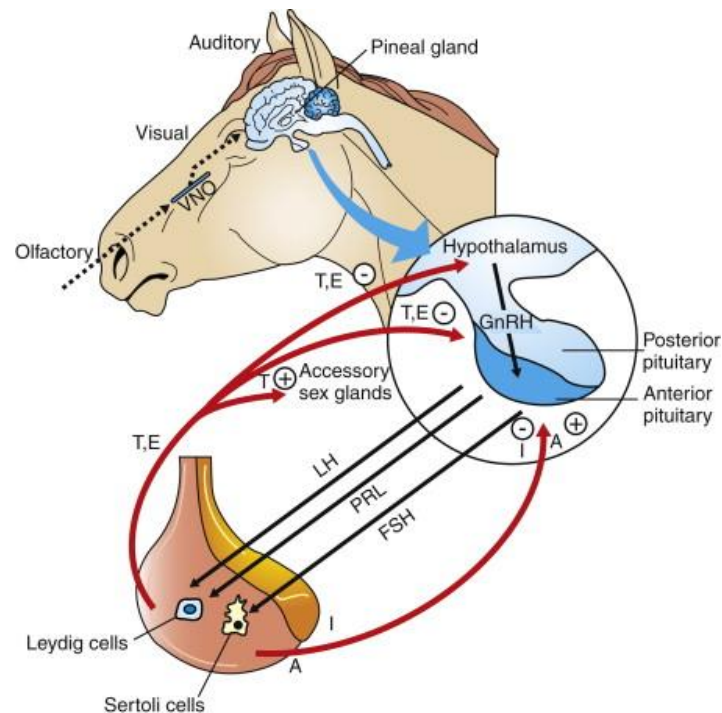


Figure 2 : Schéma de la régulation de la production d'hormones chez l'étalon
Source : Dyce KM et al, 1987 (24)

Olfactory : stimulus olfactif, visual : stimulus visuel, auditory : stimulus auditif, pineal gland : glande pinéale ou épiphyse, hypothalamus : hypothalamus, posterior pituitary : hypophyse postérieure, anterior pituitary : hypophyse antérieure, accessory sex glands : glandes sexuelles accessoires, VNO : organe voméronasal, PRL : prolactine, T : testostérone, E : œstrogènes, I : inhibine, A : activine

2. Les testicules

Les testicules d'étalon sont de forme ovale, symétriques et avec une taille sensiblement identique - environ 50 à 80mm (millimètres) de large, 60 à 70 mm de haut et 80 à 140 mm de long - , fermes et positionnés horizontalement en région sous-inguinale. Ils pèsent entre 150 et 300 g (grammes) (figure 3). (24)

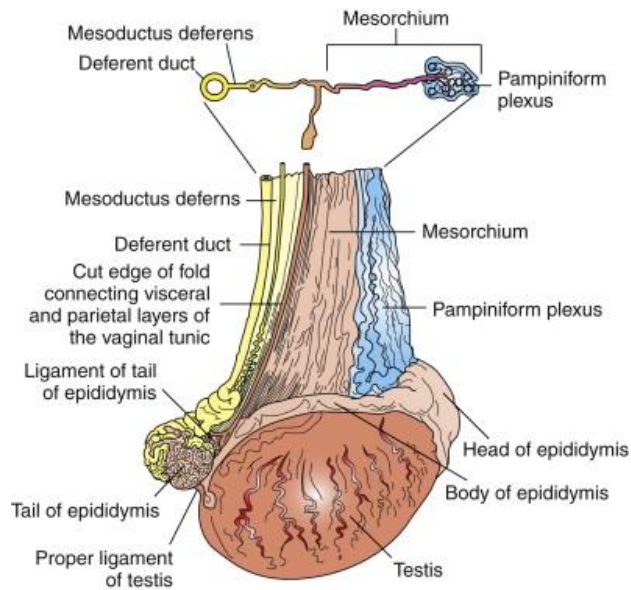


Figure 3 : Vue latérale du testicule droit d'un étalon
Source : Dyce KM et al, 1987 (24)

Mesoductus deferens : méso du canal déférent, mesorchium : mésorchium, pampiniform plexus : plexus pampiniforme, head of epididymis : tête de l'épididyme, body of epididymis : corps de l'épididyme, testis : testicule, proper ligament of testis : ligament propre du testicule, tail of epididymis : queue de l'épididyme, ligament of tail of epididymis : ligament de la queue de l'épididyme, cut edge of fold connecting visceral and parietal layers of the vaginal tunic : bord coupé du pli reliant les couches viscérales et pariétales de la tunique vaginale, deferent duct : canal déférent

a) Les enveloppes des testicules

Les testicules sont contenus dans le scrotum. Ce dernier assure un rôle dans la protection et la thermorégulation des testicules. En effet, afin d'assurer une fonction optimale la température des testicules doit être maintenue à une température inférieure à la température corporelle centrale (température cutanée scrotale : 33 °C (degré Celsius), température testiculaire : 30,5 °C- 32,5 °C).

Le scrotum est formé de quatre couches :

- La peau : elle est riche en glandes sébacées
- Le dartos : c'est un tissu musculaire et fibroélastique
- Le fascia scrotal : il s'agit d'un tissu conjonctif lâche
- La tunique vaginale pariétale : c'est une évagination du péritoine pariétal à travers les anneaux inguinaux. Le muscle crémaster, muscle strié, se situe dorso-latéralement à la tunique vaginale. (24)

La tunique albuginée, tissu de collagène dense et de muscle lisse, encapsule le testicule. Elle se prolonge au sein du parenchyme testiculaire et divise le testicule en lobules. (24)

b) Le parenchyme testiculaire

Au sein de chaque lobule, le parenchyme testiculaire est composé des tubes séminifères et du tissu interstitiel.

Les tubes séminifères possèdent un épithélium composé de cellules somatiques de Sertoli et de cellules germinales à plusieurs stades de développement, disposées en couches concentriques (figure 4) (79)

Le tissu interstitiel est composé de cellules de Leydig, ainsi que de vaisseaux sanguins et lymphatiques (figure 4). (102)

Les deux extrémités des tubes séminifères s'ouvrent dans les tubes collecteurs puis dans le *rete testis*. Ce dernier, situé au centre du testicule, est composé de canaux interconnectés qui collectent les spermatozoïdes produits dans les tubes séminifères et les acheminent jusque dans l'épididyme. (79)

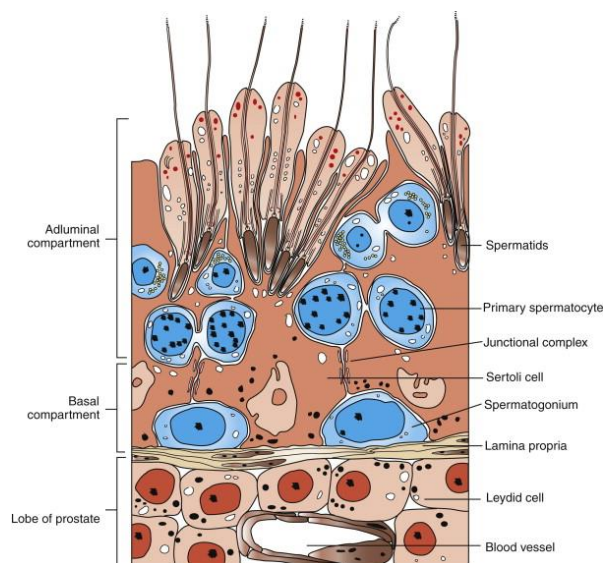


Figure 4 : Coupe transversale d'un tube séminifère : organisation cellulaire

Source : Pickett BV et al, 1989 (79)

Adluminal compartment : compartiment adluminal, basal compartment : compartiment basal, lobe of prostate : lobe de la prostate, spermatids : spermatozoïdes, primary spermatocyte : spermatocyte primaire, junctional complex : jonction serrée, sertoli cell : cellule de Sertoli, spermatogonium : spermatogonie, lamina propria : lamina propria, Leydig cell : cellule de Leydig, blood vessel : vaisseau sanguin

(1) Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig (figure 4) disposent de récepteurs à la LH. Lorsque l'hormone se fixe sur les récepteurs, la cellule de Leydig active la synthèse de la testostérone. La testostérone produite intervient dans la production et la maturation des spermatozoïdes, dans le fonctionnement des glandes sexuelles accessoires et dans le développement des caractères sexuels secondaires. (102)

(2) Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli (figure 4) sont de forme cylindrique, irrégulières avec un noyau de taille importante situé proche de la membrane basale. Elles reposent sur la membrane basale mais se prolongent sur toute l'épaisseur de l'épithélium du tube séminifère. Elles sont ainsi en contact avec les cellules germinales à tous les stades de développement, assurant ainsi un rôle structurel et nutritionnel à ces cellules. (79)

Les cellules de Sertoli possèdent également des récepteurs à la FSH. La stimulation de ces récepteurs par l'hormone aboutit à la conversion de la testostérone en œstrogène et active certains gènes de la cellule de Sertoli qui régulent et soutiennent la spermatogénèse. Elles produisent également de l'inhibine qui provoque un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH par l'hypophyse.

Les jonctions serrées entre les cellules de Sertoli forment la barrière hémato-testiculaire assurant une séparation des cellules germinales en cours de formation du système immunitaire. (102)

c) *Le cordon spermatique*

Le cordon spermatique (figure 5) de chaque testicule est contenu dans la tunique vaginale. Il est composé du canal déférent correspondant, de l'artère testiculaire, des veines testiculaires, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs.

L'irrigation du testicule et de l'épididyme se fait à partir de la division de l'artère testiculaire, branche de l'aorte abdominale, proche du testicule. Les branches artérielles issues de cette division pénètrent le parenchyme testiculaire au sein de son tissu conjonctif (trabécules et septas du testicule). Les veines correspondantes sortent du testicule entourées autour de l'artère testiculaire, pour former le plexus pampiniforme, dans la tunique albuginée, avant de rejoindre la veine cave caudale. Cette organisation de l'irrigation met en contact le sang artériel plus chaud et le sang veineux plus froid, ce qui permet, grâce à un échange de chaleur,

une diminution de la température du sang artériel qui arrive au testicule. Ceci permet ainsi un meilleur contrôle de la thermorégulation. (24)

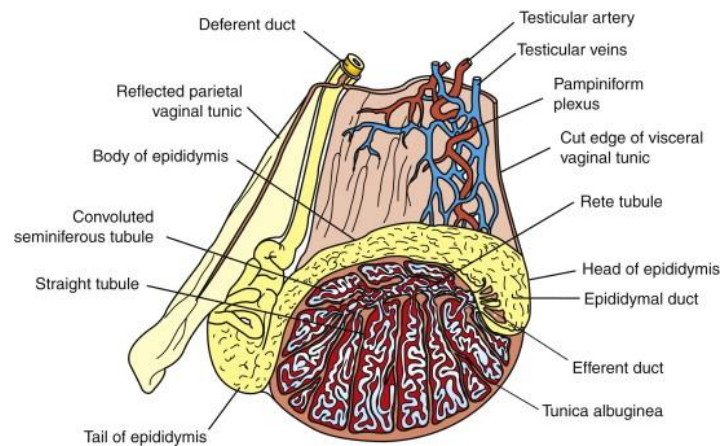


Figure 5 : Schéma de l'irrigation du testicule

Source : Pickett BW et al, 1989 (24)

Deferent duct : canal deferent, testicular artery : artère testiculaire, testicular veins : veines testiculaires, pampiniform plexus : plexus pampiniforme, cut edge of visceral vaginal tunic : bord coupé de la tunique vaginale viscérale, rete tubule : rete testis, head of epididymis : tête de l'épididyme, epididymal duct : canal épидидymaire, efferent duct : canal efferent, tunica albuginea : tunique albuginée, tail of epididymis : queue de l'épididyme, straight tubule : tubule droit, convoluted seminiferous tubule : tubule séminifère contourné, body of epididymis : corps de l'épididyme, reflected parietal vaginal tunic : tunique vaginale pariétale réfléchie

d) La spermatogénèse

La spermatogénèse est un processus de production des spermatozoïdes. Elle se déroule dans l'épithélium des tubes séminifères. La spermatogénèse se déroule en plusieurs étapes : la spermatocytogénèse, la méiose et la spermiogénèse. La durée de la spermatogénèse est d'environ 57 à 58 jours (figure 6). (79)

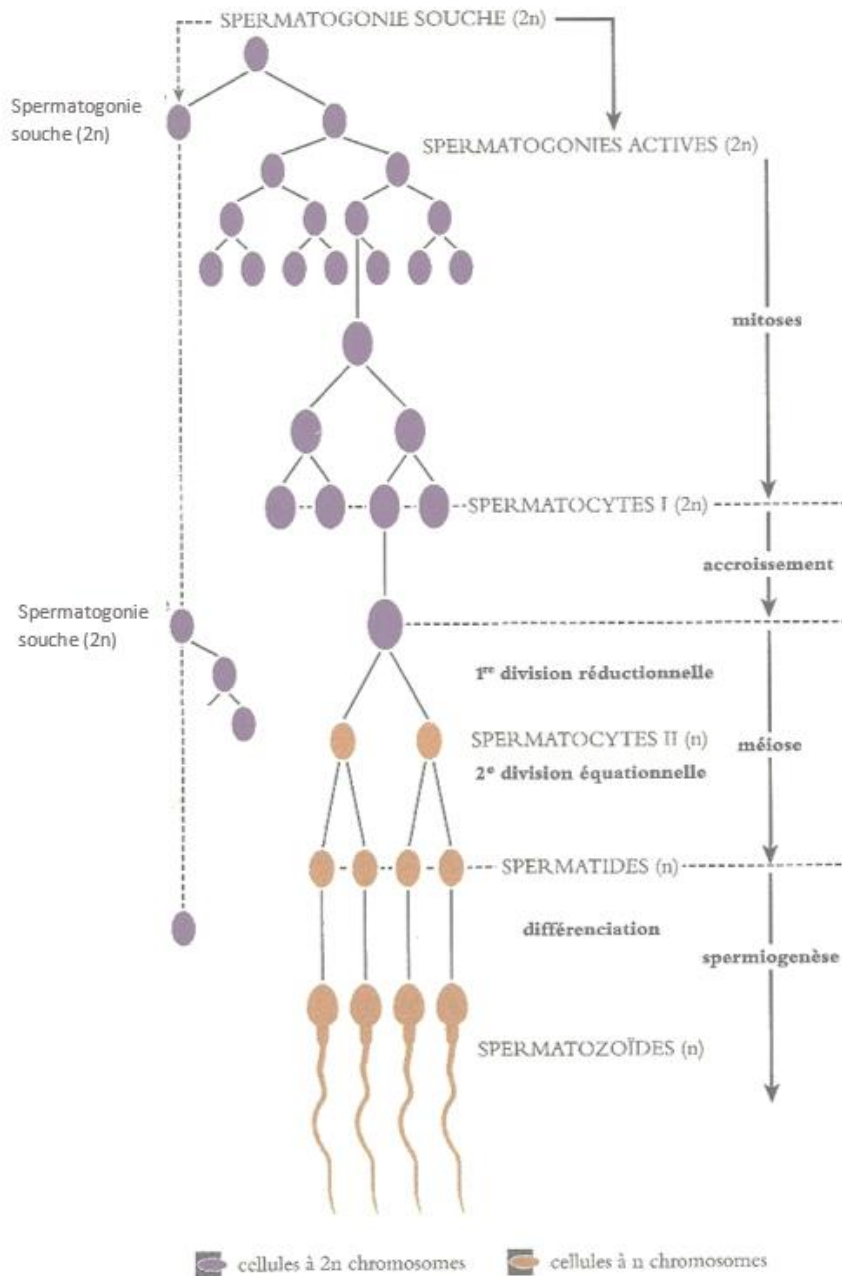


Figure 6 : Schéma du déroulement de la spermatogénèse
 Source : Jean Marc Foisseau et al, 2005 (34)

(1) La spermatocytogénèse

La spermatocytogénèse, au cours duquel les spermatogonies se transforment en spermatocytes, est une étape de mitose, à savoir une division de la cellule par dédoublement de chaque chromosome de sorte que la cellule nouvelle a un nombre de chromosomes inchangé.

Les spermatogonies, cellules souches situées le plus proche de la membrane basale des tubes séminifères, subissent une division mitotique, qui intervient à un intervalle régulier tous les 12,2 jours. Ceci aboutit à la genèse de deux cellules filles qui vont pour une part reconstituer la population de cellules souches (pour une synthèse durable des spermatozoïdes) et pour une autre part continuer la spermatogénèse. (79)

Les spermatogonies subissent ensuite plusieurs étapes de maturation aboutissant à des spermatocytes primaires.

(2) La méiose

Les spermatocytes primaires vont entrer dans une première phase de méiose, qui comporte deux divisions successives (méiose I et méiose II) aboutissant à la formation de cellules contenant un nombre haploïde (n) de chromosomes à partir de cellules parentales diploïdes ($2n$). (79)

Dans la première phase de méiose, les spermatocytes aboutissant à des spermatocytes secondaires. La seconde phase de méiose permet d'obtenir des spermatides.

(3) La spermiogénèse

La spermiogénèse est la phase de maturation et de différenciation des spermatides. Elle commence par une phase de synthèse d'ARN (Acide ribonucléique) puis par une condensation de la chromatine nucléaire. L'acrosome se forme ensuite à partir de l'appareil de Golgi et recouvre le pôle basal du noyau. Le noyau se déplace vers les marges de la cellule et s'allonge. Au cours de la condensation du noyau, une structure microtubulaire est observée dans le cytoplasme et permet la mise en place de la queue et de la tête du spermatozoïde. Plus tard, la pièce médiane du spermatozoïde se développe par la condensation de mitochondries autour de la pièce proximale du flagelle. Enfin, le cytoplasme résiduel est éliminé par la cellule de Sertoli (figure 7). (102)

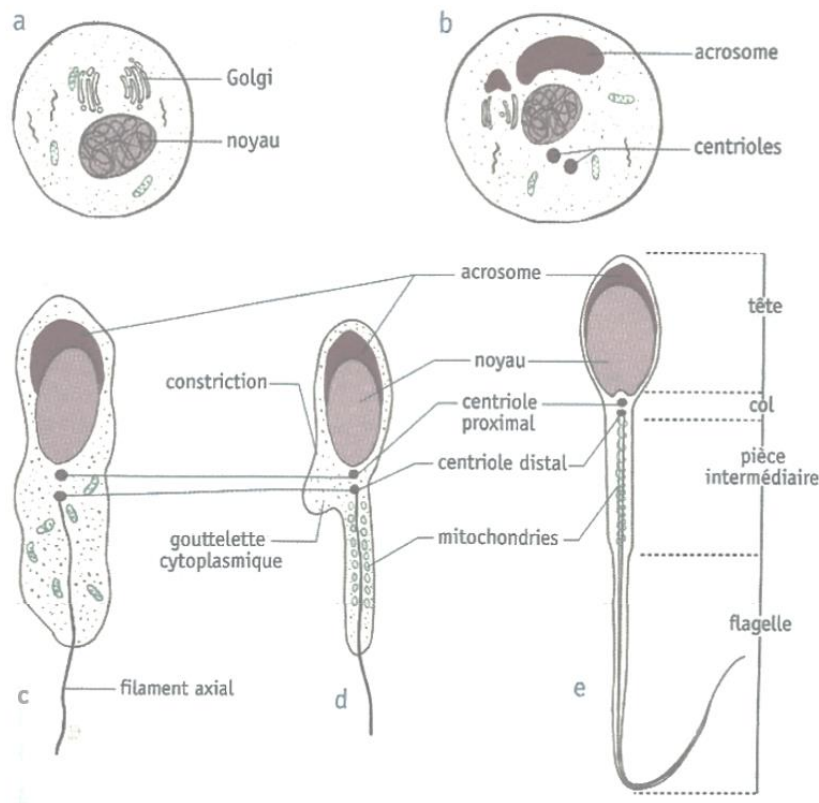


Figure 7 : Schéma des étapes de la spermiogénèse
 Source : Jean Marc Foisseau et al, 2005 (34)

3. L'épididyme

L'épididyme (figure 1) est composé d'une tête, liée au bord crânial du testicule, d'un corps le long de la face dorso latérale du testicule et d'une queue liée au pôle caudal du testicule. (24)

Au sein de l'épididyme, les spermatozoïdes sont transportés dans les canaux efférents du *rete testis* au canal déférent grâce au péristaltisme des parois musculaires. Le temps de transit des spermatozoïdes dans l'épididyme est d'environ dix jours. (79)

Les spermatozoïdes vont subir des modifications morphologiques et physiologiques aboutissant à leur maturation. En effet, à la sortie du *rete testis*, les spermatozoïdes sont incapables de féconder un ovocyte. Les spermatozoïdes vont obtenir une capacité de motilité progressive dans le corps de l'épididyme grâce à une augmentation du pH environnant. Les sécrétions épидидymaires, et notamment de protéines, modifient la structure de la membrane plasmatique. Ceci aboutit à des modifications morphologiques, fonctionnelles et métaboliques du flagelle qui acquiert sa capacité à se fixer à la zone pellucide. Au cours de son cheminement dans l'épididyme, la spermatide en cours de maturation subit aussi l'excrétion de la gouttelette cytoplasmique, la modification de la membrane acrosomique, la stabilisation de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) et des changements métaboliques. L'épididyme est sous contrôle des androgènes. (130)

La partie proximale de l'épididyme possède donc un épithélium sécréteur responsable de la maturation des spermatozoïdes. Le segment distal possède une lumière plus importante permettant le stockage des spermatozoïdes. (79)

4. Les glandes sexuelles accessoires

Les glandes sexuelles accessoires de l'appareil reproducteur de l'étalon sont la prostate, les vésicules séminales, les glandes bulbo urétrales et les ampoules (figure 8). Elles produisent le plasma séminal. Elles ont besoin d'androgènes pour leur fonctionnement. (24)

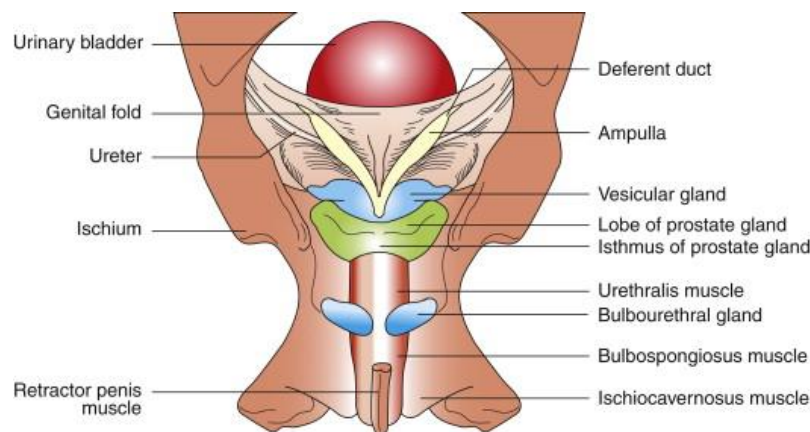


Figure 8 : Schéma présentant les glandes accessoires sexuelles de l'étalon (vue dorsale de la partie pelvienne de l'appareil reproducteur)

Source : Pickett BW et al, 1989 (24)

Urinary bladder : vessie, deferent duct : canal deferent, ampulla : ampoule, vesicular gland : glande vésiculaire, lobe of prostate gland : lobe de la prostate, isthium of prostate gland : isthium de la prostate, urethralis muscle : muscle urétral, bulbourethral gland : glande bulbourétrale, bulbospongiosus muscle : muscle bulbospongieux, ischiocavernosus muscle : muscle ischiocaverneux, retractor penis muscle : muscle rétracteur du pénis, ischium : ischium, ureter : uretère, genital fold : pli génital

a) *La prostate*

La prostate est composée de deux lobes séparés par un isthme central. Les lobes sont situés le long des bords caudolatéraux de chaque glande vésiculaire. Ils mesurent 5 à 9 cm de long, 2 à 6 cm de large et 1 à 2 cm d'épaisseur. (24)

b) *Les vésicules séminales*

Les vésicules séminales sont situées latéralement aux ampoules dans le pli génital. Leur taille peut aller jusqu'à 12 à 20 cm de long et 5 cm de diamètre lors de stimulation sexuelle. La production des vésicules séminales forme la fraction de gel de l'éjaculat. (24)

c) *Les glandes bulbo-urétrales*

Les glandes bulbourétrales sont situées à la surface dorsale de l'urètre pelvien, environ 8 cm caudalement à la prostate. Elles produisent des sécrétions qui constituent le pré-sperme et les premières fractions de l'éjaculat. Ces sécrétions possèdent une activité enzymatique lipase qui peut être responsable de la perte de motilité des spermatozoïdes lors de leur stockage. (24)

d) *Les ampoules*

Les glandes ampoulaire mesurent 1 à 2 cm de diamètre et 10 à 25 cm de longueur. Elles sont formées par un élargissement de la partie distale du canal déférent. Elles se trouvent dorsalement à l'urètre pelvien, le long de la ligne médiane du plancher pelvien au-dessus du col de la vessie. Leur paroi présente de nombreuses glandes tubulaires. (24)

5. Les conduits spermatiques

Les conduits spermatiques sont responsables du transport des spermatozoïdes.

Le canal déférent prend son origine au niveau de la queue de l'épididyme puis passe dans l'anneau vaginal au sein du cordon spermatique et se termine au *colliculus seminalis* de l'urètre pelvien. Ce canal possède des parois musculaires épaisses. Il permet le stockage et l'acheminement des spermatozoïdes de l'épididyme jusqu'au pénis. Le *colliculus seminalis*, partie élargie de l'urètre pelvien caudalement à la prostate, est le lieu où les conduits des glandes sexuelles se déversent (figure 9). (24)

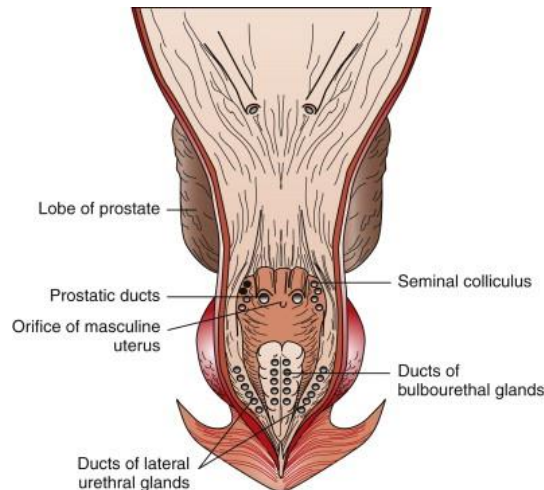


Figure 9 : Schéma de l'abouchement des différents conduits d'acheminement du sperme au niveau de l'urètre pelvien et de la partie caudale de la vessie de l'étalon (parties anatomiques fendues et ouvertes ventralement)

Source : Pickett BW et al, 1989 (24)

Lobe of prostate : lobe de la prostate, seminal colliculus : colliculus séminal, ducts of bulbourethral glands : conduits des glandes bulbo-urétrales, ducts of lateral urethral glands : conduits des glandes urétrales latérales, prostatic ducts : conduits prostatiques

6. Le pénis

Le pénis de l'étalon est de type musculocaverneux. Deux piliers prennent naissance au niveau de l'arc ischiatique puis fusionnent et forment le corps caverneux unique et dorsal du pénis. Le corps spongieux entoure l'urètre pénien sur la face ventrale du pénis. Le corps caverneux, le corps spongieux et le corps spongieux glandis forment le tissu érectile du pénis (figure 10). L'érection est provoquée par l'engorgement de ces structures par du sang provenant des branches des artères pudendales internes et externes et des artères obturatrices. (24)

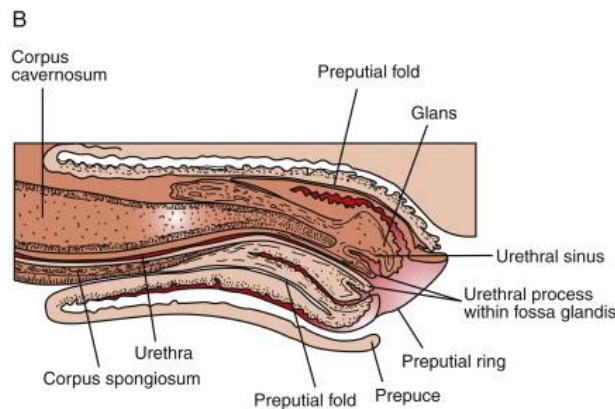


Figure 10 : Schéma de l'organisation structurelle de l'extrémité du pénis de l'étalon sur une coupe médiane

Source : Pickett BW et al, 1989 (24)

Coprus cavernosum : corps caverneux, *preputial fold* : pli préputial, *glans* : gland, *urethral sinus* : sinus urétral, *urethral process within fossa glandis* : processus urétral dans la fosse glandulaire, *preputial ring* : anneau préputial, *prepuce*, prépuce, *urethra* : urètre, *corpus spongiosum* : corps spongieux

L'urètre est dorsal au muscle bulbospongieux (figure 10). Les contractions de ce muscle interviennent dans le déplacement distal du contenu de l'urètre pénien. Le pénis dispose également de muscles rétracteurs du pénis situés ventralement sur toute la longueur du pénis. Ces muscles permettent de positionner le pénis dans la gaine une fois l'érection terminée. (24)

Le prépuce contient et protège le pénis lorsqu'il n'est pas en érection (figure 10). (24)

Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes acquièrent un récepteur membranaire qui intervient dans la capacitation et la réaction acrosomiale. (116)

7. La maturation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes subissent une modification de leurs lipides membranaires lors de leur transit dans l'oviducte. Ceci entraîne une perte de symétrie de la membrane plasmique, une apparition d'une zone de fusion et une externalisation des récepteurs de la liaison avec la zone pellucide. (116)

L'appareil génital de la jument va tout au long du trajet sélectionner un faible nombre de spermatozoïdes capables d'atteindre le sommet des cornes utérines. Tout au long de ce trajet,

les spermatozoïdes interagissent avec le liquide présent dans l'appareil reproducteur de la jument et les cellules épithéliales. (117)

a) *La capacitation*

Les spermatozoïdes, bien que matures à la sortie de l'épididyme, ne sont pas capables de féconder un ovocyte. En effet, une étape de capacitation est nécessaire afin d'acquérir la capacité à se lier à la zone pellucide, pénétrer le cumulus de l'ovocyte, provoquer la réaction acrosomique et enfin fusionner avec l'ovocyte. Cette étape se produit naturellement dans les voies génitales de la jument lors d'une monte naturelle mais elle peut aussi avoir lieu *in vitro* dans le cas de l'insémination artificielle. (79)

Lors de la capacitation, des modifications aboutissent à la phosphorylation des protéines membranaires et cytosoliques. Sous l'action de protéines présentes dans le tractus génital de la jument, le cholestérol membranaire est éliminé, ce qui rend la membrane plasmatique plus fluide et donc facilite sa fusion avec l'acrosome. Lors de la capacitation, il est probable que des facteurs de décapacitation, contenus dans le plasma séminal, présents à la surface du spermatozoïde et inhibant la fécondation, soient éliminés (figure 11). (79)

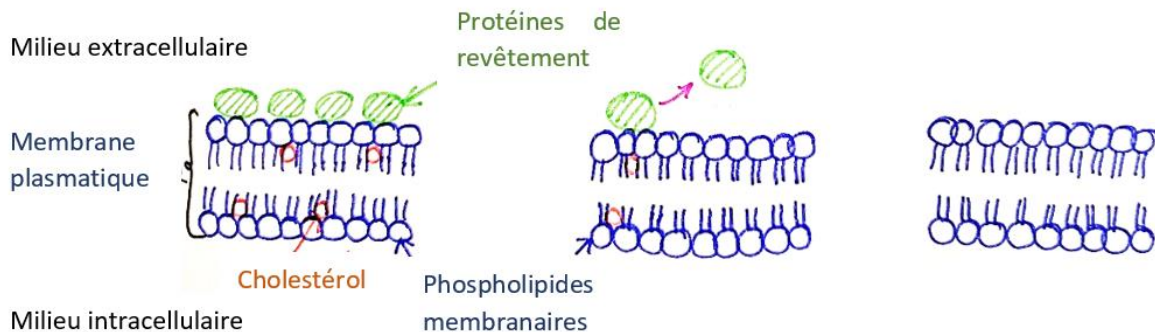


Figure 11 : Schéma des modifications de la membrane plasmatique des spermatozoïdes au cours de la capacitation
Source : Pabiou Margot

b) *La réaction acrosomique*

La réaction acrosomique a lieu dans les voies génitales femelles, à proximité de la zone pellucide. Elle peut avoir lieu uniquement après la fin de la capacitation. Au cours de ce processus, les enzymes contenues dans l'acrosome et certains éléments structuraux du

spermatozoïde fuient à travers des pores de la membrane des spermatozoïdes. Ceci conduit à la pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde (figure 12). (79)

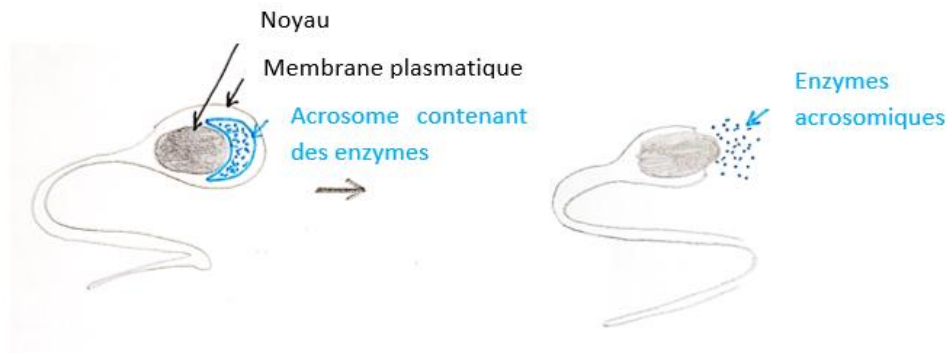


Figure 12 : Schéma de la réaction acrosomique après fixation des récepteurs spermatiques sur les récepteurs de la zone pellucide
Source : Pabiou Margot

B. La collecte de la semence

Cette partie aborde dans un premier temps, l'examen clinique de l'étalon réalisé avant de réaliser le prélèvement de sa semence. Ensuite, les étapes de la collecte de la semence de l'étalon sont détaillées. Puis, les différents examens réalisés afin d'analyser la semence sont présentés. Enfin, le traitement de la semence avant sa conservation est développé.

