

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHESCIENTIFIQUE



جامعة ابن خلدون تيارت
UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET
معهد علوم البيطرة
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
قسم الصحة الحيوانية
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Vétérinaires

Présenté par : HADIDI Ikram

Evolution de la cryoconservation de la semence équine (étude bibliographique)

Jury :

Président : SAIM Mohamed Said

Encadrant (e) : AYAD Mohamed Amine

Examineur I : DERRAR Sofiane

Examineur II : HAMDY Mohamed

Grade:

Maitre de conférences A

Maitre de conférences A

Maitre de conférences A

Maitre de conférences B

Année universitaire :2021/2022

Dédicaces

A l'être le plus cher de ma vie, mon papa rabi yerhmou,

*A ma chère maman, pour tous ses sacrifices, son amour, sa
Tendresse, son soutien et ses prières tout au long de mes études.
Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

*A mes chers frères et sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur
Soutien moral*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire, et
a mes amis qui m'ont toujours encouragé, et a qui je souhaite plus de succès.*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le
fruit de votre soutien infaillible,*

Merci d'être toujours là pour moi.

Remerciements

*Tout d'abord je remercie **Dieu le tout puissant** de m'avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mr AYAD MOHAMED AMINE**, je le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

Je remercie également les membres de jury d'avoir accepté d'évaluation de ce modeste travail

*Je souhaite remercier tout particulièrement monsieur **SAIM Mohamed Said**, docteur en sciences vétérinaires pour avoir accepté d'être président du jury et d'être disponible pour la soutenance. Soyez assuré monsieur de ma profonde gratitude.*

*Mes remerciements vont également à monsieur **DERRAR Sofiane** pour avoir accepté de participer à ce jury et examinateur de thèse, Soyez assuré monsieur de ma profonde gratitude.*

*Mes remerciements vont également à monsieur **HAMDI Mohamed** pour avoir accepté d'être jury et examinateur de thèse, Soyez assuré monsieur de ma profonde gratitude.*

Mes remerciements à mes enseignants

الملخص

يعد حفظ الحيوانات المنوية بالتبريد أحد أهم الإجراءات في تطوير التقانات الحيوية للمساعدة على الإنجاب. في بعض حيوانات المزرعة ، يتمتع استخدام الحيوانات المنوية المحفوظة بالتبريد بالعديد من المزايا ، والتي أصبحت أهميتها أكثر وضوحًا في العقود الأخيرة. ومع ذلك ، تختلف قيم جودة الحيوانات المنوية بعد الذوبان بين الأنواع وداخل الأفراد من نفس النوع. لا توجد منهجية موحدة لكل مرحلة من مراحل إجراء الحفظ بالتبريد (فحص الذكورة ، جمع السائل المنوي ، التخفيف ، الطرد المركزي ، إعادة تعليق الحبيبات بوسط التجميد ، التكييف ، التجميد وتقييم الحيوانات المنوية بعد الذوبان) ، والتي أيضًا يساهم في الاختلافات بين الدراسات.

تم تقييم علامات التحمل البارد للحيوانات المنوية والبلازما المنوية (SP) للنتنبؤ بقدرة تجميد السائل المنوي. بالإضافة إلى ذلك ، في الأبحاث السابقة ، تم التركيز على استكمال وسائط الحفظ بالتبريد بمواد مختلفة ، مثل مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية. في معظم الدراسات ، أدى إدراج هذه المواد إلى تحسين جودة الحيوانات المنوية وقدرتها على الإخصاب بعد الذوبان عن طريق تقليل الآثار الضارة على بنية ووظيفة الحيوانات المنوية. نهج آخر هو استخدام عوامل الحماية من التجمد المختلفة. الهدف من مقالة المراجعة هذه هو مراجعة حفظ الحيوانات المنوية في الخيول أثناء تطورها بمرور الوقت.