1. Examen de l'étalon

a) *Anamnèse et commémoratifs*

L'examen de l'étalon débute par la prise des commémoratifs et de l'anamnèse de l'étalon en s'attardant particulièrement sur les conditions d'élevage et les antécédents reproductifs de l'étalon. (18)

b) Examen clinique général

Ensuite, l'examen clinique général de l'étalon est réalisé en portant notamment attention à l'état général, aux éventuelles maladies héréditaires, aux boiteries et aux douleurs dorsales qui peuvent avoir un impact sur la capacité d'accouplement. (18)

Des examens de laboratoires comme des analyses hématologiques, coproscopiques, urinaires... peuvent, dans certains cas, apporter des informations pertinentes sur l'état général de l'étalon. (18)

c) Examen de l'appareil reproducteur

Par la suite, un examen rapproché de l'appareil génital de l'étalon est réalisé, en commençant par l'examen des organes génitaux externes. (18)

L'observation minutieuse du pénis peut être réalisée, soit après avoir présenté une jument en chaleur à l'étalon afin d'obtenir une érection, soit en plaçant l'étalon dans un box nouvellement paillé afin qu'il urine. L'utilisation d'acépromazine est controversée, voire déconseillée, car le prolapsus du pénis qu'elle induit peut-être irréversible. Il peut être nécessaire de nettoyer le pénis avant son inspection (figure 13). (18)

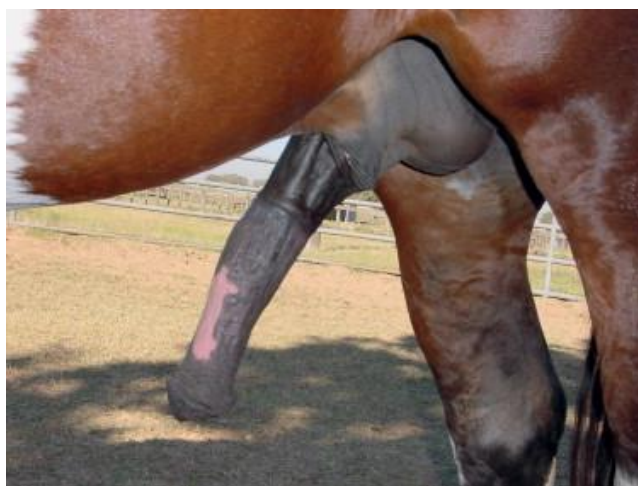


Figure 13 : Photo des organes génitaux externes normaux d'un étalon adulte
Source : Steven P. Brinsko et al, 2011 (18)

Toutes les anomalies ou les lésions sont notées. (18)

L'examen des organes génitaux externes se poursuit par l'inspection du prépuce puis la palpation des testicules. (18)

Les testicules doivent être quasiment symétriques et mesurer entre 4,5 et 6 cm de largeur, 8,5 et 11 cm de longueur et 5 à 6,5 cm de hauteur pour un étalon pubère. Ces mesures peuvent être obtenues à l'aide de compas d'épaisseur, mais aussi par échographie transcrotale. (18)

La mesure grâce au compas d'épaisseur consiste à maintenir les testicules dans le bas du scrotum pendant que les branches du compas d'épaisseur sont placées sur le bord latéral de chaque testicule (figure 14). Ceci permet d'obtenir la mesure de la largeur des deux testicules. Il est également possible de mesurer la longueur des testicules en plaçant les branches du compas d'épaisseur sur les bords crânial et caudal. La largeur individuelle ainsi que la hauteur de chaque testicule, ne peuvent pas être obtenues par cette méthode. (18)



Figure 14 : Photo illustrant la technique de mesure des testicules d'étalon à l'aide d'un compas d'épaisseur

Source : Steven P. Brinsko et al, 2011 (18)

La mesure échographique transcrotale est obtenue à partir de trois mesures :

- La mesure de la largeur du testicule est réalisée en plaçant la sonde échographique sur le bord latéral du testicule et orientée latéro-médialement.
- La mesure de la hauteur du testicule est obtenue en plaçant la sonde échographique sur le bord ventral du testicule et orientée ventro-dorsalement.
- La longueur du testicule est réalisée en plaçant la sonde échographique sur le bord caudal du testicule à proximité de la queue de l'épididyme et orientée caudo-crânialement (figure 15 et 16). (18)

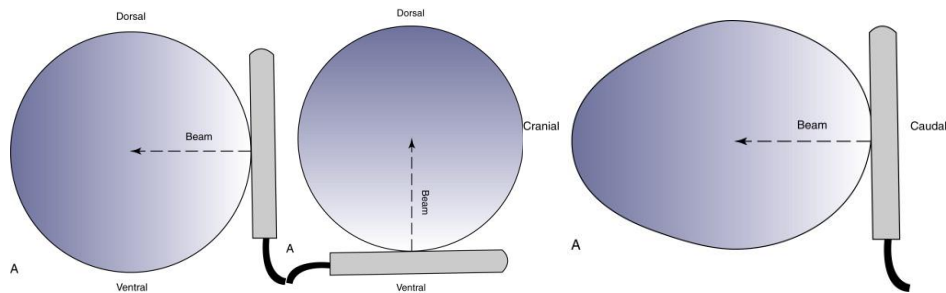


Figure 15 : Schéma explicatif de la position de la sonde échographique afin d'obtenir une mesure de la largeur (1), de la hauteur (2) et de la longueur (3) du testicule par une échographie transcrotale

Source : Source : Steven P. Brinsko et al, 2011 (18)

Beam : rayon

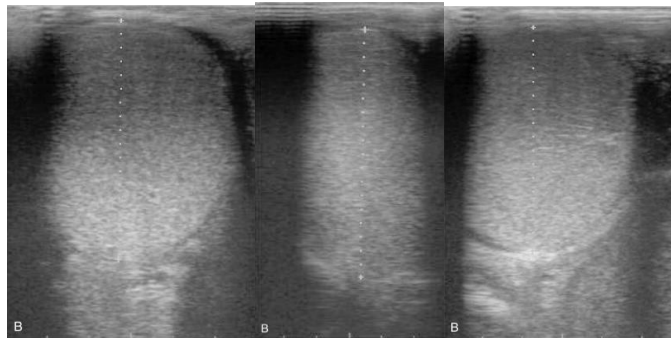


Figure 16 : Image d'échographie transcrotale obtenue pour la mesure de la largeur (1), de la hauteur (2) et de la longueur (3) d'un testicule d'étalon

Source : Steven P. Brinsko et al, 2011 (18)

Ces mesures permettent de donner le volume testiculaire (VT) de chaque testicule puis le volume testiculaire total.

$$VT = \text{largeur} \times \text{hauteur} \times \text{longueur} \times 0,5233$$

Le volume testiculaire total permet d'estimer la production de spermatozoïdes par jour :

$$DSO \text{ (Daily Sperm Output) } = (0,024 \times VT) - (0,76 \text{ à } 1,26)$$

Ainsi, si la production de spermatozoïdes quotidienne attendue est significativement inférieure à la production réelle, un dysfonctionnement testiculaire, à l'origine d'une faible efficacité de spermatogénèse et d'une dégénérescence des cellules germinales, peut être mis en évidence. Ceci est à l'origine d'une faible production de spermatozoïdes normaux. (18)

La forme, la texture et la régularité des testicules sont aussi évaluées. Un examen de la structure testiculaire par échographies transcrotale et transrectale peut ainsi être intéressante. (18)

L'examen des organes génitaux internes est ensuite réalisé par palpation transrectale. (18)

La libido de l'étalon est également évaluée en plaçant ce dernier à proximité d'une jument manifestant des chaleurs. (18)

Enfin, il est important de rechercher les éventuelles maladies vénériennes. (18)

2. Collecte de la semence

a) *Le vagin artificiel*

La première étape lors d'une collecte de semence, consiste à sélectionner un vagin artificiel. En effet, plusieurs vagins artificiels sont commercialisés. (17)

(1) *Modèle Missouri*

Le modèle Missouri (figure 17) est un vagin artificiel constitué d'une chambre à eau étanche grâce à deux doublures en caoutchouc à l'intérieur d'un étui en cuir. Cette chambre à eau est présente sur la longueur du vagin artificiel sans atteindre le gland du pénis. Ceci permet une bonne rétention de la chaleur sans exposer les spermatozoïdes à des températures pouvant les endommager. Une vanne d'air laisse la possibilité de pressuriser le vagin artificiel avec de l'air et de l'eau plutôt qu'avec de l'eau seule. (17)



Figure 17 : Photo d'un vagin artificiel modèle Missouri
Source : Varner DD et al, 1991 (17)

(2) Modèle japonais (Nishikawa)

Le modèle Nishikawa (figure 18) est un assemblage d'un boîtier en aluminium avec un réceptacle de sperme et d'une doublure en caoutchouc. L'eau est placée entre le boîtier en aluminium et la doublure en caoutchouc. Le réceptacle permet d'éviter le contact de l'éjaculat avec le caoutchouc. (17)



Figure 18 : Photo d'un vagin artificiel modèle japonais
Source : Varner DD et al, 1991 (17)

(3) Modèle Colorado

Le modèle Colorado est constitué de deux doublures en caoutchouc, permettant d'éviter la contamination de l'éjaculat par de l'eau, dans un boîtier en plastique, le tout enveloppé par une structure en cuir permettant une bonne rétention de la chaleur. Il est important de contrôler la température de l'eau pour ne pas endommager les spermatozoïdes en contact direct avec la chambre à eau. (17)

Des versions avec des accessoires supplémentaires, comme des filtres de sperme, des thermomètres de contrôle de la température interne... sont possibles. Ce sont les modèles CSU (figure 19) et Lane. (17)



Figure 19 : Photo d'un vagin artificiel Colorado, modèle CSU
Source : Varner DD et al, 1991 (17)

(4) Modèle Polonais

Le modèle Polonais (figure 20) est une modification du modèle Missouri ou CSU. Ce modèle est caractérisé par le retrait de l'extrémité du vagin artificiel des modèles précédents afin que le gland dépasse du vagin. Ceci permet de collecter l'éjaculat de manière fractionnée afin d'obtenir une fraction plus concentrée en spermatozoïdes présente dans les trois premiers jets, ou lors d'examen d'analyse des fractions séparées. (17)



Figure 20 : Photo d'un vagin artificiel modèle polonais
Source Varner DD et al, 1991 (17)

b) Préparation du matériel

Il faut ensuite préparer le vagin artificiel pour la collecte de la semence. (17)

La poche d'eau du vagin artificiel est remplie avec de l'eau dont la température avoisine 45 - 50 °C, ceci afin que la température interne du vagin artificiel soit comprise entre 44 et 48 °C. Cette température permet une stimulation optimale du pénis.

Par ailleurs, la pression au sein du vagin artificiel doit aussi être ajustée puis maintenue constante afin que le contact avec le pénis soit uniforme et n'interfère pas avec la pénétration tout au long de la collecte.

Ensuite, le vagin artificiel doit être lubrifié en utilisant un lubrifiant stérile et non spermicide. Le récipient de collecte opaque est maintenu à une température corporelle durant toute la procédure. Ce dernier contient un filtre qui retient le « gel » présent à la fin de l'éjaculat. (17)

c) Collecte du sperme

La collecte peut se faire au sol (figure 21), sur une jument ou sur un mannequin (figure 22). (17)



Figure 21 : Photo de la collecte d'un étalon au sol
Source : Steven P. Brinsko et al, 2011 (17)



Figure 22 : Photo de la collecte d'un étalon sur mannequin
Source : Steven P. Brinsko et al, 2011 (17)

Le sperme est récupéré, après avoir enlevé le filtre piégeant le gel. Le sperme est amené immédiatement dans le récipient opaque dans le laboratoire chauffé. (17)

La concentration en spermatozoïdes, le volume et la couleur du sperme sont évalués (figure 23).



Figure 23 : Photo d'un éjaculat d'étalon
Source : Source : Steven P. Brinsko et al, 2011 (17)

Ensuite, l'échantillon de sperme est mélangé avec un dilueur. Pour cela, il faut mélanger un volume d'éjaculat obtenu à un à deux volumes de dilueur. (17)

3. Examen de la semence récoltée

Tous les étalons ne sont pas aptes à être utilisés pour l'insémination artificielle. En effet, selon les caractéristiques séminales qualitatives, c'est-à-dire la composition du sperme, et quantitatives, c'est-à-dire le volume de sperme, environ 95 % des étalons aptes à la reproduction peuvent être utilisés en insémination artificielle de semence fraîche, 75 % en semence refroidie, dont 80 % en semence congelée. (18) (78)

Le potentiel d'un étalon sera évalué à partir de cinq éjaculats prélevés sur 24 heures. Les paramètres déterminants pour une conservation optimale du sperme sont la concentration de la semence en spermatozoïdes et la motilité de ces derniers après 24 à 48 heures de conservation à 4 °C. (71)

L'analyse de la semence commence par une évaluation brute de la qualité du sperme, une évaluation de la concentration en spermatozoïdes, une mesure du pH (potentiel hydrogène) séminal, une évaluation de la motilité, c'est-à-dire le mouvement et l'activité des spermatozoïdes dans l'échantillon de sperme, et de la morphologie, c'est-à-dire la forme de la tête, du corps et de la queue, des spermatozoïdes. (18)

a) *Evaluation brute de la qualité du sperme*

L'évaluation brute de la qualité du sperme commence en séparant le gel du reste de l'éjaculat. Le volume est ensuite mesuré à l'aide d'une éprouvette graduée de 100 mL. Il varie de 30 à 50 mL pour les étalons de sang et de 120 à 150 mL pour les races lourdes. Cette mesure permet d'obtenir une idée de la concentration en spermatozoïdes de l'échantillon. En effet, le nombre de spermatozoïdes dans un éjaculat est généralement constant, alors que le volume de sperme sécrété par les glandes sexuelles accessoires est dépendant de la préparation de l'étalon et de la saison de reproduction notamment. (18)(78)

La couleur et la consistance de la semence sont également observées. L'éjaculat doit être blanc laiteux. Des modifications de couleurs sont généralement révélateurs d'une contamination de l'éjaculat par du sang, de l'urine ou du pus. (18)

b) *Evaluation de la concentration en spermatozoïdes*

L'évaluation de la concentration en spermatozoïdes se fait à l'aide d'un hémacytomètre, d'un densimètre, d'un compteur cellulaire ou d'un spectrophotomètre. (18)

L'évaluation de la concentration en spermatozoïdes à l'aide d'un hémacytomètre consiste à remplir les chambres de comptage de l'hémacytomètre avec un volume connu de sperme de dilution connue (figure 24). Chaque chambre de comptage dispose d'une grille sur laquelle les spermatozoïdes se déposent. Il faut alors compter le nombre de spermatozoïdes présents dans un des neuf carrés de la grille pour chaque chambre de l'hémacytomètre. Une différence de moins de 10 % entre les deux chambres est tolérée. (18)

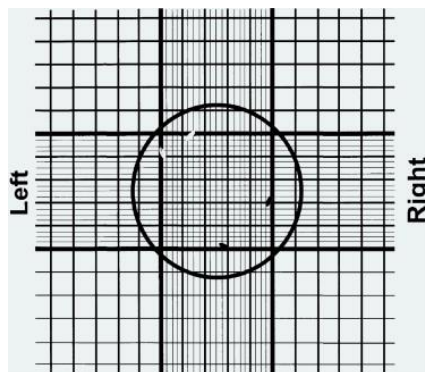


Figure 24 : Photo de la grille d'un hémacytomètre
Source : Steven P. Brinsko et al, 2011 (18)

Left : gauche, Right : droite

Le spectrophotomètre mesure l'absorbance de l'échantillon à une longueur d'onde donnée. Après avoir étalonné l'appareil avec des échantillons de spermatozoïdes dont la concentration est connue, il est possible de corréliser l'absorbance de l'éjaculat à une concentration en spermatozoïdes. (18)

Le densimètre (figure 25) mesure la densité optique de l'échantillon de sperme. Celle-ci est par la suite corrélée à la concentration en spermatozoïdes, grâce à des échantillons de sperme d'étalon. (18)



Figure 25 : Photo d'un densimètre
Source : Steven P. Brinsko et al, 2011 (18)

Un compteur cellulaire est un outil qui utilise la liaison d'une sonde fluorescente d'iodure de potassium à l'ADN des spermatozoïdes. Cet instrument utilise l'impédance lumineuse pour déterminer la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat. (18)

Le nombre de spermatozoïdes éjaculés dépend de la saison, de l'âge, de la taille des testicules, de l'efficacité de la spermatogénèse, de la quantité de sperme extragonadal et de la présence éventuelle de maladies. La concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat est d'environ 100-200 millions/ mL. (18)

c) Mesure du pH séminal

La mesure du pH séminal est effectuée avec un pH mètre (figure 26). L'extrémité du pH mètre est placée dans l'échantillon. L'instrument donne le pH mesuré. (18)



Figure 26 : Photo d'un pH mètre
Source : pierron.fr

Le pH varie entre 7,2 et 7,9 avec un pH optimal pour la motilité des spermatozoïdes de 7,7. (18)

d) Evaluation de la motilité des spermatozoïdes

Une analyse visuelle par une personne expérimentée grâce à un microscope optique à contraste de phase et d'une platine chauffante permet de donner une estimation de la motilité des spermatozoïdes. Il est important d'évaluer la motilité totale, c'est-à-dire le pourcentage de spermatozoïdes qui présentent une motilité, la motilité progressive, c'est-à-dire le pourcentage de spermatozoïdes qui présentent un mouvement rapide et linéaire, et la vitesse des spermatozoïdes sur une échelle de zéro à quatre. (18)

Une évaluation plus précise peut être obtenue grâce à la photomicrographie accélérée, la vidéomicrographie image par image, la spectrophotométrie et l'analyse informatisée. (18)

Cette estimation est importante du fait qu'il existe une corrélation entre la motilité et la capacité de fécondation des spermatozoïdes. (18)

La motilité moyenne est de 75 %. (18)

e) Evaluation de la morphologie des spermatozoïdes

La morphologie des spermatozoïdes est observée au microscope optique à l'immersion au grossissement x1000 à x1250. Pour cela, il faut réaliser des frottis de l'échantillon, les laisser sécher à l'air libre avant de les colorer avec de l'éosine-nigrosine (figure 27). (18)

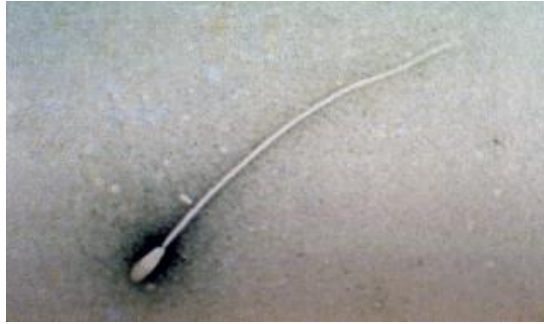


Figure 27 : Photo d'un spermatozoïde d'étalon à partir d'une goutte de sperme coloré à l'éosine nigrosine et observé avec un microscope optique à l'immersion

Source : Steven P. Brinsko et al, 2011 (18)

La tête, le corps et la queue d'au minimum cent spermatozoïdes sont observés. Chaque anomalie est notée. Une anomalie est dite primaire si elle est due à un défaut au cours de la spermatogénèse. Elle est dite secondaire si elle survient lors du transport des spermatozoïdes dans les voies génitales mâles. Elle est dite tertiaire si elle a lieu après la collecte. La figure 28 donne des exemples d'anomalies de morphologie des spermatozoïdes. (18)



Figure 28 : Dessins de spermatozoïdes ayant une morphologie normale ou anormale

Source : Blanchard TL et al, 1996 (18)

Normal : normal, abnormal heads : têtes anormales, abnormal acrosomes : acrosomes anormaux, abnormal midpieces : pieces intermédiaires anormales, tail abnormalities : anomalies de la queue

La morphologie des spermatozoïdes semble exercer une influence sur les taux de fécondation, de gestation et d'implantation embryonnaire selon les travaux de de Voos. (26)

4. Dilution de la semence pour la conservation

La plupart des inséminations artificielles dans l'espèce équine se font avec une semence d'étalon refroidie plutôt qu'avec une semence fraîche. (101)

Après la récolte de la semence et sa filtration, la semence doit être diluée rapidement afin de conserver la motilité des spermatozoïdes et d'en assurer sa conservation pour une utilisation différée. En effet, le sperme peut être utilisé immédiatement après la récolte ou être conservé pour une utilisation ultérieure. (17)(40)

Le refroidissement de la semence induit une restriction métabolique des spermatozoïdes. Ceci va limiter la production de sous-produits métaboliques toxiques, d'espèces réactives de l'oxygène. Par ailleurs, le refroidissement va réduire la consommation d'ATP (Adénosine triphosphate). Ainsi, le refroidissement de la semence va permettre de maintenir l'homéostasie au sein de l'échantillon et donc de limiter la perte en spermatozoïdes. (40)

a) Dilueur

Un dilueur est un mélange liquide qui présente une composition permettant de protéger les spermatozoïdes le temps de la conservation de la semence avant l'insémination artificielle. Son pH doit être compris entre 6,7 à 7,3. L'osmolarité doit être comprise entre 300 et 400 mOsm (milliosmoles) par litre. Il est composé d'éléments nutritifs pour les spermatozoïdes tels que du fructose, glucose... Il contient également des lipoprotéines afin de protéger la membrane des spermatozoïdes lors des variations de température. Selon les cas, il peut contenir des antibiotiques. (29)

b) Conservation de la semence fraîche

La semence fraîche non refroidie peut être conservée jusqu'à 30 minutes après la collecte. (71)

Il est possible de conserver de la semence à température ambiante. Ceci évite les effets néfastes des changements de températures sur la membrane des spermatozoïdes. Toutefois, cette technique doit prendre en compte la vitesse métabolique rapide des spermatozoïdes d'étalons et donc la production d'espèces réactives de l'oxygène lors de la phosphorylation oxydative. Ceci est d'autant plus important que les spermatozoïdes perdent leur capacité de biosynthèse et de réparation lors des dernières phases de la spermatogénèse. (40)

c) Conservation de la semence refroidie

La semence peut être conservée jusqu'à 72 heures entre 4 et 10 °C. (40)

Le lait UHT (Ultra Haute Température) demi-écrémé est le dilueur le plus utilisé pour la conservation de la semence réfrigérée. (91)

Des dilueurs commerciaux comme le dilueur INRA 96 (figure 29) peuvent aussi être utilisés. Ce dernier donne de meilleurs résultats de conservation que le lait UHT demi-écrémé. Le dilueur INRA 96 est une solution de sel et de sucre dans laquelle sont ajoutés la fraction purifiée des caséines du lait (phosphocaséinate natif), des antibiotiques (pénicilline et gentamicine) et un antifongique (amphotéricine B). (17) (19) (40) (91)



Figure 29 : Photo du dilueur de semence commercial INRA 96
Source : Isabelle Barrier-Battut et al, 2018

Le dilueur Kenney peut aussi être utilisé. Il est composé de lait écrémé, de glucose, d'eau déminéralisée, de bicarbonate de sodium et d'antibiotiques (pénicilline G et sulfate de streptomycine ou gentamicine). (17)

Le dilueur INRA 82 peut également être utilisé. Celui-ci est composé de lait écrémé, de glucose et d'antibiotiques. (30)

Une fois la dilution terminée, la semence est conditionnée dans des seringues de 10 mL en anaérobiose à une dilution de 20 millions de spermatozoïdes par millilitre.

Il est important de noter que la semence équine est très sensible au choc thermique. Il est de ce fait important de refroidir la semence à une vitesse proche de $-0,3$ °C par minute. Des systèmes commerciaux sont disponibles pour obtenir un refroidissement et un transport de l'échantillon optimal. (40)

d) Conservation de la semence congelée

La cryoconservation de la semence commence par une étape de centrifugation de l'échantillon. Cette dernière permet d'éliminer le plasma séminal. Elle entraîne une perte de 25 à 50 % des spermatozoïdes. Le culot issu de cette centrifugation est ensuite remis en suspension dans un dilueur avec un cryoprotecteur, c'est-à-dire une substance qui protège les spermatozoïdes lors de leur conservation sous forme congelée. En effet, les cryoprotecteurs vont agir en baissant le point de congélation de l'échantillon et en augmentant sa viscosité. Ceci permet d'éviter la formation de cristaux de glace. Les dilueurs contenant un cryoprotecteur sont le jaune d'œuf, les sucres, le glycérol, et le méthylformamide. (4) (45)

Il est possible d'utiliser un dilueur obtenu à partir du dilueur INRA 82 auquel du jaune d'œuf et du glycérol sont ajoutés. Le dilueur INRA freeze peut aussi être utilisé. Ce dernier contient du plasma de jaune d'œuf. (30)

Le produit obtenu est ensuite conditionné en paillettes de 0,25 à 0,5 mL (figure 30), avec une concentration élevée à 200 millions de spermatozoïdes mobiles/mL. (4)



Figure 30 : Photo d'une paillette de semence congelée de 0,5 mL
Source : Steven P. Brinsko, 2011 (19)

Les paillettes sont ensuite refroidies à 5 °C puis placées dans de la vapeur d'azote liquide à environ 1 à 4 cm de l'interface gaz-liquide (figure 31). Enfin, elles sont placées dans l'azote liquide (figure 32). (4) (45)

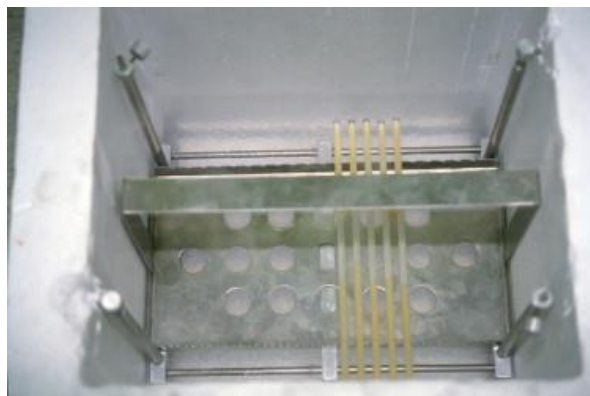


Figure 31 : Photo de paillettes de semence congelée placées dans de la vapeur d'azote liquide
Source : Steven P. Brinsko, 2011 (19)



Figure 32 : Photo de la mise en place d'une paillette de semence congelée dans une cuve d'azote liquide

Source : Steven P. Brinsko, 2011 (19)

Les paillettes congelées peuvent être conservées pendant une durée indéterminée. (30)

La cryoconservation et la décongélation vont produire un stress osmotique responsable d'une diminution de l'intégrité acrosomale, de la viabilité et de la motilité des spermatozoïdes. La cryoconservation entraîne la production de lésions sur l'acide désoxyribonucléique des spermatozoïdes, en particulier sur des gènes essentiels à la fécondation et au développement embryonnaire. C'est pourquoi il est important d'évaluer la qualité de la semence (nombre, morphologie, motilité) lors de la décongélation. (40)

Par ailleurs, 20 % des étalons produisent une semence qui se congèle mal. Ceci peut être dû à des facteurs génétiques, au type de cryo-conservateur utilisé et à d'autres facteurs inconnus aujourd'hui. (50)

C. Composition de la semence d'étalon

Les caractéristiques de la semence d'étalon dépendent de l'environnement social de l'étalon et notamment de la présence ou non d'autres étalons et de juments. En effet, il semble que l'exposition d'un étalon à des juments, après avoir été exposé à des étalons augmente le nombre de spermatozoïdes produits, et la vitesse curviligne des spermatozoïdes. (114)

La semence équine produite lors de l'éjaculation est composée du plasma séminal et des spermatozoïdes.

Un éjaculat d'étalon est composé de six à neuf fractions consécutives de sperme. Les spermatozoïdes sont concentrés dans les trois premières fractions (70 % des spermatozoïdes). (76)

1. Le plasma séminal

Le plasma séminal est synthétisé par le *rete testis*, l'épididyme, et les glandes sexuelles accessoires. Il joue un rôle important dans la fécondation. Le plasma séminal présente des effets bénéfiques pour la viabilité et l'intégrité acrosomale des spermatozoïdes. Par ailleurs, en inhibant la liaison des polynucléaires neutrophiles et en réduisant la phagocytose des spermatozoïdes dans l'appareil reproducteur féminin, il permet d'améliorer la fertilité de la semence en cas d'inflammation de l'utérus de la jument. Il nuit néanmoins à la motilité et l'intégrité de la membrane plasmique des spermatozoïdes. (18) (40) (76)

Le sperme d'étalon est très dilué par les sécrétions des glandes annexes. Il est riche en électrolytes et notamment en chlore, ce qui réduit le temps de survie des spermatozoïdes conservés *in vitro* à trois à quatre heures en moyenne. (137)

Le plasma séminal est composé d'eau (95,16 %), de protéines (2,2 %), notamment de l'albumine et des globulines, d'ions, de monosaccharides, de lipides, de prostaglandine et d'hormones stéroïdiennes. (126) (137)

2. Les spermatozoïdes

Les spermatozoïdes sont produits par les testicules. Ils sont véhiculés dans le plasma séminal au sein du tractus génital de l'étalon. (79)

Les spermatozoïdes (figure 33) équins sont composés d'une tête, d'une pièce principale et d'une pièce terminale. Le spermatozoïde mesure 60-65 μm (micromètre) de longueur. (79)

Le spermatozoïde est constitué par (figure 33)

- Une membrane plasmique : c'est elle qui se lie à la zone pellucide lors de la fécondation, notamment sa partie post-acrosomiale. (79)
- L'acrosome : il est situé en avant du noyau au sein de la tête. Il contient des enzymes glycolytiques et hydrolytiques nécessaires pour la fécondation. (79)
- Le noyau : il est constitué d'ADN génomique contenant de la chromatine condensée et liée à la protamine. La chromatine est capable, chez les étalons fertiles, de résister à la dénaturation acide, ce qui n'est pas le cas pour les étalons ayant des troubles de la fertilité. (79)
- Le flagelle : il est composé d'une pièce intermédiaire, d'une pièce principale et d'une pièce terminale. Il est responsable de la motilité du spermatozoïde. (79)

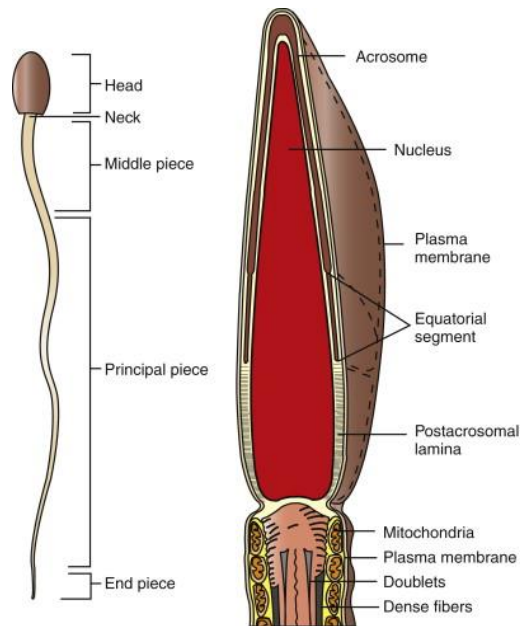


Figure 33 : Schéma d'un spermatozoïde
Source : Stuart A. Meyers, 2009 (18)

Head : tête, neck : cou, middle piece : pièce intermédiaire, principal piece : pièce principale, end piece : pièce terminale, acrosome : acrosome, nucleus : noyau, plasma membrane : membrane plasmique, equatorial segment : segment équatorial, postacrosomal lamina : lame post-acrosomique, mitochondria : mitochondrie, doublets : double tubule, dense fibers : fibres denses

D. Les indicateurs de performance de la reproduction chez l'étalon

1. Calcul de la fertilité d'un étalon

La fertilité est la capacité de produire une descendance. L'infertilité ou la subfertilité peuvent être définies comme la difficulté à produire une descendance. La fertilité concerne le nombre de mise bas par an et la fécondité concerne le nombre de poulains nés par an. Dans l'espèce équine, ces termes peuvent être confondus.

Les indicateurs de performance de la reproduction chez les étalons permettent de comparer l'efficacité de reproduction des étalons entre eux.

Trois techniques sont habituellement utilisées pour mesurer la fertilité d'un étalon : la fertilité par cycle, la fertilité par saison et la fertilité apparente. (74) (124)

a) *La fertilité par cycle*

La fertilité par cycle correspond au pourcentage de chance que possède l'étalon à féconder une jument à chaque cycle utilisé. Elle peut être calculée à n'importe quel moment de la saison de reproduction. C'est l'indicateur le plus fiable de la fertilité. (74)

$$\text{Fertilité par cycle} = \frac{\text{nombre de cycles fécondés} \times 100}{\text{nombre de cycles fécondés} + \text{nombre de cycles non fécondés}}$$

Avec :

- Nombre de cycles fécondés : cela correspond au nombre de cycles à la suite desquels un diagnostic de gestation est positif, même si la gestation ne va pas à terme (résorption, avortement)
- Nombre de cycles non fécondés : cela correspond au nombre de cycles à la suite desquels le diagnostic de gestation est négatif. (124)

Pour calculer cet indice, il faut néanmoins au moins 20 cycles avec des résultats connus et moins de 60 % de juments sans résultat connu. (74)

La fertilité par cycle varie de 47 % (semence congelée) à 60 % (monte en main) en fonction de la qualité de la semence de l'étalon mais aussi en fonction du mode de reproduction utilisé. (74)

b) *La fertilité par saison*

La fertilité par saison représente le pourcentage de chance qu'une jument inséminée à partir d'une semence d'un étalon donné soit gestante à la fin de la saison de reproduction. (74)

$$\text{Fertilité par saison} = \frac{\text{nombre de juments pleines en fin de saison} + (\text{nombre de juments sans renseignement} \times \text{fertilité par cycle})}{\text{nombre total de juments saillies}}$$

La fertilité par saison se calcule à la fin de la saison de reproduction. (74)(124)

Elle varie de 70 à 90 % en fonction de la technique de monte utilisée, du nombre de juments saillies par l'étalon ou inséminées par la semence de l'étalon et de la qualité du suivi de la jument. (74)

La fertilité par saison attendue pour un étalon normal est un taux de gestation de juments fertiles de 75 % lorsqu'il est utilisé en monte naturelle (pour au moins 40 juments) et de 90 % lorsqu'il est utilisé en insémination artificielle (pour au moins 120 juments). (67)

c) *La fertilité apparente*

La fertilité apparente représente le pourcentage de chance d'avoir un poulain. (74)

$$\text{Fertilité apparente} = \frac{\text{nombre de poulains nés de l'étalon}}{\text{nombre de juments saillies par l'étalon}}$$

La fertilité apparente est calculée 18 mois après la saison de monte. (74)

Elle est en moyenne de 60 %. (74)

d) *Les autres indicateurs*

D'autres indicateurs peuvent aussi être utilisés comme le taux de gestation au premier cycle et le taux de saillies par gestation.

- Taux de gestation au premier cycle = $\frac{\text{nombre de juments gestantes à la première insémination}}{\text{nombre de juments inséminées au premier cycle}}$ (124)

- Saillies par gestation = $\frac{\text{nombre total de saillies}}{\text{nombre total de gestations}}$ (124)

2. Les outils d'aide à l'analyse de la fertilité de la semence

L'étude de la qualité de la semence, détaillée dans la partie examen de la semence, ne permet pas de prédire de façon précise la fertilité de la semence. Des tests fonctionnels, biochimiques et génétiques peuvent être effectués afin de prédire de manière plus précise la fertilité. (129)

a) *Analyse assistée par ordinateur de la motilité des spermatozoïdes*

L'analyse des spermatozoïdes assistée par ordinateur (CASA : Computer Assisted Semen Analysis) permet d'obtenir une valeur fiable de la concentration de la semence en spermatozoïdes, de la motilité des spermatozoïdes et de la morphologie de la tête du spermatozoïde (figure 34). (129)

Un microscope permet d'obtenir des images vidéo des spermatozoïdes en mouvement. Ces images sont ensuite analysées par un logiciel informatique. Ceci permet d'obtenir des valeurs objectives de la motilité des spermatozoïdes. (129)

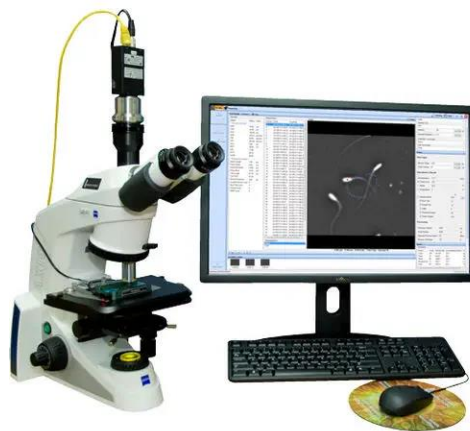


Figure 34 : Photo du système d'analyse des spermatozoïdes assistée par ordinateur CASA
Source : medicalexpo.fr

La motilité renseigne sur la viabilité et sur l'intégrité structurale des spermatozoïdes et donc impacte la fertilité de ces derniers. Toutefois ce paramètre n'est qu'une des nombreuses caractéristiques des spermatozoïdes. La motilité seule est ainsi faiblement liée à la fertilité mais l'analyse multiparamétrique permet de prédire de manière plus précise la fertilité. (21)

b) Analyse de la morphologie des spermatozoïdes par microscopie électronique

L'analyse de la morphologie du spermatozoïde par microscopie électronique (figure 35) ou par microscopie à contraste permet de comptabiliser de manière plus précise les anomalies des spermatozoïdes et ainsi de comptabiliser de manière plus fiable les spermatozoïdes normaux. (129)

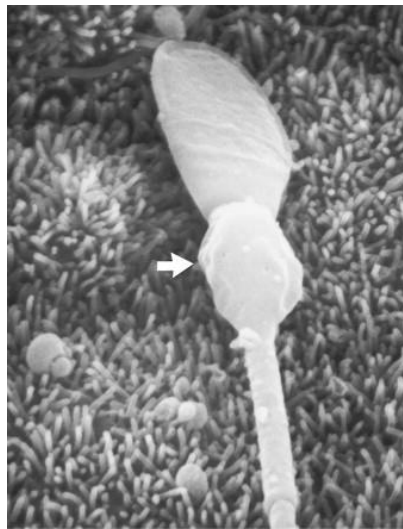


Figure 35 : Photo d'un spermatozoïde équin obtenu par microscopie électronique
Source : Steven P. Brinsko, 2011 (18)

Les anomalies peuvent aussi être classées en anomalie primaire, secondaire ou tertiaire.

Une autre classification consiste à enregistrer les anomalies morphologiques des spermatozoïdes en défauts majeurs ou mineurs :

- Les défauts majeurs : ce sont des défauts qui entraînent la mort embryonnaire précoce ou empêche la fécondation. Par exemple, les défauts de l'acrosome et du noyau sont des défauts majeurs.
- Les défauts mineurs : ce sont des défauts qui modifient la motilité du spermatozoïde de telle sorte qu'il ne soit pas capable d'atteindre l'ovocyte. Par exemple, les anomalies de la queue du spermatozoïde représentent un défaut mineur. (129)

Ces anomalies morphologiques peuvent être corrélées à la fertilité de la semence. Ainsi, par exemple, les spermatozoïdes présentant une tête avec une surface et un périmètre plus grand sont généralement associés aux mâles sous-fertiles par rapport aux mâles très fertiles. (114)

c) Analyse des spermatozoïdes par fluorescence et cytométrie en flux

La fluorescence et la cytométrie en flux sont des méthodes permettant d'évaluer la proportion de spermatozoïdes vivants et morts, la fonction mitochondriale, l'intégrité acrosomale, le statut capacitatif, la concentration intracellulaire de calcium des spermatozoïdes, et la teneur en chromatine du spermatozoïde. Cet ensemble de paramètres permettent de prédire la fertilité de la semence. (129)

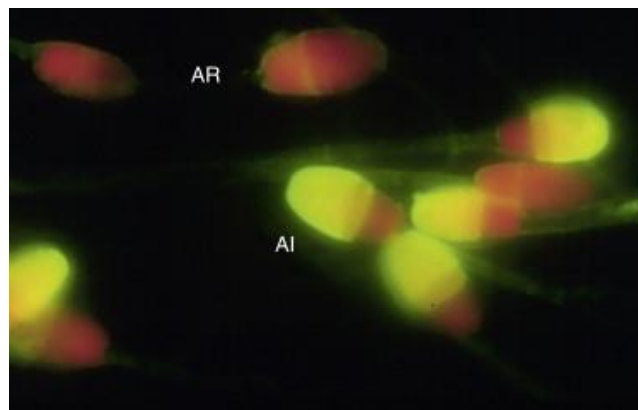


Figure 36 : Photo de spermatozoïdes équiens avec l'acrosome intact (en vert) colorés avec des colorants fluorescents et observés au microscope à fluorescence

Source : Steven P. Brinsko, 2011 (18)

Lors de cette méthode d'analyse, les spermatozoïdes sont marqués par un fluorochrome, c'est-à-dire une substance capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Les spermatozoïdes ainsi marqués passent devant un faisceau laser. Ceci émet une lumière qui est collectée et analysée (figure 36). (129)

La cytométrie en flux permet une évaluation plus complète de la semence en analysant simultanément plusieurs paramètres des spermatozoïdes en moins d'une minute. (64)

d) Analyse de l'intégrité de la membrane plasmatique par un test de gonflement hypo-osmotique

L'analyse de l'intégrité de la membrane plasmatique des spermatozoïdes par un test de gonflement hypo-osmotique cherche à montrer la fonction osmorégulatrice de la membrane plasmatique. (129)

Ce test consiste à placer les spermatozoïdes dans un milieu hypo-osmotique. Ceci conduit à un afflux d'eau dans le spermatozoïde, qui devient plus volumineux. Ainsi, lorsque la membrane plasmatique est intacte, le flagelle s'enroule (figure 37). (129)

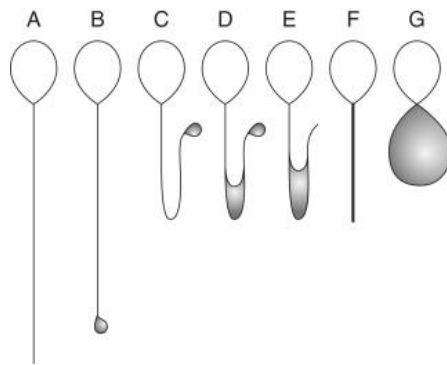


Figure 37 : Schéma des changements morphologiques des spermatozoïdes ayant subi un stress hypo-osmotique

Source : Jeyendran RS et al, 1984 (129)

Des études montrent une corrélation entre l'intégrité de la membrane plasmatique évaluée par cette méthode et la capacité de congélation de la semence ainsi qu'une corrélation avec la fertilité de la semence. (129)

e) Analyse de l'état de capacitation des spermatozoïdes

Les analyses de l'état de capacitation (paragraphe I- A- 7- a) et de la fluidité membranaire des spermatozoïdes permettent d'évaluer si les spermatozoïdes ont subi une capacitation précoce lors du processus de congélation/décongélation par exemple. (129)

L'évaluation au microscope de l'hyperactivité des spermatozoïdes fait partie des méthodes de détection des spermatozoïdes ayant subi une capacitation. (129)

Toutefois, le manque de données scientifiques sur le nombre de spermatozoïdes ayant subi une capacitation précoce sur une semence normale, empêche d'analyser ce paramètre de façon objective. (144)

f) Analyse de l'intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes ayant subi une réaction acrosomique (I- A- 7- b) précoce lors de la conservation perdent leur capacité de fécondation. (129) (144)

Il est possible d'évaluer le nombre de spermatozoïdes ayant subi cette réaction acrosomique en utilisant des colorants ou des marqueurs fluorescents qui se fixent uniquement sur l'acrosome des spermatozoïdes dont la réaction acrosomique n'a pas eu lieu. (144)

g) Evaluation du degré de condensation et de l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes

La méthode SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) permet de détecter par une coloration à l'acridine orange, l'ADN des spermatozoïdes dénaturé simple brin (colorés en rouge) et l'ADN intact double brin (coloré en vert). (129)

Cette méthode permet ainsi de donner une information sur la qualité des spermatozoïdes, utile pour évaluer la fertilité de l'étalon. En effet, des anomalies de la chromatine peuvent provoquer des avortements précoces. (129)

h) Analyse des composants du plasma séminal

Des marqueurs biochimiques de la fonction des spermatozoïdes peuvent être utilisés pour évaluer la fertilité de la semence d'étalon. (129)

Par exemple, la phosphatase alcaline présente dans le plasma séminal est corrélée de manière positive à la fertilité. En effet la phosphatase alcaline est le témoin d'une contribution normale de la sécrétion testiculaire et épидидymaire dans l'éjaculat, lorsqu'elle est présente en quantité élevée. Par ailleurs, les espèces réactives de l'oxygène sont liées à des dommages de l'ADN des spermatozoïdes. (129)

i) Autres analyses

Des tests de liaison des spermatozoïdes aux ovocytes sont des tests très fortement corrélés à la fertilité des étalons mais extrêmement difficiles à mettre en place. (129)

Aussi des marqueurs génétiques de la fertilité sont encore peu développés mais pourraient être des outils précieux dans le futur. (129)

Bien que ces méthodes permettent de donner une idée du potentiel de fertilité, il n'est néanmoins pas possible de prédire la fertilité d'un étalon avec une simple analyse de sa semence. En effet, il existe d'autres facteurs complexes qui peuvent affecter la fertilité. (64) Comme pour l'espèce humaine, 15 % des étalons présentant des caractéristiques de semence normale sont hypofertiles. Ces spermatozoïdes d'apparence normale sont incapables de féconder un ovocyte du fait, par exemple, de leur incapacité à se lier à la zone pellucide et de provoquer une réaction acrosomale. (58) (80)

E. Causes d'infertilité de l'étalon

De nombreuses recherches visent à comprendre la fertilité des étalons. En effet, plusieurs facteurs impactent la fertilité. (67)

Une sous-estimation de la fertilité d'un étalon peut être causée par l'utilisation de juments subfertiles. Par ailleurs, la présence de résidus chimiques et spermicides dans le matériel en contact avec la semence de l'étalon peut également faussement diminuer la fertilité de l'étalon. Une bonne condition corporelle, ainsi qu'une bonne santé sont des facteurs nécessaires à la fertilité optimale de l'étalon. Aussi, certains médicaments, comme les progestatifs et les stéroïdes anabolisants, peuvent avoir un effet néfaste sur la fonction de reproduction des étalons au long terme. La gestion de la fréquence de reproduction trop intense ou trop faible, l'âge de l'étalon, une température ambiante trop élevée et/ou des facteurs intrinsèques à l'étalon peuvent affecter la fertilité de ces derniers. (67)

Les différentes causes d'infertilité de la semence équine sont présentées ci-après.

1. Contamination de la semence

a) *Hémospermie*

L'hémospermie est la contamination de la semence par du sang. Elle est causée par des lésions de surface (hématomes, lacération, abrasion, ulcères...) du pénis et du processus urétral, par des ulcères urétraux, par des urétrites bactériennes, par des anomalies de conformation urétraux, par des tumeurs (carcinomes épidermoïdes), par des vésiculites séminales, des épидидymites, un exanthème coïtal, une habronérose cutanée et une occlusion des ampoules. (67) (139) (141)

L'hémospermie peut être constante ou intermittente chez un étalon. Elle n'est pas dépendante de l'intensité d'utilisation de l'étalon. (141)

Le diagnostic passe par l'observation de sang frais ou séché sur le pénis, les membres pelviens et l'abdomen ventral de l'étalon ou dans la semence collectée (figure 38) après avoir exclu que cela pourrait provenir d'une lésion de la femelle. Le diagnostic peut être confirmé par un examen visuel puis endoscopique du pénis de l'étalon. (67)

L'hémospermie provoque une baisse de fertilité jusqu'à une infertilité totale qui est fonction du nombre d'hématies dans l'éjaculat. (67) En effet, ce n'est pas la simple présence de sang dans l'éjaculat, mais la quantité de sang dans l'éjaculat, qui entraîne l'infertilité de la semence. Par exemple, une contamination de l'éjaculat avec 5 % de sang ne semble pas affecter la fertilité de ce dernier alors qu'une contamination de 50 % semble provoquer une infertilité totale. Le taux minimum de contamination sanguine de l'éjaculat affectant la capacité de

fertilité de la semence n'est actuellement pas connu. Le mécanisme qui induit l'infertilité par les globules rouges sur l'éjaculat est encore inconnu. La formation d'un caillot dans l'échantillon de la semence ou l'altération de la qualité des spermatozoïdes par des leucocytes se retrouvant ainsi à proximité des spermatozoïdes sont des hypothèses émises dans certaines études. (155)



Figure 38 : Photo d'un éjaculat d'étalon hémospérmiq
Source : Sidnei N. Oliveira, 2020 (98)

b) Urospermie

L'urospermie correspond à une miction lors de l'éjaculation. Il s'agit d'un défaut de fermeture du col de la vessie lors de l'éjaculation causé par un défaut du système sympathique adrénérqique contrôlant cette fonction, une paralysie de la vessie, une névrqite de la queue de cheval, une intoxication au Sorgho et à l'herbe du Soudan, une virose équine due à EHV1 (Herpès Virus Equin de type 1) ou des néoplasies. (67) (139)

Ce phénomène peut être intermittent ou permanent chez les étalons. L'urine va modifier le pH et l'osmolarité de la semence et provoquer ainsi une diminution de la viabilité et de la motilité des spermatozoïdes. Elle entraîne, de ce fait une hypofertilité de l'éjaculat. Ces perturbations des spermatozoïdes sont doses dépendantes : plus il y a d'urine, plus les spermatozoïdes sont affectés négativement. (139)

L'urospermie peut être détectée par une modification du volume, de couleur, de pH, d'odeur de l'éjaculat, ou par un dosage en créatinine et urée de la semence. Des solutions comme une incitation à uriner avant la collecte, un cathétérisme urétral, une collecte fractionnée, ou l'utilisation de substances pharmacologiques comme le chlorhydrate d'imipramine, afin de

contrôler le sphincter de la vessie, peuvent être envisagées mais ne sont pas toujours satisfaisantes. (104)

c) *Pyospermie*

Souvent secondaire à une infection ou à une inflammation des canaux déférents, des glandes accessoires ou de l'urètre, la pyospermie se traduit par la présence de débris purulents, de globules blancs et d'agents pathogènes dans la semence éjaculée (figure 39). Elle est responsable d'infertilité chez l'étalon. La présence de leucocytes dans la semence joue un rôle dans l'immunosurveillance et l'élimination des spermatozoïdes anormaux. Toutefois, la présence de leucocytes en quantité excessive et de bactéries dans la semence provoque une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de cytokines pro inflammatoires qui ont un effet négatif sur l'intégrité de la membrane plasmique, de l'ADN et de la fonction mitochondriale, ce qui conduit à l'apoptose des spermatozoïdes. La motilité et la longévité des spermatozoïdes sont ainsi réduites, entraînant une baisse de la fertilité. (119) (124) (138) (151)



Figure 39 : Photo d'un éjaculat d'étalon contenant du pus
Source : Sidnei N. Oliveira, 2020 (98)

d) *Agents pathogènes dans le tractus génital*

Certains agents pathogènes peuvent se retrouver dans la semence et perturber les caractéristiques de cette dernière, ce qui entraîne par la suite une réduction de sa qualité et donc une baisse de la fertilité. Il est aussi possible que des agents pathogènes présents dans la semence soient transmis à la jument par voie vénérienne, ce qui cause des infections de l'appareil reproducteur de la jument et donc des problèmes de fertilité de celle-ci imputables à l'étalon. (67)

(1) Les bactéries

Les micro-organismes peuvent être transmis par voie vénérienne ou non.

Les organes génitaux externes de l'étalon possèdent une flore commensale. Il peut également y avoir des bactéries pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus zooepidermicus*, *Taylorella equigenitalis* et rarement d'autres. Ces bactéries provoquent une hypofertilité des étalons. (67)

Une balanoposthite provoquée par *Mycoplasma equigenitalium*, *Mycoplasma subdolum* ou *Acholeplasma spp*, à la suite d'une contamination par voie vénérienne peut entraîner une baisse de la fertilité des étalons. La chlamydie peut par ailleurs provoquer une baisse de la qualité de la semence produite. Ces bactéries pathogènes peuvent aussi être présentes dans tout l'appareil reproducteur de l'étalon. (139)

La présence de bactéries dans la semence peut, par ailleurs, conduire à une diminution de sa capacité de cryoconservation. (119)

(2) Les virus

Deux virus peuvent également être responsables d'hypofertilité chez les étalons, le virus de l'artérite virale équine et l'herpès virus équin de type III. (67)

L'artérite virale peut être responsable d'une maladie systémique et ainsi provoquer fièvre, démarche raide, larmoiement et conjonctivite, écoulement nasal, éruption cutanée et œdème des membres inférieurs, du scrotum et de la tête. Des avortements sont aussi possibles en cas d'infection grave. L'étalon peut aussi présenter un œdème scrotal, et donc une infertilité due à l'élévation de température au niveau des testicules impactant la qualité de la semence et la spermatogénèse. L'infection se fait par voie respiratoire ou vénérienne. L'étalon infecté devient porteur jusqu'à trois ans après. La séroconversion de l'étalon permet de mettre en évidence le statut de l'étalon. Par ailleurs, les étalons atteints d'artérite virale équine excrètent le virus dans leur semence pendant environ trois mois et demi. Cependant l'excrétion du virus dans la semence ne semble pas être responsable de la détérioration de la qualité de cette dernière. (22)

L'exanthème coïtal causé par l'herpes virus III peut provoquer une infection des organes génitaux externes des juments et étalons (vésicule sur le prépuce, pénis ou vulve puis pustules puis ulcères et croûtes), ou une maladie systémique (principalement fièvre ou anorexie). Les lésions sur les organes génitaux externes peuvent entraîner de la douleur ou des saignements. La transmission se fait par voie vénérienne lorsque les lésions sont en place. (67)

(3) Les parasites

Des parasites peuvent aussi être transmis par voie vénérienne. *Trypanosoma equiperdum* responsable de la dourine provoque de la fièvre, une perte de poids, une atteinte dermatologique et un exsudat purulent de l'urètre. (67)

(4) Les champignons

Candida spp. et *Aspergillus spp.* peuvent également entraîner de l'infertilité chez l'étalon lors d'une contamination par du matériel d'insémination artificielle. (139)

2. Anomalies de production des spermatozoïdes

a) *Traumatisme physique*

Un traumatisme physique des organes génitaux externes de l'étalon peut avoir lieu lors d'une monte naturelle et entraîner un œdème, des plaies, des lacérations ou un paraphimosis (prépuce rétracté derrière le gland). Des traumatismes du scrotum ou des testicules peuvent également avoir lieu. Ces derniers peuvent provoquer de l'œdème et une augmentation de la température localement ce qui peut compromettre la thermorégulation et donc la spermatogénèse. La température intra-testiculaire normale d'un étalon lors de la spermatogénèse est de 35 °C avec une diminution graduelle de la température de la base à l'apex. La régulation de la température est assurée par la contraction et la décontraction à la fois du dartos et du muscle crémaster qui rapproche ou éloigne les testicules de l'abdomen de l'étalon, par l'activité des glandes sudoripares, par l'irradiation de chaleur sur la surface scrotale, ainsi que par les échanges de chaleur artério-veineux. Lorsque la thermorégulation n'est plus assurée et que la température scrotale augmente de plus de 2 °C, il se produit une dégénérescence du testicule et donc une altération de la cinétique des spermatozoïdes, de l'intégrité de la membrane plasmatique et de la morphologie des spermatozoïdes. (118)

Par ailleurs, une lésion des testicules peut être à l'origine de l'exposition des spermatozoïdes à la circulation systémique. Ceci provoque la production d'anticorps anti-spermatiques et donc une hypofertilité ou une infertilité. (67)

b) Infections systémiques et maladies infectieuses

Les maladies systémiques influent sur la fertilité des étalons par différents mécanismes. Elles peuvent premièrement causer une inflammation de l'appareil reproducteur, comme le scrotum, les testicules et d'épididyme, et ainsi provoquer une baisse de fertilité. (67)

Ensuite, les maladies systémiques peuvent provoquer de la fièvre. Celle-ci peut interagir avec le mécanisme de thermorégulation des testicules et ainsi entraîner une réduction significative du nombre de spermatozoïdes produits, une réduction du nombre de spermatozoïdes progressivement motiles, et une augmentation du nombre de spermatozoïdes présentant des défauts morphologiques. Ces effets sont réversibles 60 à 70 jours (temps de la spermatogénèse) après la résolution de la maladie systémique. (67)

Aussi, les maladies systémiques peuvent avoir un effet négatif sur la libido de l'étalon. (67)

c) Inflammation locale

(1) Orchite

Une orchite est une infection des testicules provoquée par des bactéries, des virus ou des parasites. L'infection peut se faire par voie ascendante, traumatique ou systémique. Elle est à l'origine de fièvre, mais aussi d'une baisse de la libido, d'une azoospermie due à l'atteinte du fonctionnement normal des cellules testiculaires intervenant dans la spermatogénèse, d'une contamination de l'éjaculat par des polynucléaires neutrophiles, des anomalies des spermatozoïdes et d'une faible motilité des spermatozoïdes. Des adhérences entre la tunique vaginale et le tissu sous cutané ainsi qu'un œdème scrotal peuvent aussi être observés. L'ensemble de ces facteurs causent une diminution de la fertilité de l'étalon atteint. (138)

(2) Epididymite

L'épididymite est une affection causée par des bactéries ou des parasites. L'épididymite peut provoquer de la fièvre et une tuméfaction locale. Les éjaculats de ces étalons peuvent présenter une oligospermie ou une azoospermie, une hypasthénie et un nombre plus important de spermatozoïdes sans tête. L'éjaculat présente aussi un nombre accru de neutrophiles. En cas d'atteinte bilatérale, le pronostic de fertilité est très réduit. (138)

d) Anomalies endocriniennes

Des déséquilibres ou anomalies endocriniennes peuvent réduire la fertilité des étalons. (67)

Une augmentation du taux de FSH et une diminution du taux de testostérone et d'inhibine sont liées à une dégénérescence testiculaire et à une hypofertilité. (67)

Aussi, une diminution de la concentration en inhibine et en œstrogènes associée à des taux de FSH élevés, sont responsables d'une baisse de la fertilité. En effet, ces déséquilibres provoquent une diminution de la motilité des spermatozoïdes, une modification de la morphologie des spermatozoïdes ainsi qu'un changement de la consistance des testicules. Le dysfonctionnement initial a lieu au niveau des cellules de Sertoli qui produisent l'inhibine puis continue par les cellules germinales, puis les cellules de Leydig, et enfin l'hypothalamus. (67)

Un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire peut également causer une faible réponse testiculaire à la stimulation par de la GnRH. (67)

e) Azoospermie et hypoazoospermie

L'azoospermie est l'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat, causée par un défaut de spermatogénèse, une obstruction des canaux, un échec de l'éjaculation ou une éjaculation rétrograde. (145)

Une hypoazoospermie est une faible teneur en spermatozoïdes présents dans la semence (moins de quatre millions de spermatozoïdes/cm³ de parenchyme testiculaire). Une éjaculation d'un faible nombre de spermatozoïdes entraîne une diminution du nombre de spermatozoïdes atteignant l'oviducte et donc réduit la fertilité de l'étalon. Par ailleurs, ces étalons produisent une quantité de plasma séminal supérieure par rapport au nombre de spermatozoïdes, ce qui peut entraîner une expulsion d'une partie de l'éjaculat hors de l'utérus avant que les spermatozoïdes n'aient pu atteindre l'oviducte. (13) (145)

f) Dysfonctionnement acrosomique

La réaction acrosomique est la fusion de la membrane plasmique externe avec l'acrosome. Cette réaction libère des enzymes indispensables pour la pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde. La progestérone ou des ionophores de calcium déclenchent la réaction. Certains spermatozoïdes d'étalon ne répondent pas à la progestérone ou aux ionophores de calcium ce qui empêche la réaction acrosomique d'avoir lieu et ainsi provoque une sub-fertilité chez ces étalons. (145)

g) Chromatine spermatique anormale

La proportion de chromatine anormale dans les spermatozoïdes est corrélée négativement avec la fertilité d'un étalon. Tout incident traumatique ou stressant du testicule peut provoquer une anomalie de la chromatine. Les anomalies de chromatines peuvent aussi être de cause inconnue. La détection passe par la cytométrie en flux, notamment. (145)

h) Tumeur des testicules

Le séminome et le tératome sont les tumeurs testiculaires les plus fréquentes. Elles entraînent un dysfonctionnement des cellules intervenant dans la spermatogénèse et donc une production de spermatozoïdes avec une morphologie et une motilité anormale. (124)

Un séminome peut être mis en évidence par une hypertrophie et un durcissement testiculaire qui devient de plus en plus invasif. (67) (124)

3. Les causes d'infertilité liées à l'étalon

a) Incapacité de monter sur la jument et de la pénétrer

Les boiteries, blessures, notamment des membres pelviens, ou affections neurologiques (myéloencéphalopathie à protozoaire équin, instabilité cervicale, paralysie du pénis et myéloencéphalopathie à herpesvirus) qui empêchent l'étalon de monter une jument ou modifient son comportement peuvent être des causes d'infertilité. (67)

b) Traumatismes psychologiques et faible libido

Certains étalons ayant eu une mauvaise expérience d'une saillie précédente peuvent refuser de monter une jument, ou bien peuvent monter la jument sans pénétration et/ou éjaculation. (67)

c) Anomalies congénitales

Les anomalies congénitales chez l'étalon peuvent concerner les testicules, l'épididyme et/ou le pénis. Pour les testicules, les principales anomalies congénitales rencontrées sont un testicule ectopique, une cryptorchidie, une hypoplasie ou une atrophie gonadique. Ces anomalies sont responsables d'un fonctionnement anormal des cellules du testicule et impliquent une spermatogénèse défectueuse. (124)

Les anomalies congénitales de l'épididyme sont principalement représentées par une fusion incorrecte des canaux lors du développement de l'épididyme ce qui entraîne la présence de canaux borgnes et donc une incapacité d'acheminer les spermatozoïdes. Une agénésie épидидymaire peut aussi être mise en évidence, ce qui conduit à une perte de fonction de l'épididyme et donc à une infertilité. (124)

Le phimosis peut également être congénital. Il s'agit de l'incapacité de rétractation du prépuce en arrière du gland, empêchant ainsi l'étalon d'extérioriser le pénis. (124)

Les anomalies congénitales des glandes sexuelles sont rares. Lorsqu'elles sont présentes une baisse de la fertilité des étalons est observée. (124)

d) Anomalies d'acheminement des spermatozoïdes

(1) Les tumeurs des organes génitaux externes

Les tumeurs des organes génitaux externes peuvent être à l'origine d'une incapacité pour l'étalon de faire une érection, d'une obstruction du tractus des voies spermatiques ou d'une douleur. Les carcinomes épidermoïdes ou les sarcoïdes sont les plus rencontrés. Le diagnostic passe par un examen histopathologique d'un prélèvement réalisé par biopsie. (67)

(2) Obstruction des voies spermatiques

Des calculs ou une cicatrice peuvent entraîner une obstruction des voies spermatiques. (67)

e) *L'âge de l'étalon*

L'âge peut provoquer une détérioration progressive de la qualité de la semence. En effet, la production de spermatozoïdes mobiles et normaux diminue avec l'âge. Celle-ci est éventuellement suivie d'une diminution de la taille, de la texture et de l'aspect échographique des testicules. La diminution de la production de spermatozoïdes est provoquée par une dégénérescence des cellules germinales, une diminution du diamètre des tubes séminifères, un taux de cellules germinales/cellules de Sertoli plus faible et une diminution de la production de testostérone. (14) (41)

F. Les effets du stress oxydatif sur la semence

Le stress oxydatif se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule.

1. Définition : Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des molécules qui contiennent l'élément oxygène et sont chimiquement très actives du fait de la présence d'un électron qui n'a qu'une seule liaison. Les électrons dans cet état ont une forte tendance à essayer de former des liaisons plus fortes, conduisant à des réactions chimiques. Les espèces réactives de l'oxygène comprennent des radicaux libres ainsi que d'autres oxydants (par exemple, le peroxyde d'hydrogène qui est la principale espèce réactive de l'oxygène toxique pour les spermatozoïdes du fait de sa grande perméabilité à la membrane plasmique). Lorsqu'elles sont à des niveaux élevés, elles ont des effets secondaires négatifs regroupés sous le terme de stress oxydatif. (9) (41)

2. La production d'espèces réactives de l'oxygène

a) *La production normale*

La production d'espèces réactives de l'oxygène a lieu lors du métabolisme oxydatif mitochondrial normal. (9)

Les étalons utilisent principalement la voie de phosphorylation oxydative pour la production d'énergie ce qui permet de créer une quantité importante d'ATP. Ceci permet une motilité plus importante des spermatozoïdes mais provoque la production d'espèces réactives de l'oxygène. (41)

b) Les productions excédentaires

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être produites de façon plus importante lors :

- de l'exposition à des leucocytes (production 1000 fois plus importante que lors du métabolisme normal) ou encore lors de l'exposition à des spermatozoïdes endommagés, morts ou anormaux. (9) (41) Les neutrophiles contiennent et libèrent, lors de la dégranulation ou de leur lyse, la myéloperoxydase, une enzyme pro oxydante qui va entraîner une diminution de la motilité des spermatozoïdes. Les cellules non spermatiques peuvent aussi contenir cette enzyme et la libérer lors d'une baisse de température. Cette enzyme est principalement retrouvée lors de la décongélation des paillettes, bien qu'elle soit présente dans la semence fraîche et dans les semences de mauvaise qualité. (105)
- de changement de volume, d'osmolarité et de pression des spermatozoïdes au cours du processus de conservation. (9) (41)
- de l'exposition au lubrifiant utilisé lors de la collecte dans le vagin artificiel. (9)

Certains autres facteurs sont susceptibles d'engendrer un stress oxydatif sur la lignée germinale masculine :

- le stress thermique : les températures élevées augmentent le taux métabolique systémique et la demande en oxygène, ce qui peut entraîner à long terme une hypoxie testiculaire et donc un stress oxydatif
- une mauvaise nutrition : des carences nutritionnelles peuvent causer l'épuisement des antioxydants.
- la pollution
- l'exposition à l'énergie électromagnétique non ionisante (41)

Par ailleurs l'âge de l'étalon provoque une augmentation de la sensibilité au stress oxydatif.