الكلمات المفتاحية: الفحل- الحفظ بالتجميد- السائل المنوي- مضادات الأكسدة

Résumé

La cryoconservation du sperme est l'une des procédures les plus importantes dans le développement des biotechnologies pour la procréation assistée. Chez certains animaux de ferme, l'utilisation de sperme cryoconservé présente de nombreux avantages dont la pertinence est devenue plus évidente au cours des dernières décennies. Cependant, les valeurs de la qualité du sperme après décongélation varient d'une espèce à l'autre et chez les individus d'une même espèce. Il n'existe pas de méthodologie standardisée pour chacune des étapes de la procédure de cryoconservation (examen andrologique, recueil de la semence, dilution, centrifugation, remise en suspension du culot avec le milieu de congélation, conditionnement, congélation et évaluation du sperme après décongélation), ce qui contribue également aux différences parmi les études. Marqueurs de cryotolérance du sperme et du plasma séminal (SP) ont été évalués pour la prédiction de la capacité de congélation de l'éjaculat. De plus, dans des recherches antérieures, l'accent a été mis sur la supplémentation des milieux de cryoconservation avec différentes substances, telles que des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Dans la plupart des études, l'inclusion de ces substances a conduit à une amélioration de la qualité et de la capacité de fécondation du sperme après décongélation en minimisant les effets néfastes sur la structure et la fonction des spermatozoïdes. Une autre approche consiste à utiliser différents cryoprotecteurs. L'objectif de cet article de synthèse est de faire le point sur la cryoconservation du sperme chez le cheval en l'évolution de cette dernière dans le temps.

Mots clés : étalon- cryoconservation- semence - Antioxydants-

Abstract

Sperm cryopreservation is one of the most important procedures in the development of biotechnologies for assisted reproduction. In some farm animals, the use of cryopreserved sperm has many advantages, the relevance of which has become more apparent in recent decades. However, sperm quality values after thawing vary between species and within individuals of the same species. There is no standardized methodology for each of the stages of the cryopreservation procedure (andrological examination, collection of the semen, dilution, centrifugation, resuspension of the pellet with the freezing medium, conditioning, freezing and evaluation of the sperm after thawing), which also contributes to differences among studies. Sperm and seminal plasma (SP) cryotolerance markers were assessed for the prediction of ejaculate freezing ability. Additionally, in previous research, emphasis has been placed on supplementing cryopreservation media with different substances, such as enzymatic and non-enzymatic antioxidants. In most studies, the inclusion of these substances led to an improvement in the quality and fertilization capacity of sperm after thawing by minimizing adverse effects on sperm structure and function. Another approach is to use different cryoprotectants. The objective of this review article is to review sperm cryopreservation in horses as it evolves over time.

Key words: stallion- cryopreservation- semen- Antioxidants

Table des matières

Dédicaces	ii
Remerciements.....	iii
الملخص.....	iv
Résumé	v
Abstract	vi
Table des matières	vii
Liste des figures, tableaux.....	viii
Introduction.....	1
Chapitre : les Cryo protecteurs & cryoconservation de la semence équine	3
1. Histoire et présent de la cryoconservation de sperme équin	3
1. 1. Concepts généraux de la semence équine	4
1.1.2. Protocoles de congélation actuels pour la semence d'étalon.....	7
1.1.4. Particularités de la composition lipidique de la membrane plasmique du sperme équine.....	15
1.1.5. Stress oxydatif.....	16
1.1.6. Récupérateurs de ROS dans la semence équine	17
1.1.7. Génération de ROS par les spermatozoïdes	17
1.1.8. Vulnérabilité des spermatozoïdes au stress oxydatif	19
1.1.9. Prévention et gestion du stress oxydatif : effets de certains antioxydants sur la cryoconservation de la semence équine.....	20
2. Altérations structurelles suite à la cryoconservation du sperme	22
3. Altérations moléculaires dues à la cryoconservation du sperme	23
3. 1. Effets sur le pouvoir fertilisant.....	24
3. 2. Effets sur l'embryon.....	25
4. Équilibre redox et fonction mitochondriale.....	26
conclusion	28
Bibliographie	29

Liste des figures, tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Modifications putatives du sperme et de la charge pendant la congélation et la décongélation. Les effets de diverses vitesses de refroidissement sur la formation de cristaux de glace12