3. Les effets des espèces réactives de l'oxygène sur les spermatozoïdes

a) Les effets bénéfiques des espèces réactives de l'oxygène sur les spermatozoïdes

Il faut noter que les espèces réactives de l'oxygène (par exemple l'anion peroxyde) sont importantes pour le fonctionnement physiologique des spermatozoïdes, notamment lors du stockage frais ou réfrigéré de la semence ou lors de l'induction de la capacitation des spermatozoïdes, ainsi que pour la réaction acrosomique. (9)

Elles ont aussi des fonctions antimicrobiennes et immunomodulatrices qui permettent de déclencher l'apoptose des spermatozoïdes excédentaires dans l'appareil reproducteur femelle. (41)

b) Les effets négatifs du stress oxydatif sur les spermatozoïdes

Lorsque les espèces réactives de l'oxygène sont présentes en trop grande quantité, une rupture de l'homéostasie, entretenue par les antioxydants, se produit. Ainsi, le stress oxydatif apparaît et cause des dommages importants aux spermatozoïdes. En effet, il se produit notamment des dommages au niveau de la chromatine avec une fragmentation de l'ADN. Aussi, la membrane plasmique subit des dommages avec une peroxydation lipidique qui affecte la fluidité de la membrane et cause problème lors de la fusion des membranes notamment lors de l'exocytose de l'acrosome au moment de la réaction acrosomique. Les protéines sont également endommagées, ce qui crée un dysfonctionnement des protéines de structure et de fonction des spermatozoïdes, notamment celles permettant la reconnaissance des spermatozoïdes et des ovules. Une exposition importante aux espèces réactives de l'oxygène peut provoquer l'induction de la cascade apoptotique des spermatozoïdes. Ceci provoque une diminution de la fertilité des spermatozoïdes (figure 40). (9) (41) (92) (105)

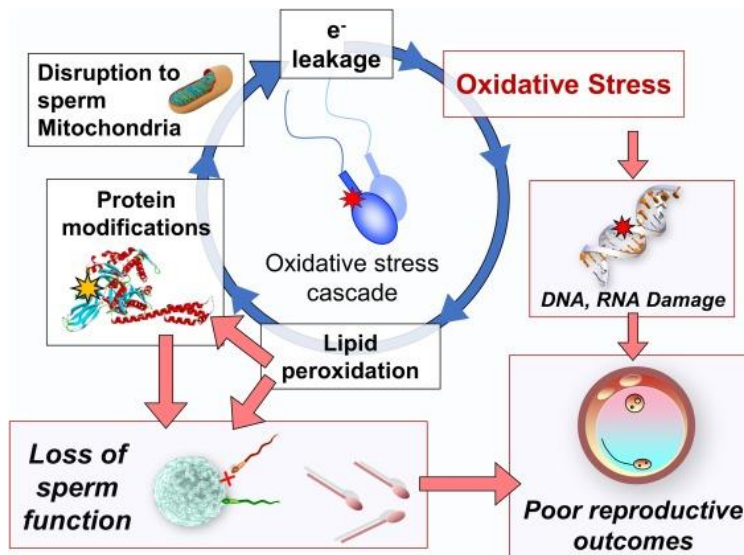


Figure 40 : Schéma des dommages causés aux spermatozoïdes par le stress oxydatif
 Source : Zamira Gibb et al, 2020 (41)

e- leakage : fuite d'électron, oxidative stress : stress oxydatif, DNA, RNA Damage : dégradations à l'ADN et à l'ARN, poor reproductive outcomes : mauvais résultats de reproduction, loss of sperm function : perte de la fonction des spermatozoïdes, protein modifications : modifications des protéines, disruption to sperm mitochondria : perturbation des mitochondries des spermatozoïdes

Ainsi, lors d'une forte exposition aux espèces réactives de l'oxygène, une diminution de la motilité des spermatozoïdes est observable. (41)

Les spermatozoïdes sont très sensibles au stress oxydatif. En effet, ils disposent d'un cytoplasme réduit, d'une surface importante par rapport à leur volume, et ils n'ont pas de système de réparation enzymatique. Ainsi, les radicaux libres accumulés au cours de la conservation réfrigérée et de la cryoconservation et décongélation vont réagir avec la membrane plasmatique, les mitochondries, l'ADN et les protéines et provoquer des dommages fonctionnels et structurels irréversibles. (41) (92)

Contrairement aux spermatozoïdes, le plasma séminal contient une quantité variable, selon les étalons, d'anti-oxydants (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase), qui permet de protéger les spermatozoïdes du stress oxydatif. Ceci explique pourquoi les dommages causés par le stress oxydatif sont d'autant plus importants que la semence est conservée congelée, où une grande partie du plasma séminal est retirée dans ce procédé de conservation. (9)

L'acide nicotinique, présent naturellement à des concentrations inconnues dans le sperme, est la partie fonctionnelle de plusieurs coenzymes dans les réactions d'oxydo-réduction du métabolisme cellulaire. L'acide nicotinique a une action anti-oxydante et permet de protéger les cellules des dommages oxydatifs. Ainsi, l'acide nicotinique à une concentration de 20 ou 40 millimoles par litre pourrait réduire les effets négatifs sur les paramètres de qualité des

spermatozoïdes lors de la conservation frigorifique. Les paramètres sont l'intégrité de l'acrosome, l'intégrité de la membrane plasmatique et l'intégrité de l'ADN. L'acide nicotinique peut aussi réduire la détérioration des paramètres de qualité des spermatozoïdes après la décongélation. (7)

G. Amélioration de la fertilité des étalons

Plusieurs méthodes sont utilisées afin d'améliorer la fertilité des étalons. Cette partie présente différentes méthodes.

1. Utilisation d'antioxydants dans la semence

Des antioxydants peuvent être utilisés en les ajoutant dans le dilueur lors de la préparation de la semence pour la conservation, afin de limiter l'impact du stress oxydatif sur les spermatozoïdes cryoconservés : (9)

- Le pyruvate limite la perte de motilité des spermatozoïdes lorsqu'il est ajouté au milieu de conservation du sperme bovin.
- La vitamine E est utilisée en espèce porcine lors du refroidissement du sperme et a une action positive sur la motilité des spermatozoïdes.
- Le glutathion protège la motilité des spermatozoïdes des étalons lorsqu'il est en présence de système générateur de stress oxydatif pour les spermatozoïdes, notamment le système xanthine-xanthine oxydase.

Néanmoins l'ajout d'une grande variété d'antioxydants liposolubles ou hydrosolubles n'a pas permis de préserver la motilité des spermatozoïdes de façon satisfaisante lors du stockage refroidi de semence. (47) (9)

2. Adaptation du régime alimentaire

Les spermatozoïdes sont riches en lipides. De ce fait, une supplémentation en acides gras n-3 modifie la teneur en acide gras du sperme et semble augmenter la concentration en spermatozoïdes, et la motilité de ces derniers, ainsi que diminuer le nombre de spermatozoïdes morphologiquement anormaux surtout chez les étalons avec une qualité de semence non optimale avant le changement alimentaire. (66)

Une alimentation complémentée en vitamine E et sélénium peut aussi avoir un effet positif pour limiter la peroxydation lipidique par les espèces réactives de l'oxygène sur les spermatozoïdes d'oiseaux ou d'autres mammifères. Elle permet d'augmenter l'activité des

anti-oxydants présents dans le plasma séminal. Cette supplémentation peut aussi augmenter la fertilité lorsqu'elle est proposée aux juments. (9)

3. Insémination en corne utérine profonde

L'insémination en corne utérine profonde est une technique d'insémination qui consiste à déposer le sperme en haut de la corne utérine se trouvant du côté du follicule pré-ovulatoire (figure 41). (96)

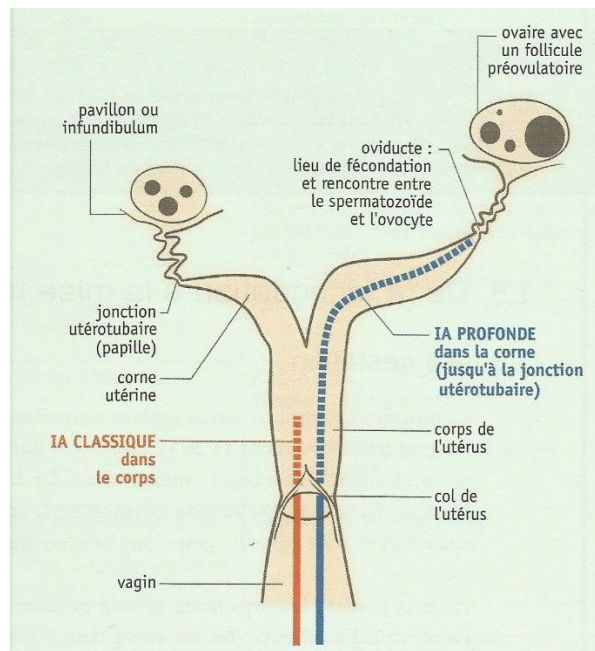


Figure 41 : Schéma d'un utérus de jument montrant les sites d'inséminations classique et profonde

Source : Source : Jean Marc Foisseau et al, 2005 (35)

L'insémination en corne utérine profonde chez la jument permet une utilisation plus efficace de la semence équine. Elle permet, une fois concentrée, d'optimiser la semence d'un étalon oligospermique. Cette technique permet aussi de réduire la réaction inflammatoire après l'insémination. (96)

4. Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI)

L'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) désigne une technique de procréation médicalement assistée (PMA), qui consiste à injecter un spermatozoïde dans un ovocyte. Dans

l'espèce équine, la fécondation *in vitro* (FIV) classique ne fonctionne pas, d'où l'intérêt de cette technique pour la filière. Initialement utilisée lors de troubles de la fertilité de la jument, cette technique s'est ensuite développée afin d'augmenter la production de descendants à partir d'une jument fertile lors d'une saison ou pour éviter d'interférer avec la carrière sportive de la jument. (37)

Cette technique peut aussi être utilisée lors de troubles de la fertilité chez un étalon oligospermique ou pour une semence de mauvaise qualité. Ceci ne peut cependant fonctionner que si les spermatozoïdes des étalons infertiles sont motiles. Les résultats de cette procédure sont inférieurs à ceux obtenus à partir de spermatozoïdes d'étalons fertiles. (61)

Cette méthode peut être précédée d'une centrifugation en gradient de densité (développée dans le paragraphe II- B) et/ou de swim-up (développée dans le paragraphe II- C- 3- a- (2)) afin d'enrichir la semence en spermatozoïdes motiles et de réduire la quantité de dilueur. Ceci sera abordé dans la partie II. (27) (37) (45) (61)

Cette technique présente aussi des avantages en cas de faible disponibilité de la semence désirée du fait de la mort ou de la castration de l'étalon producteur. Lors de cette pratique, il est possible de décongeler des paillettes, de diluer la semence obtenue, d'en utiliser une microdose pour l'injection intracytoplasmique, puis de recongeler le reste dilué pour une utilisation ultérieure. Ceci n'interfère pas avec le potentiel de fertilité de l'étalon. (45)

5. Collecte de sperme fractionnée

La collecte de sperme fractionnée consiste à collecter la semence de manière fractionnée, à savoir par phase d'éjaculat. Elle est indiquée en cas de vésiculite séminale, d'éjaculat à grand volume mais peu concentré en spermatozoïdes, de semences avec une mauvaise réaction au refroidissement ou à la congélation, d'urospermie ou de pyospermie. (98)

La collecte de sperme fractionnée est réalisée à l'aide d'un vagin artificiel modifié, à savoir ayant une doublure intérieure (en contact avec le pénis de l'étalon), plus longue. Lors de l'éjaculation, les différentes fractions du sperme sont séparées grâce à des pinces disposées sur la doublure et fermées au moment opportun (figure 42). Les deux premiers jets de sperme proviennent des testicules, de l'épididyme et de l'ampoule séminale, et les suivants de la vésicule séminale. (98)

Dans le cas d'une vésiculite séminale, cette méthode permet d'obtenir dans les deux premiers jets d'éjaculat, une semence exempte de bactéries pathogènes, de polynucléaires et de globules rouges. Les deux jets suivants sont faiblement contaminés par des bactéries pathogènes, des globules rouges et des polynucléaires et les derniers jets sont fortement contaminés par ces mêmes cellules. Par ailleurs, la motilité des spermatozoïdes se détériore des premières aux dernières fractions. Une insémination artificielle après réfrigération des deux premiers jets permet ainsi d'obtenir des gestations, alors qu'une insémination avec le sperme entier des mêmes étalons n'aboutit pas à une gestation. (98)

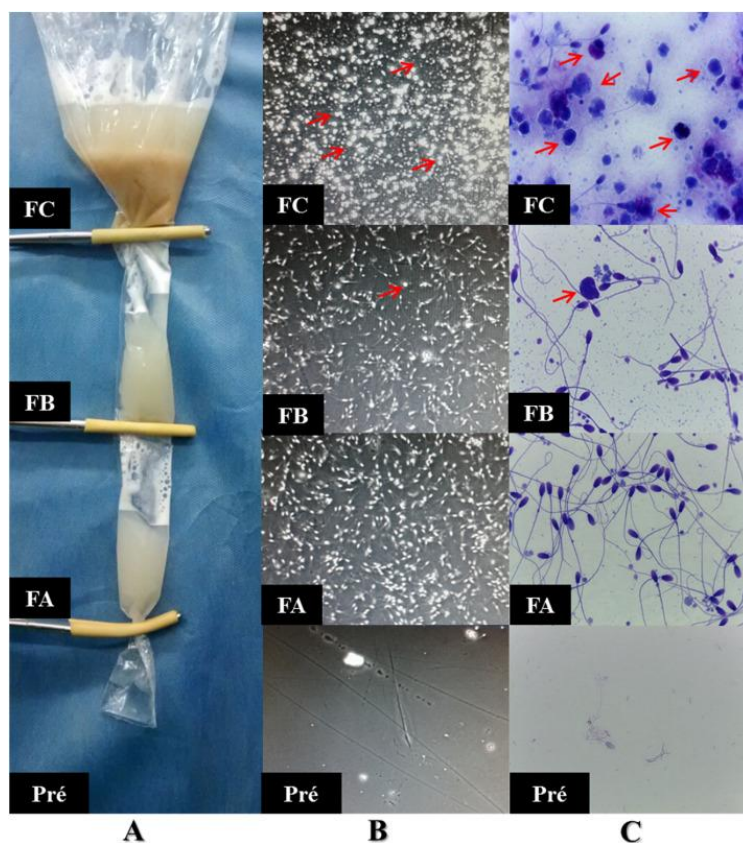


Figure 42 : Photo de la cellularité (A), des images obtenues par le système d'analyse des spermatozoïdes CASA (B) et des images obtenues au microscope optique au grossissement x 1000 (C) des différentes fractions d'un éjaculat d'étalon atteint de vésiculite séminale
Source : Sidnei N. Oliveira, 2020 (98)

6. Gestion de l'étalon âgé avec déclin de la capacité de reproduction

Un étalon âgé connaît, au fil du temps, une dysfonction testiculaire qui se traduira tout d'abord par une baisse de la production en spermatozoïdes, ce qui entraîne une diminution de l'efficacité de la spermatogénèse. Ensuite, une diminution du nombre de spermatozoïdes morphologiquement normaux et progressivement motiles est observée. Par la suite, c'est l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes qui est touchée. A ce stade, la taille des testicules est diminuée et les concentrations en hormones circulantes sont modifiées. (15)

Plusieurs stratégies permettent d'optimiser au mieux la semence d'un étalon âgé : (14)

- En monte naturelle : un accouplement plus proche du moment de l'ovulation, une diminution de la fréquence d'accouplement et des accouplements multiples, planifiés pendant le même œstrus permettent de maximiser la semence d'un étalon âgé.
- En insémination artificielle plusieurs stratégies sont possibles :

- Concentrer les doses en nombre de spermatozoïdes dans un faible nombre de doses.
- Réaliser une centrifugation coussinée pour augmenter la concentration en spermatozoïdes dans les échantillons dilués.
- Inséminer en corne utérine profonde.
- Séparer les spermatozoïdes et inséminer en corne utérine profonde à faible dose.

7. Utilisation de dilueurs de semence adaptés

Pour les étalons dont la semence est difficilement congelable il est préférable d'utiliser le méthylformamide comme dilueur de semence car ce dernier contient un cryoprotecteur qui permet d'améliorer la motilité des spermatozoïdes.

Les amines peuvent aussi être utilisées. (4)

II. Utilisation de la centrifugation en gradient de densité pour la sélection de spermatozoïdes de différentes espèces

La centrifugation par gradient de densité consiste à superposer des couches de milieu de densité différente dans un tube de façon à ce que la couche la plus lourde se trouve au fond et la plus légère sur le dessus. La fraction cellulaire que l'on cherche à séparer est ensuite placée sur la couche supérieure et centrifugée. La séparation par gradient de densité peut être classée en deux catégories : la séparation zonale (par la taille) et la séparation isopycnique (par la densité).

Elle a été développée initialement pour l'espèce humaine, puis progressivement utilisée dans d'autres espèces (bovins, ovins) avant d'être appliquée à l'espèce équine. Nous allons ainsi d'abord présenter la genèse et l'évolution de cette méthode chez l'homme et dans ces différentes espèces avant d'aborder exclusivement l'espèce équine dans la partie III.

A. Chronologie de l'utilisation de la centrifugation en gradient de densité

Les premières études décrivant la séparation isopycnique par la centrifugation en gradient de densité ont été menées par Behrens en 1938, dans une étude sur les méthodes de fractionnement cellulaire. (89) (92)

Avant, en 1932, Harvey avait utilisé des gradients de densité afin de réaliser une étude sur la stratification centrifuge des œufs d'invertébrés marins. (106)

Ensuite, en 1947, Vallée et al ont étudié la séparation des leucocytes du sang total avec un gradient de densité d'albumine. (106)

En 1951 Brakke, mais aussi Kahler et Lloyd, ont décrit à leur tour la séparation isopycnique. (106)

Plusieurs études ont ensuite utilisé la centrifugation en gradient de densité afin d'apporter des connaissances à l'hétérogénéité mitochondriale. (106)

Lors du développement de ces méthodes, ces chercheurs ont été confrontés aux problèmes de disponibilité des centrifugeuses, mais aussi à la difficulté de synthèse des gradients de densité. Ces derniers étaient aussi utilisés dans la méthode d'ultracentrifugation standard, mais cette méthode ne permettait pas de récupérer les éléments séparés. (106) Pickels, en 1953, a mis en place une technique qui permet de stabiliser et d'identifier les éléments séparés. Cette technique a été par la suite beaucoup utilisée. (106)

Les techniques ont ensuite été améliorées afin d'aboutir, dans les années 1960, à des techniques fiables en biologie tant pour la préparation que pour l'analyse. Anderson a modifié

les outils utilisés afin d'améliorer la technique. D'autres chercheurs ont après créé d'autres gradients de densités pour les rendre plus performants. (106) (107) (108) (109)

Les premières études concernant la centrifugation de sperme en gradient de densité ont vu le jour dans les années 1964. Les auteurs ont alors montré que la silice colloïdale permet de séparer de manière isopycnique les spermatozoïdes mais que ce matériel réduit la fertilité de ces derniers. (89)

En 1978, Pertoft et al ont modifié la silice colloïdale avec la polyvinylpyrrolidone et ont rendu possible son utilisation pour réaliser des gradients de densité pour des préparations de sperme. En effet, la silice, enrobée de polyvinylpyrrolidone (PVP) en mélange avec plusieurs solutions salines, permet de synthétiser des solutions avec des densités différentes et donc de construire des gradients de densité : le Percoll® (Cytiva, Etats Unis) est ainsi commercialisé en 1980. Il présente de nombreux avantages : il n'a pas d'effet osmotique, présente une gravité spécifique élevée (ce qui permet de séparer des cellules denses comme le sont les spermatozoïdes matures et normaux), et sa faible viscosité permet de ne pas interférer avec la sédimentation des spermatozoïdes. Cependant, en 1996, son fabricant, Pharmacia Biotech, le retire du marché pour des raisons de sécurité. Il est alors qualifié de non conforme aux bonnes pratiques de fabrication à usage clinique. En effet, certaines études montrent que le PVP peut présenter une toxicité pour les spermatozoïdes. De plus, des lots de Percoll® (Cytiva, Etats Unis) sont contaminés par une endotoxine, ce qui engendre un besoin d'analyse de tous lots de Percoll® (Cytiva, Etats Unis), ce qui devient difficilement réalisable. À ce moment-là, le Percoll® (Cytiva, Etats Unis) était utilisé pour la préparation de gradients de densité afin de sélectionner les spermatozoïdes humains. (92)

D'autres matériaux ont ensuite été utilisés pour la fabrication des gradients de densité comme la molécule arabinogalactane (nom déposé : isoCare®), tout comme d'autres produits à base de silice colloïdale liée à une molécule de silane (nom déposé : ISolate®). Les produits composés de silice, enrobée de silane, sont apparus sur le marché en 1990. Ces produits présentent l'avantage d'être stables de manière durable dans les solutions salines, de passer dans l'autoclave et de contenir moins d'endotoxines. Il devient alors possible de créer des produits prêts à l'emploi. Le Nycodenz (Optiprep®) a montré son efficacité dans la préparation de semence humaine. (92)

Des études sur d'autres matériaux (comme le saccharose, le chlorure de césium...) ont échoué du fait des caractéristiques très visqueuses et hypertoniques de ces solutions. (92) (106) (107)

B. Fonctionnement des gradients de densité

1. Principe

La centrifugation en gradient de densité permet de séparer, dans un milieu présentant plusieurs niveaux de densité, des particules en fonction de leur taille et de leur densité. (106) (107) (108) (109)

Cette méthode consiste à placer des particules de taille et de densité variables au-dessus d'un gradient de densité avant de centrifuger le tout. Lors d'une centrifugation courte ou lente, la séparation des particules se fait en fonction de leur taille, les plus grosses allant plus loin que les petites. Lors d'une centrifugation longue ou rapide, la séparation des particules se fait en fonction de leur densité. Les particules vont donc se déplacer vers la zone du gradient ayant la même densité qu'elles. Les particules les plus denses migrent ainsi plus profondément dans le gradient et les particules moins denses remontent jusqu'à se trouver au niveau de leur densité ou au-dessus si elles sont moins denses que la couche supérieure du gradient. (figure 43). (106) (107) (108) (109)

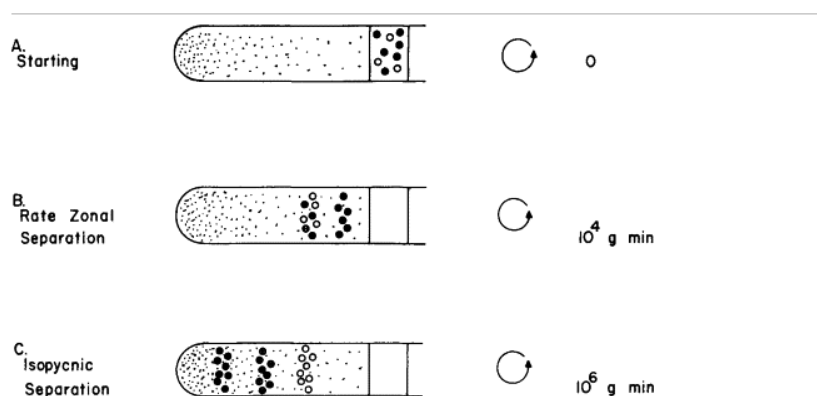


Figure 43 : Schéma de la séparation d'un mélange de particules lors de la centrifugation en gradient de densité. Les particules sont placées au-dessus du gradient (A) puis, lors de la centrifugation lente et courte, elles sédimentent en fonction de leur taille (B), puis, lors d'une centrifugation plus longue, elles sédimentent en fonction de leur densité (C)

Source : C. A. Price, 1982 (106)

Starting : au départ, rate zonal separation : zone de séparation, isopycnic separation : séparation isopycnique

En effet, lors de la centrifugation, la vitesse de sédimentation des particules centrifugées est liée au coefficient de sédimentation, qui est lui-même lié à la taille des particules et à la densité des particules. (106) (107) (108) (109)

2. Composition des gradients de densité

Les gradients de densité sont obtenus en faisant varier la concentration du produit utilisé dans la solution.

a) Propriétés des gradients de densité

Les gradients de densité sont fabriqués à partir de solutés aux propriétés suivantes :

- solubles dans l'eau
- ayant une pression osmotique très faible
- peu visqueux
- denses
- physiologiquement et chimiquement inactifs et transparents (à la lumière et aux ultra-violets).

Par exemple, la silice colloïdale est faiblement osmotique et peu visqueuse, elle ne pénètre pas les membranes cellulaires, et est stable à pH bas ou avec une concentration en sel élevée.

Elle absorbe toutefois les Ultra-violets et est difficile à enlever des particules séparées. (106) (107) (108) (109)

D'autres gradients de densité sont formés en utilisant des concentrations de particules de silices colloïdales différentes. Les particules de silice colloïdale ont l'avantage de ne pas pénétrer les membranes plasmiques et ne provoquent pas de stress osmotique pour la cellule. Sa faible viscosité permet aux spermatozoïdes sélectionnés une sédimentation optimale. Ainsi, les cellules sont séparées par gravités spécifiques en fonction de leur point isopycnique. (33) (148)

b) Gradients continus et discontinus

Il est possible de réaliser des gradients discontinus et des gradients continus. (68)

Les gradients discontinus sont composés de plusieurs couches de solution de diverses densités disposées les unes au-dessus des autres. Chaque couche a sa propre densité, suffisamment différente des autres. Ces gradients sont utiles lors de la séparation de types cellulaires dont la densité est connue, dont les spermatozoïdes. (68)

Les gradients continus sont composés de solution avec une variation de densité qui est graduelle. Ces derniers sont plus sensibles que les gradients discontinus pour la sélection cellulaire. (68)

3. Utilisation pour la sélection des spermatozoïdes

a) *La sélection naturelle des spermatozoïdes*

Dans l'appareil reproducteur femelle, les spermatozoïdes sont séparés du reste de l'éjaculat lors de la migration des spermatozoïdes du lieu de dépôt jusqu'à l'ovocyte. De plus, il est possible que l'appareil reproducteur féminin sélectionne les spermatozoïdes lors de la progression de ces derniers jusqu'à l'ovocyte. Cette sélection a lieu au niveau de la jonction utéro-tubale et dans les oviductes. Elle permettrait d'obtenir des spermatozoïdes de morphologie normale avec notamment une membrane intacte et une chromatine intègre. (89)

Plusieurs techniques de sélection des spermatozoïdes permettent de reproduire cette séparation des spermatozoïdes du plasma séminal et cette sélection de manière *in vitro*. (89)

b) *La densité des spermatozoïdes*

La force G permet de faire bouger les spermatozoïdes jusqu'au point du gradient qui correspond à leur densité. Les spermatozoïdes peuvent ainsi être séparés en fonction de leur densité. La densité des spermatozoïdes varie en fonction de :

- leur morphologie : les spermatozoïdes de morphologie anormale, moins denses, vont se stabiliser au-dessus des milieux de densité définis alors que ceux de morphologie normale, denses, vont traverser ces gradients de densité. (33) (89)
- leur maturité : les spermatozoïdes matures présentent une chromatine condensée et une extrusion de leur cytoplasme. Ils sont ainsi plus denses. (28) (62) (140)
- leur motilité : les spermatozoïdes motiles ont une plus grande facilité de sédimentation dans un champ centrifuge que les autres. (58) (143)
- l'intégrité de la chromatine supérieure : les spermatozoïdes ayant une chromatine supérieure intègre sont plus denses et ont une capacité de fécondation augmentée. (58) (143)

Cette séparation des spermatozoïdes permet ainsi de sélectionner des spermatozoïdes denses avec des caractéristiques de morphologie, motilité, maturité et intégrité de la chromatine supérieures. (58) (143)

c) *Elimination des spermatozoïdes anormaux*

Lors du processus de centrifugation en gradient de densité, les spermatozoïdes anormaux peuvent être éliminés. Ceci permet d'obtenir des échantillons contenant des spermatozoïdes de meilleure qualité, sans qu'il n'y ait de compétition avec des spermatozoïdes motiles mais avec une chromatine altérée.

De plus, ceci permet aussi de limiter les effets négatifs que les spermatozoïdes anormaux peuvent avoir sur la semence. Les spermatozoïdes anormaux présents dans la semence sont en effet générateurs de radicaux libres qui ont, lors du stockage, un effet négatif sur les spermatozoïdes de bonne qualité. (11)

d) *Echantillons obtenus*

(1) *Séparation des spermatozoïdes en fonction de leur qualité*

La centrifugation en gradient de densité permet d'obtenir des échantillons de spermatozoïdes de qualité supérieure au niveau de la morphologie, motilité, maturité et intégrité de la chromatine supérieure. Or selon De Voos, la morphologie des spermatozoïdes influence les taux de fécondation, de grossesse et d'implantation embryonnaire (26)

(2) *Séparation des spermatozoïdes du reste de l'éjaculat*

La centrifugation en gradient de densité permet également une séparation du liquide séminal et d'autres agents contaminants de la semence (leucocytes, agents pathogènes, débris...) des spermatozoïdes. L'élimination du plasma séminal et d'autres agents contaminants de la semence permet de limiter l'effet négatif de ces derniers sur la survie des spermatozoïdes mais empêche aussi les effets bénéfiques que le liquide séminal peut avoir lors de la fécondation ou lors du stockage de la semence *in vitro* (figure 44). (89)

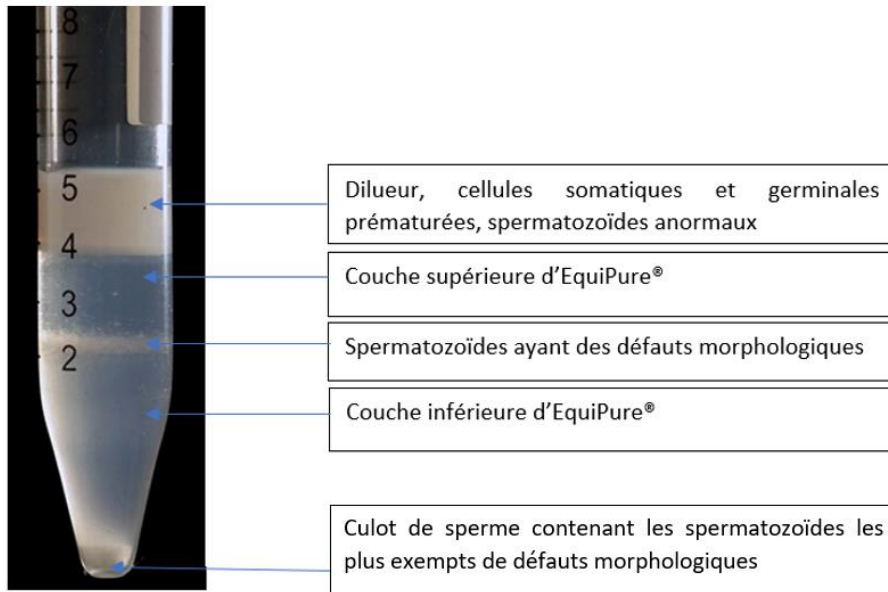


Figure 44 : Photo d'un tube contenant le résultat de la centrifugation en gradient de densité bicouche (EquiPure® (Nidacon, Suède)) d'un échantillon de sperme d'étalon
 Source : Dickson D. Varner et al, 2008 (149)

4. Exemple du Percoll® (Cytiva, Etats Unis)

a) *Composition*

Le Percoll® (Cytiva, Etats Unis) est composé de particules de silice colloïdale enrobées d'une couche de polyvinylpyrrolidone (PVP). (figure 45). (81)

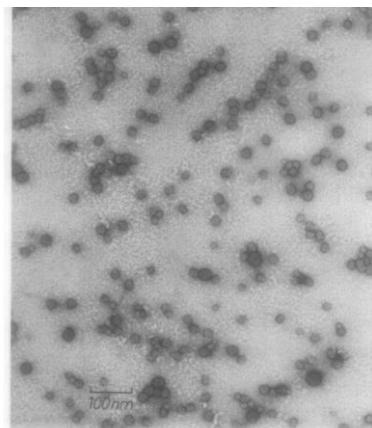


Figure 45 : Photo de l'observation du Percoll® (Cytiva, Etats Unis) au microscope électronique
 Source : Håkan Pertoft et al, 1978 (103)

Le polyvinylpyrrolidone (PVP) n'a pas d'effet sur la densité de la solution, mais la diminution de la charge à la surface des particules provoque une baisse d'osmolarité et de la conductivité des particules. (103)

Le Percoll® est incolore, légèrement opaque. Il est faiblement conducteur, faiblement osmotique, peu visqueux et sa solubilité est élevée. (81) (103)

Les solutions de Percoll® (Cytiva, Etats Unis) peuvent être stérilisées sans modification de leurs propriétés.

En fonction de sa concentration, la densité de la solution varie de 1,00 à 1,20 g/mL. Le gradient de densité est produit lors de la centrifugation du gradient de densité ou lors de sa sédimentation. Les gradients de densité les plus utilisés sont composés de trois couches, mais ils peuvent être composés d'une couche jusqu'à plus de dix couches. (81) (103)

b) Utilisation pour la séparation des spermatozoïdes

La migration des spermatozoïdes au sein du gradient de densité Percoll® (Cytiva, Etats Unis) sélectionne une population de spermatozoïdes avec une morphologie améliorée. En effet, le gradient va reproduire le processus de sélection des spermatozoïdes qui se passe lors de la pénétration de la glaire cervicale dans l'appareil génital femelle. Cette sélection se base sur des critères phénotypiques, notamment les défauts de la partie médiane et de la queue des spermatozoïdes, et non génotypiques, bien qu'il existe toutefois un lien entre la taille de la tête du spermatozoïde et la composition chromosomique de son noyau. Ainsi, une taille anormale de la tête des spermatozoïdes peut être liée à une aneuploïdie ou une diploïdie. (3) Cependant, des spermatozoïdes ayant une tête de taille anormale peuvent avoir une formule chromosomique normale, tout comme des spermatozoïdes ne présentant pas de défaut de taille de leur tête peuvent avoir une formule chromosomique anormale.

Il faut, par ailleurs, noter que des spermatozoïdes présentant des anomalies de formule chromosomique peuvent aussi être sélectionnés lors d'un accouplement naturel. (92)

C. Description de l'utilité de la centrifugation en gradient de densité pour les semences de différentes espèces

1. Chez l'homme

Les spermatozoïdes sont des cellules très complexes. Leur potentiel de fertilité peut être impacté lorsque l'une des nombreuses entités biochimiques, physiologiques ou morphologiques est perturbée. (60) (150) (152)

a) Etat des lieux de la fertilité masculine

Aujourd'hui, dans le monde, la fertilité humaine baisse. Environ 48.5 millions de couples dans le monde sont touchés par cette baisse de fertilité. L'infertilité masculine est en cause dans 20 à 30 % des cas. (53)

L'infertilité masculine est mise en évidence chez l'homme par l'incapacité à concevoir un enfant après un an de rapports sexuels réguliers avec une partenaire qui ne présente pas de problème de fertilité. Elle peut être mise en évidence par deux analyses de sperme montrant des anomalies de spermatozoïdes (nombre, morphologie, motilité ou autres). (53)

b) Les causes d'infertilité chez l'homme

(1) Les défauts détectés lors de l'analyse du sperme

L'infertilité masculine peut être due à une motilité anormalement faible des spermatozoïdes (asthénozoospermie), à une faible concentration de la semence en spermatozoïdes (oligozoospermie) ou à une anomalie de morphologie des spermatozoïdes (téatospermie). (51)

(2) Les défauts de l'ADN des spermatozoïdes

Au total, 15 % des hommes infertiles ont des paramètres de spermes normaux.

L'infertilité de ces hommes est alors attribuée à :

- des anomalies et à des dégradations de l'ADN des spermatozoïdes
- des concentrations élevées en espèce réactive de l'oxygène
- des dysfonctionnements des spermatozoïdes. (110)

En effet, les mâles infertiles ont plus de spermatozoïdes aneuploïdes, à savoir n'ayant pas un nombre normal de chromosomes, et de spermatozoïdes avec une fragmentation de l'ADN que les mâles fertiles. (122)

Toutefois, les dégradations de l'ADN des spermatozoïdes peuvent aussi être observés chez des hommes dont l'évaluation de la semence est normale. (122)

La fragmentation de l'ADN, ainsi qu'un défaut de condensation de la chromatine, provoque des taux de fécondations bas, un développement pré-implantatoire altéré, un nombre plus important de fausses couches et de morbidité dans la progéniture. (25) (32) (110)

En effet, une condensation anormale de la chromatine entraîne, notamment, un retard dans le premier cycle cellulaire. (111)

L'intégrité de l'ADN est ainsi le paramètre le plus indicatif pour différencier les hommes fertiles des hommes infertiles (plus encore que la motilité, la concentration et la morphologie). (122)

La fragmentation de l'ADN peut être un problème indépendant ou lié aux autres problèmes de fertilité (concentration, motilité, morphologie des spermatozoïdes) et peut ainsi être un problème de fertilité non objectivé par une analyse des spermatozoïdes. (10) (110) Par exemple, des dégradations de l'ADN nucléaire et mitochondrial peuvent entraîner un défaut de production d'ATP et ainsi réduire la motilité des spermatozoïdes. (32)

La fragmentation de l'ADN peut aussi entraîner des anomalies morphologiques. (122)

Les causes de dommages causés à l'ADN sont :

- le stress oxydatif : c'est le principal mécanisme responsable de dommages causés à l'ADN. Il peut être causé par la présence de leucocytes, de spermatozoïdes immatures et de spermatozoïdes anormaux. Par ailleurs, les espèces réactives de l'oxygène ont un effet négatif sur la membrane lipidique des spermatozoïdes, ce qui entraîne une motilité altérée. De ce fait, la motilité des spermatozoïdes dans la semence pure est inversement corrélée à la fragmentation de l'ADN de ces derniers. (110)
- les causes environnementales : une mauvaise hygiène de vie, le tabagisme, l'obésité, l'abus d'alcool...(63)
- des maladies ou des causes iatrogènes : elles peuvent également causer des dégradations à l'ADN des spermatozoïdes. (63)
- le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes : il est aussi influencé par la méthode de conservation de la semence. En effet, pour des échantillons de sperme normo-spermiques d'hommes subissant une évaluation de l'infertilité, l'augmentation du taux de fragmentation de l'ADN est maximale après 4 h de conservation et continue d'augmenter avec le temps. La cryoconservation semble également intervenir de

manière négative sur la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes ainsi conservés mais dans une moindre mesure que la conservation à température ambiante. (59) (63)

c) *La centrifugation en gradient de densité chez l'homme*

(1) Circonstances d'utilisation

Dans le but d'atténuer les problèmes de fertilité, des procédures de conception médicalement assistées se sont développées. Le traitement du sperme fait partie intégrante de ces procédures. (81)

La technique de séparation des spermatozoïdes par centrifugation en gradient de densité est utilisée dans les techniques de procréation médicalement assistée et plus particulièrement lors de l'insémination intra-utérine, la fécondation *in vitro* (FIV) et l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI). (81)

(2) Objectifs de cette technique

La méthode de sélection des spermatozoïdes par gradient de densité permet de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal.

Cette méthode permet donc de sélectionner pour des échantillons de sperme fertile et des échantillons de sperme peu fertiles au départ, des spermatozoïdes de qualité supérieure (voir partie II- B- 3- b) (10) (25) (46) (81) (83) (110) (153) avec notamment :

- un degré de vacuolisation des spermatozoïdes plus faible que l'échantillon non traité. L'analyse des spermatozoïdes à fort grossissement a permis d'obtenir plus d'informations sur les spermatozoïdes et montre que la vacuolisation nucléaire pourrait être liée à une faible condensation de la chromatine des spermatozoïdes, à une sensibilité de l'ADN à de potentielles dégradations et à des taux d'aneuploïdie supérieurs. Ceci semble en lien avec des avortements précoces provoqués par un défaut de développement du blastocyte. La centrifugation en gradient de densité permettrait ainsi de sélectionner des spermatozoïdes plus aptes à entraîner une grossesse avec un déroulement normal. (94)
- des télomères plus longs que la semence brute. Les télomères sont des séquences d'ADN non codantes situées à l'extrémité des chromosomes. Lors de la spermatogénèse, une expression intense de la télomérase se produit, ce qui augmente la taille des télomères. Il semble que les télomères des chromosomes des spermatozoïdes de sujets infertiles soient plus courts et possèdent une structure

anormale comparée à ceux de sujets fertiles. Ceci est peut-être dû au fait que les télomères courts peuvent conduire à des erreurs de ségrégation des chromosomes homologues et à l'apoptose des cellules germinales. La centrifugation en gradient de densité permet ainsi de sélectionner des spermatozoïdes présentant des caractéristiques de télomères proches de celles de spermatozoïdes de sujets fertiles. (153)

Par ailleurs, la centrifugation discontinue en gradient de densité semble pouvoir éliminer les anticorps liés à la membrane des spermatozoïdes d'hommes présentant une infertilité inexplicée. (123)

(3) Les autres objectifs de cette méthode

La centrifugation en gradient de densité peut aussi être utilisée chez l'homme à d'autres fins.

Par exemple, certains gradients de densité sont utilisés pour obtenir des spermatozoïdes sains pour des patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine. (121)

Aussi, l'utilisation d'un gradient de densité composé de quatre couches (90 %, 60 %, 45 % et 20 %) puis d'une centrifugation pendant 25 minutes à 300 G permet de séparer les spermatozoïdes présentant des chromosomes sexuels différents. Le culot permet de concentrer les spermatozoïdes avec des chromosomes sexuels femelles (71 % +/- 3,1), et la partie plus claire comprend les spermatozoïdes avec des chromosomes sexuels masculins (76 % +/- 3,8 %). (95)

(4) Les inconvénients de cette méthode

L'utilisation de la centrifugation en gradient de densité sur la semence humaine présente aussi des inconvénients.

En effet, bien que les spermatozoïdes sélectionnés soient de qualité supérieure, ils présentent une longévité moindre que ceux n'ayant pas subi de processus de sélection. Cela est dû au fait que toute manipulation des spermatozoïdes, notamment la centrifugation, induit une diminution de la longévité de l'ADN de ces derniers. (46)

La centrifugation augmente effectivement la production d'espèces réactives de l'oxygène à partir de cinq minutes de centrifugation. Si la production de ces espèces réactives de l'oxygène dépasse la capacité anti-oxydante des spermatozoïdes, il se produit un stress oxydatif qui apparaît et l'intégrité de l'ADN est perturbé. Par ailleurs, les espèces réactives de l'oxygène peuvent provoquer la peroxydation des lipides de la membrane plasmique des spermatozoïdes. (122)

d) Exemples de méthodes de centrifugation en gradient de densité

Le Percoll® (Cytiva, Etats Unis), gradient discontinu de milieu de haute densité (1,13 g/mL), permet de séparer le liquide séminal, les leucocytes, les débris et les spermatozoïdes anormaux, répartis sur les couches supérieures, des spermatozoïdes motiles et normaux qui se retrouvent au fond du culot. Ceci s'explique par le fait que les débris ont une densité plus faible que les spermatozoïdes et restent donc piégés dans la zone de même densité. Par ailleurs, les spermatozoïdes mobiles, orientés tête vers le bas par la force centrifuge, vont probablement se déplacer vers le culot tandis que les spermatozoïdes immobiles vont être, grâce à la force centrifuge, déplacés dans des couches de densité moindre (entre 40 et 80 %).

Cependant, la force centrifuge peut suffire à déplacer complètement les spermatozoïdes anormaux et non motiles si la centrifugation dépasse 30 à 60 minutes, ce qui rend la technique de séparation des spermatozoïdes inefficace. Il est donc recommandé de réaliser une centrifugation de 20 à 30 minutes à 300 G. Une centrifugation de moins de dix minutes permet de récupérer des spermatozoïdes de motilité excellente, mais le rendement est plus faible. (72)

Les gradients de densité composés de silice peuvent également être utilisés afin de sélectionner les spermatozoïdes de qualité supérieure. Les spermatozoïdes présents dans la couche de densité 90 % sont essentiellement des spermatozoïdes avec une maturité et une concentration de leur chromatine normale et présentent un ADN peu fragmenté. (140)

e) Comparaison de plusieurs techniques utilisées

(1) Comparaison de la composition de deux gradients

Les milieux à gradient de densité discontinu contenant des particules de silice recouvertes de silane (comme PureSperm® (Nidacon, Suède)) permettent de récupérer des spermatozoïdes de qualité semblable à celle récupérée avec le Percoll® (Cytiva, Etats Unis). De plus, la comparaison des résultats obtenus après sélection de spermatozoïdes par les gradients de densité Percoll® (Cytiva, Etats Unis) et PureSperm® (Nidacon, Suède) ne montre aucune différence concernant la motilité, la fécondation, la qualité de l'embryon qui en est issu et la gestation. (81) (125)

Par exemple, les gradients de densité à trois couches (40 %, 70 % et 90 %) de Percoll® (Cytiva, Etats Unis) et PureSperm® (Nidacon, Suède) permettent d'améliorer la motilité, le pourcentage de vitalité et le pourcentage de formes normales par rapport à une semence brute d'homme normospermique. Le Percoll® (Cytiva, Etats Unis) permet de sélectionner des spermatozoïdes avec un rendement supérieur que PureSperm® (Nidacon, Suède), mais les

caractéristiques morphologiques et de motilité sont de qualité identique pour les deux gradients. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le Percoll® (Cytiva, Etats Unis) est composé de particules plus grosses que PureSperm® (Nidacon, Suède), et a une densité plus faible que PureSperm® (Nidacon, Suède). Par ailleurs, PureSperm® (Nidacon, Suède) contient moins d'endotoxines que le Percoll® (Cytiva, Etats Unis), ce qui génère moins de fragmentations de l'ADN des spermatozoïdes. (81)

(2) Comparaison du nombre de couches des gradients

Les gradients de Percoll® (Cytiva, Etats Unis), composés de deux couches, donnent des résultats identiques à ceux contenant trois couches. Les gradients de PureSperm® (Nidacon, Suède) composés de trois couches semblent plus efficaces que ceux composés de deux couches d'un point de vue de la sélection de spermatozoïdes, de la motilité, de la morphologie et de la viabilité. (81)

(3) Comparaison du volume de sperme traité

L'utilisation de PureSperm® (Nidacon, Suède) avec un grand volume de sperme (3 mL) est plus adaptée à la sélection de spermatozoïdes de qualité augmentée concernant la morphologie, la motilité et la viabilité. Pour augmenter le rendement, afin d'obtenir un nombre de spermatozoïdes important sans prendre en compte la qualité des spermatozoïdes sélectionnés, il est préférable d'utiliser un plus petit volume de sperme (0,75 mL). (81)

f) Autres méthodes de sélection des spermatozoïdes

Plusieurs techniques de laboratoire se sont développées dans le but de sélectionner des spermatozoïdes afin d'améliorer la fertilité des hommes. Ces techniques doivent être capables d'obtenir un échantillon sans plasma séminal, ni débris, ni microbes et avec une récupération importante de spermatozoïdes motiles et ayant une morphologie normale. (81)

Différentes techniques sont exposées ci-après. Les méthodes swim-up, de tri microfluidique et de filtration sur laine de verre, utilisées pour la sélection des spermatozoïdes humains, ne seront pas développées ici, mais dans la partie III – C- 3- a.

(1) Méthode de pré-incubation de la semence

La pré-incubation de la semence dans une solution de tampon à base de jaune d'œuf modifie la fluidité de la membrane du spermatozoïde, ce qui permet la réaction acrosomique et la décapacitation lorsqu'elle n'est pas possible autrement. Elle permet d'améliorer les résultats de fécondation. (60)

La pré-incubation dans la pentoxifylline stimule la motilité et la réaction acrosomique. Les taux de grossesse semblent améliorés, surtout pour les semences présentant une motilité anormale. (60)

(2) La méthode du potentiel zéta

La méthode du potentiel zéta trie les spermatozoïdes en fonction de la charge électrique de ces derniers. Les spermatozoïdes les plus chargés sont sélectionnés et les moins chargés sont éliminés. Ainsi, les spermatozoïdes matures, avec un ADN intact, sont sélectionnés. L'amélioration de la fertilité avec cette méthode est plus importante qu'avec celle de centrifugation en gradient de densité. Toutefois, cette méthode ne permet pas d'obtenir un taux de récupération des spermatozoïdes optimal. Aussi, les spermatozoïdes sélectionnés présentent une motilité moindre. (60)

(3) Méthode de tri magnétique cellulaire activé

Le tri cellulaire magnétique activé est une méthode qui retient les spermatozoïdes apoptotiques au sein d'un champ magnétique grâce à des billes fixées sur des protéines propres à ces cellules. Ceci permet d'éliminer les spermatozoïdes pro-apoptotiques de la semence mais ne permet pas d'améliorer les résultats de fécondation *in vitro*. (60) Cette technique peut aussi endommager la queue des spermatozoïdes et donc entraîner des défauts de motilité. De plus, les microbilles utilisées peuvent être nocives pour la procédure de procréation médicalement assistée. Il peut donc être intéressant d'utiliser la centrifugation en gradient de densité par la suite. (28)

(4) Méthode de gonflement hypo-osmotique

La sélection par le test de gonflement hypo-osmotique permet de sélectionner des spermatozoïdes équilibrés dans leur formule chromosomique, et avec une membrane intacte et de bonne qualité. Elle permet de prédire les résultats de la fécondation *in vitro*. (60)

(5) La méthode des complexes cumulus oophorus

Le test des complexes cumulus oophorus permet de séparer efficacement les spermatozoïdes avec un ADN fragmenté et une faible maturation de la chromatine, en utilisant l'acide hyaluronique. (93) (140)

Les spermatozoïdes matures et sains possèdent un récepteur à l'acide hyaluronique. Les spermatozoïdes capables de se lier à l'acide hyaluronique ont achevé leur processus de maturation de leur ADN et de leur membrane plasmique. Ils présentent une meilleure extrusion cytoplasmique. Ils ont généralement une morphologie normale, une chromatine intègre et ont une efficacité supérieure de produire une réaction acrosomique. La sélection des spermatozoïdes par la technique des complexes cumulus oophorus permet de sélectionner des spermatozoïdes avec une motilité vers l'avant, une intégrité de l'ADN et une morphologie normale supérieures par rapport au groupe témoin. Les spermatozoïdes ainsi sélectionnés ont des capacités de fécondation supérieures. (93) (140)

Cette technique pourrait donc être utilisée préalablement à l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes afin d'effectuer un tri des spermatozoïdes qui est une étape qui ne peut avoir lieu naturellement dans les voies génitales femelles lors de l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes. (93) (140)

g) Comparaison de différentes méthodes de sélection des spermatozoïdes

La figure 46 montre le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes après différents traitements. La méthode de sélection par l'utilisation de gradient de densité permet d'obtenir des taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes le plus bas. Ce taux est encore plus bas lorsqu'il est combiné à la méthode swim-up.

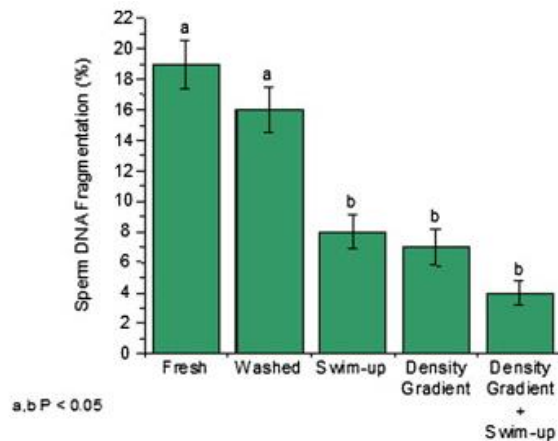


Figure 46 : Diagramme de présentation des résultats d'une étude montrant le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes après différents traitements de sperme
Source : Robert E. Jackson et al, 2010 (59)

Fresh : semence fraîche, washed : semence lavée, swim-up : semence après la méthode swim-up, density gradient : semence après centrifugation en gradient de densité, density gradient + swim-up : semence après centrifugation en gradient de densité et la méthode swim-up

2. Chez le taureau

a) *La fertilité des taureaux*

Les bovins sont des animaux élevés à des fins économiques. Afin d'assurer la viabilité d'un élevage, l'objectif est de produire un veau par vache et par an. Une bonne fertilité à la fois des vaches et des taureaux est donc indispensable. (12)

La fertilité d'un taureau est variable. Elle est influencée par sa génétique, son état corporel, son état de santé, sa nutrition et la conduite d'élevage. Dans une population non sélectionnée, environ un taureau sur cinq est infertile. (6)

L'hypofertilité d'un taureau a de lourdes conséquences sur l'économie des élevages, d'autant plus si sa semence est utilisée pour un nombre important de femelles. L'utilisation d'un taureau hypofertile peut néanmoins être nécessaire si ce dernier possède des caractéristiques génétiques intéressantes pour l'élevage. (12)

b) Evaluation de la fertilité des taureaux

Après une analyse de la santé physique, de la libido, et de la qualité de la semence, il est possible de classer les taureaux en fonction de leur potentiel de reproduction. (12) Pour cela, des évaluations de la semence sont réalisées.

La mesure de la circonférence scrotale est le paramètre utilisé pour évaluer la capacité d'un taureau à produire des spermatozoïdes. Les taureaux ayant une circonférence scrotale faible présentent une qualité de semence plus faible avec une production plus faible de spermatozoïdes morphologiquement normaux et de spermatozoïdes motiles. (12)

L'évaluation de la motilité individuelle des spermatozoïdes, tout comme l'estimation du nombre de spermatozoïdes progressivement motiles, permet d'apprécier l'intégrité de la membrane plasmique des spermatozoïdes, mais aussi la morphologie de ces derniers. (12)

Certaines anomalies de morphologie sont liées à des défauts de fertilité. (12)

La quantité et la qualité du plasma séminal sont dépendantes de l'individu. En effet, certains taureaux présentent un plasma séminal avec une composition en protéines différente des autres. Ces taureaux ont souvent une fertilité plus faible. Lors de l'insémination artificielle, le sperme est plus longtemps en contact avec des spermatozoïdes que lors de la fécondation naturelle. Ceci peut entraîner des dommages aux spermatozoïdes. (21)

c) Amélioration de la fertilité de la semence de taureau

Afin d'améliorer la fertilité des semences de taureau, il est nécessaire de sélectionner des spermatozoïdes de bonne qualité et d'éliminer les spermatozoïdes morts ou présentant des défauts. (6)

(1) La méthode de centrifugation en gradient de densité

La centrifugation en gradient de densité permet de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal et de sélectionner des spermatozoïdes de taureau de qualité supérieure (voir partie II- B- 3- b). Le retrait du plasma séminal permet d'éviter la peroxydation lipidique de la membrane plasmique et donc une altération de la perméabilité plasmique, l'inactivation des enzymes ou la mort des spermatozoïdes, ce qui provoque une baisse de la fertilité. (21) (49) Elle permet ainsi d'obtenir une fertilité *in vivo* plus importante. (8) (21) (49)

En cas de viscosité importante du sperme, de semence de mauvaise qualité ou encore lors d'une cryoconservation du sperme bovin, les gradients de densité permettent d'améliorer la qualité de la semence. (6)

Le Percoll® (Cytiva, Etats Unis) et BoviPure® (particules de silice enrobées de silane dans une solution saline isotonique (Nidacon, Suède)) sont des gradients de densités qui permettent de sélectionner des spermatozoïdes avec une mobilité, une intégrité de la membrane, de la membrane acrosomiale et de l'ADN augmentée. Le Percoll® (Cytiva, Etats Unis) permet d'améliorer de manière plus importante la motilité des spermatozoïdes que la méthode BoviPure® (Nidacon, Suède). Le Percoll® (Cytiva, Etats Unis) utilisé en gradient de densité discontinu à trois couches, peut provoquer une décondensation de la chromatine des spermatozoïdes congelés puis décongelés, de manière homogène. (6) (97)

(2) Autres méthodes

Comme pour l'espèce humaine, d'autres moyens de sélection des spermatozoïdes sont possibles comme la méthode swim-up, la filtration sur laine de verre... La méthode swim-up est peu coûteuse, donc intéressante en milieu bovin. Comme dit précédemment, son principe repose sur le mouvement des spermatozoïdes du culot vers le haut. Elle permet ainsi de sélectionner des spermatozoïdes de morphologie normale et des spermatozoïdes motiles. Mais le rendement de spermatozoïdes obtenus est faible. Aussi, la chromatine des spermatozoïdes obtenus est souvent anormalement condensée. Le culot peut également être riche en espèces réactives de l'oxygène. (6)

d) Inconvénients de la centrifugation en gradient de densité

La centrifugation en gradient de densité présente aussi des inconvénients. Suivant son intensité et sa durée, la centrifugation peut causer des dégradations de l'intégrité de la membrane plasmique et peut entraîner une baisse de motilité. La centrifugation produit aussi des dégradations de l'ADN, ce qui ne pose pas de problème pour la fécondation, mais qui provoque une apoptose à partir du stade de développement huit cellules. (21)

Sachant que la force de centrifugation n'influence pas la concentration en spermatozoïdes, en utilisant des forces de centrifugation plus faibles, il est possible d'obtenir plus de spermatozoïdes motiles et de réduire la production d'espèces réactives de l'oxygène. La centrifugation à 2200 G permet notamment d'obtenir le même rendement de spermatozoïdes qu'avec une centrifugation classique à 9000 G tout en améliorant la réussite à la fécondation de la semence obtenue. De plus, l'utilisation de seulement 100 µL de Percoll® (Cytiva, Etats Unis) et d'une centrifugation à 2000 G pendant cinq minutes permet de récupérer plus de

spermatozoïdes de taureau sans que cela ne pose de problème au niveau de la fécondation et de développement embryonnaire précoce. (82)

3. Chez le bélier et le bouc

a) La fertilité des béliers

Tout comme pour l'espèce bovine, la fertilité d'un troupeau ovin et caprin est fortement liée à la rentabilité de ce dernier. Les causes d'infertilité peuvent être liées à une mauvaise conduite d'élevage, des facteurs climatiques, la photopériode, la température, la présence de maladies, ...

La reproduction chez les espèces ovine et caprine est majoritairement réalisée en monte naturelle, dans des pâturages où les femelles sont laissées avec un ou plusieurs mâles, sans intervention humaine, la plupart du temps. En effet, le sperme de bélier conservé réfrigéré présente une faible fertilité lorsque la durée de conservation est longue. (36) De plus, la composition de la membrane plasmique des spermatozoïdes de bélier est responsable d'une mauvaise cryoconservation. Ainsi, les spermatozoïdes décongelés sont de mauvaise qualité et entraînent une fertilité plus faible. Ceci explique pourquoi l'insémination artificielle est peu étendue chez cette espèce. (132)

L'utilisation de spermatozoïdes de qualité optimale, grâce à une sélection des spermatozoïdes de bonne qualité, est donc indispensable afin de maximiser le résultat économique de l'élevage. (120)

b) La sélection des spermatozoïdes de béliers et de boucs par centrifugation en gradient de densité

Chez le bélier, des méthodes de séparation des spermatozoïdes en gradient de densité, tels que Percoll® (Cytiva, Etats Unis), BoviPure® (Nidacon, Suède) ou PureSperm® (Nidacon, Suède), sont utilisées. Chez le bouc, c'est le gradient de densité Capripure® (Nicacon, Suède) qui est utilisé. (120) (127)

Comme mentionné précédemment, ces méthodes permettent de sélectionner des spermatozoïdes décongelés de meilleure qualité (figure 47). Toutefois, la motilité des spermatozoïdes n'atteint pas des valeurs optimales. De plus, ces méthodes semblent réduire la viabilité des spermatozoïdes sélectionnés par rapport aux spermatozoïdes non sélectionnés. (132) (143) Par ailleurs, le coût élevé de ces méthodes est également un frein à son utilisation chez ces espèces qui est ainsi utilisée à titre de recherche uniquement.

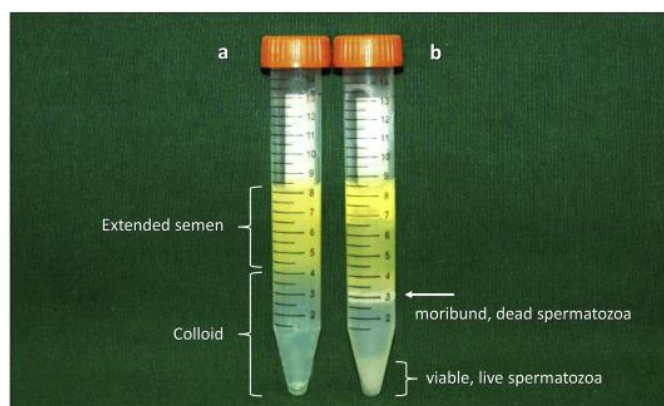


Figure 47 : Photo d'un tube contenant un gradient de densité monocouche (Androcoll O[®] (Minitube, Allemagne)) surmonté de semence de bélier avant (a) et après (b) la centrifugation

Source : N. Šterbenc et al, 2019 (132)

Extended semen : sperm dilué, colloid : colloïde = gradient de densité, moribund, dead spermatozoa : spermatozoïdes moribonds et morts, viable, live spermatozoa : spermatozoïdes viables et vivants

III. Utilisation de la centrifugation en gradient de densité pour la sélection des spermatozoïdes dans l'espèce équine

A. Historique de l'intervention de l'homme dans la reproduction équine

1. L'insémination artificielle

a) Historique de l'insémination artificielle

La première insémination artificielle équine réussie a eu lieu en 1322. Une jument a en effet donné naissance à un poulain après avoir été inséminée à partir de sperme d'étalon prélevé dans le vagin d'une autre jument qui avait été saillie par cet étalon. (40)

En 1776, Spallanzani découvre que les spermatozoïdes d'étalon peuvent être conservés par le froid dans un état de léthargie et peuvent revenir dans leur état initial une fois réchauffés. (40)

C'est ensuite à la fin du XIX^{ème} siècle, en Grande Bretagne, que l'utilisation de l'insémination artificielle a été relancée, avant d'être utilisée en Russie et en Chine au XX^{ème} siècle afin d'accroître la population de leurs troupeaux. (91)

L'insémination artificielle s'est développée en France dans les années 1980 grâce à la collaboration entre l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) et les Haras nationaux (HN). (71)

b) Les avantages de l'insémination artificielle

L'insémination artificielle présente de nombreux avantages. En effet, l'absence de contact entre la jument et l'étalon permet de réduire les risques physiques (coups de pieds, morsures...), mais également les contaminations vénériennes entre la jument et l'étalon.

L'insémination artificielle permet par ailleurs d'augmenter la rentabilité d'un étalon puisqu'un éjaculat permet d'inséminer environ 12 à 25 juments. Aussi, l'étalon peut mener de front une carrière sportive et une carrière de reproducteur. Enfin, l'insémination artificielle permet de conserver et d'exporter le patrimoine génétique de certains étalons. (30)

2. Historique des techniques d'amélioration de la qualité du sperme

Pour conserver le sperme d'étalon, il est nécessaire de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal. De plus, afin d'obtenir des échantillons de semence de meilleure qualité, la sélection des spermatozoïdes peut être intéressante. (69)

Des techniques de séparation et de sélection des spermatozoïdes ont ainsi été créées depuis plus de 35 ans afin d'améliorer la qualité de la semence des étalons utilisée pour l'insémination artificielle. La première méthode utilisée pour séparer les spermatozoïdes motiles d'étalon était la filtration à l'aide de billes de verre. La centrifugation en gradient de densité de la semence d'étalon a ensuite été développée. (69)

L'utilisation de cette méthode dans l'espèce équine remonte aux années 1994 environ. Les premiers gradients de densité utilisés étaient composés de silice enrobée. Au départ, le Percoll® (Cytiva, Etats Unis), gradient de densité composé de silice enrobée de polyvinylpyrrolidone, était utilisé, avant d'être retiré du marché.

D'autres gradients de densité ont, par la suite, été utilisés comme les gradients de densité à base de silice enrobée de silane, qui présentaient des avantages supplémentaires par rapport au Percoll® (Cytiva, Etats Unis), comme la possibilité d'être conditionnés sous forme stérile prête à l'emploi, sans présenter les défauts du Percoll® (Cytiva, Etats Unis).

Par la suite, des techniques de centrifugation monocouche se sont développées à partir des années 1997. Ces techniques sont plus pratiques et prennent moins de temps que les techniques de centrifugation en gradient de densité. Elles permettent aussi une utilisation dans des tubes de contenance plus importante. (89)

Les techniques de séparation des spermatozoïdes ont été utilisées pour l'insémination à faible dose de sperme, l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) et le transfert dans l'oviducte de gamètes chez le cheval. (69)

B. Utilisation de la centrifugation en gradient de densité

1. Protocole

La centrifugation en gradient de densité est une méthode de sélection des spermatozoïdes qui peut être utilisée sur une semence qui vient d'être prélevée d'un étalon ou après conservation de la semence. (11)

Plusieurs protocoles de centrifugation en gradient de densité peuvent être utilisés. Généralement, un volume de sperme est placé sur un volume de gradient de densité dans un tube de 15 mL ou de 50 mL avec une interface marquée entre le gradient de densité et la

semence, c'est-à-dire sans mélange des deux constituants (figure 48). L'ensemble est ensuite centrifugé pendant 20 minutes à 300 G. Lors de la centrifugation, les spermatozoïdes traversent le gradient de densité et se concentrent dans le culot de centrifugation. Les spermatozoïdes sont ainsi séparés du plasma séminal, des débris et autres contaminants de la semence. Il s'opère également au cours de la centrifugation une certaine sélection des spermatozoïdes. Après la centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot contenant les spermatozoïdes sélectionnés est placé dans un dilueur approprié. (11)

Il est important de placer le sperme sur le gradient de densité déjà en place au fond du tube plutôt que de placer le gradient de densité sous le sperme présent dans le tube. En effet, si le sperme est placé au fond du tube avant d'ajouter le gradient de densité sous ce dernier, celui-ci peut contaminer le fond du tube où seront collectés les spermatozoïdes sélectionnés. Il y a donc un risque de contamination de l'échantillon collecté. Par ailleurs, lors de l'injection de gradient de densité sous le sperme présent dans le tube, l'interface gradient de densité/sperme créée est moins franche et donc l'efficacité de la centrifugation en gradient de densité est moins importante. (89)

a) Le choix du protocole et du matériel

Le choix du protocole est important car il détermine la qualité de la sélection des spermatozoïdes effectuée. Afin d'assurer une sélection des spermatozoïdes optimale par la méthode de centrifugation en gradient de densité, il est préférable d'utiliser des tubes de 15 mL, de disposer au maximum 250 à 500 millions de spermatozoïdes par tubes et d'utiliser au maximum 1 à 3 mL de gradient de densité par tube. (33)

La centrifugation à faible force comme une centrifugation de 300 G pendant 20 minutes n'endommage pas les spermatozoïdes après la décongélation. (55)

Le taux de récupération des spermatozoïdes dépend de la taille des tubes utilisés, du nombre de couches de gradient de densité utilisées, de la qualité de la semence initiale, du type de gradient utilisé (continu ou discontinu) et du volume de sperme traité. Le rendement est plus important lorsque l'on utilise des tubes à fond conique de 15 mL plutôt que 50 mL, des gradients de densité monocouches plutôt que des gradients poly-couches, des semences initiales de bonne qualité plutôt que des semences contenant des spermatozoïdes anormaux (148), des gradients continus plutôt que des gradients discontinus, un petit volume de sperme plutôt que de grands volumes. (33)

b) Les gradients de densité poly-couches

La centrifugation en gradient de densité est une technique visant à sélectionner les spermatozoïdes selon leur motilité, leur morphologie, leur viabilité et la qualité de la chromatine qu'ils contiennent.

Elle permet de sélectionner des spermatozoïdes ayant une longévité supérieure et d'éliminer le plasma séminal, les spermatozoïdes de morphologie anormale, les agents pathogènes, les espèces réactives de l'oxygène, les débris et les leucocytes. (77) (89)

Les gradients de densité continus permettent d'améliorer la qualité des spermatozoïdes sélectionnés de manière plus importante que les gradients de densité discontinus (figure 48). (33)

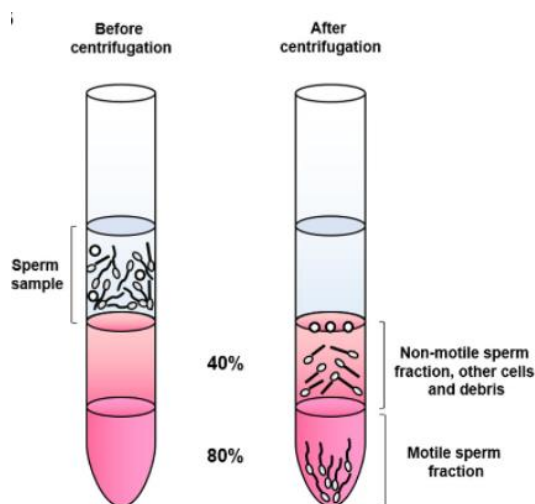


Figure 48 : Schéma de la disposition des spermatozoïdes avant et après la centrifugation en gradient de densité bi-couche

Source : Giuseppina Marzano et al, 2020 (77)

Before centrifugation : avant la centrifugation, sperm sample : échantillon de sperme, after centrifugation : après la centrifugation, non-motile sperm fraction, other cells and debris : fraction de spermatozoïdes non motiles, d'autres cellules et débris, motile sperm fraction : fraction de spermatozoïdes motiles

Par exemple, le gradient de densité EquiPure® (Nidacon, Suède), détaillé dans la partie III- B- 2- b, peut être utilisé avec des tubes de 15 mL en suivant le protocole qui suit.