Figure 2 : Altérations structurelles et moléculaires du sperme de mammifère après cryoconservation . La congélation-décongélation diminue l'intégrité de la membrane plasmique et de l'acrosome , la motilité, l'activité métabolique et mitochondriale, et augmente la production de ROS. De plus, la cryoconservation augmente la fragmentation de l'ADN , peut affecter la signature de méthylation de l'ADN, conduit à la dégradation des ARNm et des miARN et induit des altérations de l'intégrité de la structure nucléoprotéique (complexes ADN/protamine et translocation de H1)..... 23

Introduction

L'utilisation du sperme d'étalons congelés pour l'insémination artificielle est en augmentation dans la filière équine. Cette technologie est d'une grande importance pour l'élevage équin, car elle permet le stockage et le transport à long terme de la semence (indépendamment du lieu et de la disponibilité des étalons), permet de conserver la semence d'animaux génétiquement supérieurs et permet le développement d'un programme d'élevage réussi, ainsi que de contrôler ou d'éradiquer les maladies vénériennes et autres maladies infectieuses.

Peut-être l'un des principaux avantages est la disponibilité de semence congelée est que les éleveurs peuvent plus facilement inséminer une jument au moment optimal de reproduction au lieu de dépendre de la disponibilité de semence d'étalon. En outre, la cryoconservation est une approche sûre pour stocker les gamètes, soutenant la conservation des biodiversité et protection des espèces menacées.

Malheureusement, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes d'étalons cryoconservés est généralement considérée comme inférieure à celle de certaines autres espèces domestiques, en particulier celle des bovins laitiers, ainsi qu'il existe une variabilité interindividuelle dans la cryoconservation de leur semence. La raison de cette réduction de la fertilité est probablement due au fait que les étalons sont sélectionnés pour leur record de performance, pedigree et caractéristiques de conformation, plutôt pour leur fertilité [1]. On suppose généralement que 40 à 50 % des spermatozoïdes ne survivent pas au processus de congélation et de décongélation [2]. Aussi, bien que le succès de la cryoconservation chez l'étalons est inférieur à celui des autres animaux de la ferme, il existe de faibles corrélations entre la motilité du sperme et la fertilité (35-40%), comme également observé chez d'autres espèces domestiques [3].

La technologie de cryoconservation est encore à un niveau de développement sous-optimal et cause d'importants dommages cryogéniques chimiques et physiques (létaux ou sublétaux) à l'intégrité structurelle, à la biochimie et à la biophysique des spermatozoïdes. Un certain nombre de facteurs liés à la cryo-lésion ont été caractérisés : transitions de phase dans le plasmalemme, stress oxydatif, changements de type apoptotique, changements de

type capacitation et stress mécanique sur les membranes cellulaires dû au stress osmotique et aux changements de température pendant le processus de congélation et décongélation, contribuant à la mort des spermatozoïdes ou, s'ils survivent, à leur pouvoir fécondant réduit [4 ; 5 ; 6]. Le succès de la cryoconservation de la semence d'étalon a été très variable. Plusieurs régimes de congélation différents avec de nouveaux protocoles et dilueurs ont été conçus et publiés pour améliorer la qualité de la semence équine après décongélation ; cependant, aucun protocole idéal pour tous les cas n'existe. La complexité de la biologie des spermatozoïdes est considérée comme un facteur important lors du développement d'améliorations dans la cryoconservation du sperme d'étalon. On peut supposer que l'altération de la fonction cellulaire résultant d'un choc dû au froid, d'un choc osmotique et d'un stress oxydatif est la principale source de sensibilité du sperme d'étalon aux procédures de congélation conventionnelles. Ainsi, afin d'obtenir des taux de survie accrus après la cryoconservation, les méthodes de cryoconservation doivent être améliorées. L'objectif de mémoire est de décrire les paramètres qui jouent un rôle important dans la cryopréservation de la semence équine.

Chapitre : les Cryo protecteurs & cryoconservation de la semence équine

1. Histoire et présent de la cryoconservation de sperme équin

Les premières cellules de mammifères à être cryopréservées avec succès ont été les spermatozoïdes à - 79 °C [7], démontrant les propriétés cryoprotectrices du glycérol. Et la première naissance d'un poulain d'une jument inséminée avec de la semence cryoconservée a eu lieu en 1957 [8]. Depuis, la cryoconservation des spermatozoïdes et son utilisation pour l'insémination artificielle ont pris une grande importance pour l'industrie de l'élevage équin; cependant, ce n'est pas encore une technologie établie.