- Dans un tube à centrifuger conique en polypropylène de 15 mL, 2 mL de couche inférieure d' EquiPure® (Nidacon, Suède) puis 2 mL de couche supérieure d' EquiPure® (Nidacon, Suède) puis 1 mL de semence diluée (contenant 200 à 500 millions de spermatozoïdes) sont déposés.

- Ensuite, le tube est centrifugé à température ambiante avec une force de 200 G pendant 30 minutes.
- Le surnageant est ensuite éliminé avec une pipette et le culot est lavé en ajoutant 3 mL de diluant avant de réaliser une seconde centrifugation pendant 15 minutes à 400 G.
- Enfin, le surnageant est de nouveau éliminé. (17)

c) *Les gradients de densité monocouche*

La centrifugation en gradient de densité monocouche consiste à placer le gradient de densité puis d'ajouter la semence au-dessus. Le tout est ensuite centrifugé pendant 20 minutes à 300 G. Lors de la centrifugation, le plasma séminal se retrouve au-dessus du gradient de densité, et les spermatozoïdes motiles migrent à travers le gradient de densité pour former un culot. Les spermatozoïdes ainsi sélectionnés présentent l'avantage d'être plus motiles, de morphologie normale, avec une chromatine intègre et avec de meilleures viabilité et longévité.

Cette technique permet aussi de retirer le plasma séminal, les agents pathogènes, les débris, les espèces réactives de l'oxygène et les leucocytes de la semence. Elle permet d'augmenter les taux de gestation lors de semence équine à problème de 65 %. Toutefois, elle ne permet pas d'améliorer le taux de gestation des semences d'étalons fertiles. De ce fait, le traitement de ce type de semence est inutile par centrifugation en gradient de densité. Elle présente par ailleurs l'avantage d'être rapide (totalité de l'éjaculat traité en 30 minutes) et d'obtenir un rendement en spermatozoïdes supérieur à 50 %. (23) (77) (89)

Elle peut être utilisée sur une semence fraîche, sur une semence congelée puis décongelée, sur une semence réfrigérée depuis 24 heures. (99) (133)

Le taux de récupération des spermatozoïdes lors de l'utilisation de cette méthode est plus faible chez les ânes que chez les étalons. Ceci est probablement dû au manque de formulation et de protocole spécifique aux ânes. (99)

Le protocole qui suit est un exemple de centrifugation en gradient de densité monocouche :

- Le gradient de densité est placé dans un tube puis la semence est ajoutée avant de réaliser une centrifugation à 300 G pendant 20 minutes.
- Un surnageant contenant le liquide séminal, les spermatozoïdes morts et le gradient de densité séparé du culot, contenant les spermatozoïdes, est obtenu.
- Le culot est mélangé à un dilueur.
- La concentration en spermatozoïdes est ensuite ajustée. (55)

Le rendement dépend de la qualité et de la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat. (89)

La technique de séparation des spermatozoïdes par centrifugation en gradient de densité monocouche permet de récupérer plus de spermatozoïdes que la centrifugation en gradient de densité bicouche. Le gradient monocouche permet aussi d'obtenir des spermatozoïdes plus motiles, avec une qualité d'ADN supérieure et une morphologie normale. (33)

2. Les différents gradients de densité utilisés en espèce équine

Plusieurs spécialités commerciales de gradient de densité sont utilisées dans l'espèce équine pour la sélection des spermatozoïdes. Ces gradients de densité peuvent être utilisés sous forme de gradient de densité proprement dit : deux couches de gradient de densité, de densité différente (EquiPure® Top Layer et EquiPure® Bottom Layer) ou une monocouche (EquiPure® Bottom Layer uniquement, ou AndroColl-E® (Minitube, Allemagne)).

a) *AndroColl-E® (Minitube, Allemagne)*

AndroColl-E® (Minitube, Allemagne) est composé de particules de silice enrobées de silane. Ce gradient de densité est utilisé en gradient mono- ou polycouches. Il a l'avantage de permettre de traiter des volumes de semence plus importants que d'autres gradients de densité (figure 49). (89)

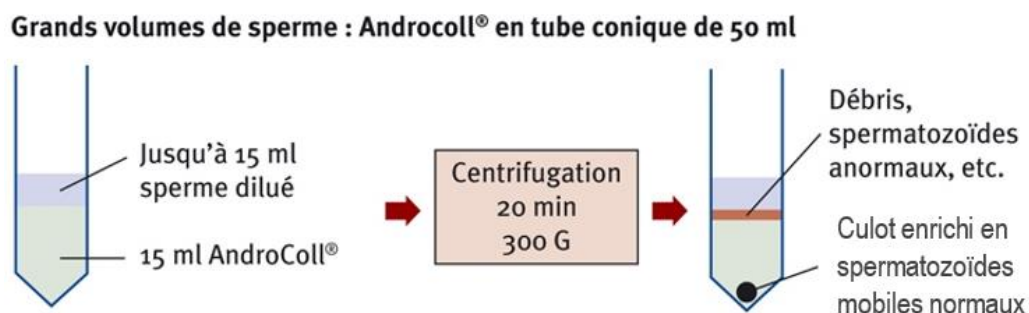


Figure 49 : Schéma d'un protocole d'utilisation du gradient de densité AndroColl-E® (Minitube, Allemagne) monocouche sur la semence équine
Source : Isabelle Barrier-Battut, 2013 (11)

b) *EquiPure® (Nidacon, Suède)*

EquiPure® (Nidacon, Suède) est composé de particules de silice colloïdale enrobées de silane, dans une solution saline isotonique. (11)

EquiPure® Top Layer peut être utilisé en gradient de densité à plusieurs couches ou monocouche. EquiPure® Bottom Layer peut seulement être utilisé en gradient de densité à plusieurs couches. (11)

Il permet d'améliorer la qualité du sperme chez les étalons, notamment les étalons hypofertiles (motilité totale et progressive, morphologie, potentiel de membrane mitochondriale et viabilité supérieure pour les spermatozoïdes séparés). Ce gradient de densité permet d'améliorer la fertilité des étalons peu fertiles après une insémination en corne profonde.

La sélection des spermatozoïdes est plus efficace lorsqu'elle est utilisée après la cryoconservation plutôt qu'avant. (56) (70) (76) (100) (134)

EquiPure® (Nidacon, Suède) est utilisé pour les petits volumes de semence (0.5 à 3 mL de semence) comme dans le cas d'étalons oligospermiques ou sur une semence décongelée (figure 50). (11)

Petits volumes de sperme : EquiPure® en tube conique de 15 ml

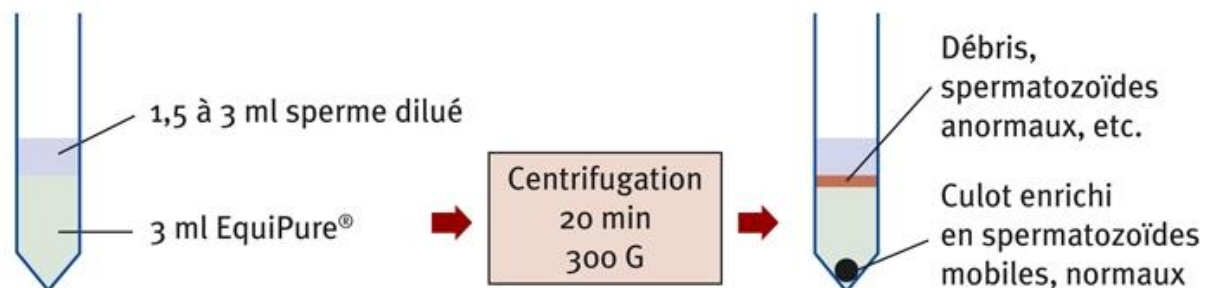


Figure 50 : Schéma d'un protocole d'utilisation du gradient de densité EquiPure®(Nidacon, Suède) monocouche sur la semence équine
Source : Isabelle Barrier-Battut, 2013 (11)

c) *Percoll® (Cytiva, Etats Unis)*

Le Percoll® (Cytiva, Etats Unis) est composé de particules de silice enrobées de polyvinylpyrrolidone. Ce gradient de densité est actuellement commercialisé uniquement pour la recherche. (142)

Il permet d'obtenir un plus grand nombre de spermatozoïdes progressivement motiles après le traitement. Toutefois, ce gain de mobilité n'est pas conservé dans le temps. Il permet par ailleurs, d'améliorer la capacitation des spermatozoïdes. (142)

d) Cellsep® (Larex, Etats Unis)

Cellsep® (Larex, Etats Unis) est composé d'arabinogalactane hautement purifié, un polymère hydrosoluble extrait du bois de mélèze. Ce gradient de densité est utilisé comme gradient de densité continu. (142)

e) Fraction V® (Sigma Aldrich, Suisse)

Fraction V® (Sigma Aldrich, Suisse) est composé d'albumine de sérum bovin. Ce gradient de densité est utilisé comme gradient de densité continu. (142)

f) RediGrad® (GE Healthcare, Suède)

RediGrad® (GE Healthcare, Suède) est composé de silice revêtue de silane. Ce dernier est uniquement commercialisé pour la recherche. RediGrad® (GE Healthcare, Suède) forme spontanément un gradient de densité lors de la centrifugation, en raison de l'hétérogénéité des particules de silicate. (76)

3. Effet de la centrifugation en gradient de densité sur la semence d'étalon

a) Neutralité des gradients de densité

Les gradients de densité utilisés lors de la centrifugation en gradient de densité ne pénètrent pas la membrane plasmique des spermatozoïdes. (33) (148)

La silice colloïdale présente également l'avantage de ne pas provoquer de stress osmotique sur les spermatozoïdes et peut donc être utilisée pour créer des densités élevées de gradient. (33)

Par ailleurs, le gradient de densité ne semble pas avoir un effet néfaste sur l'appareil reproducteur femelle du fait qu'il soit fortement dilué dans la dose d'insémination artificielle.

En cas de doute, il est possible de réaliser une étape de lavage une fois la sélection des spermatozoïdes faite. (87)

b) Conservation de la semence améliorée

(1) Cryoconservation de la semence

(i) Effets de la cryoconservation sur la semence

La congélation, puis la décongélation de la semence, provoquent une altération des spermatozoïdes notamment une altération de la motilité, de la morphologie, de l'intégrité du matériel génétique, du potentiel de membrane mitochondriale et de la structure de la membrane plasmique. En effet, la congélation provoque la formation de cristaux de glace extra-cellulaires qui induit une augmentation de l'osmolarité du liquide restant autour des spermatozoïdes et provoquant un stress osmotique, des dommages oxydatifs, de l'apoptose, et des altérations de la membrane plasmique et de l'ADN. (135)

Cette détérioration de la qualité des spermatozoïdes lors de la congélation varie en fonction de l'étalon. (55) Or, pour que la semence soit apte à l'insémination et commercialisable, il faut qu'elle présente au moins 35 % de spermatozoïdes motiles rapides lors de la décongélation. (11)

(ii) Les bénéfices de la centrifugation en gradient de densité avant la cryoconservation

La sélection des spermatozoïdes avant la congélation, pour les étalons présentant une qualité de semence médiocre, pourrait être une solution permettant de dépasser le seuil de 35 % de motilité des spermatozoïdes, et donc de commercialiser ces semences congelées. (11)

L'utilisation de la centrifugation en gradient de densité discontinu avant la congélation de la semence permet :

- d'améliorer la motilité des spermatozoïdes jusqu'à 24 heures après la décongélation. (56)
- d'améliorer, pour des semences habituellement peu congelables, la qualité des spermatozoïdes, notamment la morphologie, la motilité progressive, la structure de la chromatine, ainsi que l'intégrité de la membrane et de l'acrosome après la

décongélation. (55). Ceci est probablement dû au fait que les spermatozoïdes sélectionnés avant la congélation sont de meilleure qualité. (56)

La centrifugation par gradient de densité pourrait être une solution pour la congélation de semence de faible qualité qui ne peut pas être congelée sans une telle sélection des spermatozoïdes. En effet, seules les semences avec au moins 30 % de motilité progressive peuvent être cryoconservées. (56)

Cette technique a cependant un faible rendement, d'autant plus que l'étalon présente une semence de faible qualité. (55)

(iii) Les bénéfices de la centrifugation en gradient de densité après la cryoconservation

Il est aussi possible d'utiliser la sélection des spermatozoïdes une fois la semence décongelée avant l'insémination. (135)

Cette méthode :

- permet d'améliorer les caractéristiques de la semence décongelée : la motilité, la vitesse curviligne, la viabilité, le potentiel de membrane mitochondriale, la membrane, l'intégrité de l'ADN et de l'acrosome, ainsi que la morphologie des spermatozoïdes sont améliorés, lors de l'utilisation de gradient de densité monocouche (Equipure®(Nidacon, Suède)) sur une semence décongelée par rapport aux échantillons provenant des mêmes étalons mais qui ont seulement subi une décongélation. (135)
- entraîne une perte en nombre des spermatozoïdes : le taux de récupération des spermatozoïdes reste toutefois supérieur lors de l'utilisation de la centrifugation en gradient de densité monocouche avant la congélation plutôt qu'après. (135) (73)

Ces résultats sont à la fois applicables pour des étalons présentant une bonne qualité de semence éjaculée mais aussi pour les étalons hypofertiles. (73)

La centrifugation en gradient de densité avant et après la conservation de la semence permettent, toutes deux, d'améliorer la qualité de la semence d'étalon. Toutefois son utilisation avant la conservation de la semence permet d'obtenir un taux de récupération des spermatozoïdes plus important.

(2) Conservation réfrigérée de la semence

(i) Effet de la conservation réfrigérée sur les spermatozoïdes

La conservation et le stockage prolongé de la semence peut également se faire par réfrigération pendant 48 à 72 heures. Dans ce cas, une détérioration de la qualité de la semence au cours de son stockage est observée. En effet, les spermatozoïdes d'étalon sont particulièrement sensibles aux chocs thermiques. La motilité est altérée au bout de 24 heures, puis d'autres paramètres comme l'intégrité de la chromatine est altérée au cours des 24 heures suivantes. (62)

(ii) Les bénéfices de la centrifugation en gradient de densité sur la conservation réfrigérée des spermatozoïdes

La sélection des spermatozoïdes par centrifugation en gradient de densité monocouche avant le stockage refroidi permet de ralentir cette détérioration. Par exemple, la diminution de motilité par jour de conservation des spermatozoïdes est généralement de 21,5 % pour les spermatozoïdes non sélectionnés au cours des deux premiers jours (tableau 1). La sélection des spermatozoïdes par centrifugation en gradient de densité monocouche permet de ralentir la diminution de motilité des spermatozoïdes à 10 % par jour au cours des deux premiers jours. (62)

Cette méthode permet de conserver la qualité de la semence lors de son stockage et ce, même s'il est stocké à température ambiante pendant 48 heures. Ceci pourrait être une solution pour conserver la semence d'étalon qui ne supporte pas la congélation. (87)

Tableau 1 : Effet de la sélection des spermatozoïdes par le gradient de densité Equipure®(Nidacon, Suède) sur la conservation de la semence
Source : Isabelle Barrier-Battut, 2013 (11)

	D'après Maziero et coll. [3]				D'après Papa et coll. [7]			
	Mobilité avant réfrigération		Mobilité après 24 h de réfrigération		Mobilité avant congélation		Mobilité après décongélation	
	Sans sélection	Après sélection	Sans sélection	Après sélection	Sans sélection	Après sélection	Sans sélection	Après sélection
Pourcentage de spermatozoïdes mobiles progressifs	31 %	43 %*	19 %	34 %*	30 %	45 %*	20 %	34 %*
<i>Mobilité progressive des spermatozoïdes avec ou sans sélection par centrifugation sur colloïde, avant et après conservation à l'état réfrigéré ou congelé. * Différence statistiquement significative au seuil de 5 %. Ces deux auteurs récupèrent en moyenne 41 % des spermatozoïdes après la centrifugation sur colloïde.</i>								

c) *Elimination du plasma séminal*

(1) Le rôle du plasma séminal

Le plasma séminal contient des protéines qui jouent un rôle dans la physiologie du sperme en se fixant à la membrane plasmique des spermatozoïdes. Ces protéines sont en effet associées à une protection antioxydante des spermatozoïdes, à l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, à la capacitation, à la réaction acrosomique, au transport des spermatozoïdes vers le site de fécondation, à l'interaction et la fusion spermatozoïde-ovocyte, à la reconnaissance de l'embryon par la jument et à la réaction inflammatoire post-coïtale de l'utérus de la jument. D'autres protéines sont capables d'influencer la survie et la capacitation des spermatozoïdes cryoconservés puis décongelés. (2) (48)

(2) Les effets négatifs du plasma séminal

Le plasma séminal provoque aussi des dommages sur les spermatozoïdes. En effet il existe dans le plasma séminal équin des protéines (environ 10 mg/mL) qui interagissent avec la membrane des spermatozoïdes et qui ont une activité catalytique sur cette dernière. Certaines protéines peuvent également provoquer une diminution de la capacité de fécondation des spermatozoïdes et une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. (2) (48)

Le plasma séminal peut avoir un effet délétère sur les spermatozoïdes et, notamment, sur la stabilité de la membrane plasmique et de la chromatine lors du stockage de la semence.

Par ailleurs, le plasma séminal contient des espèces réactives de l'oxygène principalement produites par les leucocytes provenant de l'urètre, des vésicules séminales ou de la prostate. Bien que ces dernières soient nécessaires à la capacitation des spermatozoïdes, elles peuvent aussi générer la sénescence et la mort des cellules lorsque les facteurs anti-oxydants sont dépassés.

Les spermatozoïdes équins sont dépendants de la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP. Par ailleurs, ils possèdent également une grande quantité d'acides gras poly-insaturés dans leur membrane plasmique. C'est pourquoi, ils sont très sensibles aux dommages oxydatifs.

Dans les conditions naturelles, c'est-à-dire lorsque le temps d'exposition des spermatozoïdes à ces espèces réactives de l'oxygène est de courte durée et que la contamination leucocytaire est peu importante, les spermatozoïdes sont protégés de ce stress oxydatif par les antioxydants présents dans le plasma séminal. C'est lors de la conservation des

spermatozoïdes ou lorsque la semence contient une quantité trop importante d'espèces réactives de l'oxygène que des dommages vont être produits sur les spermatozoïdes. (1) (126)

Par ailleurs, le plasma séminal peut aussi produire une réaction inflammatoire de l'utérus des femelles pour les juments sujettes à l'endométrite. (76)

L'effet néfaste du plasma séminal sur les spermatozoïdes varie en fonction de l'étalon. (76) Le retrait du plasma séminal peut ainsi présenter des avantages. (101)

(3) L'élimination du plasma séminal par la centrifugation en gradient de densité

La centrifugation en gradient de densité permet d'éliminer la majorité du plasma séminal, et donc de limiter les effets négatifs des protéines et des espèces réactives de l'oxygène sur les spermatozoïdes.

Il semble que lorsque le volume de plasma séminal est réduit à 5 % du volume total, il y a peu d'effet néfaste sur les spermatozoïdes pendant le stockage réfrigéré ou cryoconservé. La conservation de moins de 5 % du plasma séminal permet de maintenir la motilité des spermatozoïdes lors de la congélation, ce qui n'est pas le cas lorsqu'il y a conservation de la totalité du plasma séminal.

Par ailleurs, l'ajout de plasma séminal d'un étalon très fertile ne semble pas améliorer la qualité et la fertilité d'un étalon peu fertile. L'ajout de 5 % du même plasma séminal que précédemment après la décongélation pourrait avoir un effet bénéfique sur la réparation des dommages à la membrane plasmique du spermatozoïde et permet d'augmenter le nombre de spermatozoïdes qui se lient à la zone pellucide des ovocytes. (2) (76)

d) *Qualité des spermatozoïdes supérieure*

La centrifugation en gradient de densité permet de sélectionner des spermatozoïdes en fonction de leur densité et donc avec des caractéristiques morphologiques, une viabilité, une motilité, ainsi qu'une intégrité et une maturité de la chromatine supérieures. (101)

(1) *Élimination des spermatozoïdes anormaux*

La centrifugation en gradient de densité permet d'éliminer les spermatozoïdes présentant des défauts morphologiques comme les défauts de gouttelettes cytoplasmiques proximales et

distales, les têtes étroites, les têtes en forme de poire, des queues enroulées, des contours de tête anormaux, des têtes non développées, des défauts acrosomiques... (90)

Ces défauts morphologiques affectent la motilité et la densité des spermatozoïdes, ce qui permet de les séparer des spermatozoïdes de morphologie normale lors de la centrifugation en gradient de densité. Par exemple, les gouttelettes cytoplasmiques proximales de certains spermatozoïdes de morphologie anormale affectent la motilité des spermatozoïdes lors de la centrifugation. Ceci les empêche de s'aligner selon la force centrifuge et donc de se retrouver dans le culot avec les spermatozoïdes normaux. (90)

Toutes les anomalies morphologiques ne sont toutefois pas éliminées, mais une réduction de l'incidence de ces défauts est observée. (90)

Pour les étalons présentant une semence avec un nombre important de spermatozoïdes anormaux morphologiquement, il semblerait que la centrifugation en gradient de densité polycouches soit plus efficace que la centrifugation monocouche pour l'élimination de ces spermatozoïdes. (90)

(2) Amélioration de la viabilité des spermatozoïdes

La centrifugation en gradient de densité, en séparant les spermatozoïdes en fonction de leur densité, améliore la viabilité des spermatozoïdes sélectionnés.

Les échantillons de spermatozoïdes sélectionnés par centrifugation en gradient de densité monocouche présentent une proportion de spermatozoïdes vivants plus importante que les échantillons de spermatozoïdes non sélectionnés et cette viabilité supérieure dure dans le temps (environ 48 heures). (20)

Par ailleurs, les spermatozoïdes ainsi sélectionnés présentent moins de marqueurs apoptotiques. Ces marqueurs apoptotiques sont la présence de caspases actives, un faible potentiel de membrane mitochondriale, une fragmentation de l'ADN, et une perméabilité de la membrane plasmique modifiée.

L'apoptose des spermatozoïdes conduit à une diminution de la fertilité de l'étalon. (20)

(3) Amélioration de la motilité

La centrifugation en gradient de densité permet d'améliorer la motilité totale et progressive des spermatozoïdes et la rectitude des spermatozoïdes. (33) Cette augmentation de la motilité des spermatozoïdes atteint des niveaux de motilité proche des spermatozoïdes d'étalons fertiles (tableau 2).

Tableau 2 : Comparaison des valeurs de motilité des spermatozoïdes d'un étalon fertile et d'un étalon subfertile avant et après la centrifugation en gradient de densité

Source : Dickson D. Varner, 2016 (147)

Étalon	Traitement du sperme	MOT (%)	PMOT (%)	VCL (μm / secondes)
Fertile	Avant centrifugation en gradient de densité	80	63	205
	Après centrifugation en gradient de densité	91	78	209
Subfertile	Avant centrifugation en gradient de densité	63	48	251
	Après centrifugation en gradient de densité	90	79	259

MOT : pourcentage de motilité totale, PMOT : pourcentage de motilité progressive, vitesse curviligne moyenne

Toutefois, l'utilisation de l'échantillon obtenu ne permet pas d'obtenir les mêmes taux de gestation chez des juments fertiles pour les étalons subfertiles par rapport aux étalons fertiles (75 % contre 35 %). La motilité n'est donc pas le seul paramètre à prendre en compte dans l'évaluation de la semence d'étalon. (147)

(4) Amélioration de l'intégrité de l'ADN

La centrifugation en gradient de densité permet également de sélectionner des spermatozoïdes ayant un ADN intègre. (33) En effet, les spermatozoïdes présentant une chromatine mature et intacte sont plus denses que les spermatozoïdes ayant une chromatine immature et/ou endommagée. Lors de la centrifugation en gradient de densité, ils sont ainsi sélectionnés. (23)

Habituellement, la dégradation de l'ADN peut être causée par le vieillissement, les maladies, les produits pharmaceutiques, l'exposition à des polluants environnementaux ou aux rayonnements et une mauvaise hygiène de vie. Les différentes manipulations de la semence d'étalon (centrifugation, cryoconservation...) peuvent également être sources de dégradation de l'ADN. (23) Ces dégradations de l'ADN peuvent être transmises à l'embryon. L'utilisation de la centrifugation en gradient de densité avant la congélation permet ainsi de sélectionner les spermatozoïdes ayant subi le moins de dégradation de l'ADN après la décongélation. (23) (55)

La centrifugation en gradient de densité monocouche semble mieux sélectionner les spermatozoïdes selon leurs morphologie, motilité et intégrité de l'ADN que la centrifugation à deux couches. (33)

e) *Elimination des contaminants*

La semence équine peut être contaminée par plusieurs agents : l'urine, le sang, les bactéries, les spermatozoïdes défectueux, les leucocytes, les parasites et les virus.

(1) L'urine

L'urine est un des contaminants qui peut se retrouver dans la semence d'étalon. Les semences fortement contaminées par de l'urine ont des spermatozoïdes avec une motilité plus faible que les semences peu ou pas contaminées.

La centrifugation en gradient de densité monocouche d'échantillons décongelés fortement contaminés par de l'urine permet de sélectionner les spermatozoïdes ayant une meilleure motilité. La motilité reste toutefois inférieure à la motilité des échantillons faiblement ou non contaminés. (104)

Par ailleurs, l'urine détériore la viabilité des spermatozoïdes. Lors de l'utilisation de gradient de densité monocouche sur ces semences, les spermatozoïdes les plus viables sont sélectionnés. (104)

Il est possible que l'urine perturbe biochimiquement les spermatozoïdes, ce qui modifie leur densité.

Il est important de noter que la centrifugation en gradient de densité de semence urospermique permet uniquement d'améliorer la qualité de la semence de manière significative, en sélectionnant les spermatozoïdes les plus viables et motiles, que si elle est réalisée après la décongélation (et non pas avant la cryopréservation). (104)

(2) Le sang

Le sang est également un contaminant de la semence équine.

L'utilisation de la centrifugation en gradient de densité semble pouvoir séparer les globules rouges de la semence lors d'une hémospemie. (5)

(3) Les bactéries

Des bactéries peuvent aussi être présentes dans la semence des étalons. Ces dernières peuvent entraîner, une fois présentes dans l'appareil génital de la jument, des affections utérines et une infertilité. (50)

Pour empêcher cette contamination de l'appareil reproducteur femelle par la semence contaminée lors d'insémination, il est possible d'ajouter dans le dilueur de semence des antibiotiques. Mais ces antibiotiques peuvent provoquer des dégradations aux spermatozoïdes. Il peut aussi y avoir une inactivation de ces antibiotiques, qui deviennent alors inefficaces lors de la conservation de la semence par le froid. Par ailleurs, cette utilisation systématique des antibiotiques relève de l'antibioprophylaxie et peut contribuer à la sélection de bactéries résistantes. (50)

La centrifugation en gradient de densité pourrait être une alternative à l'utilisation de ces antibiotiques. En effet, il a été démontré qu'elle permet de réduire la charge bactérienne d'une semence préalablement enrichie en micro-organismes (*Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *streptocoque. equi zooepidermicus*, *Taylorella equigenitalis*).

Plus la semence contient de bactéries, plus le taux d'élimination de ces bactéries est important après la centrifugation. Le taux d'élimination des bactéries dépend de l'espèce bactérienne. Il est en effet plus important pour les bactéries *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *S. zooepidemicus* que pour *Taylorella equigenitalis* ou *Corynebacterium*. Lors d'une contamination naturelle, c'est-à-dire lorsque le sperme est contaminé lors de la collecte ou lors de sa production, les concentrations bactériennes sont généralement importantes. Il est donc probable que le taux d'élimination de ces bactéries lors de la centrifugation en gradient de densité soit important (> 90 %). (88)

Le temps séparant la récolte de la semence et le traitement par centrifugation en gradient de densité monocouche, ainsi que le dilueur utilisé, pourraient être des facteurs influençant le taux d'élimination des bactéries.

Il est difficile de savoir si le taux de bactéries résiduelles est suffisant pour créer une infection ou une inflammation de l'appareil génital femelle après l'insémination et pour induire une baisse de fertilité chez ces dernières. (88)

Par ailleurs, la charge microbienne en bactéries non pathogènes de semence non contaminée *in vitro* est réduite lors de l'utilisation de centrifugation en gradient de densité monocouche avant la cryoconservation du sperme, notamment pour les bactéries du genre *Enterococcus spp* et *Bacillus spp*. (50) (88)

(4) Les spermatozoïdes défectueux

Les spermatozoïdes non viables ou de mauvaise qualité présents dans la semence des étalons représentent aussi une source de contamination. En effet, les spermatozoïdes d'étalon possèdent une L-acide aminé oxydase, libérée lors de la mort des spermatozoïdes et capable de produire des espèces réactives de l'oxygène à partir d'acides aminés animaux. Cette production d'espèces réactives de l'oxygène est à l'origine de l'accélération de la disparition des autres spermatozoïdes lors du stockage. (41)

L'utilisation de gradient de densité ou de centrifugation monocouche permet de séparer et d'éliminer les spermatozoïdes morts et anormaux et donc d'éviter la libération de la L-amino acide oxydase. (40) (41)

Cette élimination permet donc de sélectionner des spermatozoïdes de haute qualité et de préserver leur longévité et leur fertilité après le stockage. (40) (41)

(5) Les leucocytes

La centrifugation en gradient de densité permet également d'éliminer la majorité des leucocytes présents dans les éjaculats d'étalons sains (peu de leucocytes). Ceci permet donc d'éviter la production d'espèces réactives de l'oxygène de ces cellules. (40) (41)

(6) Les parasites

La centrifugation en gradient de densité permet de purifier une semence d'étalon infecté artificiellement par la dourine (*trypanosoma equiperdum*, parasite transmis par voie vénérienne) si celle-ci ne contient pas une trop grande quantité de trypanosomes (< 50000). Toutefois lors d'une contamination naturelle, cette concentration en parasites ne semble pas atteinte. (154)

(7) Les virus

Enfin, il existe une technique de double traitement du sperme qui consiste en une centrifugation en gradient de densité suivie d'un swim-up. Cette technique pourrait être utilisée afin d'éliminer le virus de l'artérite virale équine du sperme d'étalons excréteurs. (85) Par ailleurs, la centrifugation en gradient de densité monocouche d'une semence d'un étalon

excrétant le virus de l'artérite virale équine permet d'obtenir des échantillons de semence indemnes d'artérite virale équine. (154)

f) Augmentation de la fertilité

Les spermatozoïdes issus d'étalons hypofertiles présentent plus de dégradations de l'ADN, une motilité inférieure et plus d'anomalies morphologiques que les spermatozoïdes issus d'étalons fertiles. (20)

En concentrant la proportion de spermatozoïdes de haute qualité, c'est-à-dire avec une motilité, morphologie, intégrité de la chromatine augmentée, et en réduisant la contamination de la semence par les bactéries, les spermatozoïdes morts et les cellules inflammatoires notamment, la centrifugation en gradient de densité est recommandée pour améliorer la fertilité des étalons. Ainsi, l'échantillon de spermatozoïdes obtenu est de meilleure qualité et a donc une plus forte probabilité de participer à la fécondation que la population initiale. (52)

De plus, les spermatozoïdes plus denses réduisent l'expression de certaines ARN (Acide Ribonucléique) messagers. Or, la régulation de ces ARN messagers à la baisse améliore la fertilité de la semence chez plusieurs espèces. Ce sont, en effet, ces spermatozoïdes denses avec une plus faible expression de ces ARN messagers qui participent à la fécondation.