L'un des défis pour ceux qui tentent de cryoconserver les spermatozoïdes d'étalons est de traiter avec la variabilité interindividuelle des étalons dans la cryosurvie de leur semence. Tel la variabilité est le plus souvent attribuée au fait que la plupart des étalons ont été sélectionnés pour leurs performances et leur phénotype, et non pour la qualité du sperme.

Les étalons ont montré un degré particulièrement élevé de variation individuelle en ce qui concerne la cryosurvie de leur sperme. Il a été estimé que 20 % des étalons produisent de la semence qui se congèle bien, 60 % congèlent de manière acceptable et 20 % gèlent mal. Des étalons qui sont de manière satisfaisante fertile dans des conditions de terrain normales peuvent produire du sperme qui, après congélation et décongélation, produit des taux de gestations très faibles [4]. Seuls 30 à 40 % des étalons produisent une semence constamment apte à la cryoconservation avec des résultats de gestation acceptables après IA, et une variation constante de la capacité de congélation du sperme a également été observée parmi les races [9; 10; 11].

capable d'appliquer des tests de la fonction du sperme avant et après la congélation qui correspondent bien à la congélation du sperme ou à la fertilité de l'étalon [12 ; 13]. Le processus de cryoconservation des spermatozoïdes provoque des dommages non létaux et altère la membrane plasmique des spermatozoïdes d'une manière qui, à certains moments, ressemble aux changements au cours de la capacitation des spermatozoïdes [24], en raison des effets néfastes du stress osmotique et oxydatif et des changements de température auxquels les spermatozoïdes sont exposés. au cours de ce processus [15]. En conséquence, la fertilité après insémination artificielle avec de la semence congelée est plus faible qu'avec de la semence fraîche chez la plupart des espèces, ce qui ne peut être que partiellement compensé par l'insémination d'un plus grand nombre de spermatozoïdes vivants [14].

1. 1. Concepts généraux de la semence équine

Les étalons sont un excellent exemple de la nature dépendante de l'espèce de la reproduction masculine. En général, les paramètres du sperme des étalons sont très différents de ceux des autres espèces de mammifères.

Cela commence par le processus de spermatogenèse (la création de spermatozoïdes de spermatogonium), qui prend en moyenne 60 journées. Ce processus aboutit à des spermatozoïdes qui ont généralement une morphologie différente, des motilités plus faibles et une coiffe acrosomique plus délicate que les autres espèces domestiquées.

De plus, la production de sperme chez l'étalon est influencée par la saisonnalité de la femelle. En regardant les paramètres individuels du sperme, les étalons produisent un éjaculat de 25mL à 60mL, beaucoup plus grand que celui des autres espèces.

Alors que la forme morphologique d'un spermatozoïde équin suit la même forme générale : calotte acrosomique en forme de croissant, tête arrondie, cou, pièce médiane, queue et embout, sa tête a tendance à être plus symétrique que les autres espèces domestiquées, ce qui la rend plus similaire au sperme humain.

De plus, contrairement à d'autres espèces domestiquées, les autres paramètres du sperme comprennent : le nombre, la motilité et la progression vers l'avant varient largement entre les étalons individuels, car les animaux sont sélectionnés davantage pour traits de performance ou préférences personnelles plutôt que reproductifs potentiel.

Enfin le dernier paramètre est la coiffe acrosomique, qui a trois classifications : intacte, partiellement intacte et non intacte ; le maintien de l'intégrité de cette membrane étant vital pour maintenir sa capacité fertilisante. En général, l'évaluation de la qualité du sperme inclut sa capacité fonctionnelle qui est déterminée par plusieurs facteurs [16].

De nombreuses études ont corrélé la morphologie et la motilité des spermatozoïdes frais avec leur fécondation aptitude.