La technique de centrifugation en gradient de densité permet ainsi d'augmenter le taux de réussite à l'insémination artificielle de 65 % environ. (89) La technique de centrifugation en gradient discontinu permet également d'obtenir un taux de gestation d'environ 60 % pour un étalon oligospermique infertile l'année précédente, lorsque cette méthode est combinée à une insémination en corne utérine profonde. En effet, l'insémination en corne utérine profonde peut, dans ce cas, améliorer le taux de fécondation car les spermatozoïdes de bonne qualité sélectionnés sont en nombre réduit. Cette technique d'insémination permet ainsi de maximiser le nombre de spermatozoïdes sur le lieu de la fécondation en évitant qu'ils soient éliminés au cours de leur remontée dans l'utérus. (75) (76)

Enfin, concernant l'ICSI, la centrifugation en gradient de densité permet de sélectionner des spermatozoïdes d'étalons hypofertiles qui, une fois injectés dans le cytoplasme des ovocytes, sont capables de déclencher le clivage et le développement au stade blastocyte. Le développement embryonnaire obtenu après injection intracytoplasmique de spermatozoïdes sélectionnés chez des étalons hypofertiles est plus important avec la centrifugation monocouche qu'avec la centrifugation en gradient multi-couche. (27)

g) Perspectives

La centrifugation en gradient de densité pourrait être utilisée à l'avenir dans différents protocoles. Par exemple, la centrifugation monocouche pourrait être une étape préliminaire à la cytométrie de flux dans le processus de sexage des spermatozoïdes. En effet, ce processus est long en partie à cause du nombre de spermatozoïdes à traiter. En éliminant une partie des spermatozoïdes de mauvaise qualité et morts au préalable le temps nécessaire au processus de sexage pourrait être réduit. (89)

La centrifugation en gradient de densité pourrait aussi être utilisée pour sélectionner des spermatozoïdes de bonne qualité avant l'injection intracytoplasmique. En effet, la fécondation *in vitro* (FIV) est aujourd'hui peu développée pour la filière équine du fait du nombre important d'échecs enregistrés lors de son utilisation. Ceci peut être dû à la difficulté des spermatozoïdes à pénétrer la zone pellucide *in vitro* ou à la difficulté de réaliser l'étape de capacitation *in vitro*. L'utilisation de gradient de densité dans le cadre de la FIV, permet ainsi d'obtenir une augmentation du nombre d'ovocytes pénétrés par des spermatozoïdes ayant subi une capacitation préalable. En effet, il est indispensable d'avoir des spermatozoïdes les plus performants possible avant l'étape de capacitation, afin d'augmenter les chances de réussite de la FIV, bien que d'autres paramètres rentrent en jeu. (45) (84)

4. Choix du gradient de densité

Une étude compare la qualité des spermatozoïdes sélectionnés par différents gradients de densité utilisés dans l'espèce équine. (115)

- Motilité totale : Equipure®(Nidacon, Suède) = RediGrad® (GE Healthcare, Suède) > AndroColl-E® (Minitube, Allemagne) > contrôle
- Motilité progressive : AndroColl-E® (Minitube, Allemagne) = RediGrad® (GE Healthcare, Suède) > contrôle = Equipure®(Nidacon, Suède)
- Vitesse curviligne : Equipure®(Nidacon, Suède) > contrôle = AndroColl-E® (Minitube, Allemagne)
- Rectitude : AndroColl-E® (Minitube, Allemagne) > contrôle = Equipure®(Nidacon, Suède)
- Pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux : Equipure®(Nidacon, Suède) = RediGrad® (GE Healthcare, Suède) > Contrôle = AndroColl-E® (Minitube, Allemagne)
- Pourcentage d'ADN anormal : RediGrad® (GE Healthcare, Suède) < AndroColl-E® (Minitube, Allemagne) = Equipure® (Nidacon, Suède) < contrôle
- Taux de récupération des spermatozoïdes : similaire entre Equipure®(Nidacon, Suède), AndroColl-E® (Minitube, Allemagne) et RediGrad® (GE Healthcare, Suède)
- Viabilité : augmentée pour les trois gradients

- Intégrité de l'acrosome : Equipure®(Nidacon, Suède) = AndroColl-E® (Minitube, Allemagne) > RediGrad® (GE Healthcare, Suède) = contrôle

Tableau 3 : Comparaison de différents paramètres des spermatozoïdes sélectionnés par plusieurs gradients de densité utilisés dans l'espèce équine

	Contrôle	Equipure®(Nidacon, Suède)	RediGrad® (GE Healthcare, Suède)	AndroColl-E® (Minitube, Allemagne)
Motilité totale	*	***	***	**
Motilité progressive	**	**	***	***
Vitesse curviligne	**	***		**
Rectitude	**	**		***
Pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux	**	***	***	**
Pourcentage d'ADN normal	*	**	***	**
Taux de récupération des spermatozoïdes		*	*	*
Viabilité		***	***	***
Intégrité de l'acrosome	**	***	**	***

Dans cette étude, il semble que, d'une manière générale, la qualité des spermatozoïdes est améliorée par les trois gradients de densité. Néanmoins, le gradient RediGrad® (GE Healthcare, Suède) semble permettre de sélectionner des spermatozoïdes de meilleure qualité. Ce gradient de densité n'est toutefois pas commercialisé pour une utilisation autre que la recherche. (115)

D'autres études comparent les gradients de densité utilisés dans la sélection des spermatozoïdes équins. Par exemple, une étude montre la supériorité du Percoll® (Cytiva, Etats Unis) dans la sélection de spermatozoïdes viables et progressivement motiles par rapport aux gradients de densité à base d'arabinogalactane (Cellsep® (Larex, Etats Unis)) ou d'albumine sérique bovine (comme le gradient Fraction V® (Sigma Aldrich, Suisse)). Cette étude rapporte néanmoins que l'utilisation du Percoll® (Cytiva, Etats Unis) permet d'obtenir autant d'ovocytes fécondés que lorsque les gradients de densité à base d'arabinogalactane sont utilisés. (142)

Une autre étude met en évidence que le rendement en spermatozoïdes récupérés est supérieur lorsque le gradient de densité Equipure®(Nidacon, Suède) est utilisé par rapport au Percoll® (Cytiva, Etats Unis) bien que les deux permettent d'améliorer la viabilité et la qualité du sperme refroidi et permettent de sélectionner sans trop activer les spermatozoïdes. (112)

C. Utilisation peu courante de la centrifugation en gradient de densité sur la semence équine

Au final, la centrifugation en gradient de densité est très peu utilisée dans l'espèce équine. Plusieurs inconvénients limitent en effet leur utilisation dans le but d'améliorer la fertilité des étalons ayant des semences de mauvaise qualité.

1. Facteur économique

a) Coût des gradients

Le premier facteur limitant est le coût. En effet, les gradients de densité sont essentiellement utilisés chez l'homme et il y a donc peu de formulations adaptées à une utilisation chez les animaux. (90) De ce fait, les grands volumes de gradient de densité nécessaires à la séparation des spermatozoïdes équins représentent un coût considérable, d'autant plus qu'ils ne sont pas réutilisables.

Dans les protocoles habituels, il faut entre 160 et 600 mL de gradient de densité pour traiter un éjaculat entier de volume normal dilué, c'est-à-dire de 40 à 150 mL. (90) Or, le coût des gradients de densité n'est pas négligeable. Par exemple, 100 mL d'Equipure® (Bottom Layer) sont vendus 98 euros hors taxe et 250 mL d' AndroColl-E® (Minitube, Allemagne) sont vendus 75,60 euros. (11)

b) Coût du travail

En plus de la quantité de gradient de densité plus importante nécessaire au traitement de la semence équine, les grands volumes d'éjaculats à traiter représentent un coût important du fait de la difficulté et du temps nécessaire pour traiter un éjaculat entier. En effet, les tubes à centrifuger ont un volume de 15 mL ou 50 mL, en fonction de la méthode utilisée, ce qui engendre un nombre important de répétitions du processus pour traiter un éjaculat entier. (33)

L'utilisation de tubes de centrifugation de volume plus important (jusqu'à 200 mL par exemple) permettant de centrifuger un plus grand volume de sperme et un nombre plus important de spermatozoïdes, et donc de réduire le nombre de tubes à centrifuger, a été étudié. Mais peu de centrifugeuses permettent d'utiliser ces tubes. De plus, l'utilisation de tels tubes impose une utilisation d'une plus grande quantité de gradient de densité et donc un prix plus élevé. Par ailleurs, il n'est pas conseillé d'utiliser un trop grand volume de semence

ou un trop grand nombre de spermatozoïdes dans chaque tube afin de ne pas diminuer de manière trop importante le rendement. (33)

c) Rendement faible

Par ailleurs, l'utilisation de la centrifugation en gradient de densité réduit considérablement le nombre de spermatozoïdes utilisables, et donc la rentabilité de l'étalon. En effet, le rendement de ces méthodes est toujours faible, il fluctue entre 15 et 60 % en fonction de la qualité initiale du sperme et de la méthode utilisée. (11)

2. Toxicité pour les spermatozoïdes

Plusieurs études mettent en évidence l'impact négatif que les méthodes de centrifugation en gradient de densité pourraient provoquer sur les spermatozoïdes.

a) Effets de la centrifugation

Certaines études montrent que la centrifugation provoque un contact étroit entre les spermatozoïdes et engendre un stress oxydatif, ainsi que des dommages ultrastructuraux aux spermatozoïdes, ce qui pourrait nuire à leur longévité. (77) (81)

b) Retrait du plasma séminal

D'autres incriminent le fait de retirer le plasma séminal. Ceci peut modifier les protéines présentes à la surface des spermatozoïdes, ce qui déstabilise la membrane plasmique des spermatozoïdes et entraîne une décapacitation précoce des spermatozoïdes, et ainsi une baisse de la capacité fécondante de ces derniers. (132)

c) Contamination métabolique

Des études montrent également qu'une contamination métabolique peut avoir lieu lors de la préparation des billes de silice. Cette contamination est responsable de la production d'un stress oxydatif responsable de dégradations de la membrane plasmique et des protéines de

la motilité et donc d'une baisse de la fertilité de la semence. Ce stress oxydatif peut aussi provoquer des dégradations à l'ADN des spermatozoïdes qui seront responsables d'avortements, de développements embryonnaires altérés ou d'une mauvaise santé du poulain qui en est issu. (8) (40) (81)

d) Toxicité du Percoll® (Cytiva, Etats Unis)

Certaines études mettent aussi en évidence des effets indésirables du Percoll® (Cytiva, Etats Unis) sur les spermatozoïdes de différentes espèces et sur le développement embryonnaire à la suite d'insémination avec des spermatozoïdes obtenus après traitement au Percoll® (Cytiva, Etats Unis). Il semble que ces problèmes soient dus aux effets de la polyvinylpyrrolidone contenue dans les gradients à base de Percoll® (Cytiva, Etats Unis). En effet, il semblerait que la polyvinylpyrrolidone pourrait contenir des endotoxines qui provoquerait une toxicité. (128)

Par ailleurs, certaines particules de Percoll® (Cytiva, Etats Unis) peuvent se retrouver dans l'échantillon obtenu après la centrifugation et le lavage, ce qui cause des irritations tissulaires lors de l'utilisation pour l'insémination intra-utérine. (81)

La technique Percoll® (Cytiva, Etats Unis) pourrait également causer une agglutination tête à tête des spermatozoïdes ou encore des modifications de mouvement des spermatozoïdes, ce qui pourrait causer des dommages pour la semence. (128)

3. Les autres méthodes de séparation des spermatozoïdes

a) Les différentes méthodes

Il est possible qu'une sélection des spermatozoïdes se fasse au sein de l'appareil reproducteur femelle afin de permettre seulement aux spermatozoïdes de bonne qualité de remonter l'oviducte et de féconder l'ovocyte. Il est nécessaire de reproduire cette sélection lors de la préparation de la semence en vue d'une insémination afin de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal et de sélectionner les spermatozoïdes de meilleure qualité. (89)

Il existe plusieurs techniques de séparation des spermatozoïdes permettant un stockage réfrigéré ou cryoconservé. (128)

La technique de séparation des spermatozoïdes idéale doit être rapide, facile et rentable. Pour cela, elle doit isoler un maximum de spermatozoïdes motiles, ne pas causer de dégradations aux spermatozoïdes ou d'altérations non physiologiques aux spermatozoïdes séparés, éliminer les spermatozoïdes morts et les autres cellules (en particulier les leucocytes, les spermatozoïdes morts ou endommagés), éliminer les substances toxiques ou bioactives

(comme les facteurs de décapacitation ou les espèces réactives de l'oxygène) et permettre le traitement de grands volumes d'éjaculats. (65)

(1) Lavage du sperme et centrifugation coussinée

Le lavage du sperme et la centrifugation coussinée sont des techniques peu onéreuses et simples qui permettent de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal, mais qui ne permettent pas de sélectionner des spermatozoïdes de qualité supérieure, ni de retirer les agents pathogènes, les débris, les espèces réactives de l'oxygène et les leucocytes. (89)

La centrifugation coussinée utilise l'iodixanol. Ce composé ne semble pas avoir d'effet néfaste sur la qualité des spermatozoïdes lorsqu'il est utilisé à des concentrations allant jusqu'à 2 %. (16) (136)

Deux méthodes de centrifugation coussinée sont utilisées dans l'espèce équine : la méthode Eqcellsire® et la méthode CushionFluid® (69) La technique consiste à placer le sperme au fond d'un tube conique de 50 mL, puis de placer délicatement un faible volume d'iodixanol sous le sperme avant de centrifuger le tout. Ensuite le surnageant est éliminé. (148) Ce coussin d'iodixanol est très peu visqueux, ce qui implique que les spermatozoïdes s'accrochent à la surface de celui-ci, plutôt que de se diriger vers le culot du tube. De ce fait, le volume de semence à traiter est réduit et des tubes de 15 mL sont suffisants, tout en gardant le même rendement et la même qualité des spermatozoïdes sélectionnés.

Il est, par exemple, possible d'utiliser le protocole suivant : une fois la centrifugation coussinée effectuée, la semence concentrée est déposée (sans dépasser plus de 500×10^6 spermatozoïdes) sur la solution de particules de silice dans des tubes de 15 mL. Il faut ensuite centrifuger 30 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est remis en suspension dans un dilueur pour obtenir une concentration finale comprise entre 100 et 300 millions de spermatozoïdes/mL. Ainsi le volume total de gradient de densité utilisé est de 10 à 30 mL.

La centrifugation coussinée permet donc de limiter les dégradations de la centrifugation sur les spermatozoïdes, ce qui permet d'appliquer une force centrifuge et une durée de centrifugation plus importante et ainsi d'augmenter le rendement en spermatozoïdes. (40)

Ce protocole économique en solution de gradient de densité est applicable pour des étalons hypofertiles avec une concentration en spermatozoïdes inférieure à un milliard avec des défauts morphologiques, de l'intégrité de l'ADN et de la motilité. Cette technique permet d'améliorer la fertilité d'étalons hypofertiles, notamment. (33)

En cas de semence faiblement concentrée en spermatozoïdes, des tubes modifiés peuvent être utilisés (avec des tétines en verre au fond du tube : tube à tétine). Il faut alors placer un dilueur dans la partie modifiée du tube, puis l'iodixanol, puis la semence étendue. (54)(148)

Ces protocoles réduisent néanmoins de manière importante les doses d'insémination produites et donc une insémination en corne utérine profonde est souvent nécessaire. Cette

technique d'insémination, d'après le protocole décrit au-dessus, pourrait être préférable puisqu'elle réduit l'accumulation de liquide dans l'utérus. (33) (148)

D'autres études montrent que l'utilisation de méthodes à une seule couche permettrait de réduire la difficulté du processus et le coût sans affecter la qualité de la semence obtenue. En effet, les techniques de centrifugation en gradient de densité monocouche sont adaptées au traitement de grands volumes de semence. (33) (52)

(2) La méthode swim-up

La technique swim-up est une technique basée sur la motilité des spermatozoïdes. Elle mime la sélection des spermatozoïdes qui s'opère dans l'appareil génital de la jument et en particulier au niveau de la jonction utero-tubaire. (89)

Cette méthode consiste à déposer un volume de sperme sous un matériel de faible viscosité présent dans un tube. Les spermatozoïdes motiles et viables se déplacent vers le milieu de viscosité le plus élevé, c'est-à-dire vers le haut du tube lors de l'incubation. Ils sont ainsi séparés des éléments immobiles et des spermatozoïdes présentant un ADN endommagé et peuvent ainsi être collectés (figure 51). (60) (77)

La méthode consiste donc à sélectionner les spermatozoïdes hautement motiles, viables avec des propriétés morphologiques (élimination des spermatozoïdes avec des anomalies de la tête et de la queue), cinétiques et structurelles supérieures. Elle permet aussi de réduire le taux de spermatozoïdes apoptotiques présents dans la semence. (113). Avec cette méthode, le plasma séminal est également retiré. (69) (77) (89)

Le rendement d'obtention de spermatozoïdes motiles est d'environ 15 à 20 %. (69) (77) (89)

Toutefois, cette technique ne permet pas de sélectionner des spermatozoïdes en fonction de leur potentiel de fertilité. Elle ne permet aussi pas d'éliminer les espèces réactives de l'oxygène, ni les leucocytes, débris et spermatozoïdes immatures. (60)

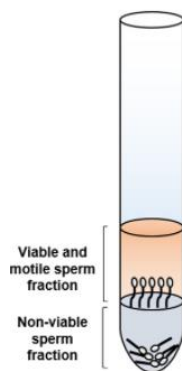


Figure 51 : Schéma de la disposition des spermatozoïdes après traitement de la semence par la méthode swim-up
Source : Giuseppina Marzano et al, 2020 (77)

Viable and motile sperm fraction : fraction de spermatozoïdes viables et motiles, non viable sperm fraction : fraction de spermatozoïdes non viables

(3) La filtration sur laine de verre ou sur des billes de verre

Il existe aussi des techniques de filtration sur laine de verre (Sephadex®) ou sur des billes de verre (Leucosorb®). En effet, les spermatozoïdes morts ou endommagés ont tendance à adhérer et à être retenus sur les surfaces en verre. (69)

La méthode Sephadex® filtre les spermatozoïdes grâce au comportement filtrant de la laine de verre et au mouvement des spermatozoïdes. Seuls les spermatozoïdes motiles et normaux peuvent passer à travers le filtre. La sélection des spermatozoïdes est basée sur la motilité, l'intégrité de la chromatine et de l'acrosome. (89) Les spermatozoïdes ainsi sélectionnés pénètrent plus facilement l'ovocyte et permettent donc d'obtenir des taux de fécondation plus élevés. (60)

Le rendement est d'environ 60 à 85 %. Ces techniques permettent d'éliminer les spermatozoïdes morts ou les débris présents dans la semence, mais ne permettent pas d'éliminer le plasma séminal du reste de la semence. (89)

Les techniques Sephadex® et Leucosorb® utilisées avant la congélation permettent d'augmenter la motilité progressive des spermatozoïdes après décongélation. (56)

Cette méthode permet de récupérer plus de spermatozoïdes que la méthode swim-up et que la centrifugation en gradient de densité.

La méthode de filtration sur laine de verre permet de réduire de manière plus importante le taux de fragmentation de l'ADN que la méthode de centrifugation en gradient de densité. (121)

(4) Le tri microfluidique

Le tri microfluidique (Fertile Plus®) est une technique basée sur la motilité, la morphologie des spermatozoïdes et la capacité des spermatozoïdes de se déplacer hors de leur ligne initiale et à se répartir sur toute la longueur contrairement aux spermatozoïdes immobiles. (44) (60) (77) (89)

La méthode consiste en un déplacement des spermatozoïdes avec une tête d'environ égale à 3 µm à travers un filtre à micropores de 8 µm d'une chambre à une autre. Les spermatozoïdes se déplacent de manière sélective contre la gravité. (42) (44)

Cette technique permet de sélectionner les spermatozoïdes avec une motilité, viabilité, morphologie, et une intégrité de l'ADN supérieures. Elle permet aussi de séparer les leucocytes. (44)

Cette technique, ne reposant pas sur la centrifugation, évite la production d'espèces réactives de l'oxygène et les dégradations de l'ADN des spermatozoïdes.

Le rendement est de 60 à 85 %. (44) (77) (89)

(5) Filtration à travers des membranes hydrophiles synthétiques

Il existe également des méthodes de filtration à travers une membrane hydrophile synthétique (comme SpermFilter® (Nidacon, Suède)). (4)

Il s'agit d'une coupelle ronde d'environ 10 cm de diamètre avec un fond poreux. Le sperme dilué est versé sur la coupelle tout en effectuant des mouvements de rotation lente pendant 5 à 10 minutes pour permettre au plasma séminal et au dilueur de passer à travers les pores. Seuls les spermatozoïdes restent sur le filtre.

Cette méthode ne permet, en revanche, pas de sélectionner des spermatozoïdes de qualité supérieure, bien que le fait de ne pas nécessiter d'étape de centrifugation permette de limiter les dégradations faites aux spermatozoïdes lors de cette étape. (4) (40)

Elle est peu onéreuse (le coût d'un filtre, réutilisable 10 fois après rinçage et pour un même étalon, est de 80 euros) et facile à mettre en place. (4) (40)

(6) Autres

Il existe d'autres méthodes de séparation et de sélection des spermatozoïdes utilisées chez l'homme, comme la sélection des spermatozoïdes assistée par laser, le tri cellulaire activé par fluorescence (cytométrie en flux), la technique de migration et sédimentation, le tri cellulaire activé magnétique, qui pourraient être testées dans l'espèce équine. (77)

b) Utilisation de ces méthodes dans le cas d'un étalon hypofertile

La centrifugation coussinée d'éjaculat d'étalon hypofertile suivie d'insémination à faible dose permet d'améliorer la fertilité de ces étalons. (13)

La technique swim-up permet d'obtenir des spermatozoïdes acceptables pour l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde à partir du sperme décongelé de mauvaise qualité d'un étalon infertile. (69)

La filtration sur laine de verre de semence d'étalons hypofertiles congelée puis décongelée n'améliore pas la fertilité, mais elle permet d'améliorer le taux de gestation lors d'utilisation d'étalons peu fertiles. (13) La méthode de sélection avec Sephadex® permet un taux de gestation plus important après une insémination en corne utérine profonde que lorsque les spermatozoïdes ne subissent pas de sélection. (142) Cette technique permet de piéger les spermatozoïdes présentant des défauts de l'acrosome ou de la membrane plasmique, ce qui est fortement corrélé à la fertilité de la semence congelée et décongelée d'un étalon. (69)

c) Comparaison des différentes méthodes

Les différentes techniques de séparation et de sélection des spermatozoïdes listées ci-dessus peuvent être comparées.

(1) Comparaison du coût, de la difficulté et du temps des différentes méthodes

La centrifugation coussinée est la technique la plus simple, rapide et la moins coûteuse.

La technique swim-up et la filtration sur laine de verre, ou bille de verre, sont des techniques qui sont un peu plus compliquées, car elles nécessitent une certaine attention aux détails. Ce sont des techniques qui demandent plus d'équipements. (89)

Le coût de la méthode swim-up reste néanmoins faible, contrairement aux méthodes de filtration, dont le coût est plus important. (89)

La centrifugation en gradient de densité est une technique plus compliquée, qui demande du matériel spécial et qui a un coût important. Cependant, la centrifugation monocouche est plus rapide, moins compliquée à mettre en place et permet de traiter un volume d'éjaculat plus important que la centrifugation poly-couche. (86) (89) (90)

(2) Comparaison de la qualité des spermatozoïdes obtenus

La méthode de sélection par filtration sur laine de verre permet d'améliorer la qualité des spermatozoïdes de manière plus efficace que la méthode de centrifugation utilisant du Percoll® (Cytiva, Etats Unis). (142)

Les techniques de filtration sur laine de verre ou billes de verre permettent d'obtenir des spermatozoïdes avec une intégrité membranaire et une motilité supérieure que la méthode par simple centrifugation ou dilution, et ce même après une conservation au froid pendant 48h. (128)

Les méthodes d'élimination du plasma séminal, sans sélection des spermatozoïdes, ne permettent pas de maintenir la motilité des spermatozoïdes lors du stockage autant que lorsqu'ils sont préalablement sélectionnés. (87)

Les méthodes de tri micro fluidique et de centrifugation en gradient de densité monocouche permettent d'obtenir une amélioration de la qualité des spermatozoïdes équivalente (motilité, morphologie, viabilité, intégrité de la membrane plasmique) et plus importante que la méthode swim-up (figure 52). (43)

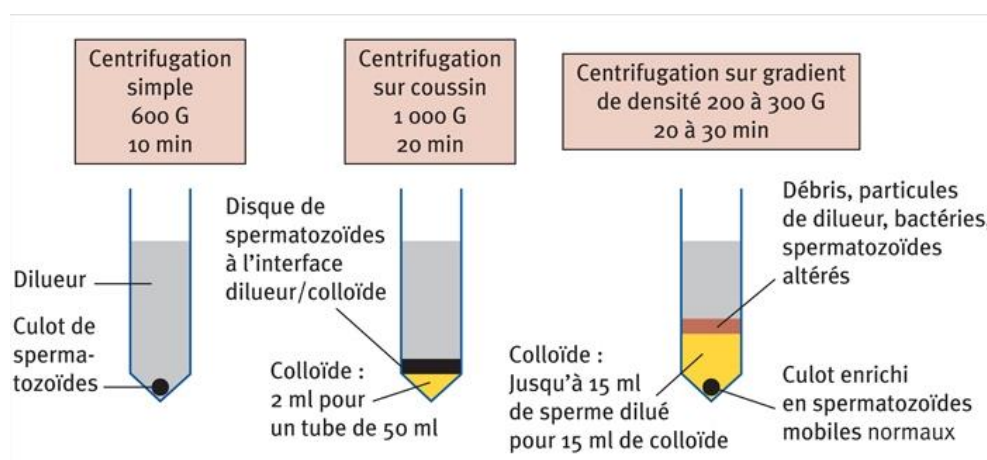


Figure 52 : Schéma du résultat de la séparation des spermatozoïdes par différentes méthodes

Source : Isabelle Barrier-Battut, 2013 (11)

(3) Comparaison du rendement

La centrifugation en gradient de densité utilisant du Percoll® (Cytiva, Etats Unis) permet d'avoir un rendement supérieur aux techniques de séparation des spermatozoïdes sur laine de verre. Néanmoins cette dernière méthode permet d'obtenir un rendement supérieur à la méthode swim-up. (128)

La centrifugation coussinée permet de récupérer plus de spermatozoïdes que la centrifugation seule.

A l'inverse, la centrifugation en gradient de densité monocouche permet d'obtenir un taux de récupération plus faible. (31) La centrifugation monocouche permet d'avoir un rendement supérieur à la centrifugation à deux couches. (33)

D. Utilisation future de la centrifugation en gradient de densité

La centrifugation en gradient de densité pourrait à l'avenir être utilisée préalablement à de nouvelles sortes de stockage des spermatozoïdes comme le stockage liquide des spermatozoïdes pendant sept jours. Cette forme de stockage consisterait à placer les spermatozoïdes sélectionnés par la méthode de centrifugation en gradient de densité dans un extenseur de sperme qui permettrait leur stockage et leur conservation au sein du milieu liquide sans nécessité de refroidir la semence. (39)

La centrifugation en gradient de densité pourrait également être utilisée avant le tri des spermatozoïdes pour le sexage, avant ou après la congélation des échantillons. Toutefois, cette pratique ne semble pas améliorer la qualité des spermatozoïdes. (131)

Elle est aussi intéressante à utiliser dans le cas d'étalons hypofertiles de races menacées qui sont représentés par un faible nombre d'étalons. Elle pourrait, dans ce cadre, permettre de maintenir certaines races.

E. Ethique

Le souhait de faire reproduire des étalons hypofertiles pose des questions quant à l'éthique de ces pratiques. En effet, la volonté de faire reproduire un étalon hypofertile sur des critères de valeur économique de l'animal est-elle suffisante pour mettre en place ces différentes stratégies de reproduction assistée ?

De plus, il est aujourd'hui difficile de faire la différence entre les causes héréditaires et non héréditaires de l'hypofertilité des étalons. Ces pratiques pourraient donc aboutir à la

multiplication d'étalons hypofertiles et à une réduction de la fertilité des étalons au cours du temps.

F. Sujet controversé

Beaucoup d'études traitent de ces différentes méthodes de séparation et de sélection des spermatozoïdes. Il existe de nombreuses contradictions dans certains de ces documents. Il se peut que ces contradictions soient dues à des différences de protocoles utilisés pour chaque méthode entre les différentes études (force centrifuge, temps de centrifugation, tubes utilisés, densité et volume des couches de gradient...).

Les échantillons utilisés, avant d'appliquer la méthode de séparation et de sélection des spermatozoïdes différents (extenseurs de sperme différents, étalons élevés différemment, temps de conservation de la semence...), peuvent aussi être source de résultats contradictoires.

Enfin, des différences de réglage des outils d'analyse des spermatozoïdes (CASA) peuvent aussi créer des contradictions dans les résultats des études.

La méthode utilisée pour évaluer la qualité des spermatozoïdes, l'analyse des données, et la population de spermatozoïdes évaluée peuvent aussi créer des biais et causer des résultats différents. (8) (59) (101)

La petite taille des échantillons pour de nombreuses études pourraient également causer des erreurs d'interprétation des résultats.

Dans certaines études, des conflits d'intérêts peuvent également être responsables de certaines contradictions.

Conclusion :

Aujourd'hui, l'amélioration de la qualité de la semence d'étalon répond à une demande de la part des propriétaires qui mettent à la reproduction leurs chevaux. En effet, certains étalons à haute valeur économique, notamment du fait de performances sportives exceptionnelles ou d'un patrimoine génétique favorable, présentent des troubles de la fertilité. La non-production de descendants pour ces chevaux étant impensable, la mise en place de méthodes d'amélioration de la fertilité représente un enjeu important pour la filière équine. Par ailleurs, le développement important des techniques de conservation de semences équines, par réfrigération ou par congélation, nécessite le développement parallèle de techniques améliorant la qualité préalable de ces semences, soumises à des contraintes néfastes aux spermatozoïdes lors de la procédure de conservation.

Puiseurs méthodes sont disponibles pour améliorer la qualité du sperme d'étalon. L'une d'entre elles, appelée centrifugation en gradient de densité, permet de séparer, dans un milieu présentant plusieurs niveaux de densité, des particules en fonction de leur taille et de leur densité par centrifugation. Elle semble être une méthode efficace de sélection des spermatozoïdes dans plusieurs espèces, notamment chez l'étalon, en améliorant la viabilité, la motilité et l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes sélectionnés. Cette méthode permet également de réduire la quantité de contaminants, c'est-à-dire de spermatozoïdes défectueux, de leucocytes, de bactéries, de virus, de parasites, de sang et d'urine, présents dans la semence. Ainsi, l'échantillon obtenu est purifié et concentré en spermatozoïdes de bonne qualité. Par ailleurs, la centrifugation en gradient de densité permet d'éliminer le plasma séminal du reste de l'éjaculat et donc d'améliorer la conservation de la semence. La centrifugation en gradient de densité aboutit donc à une augmentation de la fertilité de la semence équine, qui est mieux conservée pour une utilisation ultérieure en insémination artificielle.

Toutefois, la centrifugation en gradient de densité augmente le nombre de manipulations de la semence, ce qui peut causer des dégradations importantes aux spermatozoïdes. C'est notamment le cas de la centrifugation, qui peut nuire à la qualité de la semence traitée. De plus, cette méthode représente un coût non négligeable, ce qui explique sa faible utilisation dans la filière équine, d'autant plus que d'autres méthodes, plus abordables, existent.

Cependant, la centrifugation en gradient de densité reste une méthode de choix lorsque l'aspect financier n'est pas une contrainte, notamment pour des étalons de haute valeur économique. Cette méthode a également un grand intérêt comme étape préalable à des méthodes d'assistance à la procréation, comme l'ICSI (injection intracytoplasmique de

spermatozoïde), pour sélectionner les spermatozoïdes les plus aptes à la reproduction. Enfin, elle pourrait également être utilisée à l'avenir pour développer de nouvelles techniques de conservation de la semence ou encore pour sexer la semence d'étalon.

Bibliographie

1. Aitken RJ. Introduction. In: Henkel R, Samanta L, Agarwal A, éditeurs (2019), *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction*. Academic Press. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128125014020010>
2. Al-Essawe EM, Wallgren M, Wulf M, Aurich C, Macías-García B, Sjunnesson Y, et al (2018). Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. *Theriogenology*, Volume 115, Pages 99-107. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X1830164X>
3. Alouf CA, Carley M, Wilson L, Hannay TJ, Kellom T (1997). P-113 Sperm morphology following percoll density gradient. *Fertility and Sterility*, Volume 68, Page 145.
4. Alvarenga MA, Papa FO, Ramires Neto C (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, volume 32, Pages 521-30. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073916300426>
5. Andrade Junior LRP, Andrade LRP, Araujo EAB, Oliveira SN, Silva LFMC, Dalanezi FM, et al (2016). Fertility of blood-contaminated stallion semen prepared by density gradient centrifugation. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 43, Page 75. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080616303434>
6. Arias ME, Andara K, Briones E, Felmer R (2017). Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reproductive Biology*, volume 17 (2), Pages 126-32. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1642431X17300177>
7. Bahrami A, Divar MR, Azari M, Kafi M (2020). Nicotinic Acid (Niacin) Supplementation in Cooling and Freezing Extenders Enhances Stallion Semen Characteristics. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 94. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080620303270>
8. Baldi E, Tamburrino L, Muratori M, Degl'Innocenti S, Marchiani S (2020). Adverse effects of in vitro manipulation of spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. Volume 220. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432019310991>
9. Ball BA (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, volume 107, Pages 257-67. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432008001437>
10. Bareh GM, Robinson RD, Chang T-C, Jacoby E, Brzyski R, Schenken R (2013). Abnormal sperm motility and morphology predict sperm DNA damage and density

gradient preparation improves sperm DNA damage compared to sperm wash in patients with abnormal semen parameters. *Fertility and Sterility*, volume 100, Page 449.