Cependant, il existe des données qui démontrent que la motilité après décongélation du sperme d'étalon cryoconservé seul est un mauvais prédicteur de la fertilité de l'échantillon ; suggérant que la fertilité post--dégel des équidés le sperme peut être affecté par une variété de facteurs qui peuvent ou peut ne pas avoir d'impact sur la motilité de l'échantillon [16].

Un autre obstacle que possèdent les spermatozoïdes des étalons est une couche de plasma séminal, qui est fermement attaché et peut être retiré pendant capacité [17].

De plus, la motilité du sperme frais diffère grandement de celle du sperme congelé. Avec de la semence fraîche, on s'attend à des pourcentages beaucoup plus élevés puisqu'il n'y a pas de cryolésions superposées.

Alors qu'avec le surgelé l'industrie accepte 30%, puisqu'il doit y avoir responsabilité en cas de perte par cryoblessure.

Les chevaux sont généralement classés comme reproducteurs de longue journée, ce qui signifie qu'ils anticipent physiologiquement la saison des amours, qui, dans l'hémisphère nord, commence en février et peut se terminer jusqu'en septembre.

Il convient de noter que les étalons ne sont pas eux-mêmes considérés comme des reproducteurs saisonniers, mais il existe des différences saisonnières dans le sperme [16] et des différences claires dans les concentrations hormonales.

Les rythmes circannuels sont suggérés comme un facteur de différence observé dans la structure et l'intégrité fonctionnelle de l'acrosome et du plasma membranaire tout au long de l'année.

On pense que cela est dû aux changements hormonaux dans le plasma séminal, en particulier à la baisse de la testostérone sérique [18] ; qui provoquent une fluctuation de la composition du plasma séminal [16,19] et une diminution de la taille des testicules [18].

Cependant, des études convenant que la membrane des spermatozoïdes est compromise pendant la PC quelle que soit la saison [18], et que l'élimination du plasma séminal est vitale car il s'est avéré presque impossible de congeler la semence équine autrement [17].

Même si l'étalon n'est peut-être pas considéré comme saisonnier, un test complet des concentrations d'hormones sexuelles chez les animaux du nord hémisphère, a démontré de manière concluante un schéma clair de saisonnalité ; avec une hausse commençant en février, plafonnant en avril et mai, et chutant d'octobre à janvier [19], puis le cycle se répète.

Les différences hormonales peuvent entraîner des différences de morphologie, réactivité acrosomique, ainsi que des pourcentages de motilité [16] chez animaux individuels, mais les effets ne sont pas universels.

Grande variation hormonale et morphologique parmi les étalons ainsi qu'au sein des étalons [18] a été montré. Par exemple, une étude récente en Suisse a suggéré qu'il n'est pas une différence morphologique entre les saisons [18].

Spermatozoïdes normaux avec des pourcentages morphologiques appropriés impliquent qu'il y a plus de vitalité et de stabilité.

Cependant, une autre étude a démontré que les spermatozoïdes congelés subissent des réactions acrosomiques spontanées plus élevées pendant l'hiver [16].

Pensées initiales que la saison de reproduction était révélatrice d'une augmentation de la production de spermatozoïdes et des concentrations de gonadotrophines, l'estostérone et les œstrogènes [19], mais des découvertes récentes ont montré que seuls les paramètres séminaux ont un effet sur la motilité.

Cette connaissance a conduit à la supposition que la germination testiculaire les fonctions sont plus affectées par le système endocrinien que par saisons [19] qui serait en corrélation avec les conditions sous-optimales en dehors de la saison de reproduction entraînant une modification de la qualité du sperme[16].

L'année 1957 a été déterminante pour la CP de semence équine, en tant que Canadiens, Barker et Gandier ont rapporté le premier poulinage avec de l'épididyme congelé spermatozoïdes [17], démontrant que l'utilisation de la technique était possible chez le cheval.

Cependant, ce succès précoce n'a pas conduit à une utilisation généralisée de la technique comme elle l'a fait dans d'autres industries, en raison de la nature unique de semence équine.

En fin de compte, non seulement la spécificité de l'espèce jouera un grand rôle, mais la composition chimique corporelle de chaque individu peut avoir un impact le processus aussi.