11. Barrier Battut I (2013). Collecte et traitement de la semence d'étalon : quoi de neuf ? *La Semaine Vétérinaire*, numéro 117
Disponible sur : <https://www.lepointveterinaire.fr/publications/pratique-veterinaire-equine/archives/n-177/collecte-et-traitement-de-la-semence-d-etalon-quoi-de-neuf.html>
12. Barth AD. CHAPTER 31 - Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull. In: Youngquist RS, Threlfall WR, éditeurs (2007). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Second Edition)*. Saint Louis : W.B. Saunders, Pages 228-40.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780721693231500349>
13. Blanchard TL, Brinsko SP, Love CC, Vest DD, Berezowski CB, Wendt KM, et al (2012). Case Study of Processing and Insemination Techniques: Attempts to Improve Fertility of an Aged Stallion with Dilute Semen of Poor Quality. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 32, Pages 5-11.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080611004199#bib13>
14. Blanchard TL, Varner DD, Love CC, Brinsko SP, Morehead JP (2012). Management Options for the Aged Breeding Stallion with Declining Testicular Function. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 32, Pages 430-5.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080612002900>
15. Blanchard TL, Varner DD, Morehead JP. Chapter 152 - Breeding Management of the Older Stallion With Declining Testicular Function. In: Sprayberry KA, Robinson NE, éditeurs (2015). *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine (Seventh Edition)*. St. Louis: W.B. Saunders, Pages 641-3.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455745555001527>
16. Bliss SB, Voge JL, Hayden SS, Teague SR, Brinsko SP, Love CC, et al (2012). The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology*, volume 77, Pages 1232-9.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11005462>
17. Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, et al. CHAPTER 12 - Semen Collection and Artificial Insemination with Fresh Semen. In: Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, et al., éditeurs (2011). *Manual of Equine Reproduction (Third Edition)*. Saint Louis: Mosby, Pages 160-75.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323064828000211>
18. Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, et al. CHAPTER 13 - Examination of the Stallion for Breeding Soundness. In: Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, et al., éditeurs (2011). *Manual of Equine Reproduction (Third Edition)*. Saint Louis: Mosby, Pages 176-206.
Disponible sur :

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323064828000223>

19. Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, et al. CHAPTER 14 - Semen Preservation. In: Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, et al., éditeurs (2011). *Manual of Equine Reproduction (Third Edition)*. Saint Louis: Mosby, Pages 207-27.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323064828000235>
20. Brum AM, Sabeur K, Ball BA (2008). Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology*, volume 69, Pages 1041-55.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X08000575>
21. Campanholi SP, Monteiro FM, Ribeiro Dias EA, Mercadante MEZ, de Paz CCP, Dell'Aqua Junior JA, et al (2017). Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility. *Theriogenology*, volume 89, Pages 114-21.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16304976>
22. Campos JR, Breheny P, Araujo RR, Troedsson MHT, Squires EL, Timoney PJ, et al (2014). Semen quality of stallions challenged with the Kentucky 84 strain of equine arteritis virus. *Theriogenology*, volume 82, Pages 1068-79.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14003458>
23. Cerny KL, Hughes S, Campos JR, Coleman RJ, Troedsson MHT, Squires EL (2012). Fertility of Mares Inseminated With Frozen-Thawed Semen Processed by Single Layer Centrifugation Through a Colloid. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 32, Pages 289-91.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080611005880>
24. Chenier TS. Chapter 1 - Anatomy and Physical Examination of the Stallion. In: Samper JC, éditeur (2009). *Equine Breeding Management and Artificial Insemination (Second Edition)*. Saint Louis: W.B. Saunders. Pages 1-16.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416052340000015>
25. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT (2004). Sperm DNA damage in neat and density gradient fractions of patient and donor semen samples by different chromatin evaluation assays. *Fertility and Sterility*, volume 82, Pages 95-6.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028204015432>
26. Cohen-Bacrie (2008). Qualité et sélection du spermatozoïde. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, volume 37, Pages 4-8.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0368231508738432>
27. Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G, Rodriguez-Martinez H, Galli C, Morrell JM (2011). New Methods for Selecting Stallion Spermatozoa for Assisted Reproduction. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 31, Pages 536-41.

- Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080611001018>
28. Daneshmandpour Y, Pashazadeh F, Ansari F, Hosseinifard H, Nouri M, Yousefi M, et al (2019). The comparative effect of magnetic activated cell sorting, density gradient centrifugation and swim up on assisted reproduction outcomes, sperm DNA fragmentation, and aneuploidy: A systematic review and meta-analysis. *Meta Gene*, volume 22.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214540019300660>
 29. Decuadro-Hansen G (2004). La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, volume 32, Pages 887-93.
Disponible sur : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297958904002796?casa_token=DnRBepWewiEAAAAA:axYHReTvotuC3dgZXGeOO--SE0xA8qXyiOgPcDiTSWufFvFEg1_Ekw4bIpAI_qcjKx0kpgcgz7jO
 30. Doligez AM (équipédia ifce). L'insémination artificielle équine. URL : <https://equipedia.ifce.fr/elevage-et-entretien/elevage/reproduction/l-ia-equine>
 31. Dos Santos FCC, Morrell JM, Curcio B da R, Nunes MM, Malschitzky E (2017). Cushioned and Single Layer Centrifugation Improve Epididymal Stallion Sperm Motility Postcentrifugation. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 57, Pages 56-60.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080617303611>
 32. Ebner T, Shebl O, Moser M, Mayer RB, Arzt W, Tews G (2011). Easy sperm processing technique allowing exclusive accumulation and later usage of DNA-strandbreak-free spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, volume 22, Pages 37-43.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648310006188>
 33. Edmond AJ, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Teague SR, Varner DD (2012). Effect of centrifugal fractionation protocols on quality and recovery rate of equine sperm. *Theriogenology*, volume 77, Pages 959-66.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11005176>
 34. Foisseau JM et al. Chapitre 3 - La physiologie de l'activité sexuelle du mâle. In: Foisseau JM et al (2005). *Reproduction des animaux d'élevage (troisième édition)*, Dijon, pages 56-67
 35. Foisseau JM et al. Chapitre 9 - Les chevaux. In: Foisseau JM et al (2005). *Reproduction des animaux d'élevage (troisième édition)*. Dijon, pages 272-303
 36. Galarza DA, Ladrón de Guevara M, Beltrán-Breña P, Sánchez-Calabuig MJ, Rizos D, López-Sebastián A, et al (2019). Influence of sperm filtration and the addition of glycerol to UHT skimmed milk- and TEST-based extenders on the quality and fertilizing capacity of chilled ram sperm. *Theriogenology*, volume 133, Pages 29-37.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X19301116#abs0010>
 37. Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lazzari G (2016). Male Factors Affecting the Success of Equine In Vitro Embryo Production by Ovum Pickup-Intracytoplasmic Sperm Injection in a Clinical Setting. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 43, Pages 6-10.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080616302568>

38. García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, del Olmo E, Montoro V, Dominguez-Rebolledo AE, et al (2010). Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, volume 74, Pages 979-88.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X10002372>
39. Gibb Z, Clulow JR, Aitken RJ, Swegen A (2018). First Publication to Describe a Protocol for the Liquid Storage of Stallion Spermatozoa for 7 Days. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 74, Pages 37-40.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073708061830220X>
40. Gibb Z, Aitken RJ (2016). Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 43, Pages 29-36.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080616301290>
41. Gibb Z, Griffin RA, Aitken RJ, De Iuliis GN (2020). Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility. *Animal Reproduction Science*, volume 220
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432020303286>
42. Gode F, Bodur T, Gunturkun F, Gurbuz AS, Tamer B, Pala I, et al (2019). Comparison of microfluid sperm sorting chip and density gradient methods for use in intrauterine insemination cycles. *Fertility and Sterility*, volume 112, Pages 842-848.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028219305783>
43. Gonzalez-Castro RA, Stokes JE, Carnevale EM (2018). Equine Sperm Selection by Colloidal Centrifugation, Swim-up and a Microfluidic Device and ICSI Outcome. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 66, Pages 61-2.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080618302387>
44. Gonzalez-Castro RA, Carnevale EM (2019). Use of microfluidics to sort stallion sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Animal Reproduction Science*, volume 202, Pages 1-9.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432018307516>
45. Gonzalez-Castro RA, Trentin JM, Carnevale EM, Graham JK (2019). Effects of extender, cryoprotectants and thawing protocol on motility of frozen-thawed stallion sperm that were refrozen for intracytoplasmic sperm injection doses. *Theriogenology*, volume 136, Pages 36-42.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X19302547>
46. Gosálvez J, Johnston S, López-Fernández C, Gosálbez A, Arroyo F, Fernández JL, et al (2014). Sperm fractions obtained following density gradient centrifugation in human ejaculates show differences in sperm DNA longevity. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, volume 3, Pages 116-20.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2305050014600142>
47. Grignard E (2012). *Analyse de protéines spermatiques post-testiculaires et développement d'outils pour le contrôle de la fertilité de différents mammifères; Equus caballus, Bos taurus, Arvicola terrestris Scherman*, docteur d'université, université

Blaise Pascal, Clermont Ferrand, Page 79.

48. Guasti PN, Souza FF, Scott C, Papa PM, Camargo LS, Schmith RA, et al 2020. Equine seminal plasma and sperm membrane: Functional proteomic assessment. *Theriogenology*, volume 156, Pages 70-81.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X20303642>
49. Guimarães ACG, Leivas FG, Santos FW, Schwengber EB, Giotto AB, Machado CIU, et al (2014). Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Animal Reproduction Science*, volume 146, Pages 103-10.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432014000566>
50. Guimarães T, Lopes G, Pinto M, Silva E, Miranda C, Correia MJ, et al (2015). Colloid centrifugation of fresh stallion semen before cryopreservation decreased microorganism load of frozen-thawed semen without affecting seminal kinetics. *Theriogenology*, volume 83, Pages 186-91.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14004920>
51. Guo Y, Jiang W, Yu W, Niu X, Liu F, Zhou T, et al (2019). Proteomics analysis of asthenozoospermia and identification of glucose-6-phosphate isomerase as an important enzyme for sperm motility. *Journal of Proteomics*, volume 208.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391919302507>
52. Gutiérrez-Cepeda L, Fernández A, Crespo F, Gosálvez J, Serres C (2011). Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Animal Reproduction Science*, volume 124, Pages 85-9.
Disponible sur :
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432011000303?casa_token=AgNiMUO7e8cAAAAA:x8tckA1yo2YO3NfqGxmYIJUWOseOaBKNEJ-v0_D0qpM5NEutqWcmZylW5Nrji-EhGA8tD9mVow#bib0020
53. Hechtman L. Chapitre 185 - Infertility, Male. In: Pizzorno JE, Murray MT, éditeurs (2020). *Textbook of Natural Medicine (Fifth Edition)*. St. Louis (MO): Churchill Livingstone, Pages 1453-1472.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323430449001850>
54. Heutelbeck A, Oldenhof H, Henke S, Martinsson G, Sieme H (2012). Delayed cryopreservation of stallion sperm: effect of iodixanol density gradient centrifugation. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 32, Pages 488-9.
55. Hidalgo M, Ortiz I, Dorado J, Morrell JM, Gosálvez J, Consuegra C, et al (2017). Stallion sperm selection prior to freezing using a modified colloid swim-up procedure without centrifugation. *Animal Reproduction Science*, volume 185, Pages 83-8.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843201730057X#bib0085>
56. Hoogewijs M, Morrell J, Van Soom A, Govaere J, Johannisson A, Piepers S, et al (2011).

- Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. *Equine Veterinary Journal*, volume 43 (40), Pages 35-41.
 Disponible sur : <https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.2042-3306.2011.00489.x>
57. Iannuzzi A, Della Valle G, Russo M, Longobardi V, Albero G, De Canditiis C, et al (2020). Evaluation of bovine sperm telomere length and association with semen quality. *Theriogenology*, volume 158, Pages 227-32.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X20305124>
 58. Ing NH, Forrest DW, Love CC, Varner DD (2014). Dense spermatozoa in stallion ejaculates contain lower concentrations of mRNAs encoding the sperm specific calcium channel 1, ornithine decarboxylase antizyme 3, aromatase, and estrogen receptor alpha than less dense spermatozoa. *Theriogenology*, volume 82, Pages 347-53.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14001952>
 59. Jackson RE, Bormann CL, Hassun PA, Rocha AM, Motta ELA, Serafini PC, et al (2010). Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility*, volume 94, Pages 2626-30.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028210006709#fig3>
 60. Jeyendran RS, Caroppo E, Rouen A, Anderson A, Puscheck E (2019). Selecting the most competent sperm for assisted reproductive technologies. *Fertility and Sterility*, volume 111, 851-63.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001502821930305X>
 61. Jodar M, Attardo-Parrinello C, Soler-Ventura A, Barrachina F, Delgado-Dueñas D, Cívico S, et al (2020). Sperm proteomic changes associated with early embryo quality after ICSI. *Reproductive BioMedicine Online*, volume 40, Pages 700-10.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648320300213>
 62. Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jönsson M, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez H (2009). Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*, volume 116, Pages 119-28.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432009000098>
 63. Kanabur P, Ramasamy R. Nutraceutical Therapy in Male Infertility. In: Skinner MK, éditeur (2018). *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, Pages 333-9.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383647876>
 64. Kirk ES, Squires EL, Graham JK (2005). Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology*, volume 64, Pages 1422-39.

- Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05000877>
65. Larentis GR, Camozzato GC, Bastos HBA, Gregory RM, Mattos RC (2018). Equine Sperm Selection by Synthetic Membrane Filter. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 63, Pages 69-73.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080617307669>
 66. Lawrence LM. Chapitre 11 - Feeding stallions and broodmares. In: Geor RJ, Harris PA, Coenen M, éditeurs (2013). *Equine Applied and Clinical Nutrition*, Edimbourg, Pages 231-42.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702034220000110>
 67. Ley WB, Slusher SH. CHAPTER 3 - Infertility and Diseases of the Reproductive Tract of Stallions. In: Youngquist RS, Threlfall WR, éditeurs (2007). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Second Edition)*. Saint Louis: W.B. Saunders, Pages 15-23.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780721693231500064>
 68. Lima CM (2005). Développement d'une approche markovienne pour l'analyse de l'organisation spatiale des génomes. Doctorat. Université Claude Bernard - Lyon I.
 Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00011674>
 69. Loomis PR (2006). Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, volume 22, Pages 663-76.
 70. M.L. Macpherson et al (2002). Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. *Theriogenology*, volume 58, Pages 317-20.
 Disponible sur :
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0093691X02007367?token=5D196DAD6B564EAFB1ACB6F173106544EDA741575368C4D54FD57BE2CBFB06DDEFA9D602C6A085DFE832192356FDE4AA>
 71. Magistrine M (1999). L'insémination artificielle chez les équins. *INRAE Productions Animales*. Pages 347-9.
 72. Makler A, Stoller J, Makler-Shiran E (1998). Dynamic aspects concerned with the mechanism of separating motile sperm from nonmotile sperm, leukocytes, and debris with the use of high-density percoll* gradients**Pharmacia Ltd., Uppsala, Sweden. *Fertility and Sterility*, volume 70, Pages 961-6.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028298002866>
 73. Mancill et al (2010). Effect of density gradient centrifugation on cryopreservation of equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, volume 121, Pages 208-9.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010002381>
 74. Margat A (équipédia ifce). Calcul de fertilité. URL : <https://equipedia.ifce.fr/elevage-et-entretien/elevage/etalon/calculs-de-fertilite>
 75. Mari et al (2010). Comparison of density gradient and simple centrifugation of equine spermatozoa: effect on fertility of an oligospermic-subfertile stallion. *Animal*

- Reproduction Science*, volume 121, Pages 153-4.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843201000148X>
76. Mari G, Castagnetti C, Rizzato G, Mislei B, Iacono E, Merlo B (2011). Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility. *Animal Reproduction Science*, volume 126, Pages 96-100.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432011001266#bbib0065>
 77. Marzano G, Chiriaco MS, Primiceri E, Dell'Aquila ME, Ramalho-Santos J, Zara V, et al (2020). Sperm selection in assisted reproduction: A review of established methods and cutting-edge possibilities. *Biotechnology Advances*, volume 40.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975019301983>
 78. Meyer C (2009). *La reproduction et l'insemination artificielle du cheval*. CIRAD Campus de Baillarguet. 19 pages.
 79. Meyers SA. Chapter 5 - Sperm Physiology. In: Samper JC, éditeur (2009). *Equine Breeding Management and Artificial Insemination (Second Edition)*. Saint Louis: W.B. Saunders. Pages 47-55.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416052340000052>
 80. Meyers SA, Liu IKM, Overstreet JW, Vadas S, Drobnis EZ (1996). Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: Comparisons between fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, volume 46, Pages 1277-88.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X96002993>
 81. Ming-Jer C, Ariff B (1999). Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Human Reproduction*, volume 14, pages 759-64.
 Disponible sur : <https://academic.oup.com/humrep/article/14/3/759/632917?login=true>
 82. Missio D, Folchini NP, Leivas FG, Pavin CIUM, Pinto HF, Cibir FWS, et al (2018). Reduction in Percoll volume increases recovery rate of sex-sorted semen of bulls without affecting sperm quality and early embryonic development. *Animal Reproduction Science*, volume 192, Pages 146-53.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432017309958>
 83. Monqaut AL, Zavaleta C, López G, Lafuente R, Brassesco M (2011). Use of high-magnification microscopy for the assessment of sperm recovered after two different sperm processing methods. *Fertility and Sterility*, volume 95, Pages 277-80.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028210010241>
 84. Morató R, Soares JMDS, Orero G, Mogas T, Miró J (2013). Pre-selection by double layer density gradient centrifugation improves the fertilising capacity of frozen-thawed, capacitated stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, volume 139, Pages 62-8.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843201300136X>
 85. Morrell JM, Geraghty RM (2006). Effective removal of equine arteritis virus from

- stallion semen. *Equine Veterinary Journal*, volume 38 (3), Pages 224-9.
 Disponible sur :
<https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2746/042516406776866444>
86. Morrell JM, Johannisson A, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez H (2009). Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology*, volume 72, Pages 879-84.
 Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X09002556>
 87. Morrell JM, Johannisson A, Strutz H, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez H (2009). Colloidal Centrifugation of Stallion Semen: Changes in Sperm Motility, Velocity, and Chromatin Integrity during Storage. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 29, Pages 24-32.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080608003778>
 88. Morrell JM, Klein C, Lundeheim N, Erol E, Troedsson MHT (2014). Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science*, volume 145, Pages 47-53.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432014000074>
 89. Morrell JM (2012). Stallion Sperm Selection: Past, Present, and Future Trends. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 32, Pages 436-40.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080612002924>
 90. Morrell J, Johannisson A, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez H (2009). Morphology and Chromatin Integrity of Stallion Spermatozoa Prepared by Density Gradient and Single Layer Centrifugation Through Silica Colloids. *Reproduction in Domestic Animals*, volume 44, Pages 512-7.
 Disponible sur : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2008.01265.x?casa_token=SLejOj3cPEYAAAAA%3AeQQzWdkJPmnRRZV46e8CbgcVvQIv0J1IOkJGca1d-UB3h7NjbGW-4UYTZQLjSzxt-Gt-o7B3p6rk9_o
 91. Morris L (2006). Advanced Insemination Techniques in Mares. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, volume 22, Pages 693-703.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073906000496>
 92. Mortimer D (2000). Sperm Preparation Methods. *Journal of Andrology*, volume 21, Pages 357-66.
 Disponible sur : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03390.x>
 93. Naknam W, Salang L, Sothornwit J, Amnatbuddee S, Seejorn K, Pongsritasana T, et al (2019). Effect of sperm selection method by cumulus oophorus complexes and conventional sperm preparation method on sperm quality and DNA fragmentation for assisted reproduction technology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, volume 243, Pages 46-50.
 94. Nanassy L, Carrell DT (2011). Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation. *Fertility and Sterility*, volume 95, Pages 2310-4.
 Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028211005267>

95. Nicotra P, Uriondo H, Barrios E, Papier S, Fiszbajn G, Nodar F, et al (2014). Multilayer density gradient as a useful technique for sperm sex sorting. *Fertility and Sterility*, volume 102, page 100.
Disponibile sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028214009686>
96. Nie GJ, Johnson KE, Wenzel JGW (2003). Pregnancy outcome in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/Sephadex filtration, Percoll separation or absolute number. *Animal Reproduction Science*, volume 79, Pages 103-9.
Disponibile sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432003000861>
97. Oliveira LZ, dos Santos RM, Hossepian de Lima VFM, Paes de Arruda R, de Andrade AFC, Guimarães V, et al (2011). Chromatin and morphometry alterations of bovine sperm head after PercollTM density gradient centrifugation. *Livestock Science*, volume 141, Pages 267-71.
Disponibile sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141311002071>
98. Oliveira SN, Andrade LRP, Silva LFMC, Araujo EAB, Rayashi RM, Segabinazzi LGTM, et al (2020). Fractionated semen collection as a tool to rescue fertility in stallions with seminal vesiculitis. *Theriogenology*, volume 157, pages 110-20.
Disponibile sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X20304118>
99. Ortiz I, Dorado J, Ramírez L, Morrell JM, Acha D, Urbano M, et al (2014). Effect of single layer centrifugation using Androcoll-E-Large on the sperm quality parameters of cooled-stored donkey semen doses. *Animal*, volume 8, Pages 308-15.
Disponibile sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751731113002097>
100. Papa PM, Maziero RRD, Hartwig FP, Lisboa FP, Delláqua JA, Alvarenga MA, et al (2012). Effect of density gradient on sperm parameters of stallion frozen semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 32, Page 505.
Disponibile sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080612004066>
101. Papin J, Stuhmann G, Martinsson G, Sieme H, Lundeheim N, Ntallaris T, et al (2021). Stored Stallion Sperm Quality Depends on Sperm Preparation Method in INRA82 or INRA96. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 98.
Disponibile sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080620304585>
102. Parkinson TJ. Chapitre 2 - Reproductive Physiology of Male Animals. In: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, éditeurs (2019). *Veterinary Reproduction and Obstetrics (Tenth Edition)*. St. Louis (MO): W.B. Saunders. Pages 35-53.
Disponibile sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702072338000021>
103. Pertoft H, Laurent TC, Låås T, Kågedal L (1978). Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Analytical Biochemistry*. Volume 88 (1), Pages 271-82.
Disponibile sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269778904190?via%3Dihub>
104. Podico G, Ellerbrock RE, Curcio BR, Cheong SH, Lima FS, Canisso IF (2020). Single-Layer Colloid Centrifugation as a Method to Process Urine-Contaminated Stallion Semen After Freezing-Thawing. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 87

- Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080620300010#bib18>
105. Ponthier J, Teague SR, Franck TY, de la Rebière G, Serteyn DD, Brinsko SP, et al (2013). Effect of non-sperm cells removal with single-layer colloidal centrifugation on myeloperoxidase concentration in post-thaw equine semen. *Theriogenology*, volume 80, Pages 1082-7.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X13003324>
106. Price CA. Chapitre 2 - Origins of Density Gradient Centrifugation. In: Price CA, éditeur (1982). *Centrifugation in Density Gradients*. Academic Press, New Jersey. Pages 12-31.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125645805500076>
107. Price CA. Chapitre 5 - Gradient Materials and Construction of Gradients. In: Price CA, éditeur (1982). *Centrifugation in Density Gradients*. Academic Press, New Jersey. Pages 114-49.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125645805500106>
108. Price CA. Chapitre 6 - Techniques of Preparative Density Gradient Centrifugation. In: Price CA, éditeur (1982). *Centrifugation in Density Gradients*. Academic Press, New Jersey. Pages 150-96.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125645805500118>
109. Price CA. Chapitre 9 - Protocols for the Separation and Analysis of Some Specific Particles. In: Price CA, éditeur (1982). *Centrifugation in Density Gradients*. Academic Press, New Jersey. Pages 264-314.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125645805500143>
110. Punjabi U, Van Mulders H, Goovaerts I, Peeters K, Clasen K, Janssens P, et al (2018). Sperm DNA fragmentation in the total and vital fractions before and after density gradient centrifugation: Significance in male fertility diagnosis. *Clinical Biochemistry*, volume 62, Pages 47-54.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912018301000>
111. Punjabi U, Peeters K, De Neubourg D (2019). Sperm nuclear maturity and chromatin stability in subfertile patients: Density gradient centrifugation is fair but non-discriminative in selecting the right population. *Reproductive Biology*, volume 19, Pages 316-21.
Disponible sur : <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.vetagro-sup.fr/science/article/pii/S1642431X1930258X>
112. Ramires-Neto C, Monteiro GA, Delfiol DJZ, Farras MC, Maziero RRD, Hartwing FP, et al (2012). Effect of different methods for sperm selection on cooled stallion semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 32, Pages 509-10.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080612004145>
113. Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guaschino S, Presani G (2009). Semen

- preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertility and Sterility*, volume 91, Pages 632-8.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028207041349>
114. Rubessa M, Feugang JM, Kandel ME, Schreiber S, Hesse J, Salerno F, et al (2020). High-throughput sperm assay using label-free microscopy: morphometric comparison between different sperm structures of boar and stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, volume 219.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843202030381X>
 115. Sabatini C, Perrin A, Varner DD, Blanchard T, Rota A, Love CC (2014). Effect of density gradient centrifugation with three different media on stallion semen quality. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 34, Page 77.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080613006849>
 116. Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S. La reproduction animale et humaine. Versailles: Éditions Quae (2014).
Disponible sur : <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=1561306&lang=fr&site=ehost-live>
 117. Saint-Dizier M, Mahé C, Reynaud K, Tsikis G, Mermillod P, Druart X (2020). Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, volume 516.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720720302562>
 118. Sancler-Silva YFR, Ball BA, Esteller-Vico A, Silva-Júnior ER, Freitas-Dell'aqua CP, Papa FO (2018). Sperm Quality of Stallions Treated With Pentoxifylline After Scrotal Heat Stress. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 66.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080618302570>
 119. Sancler-Silva YFR, Monteiro GA, Ramires-Neto C, Freitas-Dell'aqua CP, Crespilho AM, Franco MMJ, et al (2020). Does semen quality change after local treatment of seminal vesiculitis in stallions? *Theriogenology*, volume 144, Pages 139-45.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X19305539>
 120. Santiago-Moreno J, Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, Delgadillo JA, López-Sebastián A (2017). Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. *Animal Reproduction Science*, volume 181, Pages 141-50.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432016307096>
 121. Sauer R, Jeyendra R, Coulam C (2010). Chromatin Intact Sperm Recovery is Higher after Glass Wool Column Filtration as Compared with the Density Gradient Centrifugation Procedure. *Fertility and Sterility*, volume 93, Page 21.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028210002396>
 122. Saylan A, Erimsah S (2019). High quality human sperm selection for IVF: A study on sperm chromatin condensation. *Acta Histochemica*, volume 121, Pages 798-803.

- Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128119300807>
123. Schneider DT, Feijó CM, Junior SV, Esteves SC (2014). Effectiveness of sperm washing by discontinuous density gradient centrifugation to remove antibodies bound to sperm membrane. *Fertility and Sterility*, volume 102, Pages 351-2.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028214018135#sec4>
 124. Schnobrich MR. Chapter 19 - Disorders of the Reproductive Tract. In: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC, éditeurs (2018). *Equine Internal Medicine (Fourth Edition)*. W.B. Saunders, Saint Louis. Pages 1217-364.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978032344329600019X>
 125. Sertac A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B (2000). A Comparison of Pure Sperm and Percoll Density Gradients for Sperm Separation in Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). *Fertility and Sterility*, volume 74, Page 218.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028200013674>
 126. Sheridan A, Medica A, Griffin R, Aitken RJ, Gibb Z (2020). Glycerophospholipids reduce oxidative stress on stallion sperm in vitro. *Animal Reproduction Science*, volume 220.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843202030302X>
 127. Shokrollahi E, Barati F, Gooraninejad S (2014). Efficacy of Histoprep® gradient for isolating ovine epididymal sperm. *Small Ruminant Research*, volume 119, Pages 96-9.
Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448814000650>
 128. Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R, et al (2003). Application of Techniques for Sperm Selection in Fresh and Frozen-Thawed Stallion Semen. *Reproduction in Domestic Animals*, volume 38, Pages 134-40.
Disponible sur : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1439-0531.2003.00416.x?casa_token=Ow13DDNaHXwAAAAA%3AL8xcD1H3CsEaUxbANgFh-cCkiI2O-D9qOzpwCTqHnDV42mkGieO_bALgrDLcX3IV-fgRn4l5_q8FKa8
 129. Sieme H. Chapter 6 - Semen Evaluation. In: Samper JC, éditeur (2009). *Equine Breeding Management and Artificial Insemination (Second Edition)*. Saint Louis: W.B. Saunders. Pages 57-74.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416052340000064>
 130. Sostaric E, Aalberts M, Gadella BM, Stout TAE (2008). The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, volume 107, Pages 237-48.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432008001401>
 131. Spinaci M, Merlo B, Love CC, Mislei B, Rizzato G, Giaretta E, et al (2014). Stallion semen quality after different pre-sorting treatments. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 34.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080613006783>
 132. Šterbenc N, Morrell JM, Kosec M, Rath D, Klein S, Klinc P (2019). Single layer colloid

- centrifugation technique improves motility, viability and chromatin integrity of ram spermatozoa after thawing. *Cryobiology*, volume 86, Pages 77-83.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224018301330>
133. Stoll et al (2010). Use of a single layer density centrifugation to reduce the number of DNA-damaged sperm and enhance sperm quality in cryopreserved-thawed stallion semen. *Animal Reproduction Science*, volume 121, Pages 163-4.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843201000120X>
134. Stoll A, Stewart BL, Brum AM, Liu IK, Ball BA (2008). Evaluation of cryopreserved-thawed stallion sperm before and after density gradient centrifugation with silane-coated silica particles (EquiPure®). *Theriogenology*, volume 73, Pages 590-1.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X08002409>
135. Stoll A, Love CC, Ball BA (2013). Use of a Single-Layer Density Centrifugation Method Enhances Sperm Quality in Cryopreserved–Thawed Equine Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 33, Pages 547-51.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080612005163#bib36>
136. Stuhtmann G, Oldenhof H, Peters P, Klewitz J, Martinsson G, Sieme H (2012). Iodixanol density gradient centrifugation for selecting stallion sperm for cold storage and cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, volume 133, Pages 184-90.
Disponible sur : <https://www-sciencedirect-com/science/article/pii/S0378432012001935>
137. Szumowski P, Stoeber M (1955). Sur les proteines du plasma séminal du cheval. *Annales de zootechnie*. Pages 165-71.
Disponible sur : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00886630/document>
138. Tibary A, Pearson LK, Fite CL. Chapter 8 - Reproductive Tract Infections. In: Sellon DC, Long MT, éditeurs (2014). *Equine Infectious Diseases (Second Edition)*. St. Louis: W.B. Saunders. Pages 84-106.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455708918000087>
139. Tibary A, Rodriguez J, C. Samper J. Chapter 10 - Microbiology and Diseases of Semen. In: Samper JC, éditeur (2009). *Equine Breeding Management and Artificial Insemination (Second Edition)*. Saint Louis: W.B. Saunders. Pages 99-112.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416052340000106>
140. Torabi F, Binduraimhem A, Miller D (2017). Sedimentation properties in density gradients correspond with levels of sperm DNA fragmentation, chromatin compaction and binding affinity to hyaluronic acid. *Reproductive BioMedicine Online*, volume 34, Pages 298-311.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648316306484>
141. Turner CE, Walbornn SR, Blanchard TL, Varner DD, Brinsko SP, LaCaze KA, et al (2016). The effect of two levels of hemospermia on stallion fertility. *Theriogenology*, volume 86, Pages 1399-402.

- Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16301273>
142. Turner JL, Arns MJ (1998). Effect of density gradient composition on in vitro maturation of stallion sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 18, Pages 260-5.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080698801433?via%3Dihub>
 143. Valcárcel A, de las Heras MA, Moses DF, Perez LJ, Baldassarre H (1996). Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, volume 41, Pages 215-24.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432095014535>
 144. Varner DD (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, volume 70, Pages 448-62.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X08002070>
 145. Varner DD, Blanchard TL, Brinsko SP, Love CC, Taylor TS, Johnson L (2000). Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. *Animal Reproduction Science*, volume 60-61, Pages 493-509.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432000001159>
 146. Varner DD. Chapter 155 - Low Sperm Count: Diagnosis and Management of Semen for Breeding. In: Sprayberry KA, Robinson NE, éditeurs (2015). *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine (Seventh Edition)*. St. Louis: W.B. Saunders. Pages 653-7.
Disponible sur :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455745555001552>
 147. Varner DD (2016). Approaches to Breeding Soundness Examination and Interpretation of Results. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 43, Pages 37-44.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080616301162>
 148. Varner DD (2016). Strategies for Processing Semen from Subfertile Stallions for Cooled Transport. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, volume 32, Pages 547-60.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073916300372>
 149. Varner DD, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Hartman DL, Bliss SB, et al (2008). Semen Processing for the Subfertile Stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, volume 28, Pages 677-85.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080608003420>
 150. Vaughan D, Sakkas D, Leader B, Tirado EE (2018). Density gradient outperforms swim-up when examining different sperm nuclear DNA integrity and membrane characteristics. *Fertility and Sterility*, volume 110, Page 345.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028218315541>
 151. Velez D, Ohlander S, Niederberger C (2021). Pyospermia: background and controversies. *F&S Reports*, volume 2, Pages 2-6.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666334121000015>

152. Viswambharan N, M. M (2021). Effect of wash and swim-up and density gradient sperm preparation on sperm DNA fragmentation. *Materials Today: Proceedings*, volume 45, Pages 2002-5.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221478532037139X>
153. Yang Q, Zhang N, Zhao F, Zhao W, Dai S, Liu J, et al (2015). Processing of semen by density gradient centrifugation selects spermatozoa with longer telomeres for assisted reproduction techniques. *Reproductive BioMedicine Online*, volume 31, Pages 44-50.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648315001467>
154. Yasine A, Ashenafi H, Geldhof P, Bekana M, Tola A, Van Brantegem L, et al (2019). Reduction of *Trypanosoma equiperdum* from equine semen by single layer centrifugation. *Experimental Parasitology*, volume 200, Pages 79-83.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489418303990>
155. Zhang Y, Huang R, Chen D, Xie B, Zhu W (2015). Hemospermia is not associated with the production of antisperm antibody. *Journal of Reproduction and Contraception*, volume 26, Pages 223-8.
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001784416300050>

UTILISATION D'UN GRADIENT DE DENSITE SUR LA SEMENCE D'ETALON LORS D'INFERTILITE

Auteur

PABIOU Margot

Résumé

La fertilité de l'étalon est une composante majeure dans l'élevage des chevaux. Pourtant celle-ci n'est que rarement intégrée dans le choix des étalons lors de la mise à la reproduction des juments. Certains propriétaires d'étalons de grande valeur économique peuvent susciter un intérêt à utiliser des méthodes afin d'améliorer la fertilité de leurs étalons. Différentes méthodes sont aujourd'hui disponibles. La centrifugation en gradient de densité en fait partie. Elle permet d'améliorer la viabilité, la motilité et l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes sélectionnés, mais aussi de purifier la semence et d'éliminer le plasma séminal de l'éjaculat. Elle permet ainsi d'améliorer la fertilité des étalons mais aussi la conservation de la semence. Toutefois, cette méthode peut parfois endommager les spermatozoïdes et son coût important peut aussi être un frein à son utilisation.

La première partie de cette thèse aborde les généralités de la reproduction des étalons. Ensuite, la deuxième partie développe l'utilisation de la centrifugation en gradient de densité sur la semence de différentes espèces. Enfin, la troisième partie montre l'intérêt de l'utilisation de cette méthode et ses limites sur la semence équine.

Mots-clés

Reproduction, Equin, Semence, Gradient de densité, Infertilité

Jury

Président du jury : Pr DORET-DION Muriel

Directeur de thèse : Dr LEFRANC POHL Anne-Cécile

1er assesseur : Dr LEFRANC POHL Anne-Cécile

2ème assesseur : Pr CADORE Jean-Luc