La semence équine cryoconservée fait face à des différences dans au moins deux domaines : les composants physiologiques et biochimiques des spermatozoïdes eux-mêmes, et les variations de l'anatomie et de la physiologie des spermatozoïdes transport dans les voies génitales féminines [20].

Actuellement, les étalons ne correspondent généralement pas aux protocoles des programmes de congélation en raison de la qualité insatisfaisante du sperme après décongélation et des taux de fertilité [21].

Les différences quantitatives observées dans le nombre requis de spermatozoïdes nécessaires à l'insémination entre les espèces sont un élément très important lorsque l'on examine la fertilité potentielle du sperme cryoconservé [20], et s'il y a un plus grand nombre de spermatozoïdes nécessaires à l'insémination, cela signifie qu'il peut y avoir moins tolérance aux mauvais congélateurs [20] et faibles taux de survie.

Chez le cheval, le nombre de spermatozoïdes viables acceptés pour l'insémination est plus individu-dépendant que chez les autres espèces [20]. Des études ont constamment montré que les spermatozoïdes CP manquaient de motilité, de viabilité et de membranes intactes par rapport à ceux du sperme frais [18]. Par conséquent, chez le cheval, le développement de procédures de congélation réussies impliquera plus que l'identification ou l'application de nouveaux CPO et additifs [20].

La motilité reste un critère majeur utilisé pour déterminer le succès ou l'échec d'une nouvelle procédure de congélation [17], mais cela est contradictoire puisque la motilité n'est pas corrélée positivement avec la fertilité future de l'échantillon. Au contraire, la définition classique d'un « spermatozoïde conservé avec succès » exige qu'il ait la capacité de féconder un ovocyte et de produire un embryon viable via l'IA [17].

Selon cette définition, les spermatozoïdes congelés/décongelés doivent pouvoir subir une capacitation, l'activation des enzymes dans la coiffe acrosomique (pendant qu'ils se trouvent dans le tractus féminin), ce qui permet au spermatozoïde de pénétrer à travers la zone pellucide et de féconder l'ovocyte. Le sperme d'étalon cryoconservé présente un degré élevé de variabilité mâle--mâle en ce qui concerne la viabilité cellulaire après décongélation [21].

Afin de classer de manière adéquate la qualité de la semence congelée, il faut comprendre la classification relative d'un congélateur « bon » ou « mauvais ». Ces concepts sont basés sur les caractéristiques de motilité après décongélation, y compris les pourcentages de spermatozoïdes progressivement mobiles et le taux de vitesse [21]. Tischner a prouvé que seulement 20 % environ des étalons présentent une « bonne » capacité de congélation du sperme avec des paramètres de plus de 40 % de spermatozoïdes à motilité progressive après décongélation [21, 22]. Étalons de congélation "passable" après décongélation avec une motilité de 60 % et une plage de motilité progressive de 20 à 40 % [21, 22]. Le sperme de « mauvaise » qualité a une survie < 20 %, avec un taux de motilité progressive après décongélation inférieur à 20 % [21, 22].

1.1.2. Protocoles de congélation actuels pour la semence d'étalon

Les protocoles actuels de congélation de la semence d'étalons et les instructions d'insémination des juments avec de la semence congelée-décongelée sont loin d'être normalisées en comparant les protocoles de différents pays (pour revue [16]). Les méthodes de congélation de la semence d'étalon impliquent une procédure de dilution en deux étapes dans laquelle la semence est d'abord diluée avec un diluant primaire, centrifugée puis diluée une seconde fois avant d'être congelée dans un diluant contenant un cryoprotecteur. Afin d'obtenir une meilleure qualité de sperme d'étalon après

décongélation, la cryoconservation doit se faire en dehors de la saison de reproduction [17]. Les haras doivent prendre en considération de nombreuses questions pratiques (par exemple, le repos sexuel, les caractéristiques individuelles des étalons et les conditions d'hygiène) qui précèdent la campagne de congélation. Après un long repos sexuel, les réserves de sperme extragonadiques doivent être épuisées par des collectes répétées jusqu'à ce qu'une bonne qualité de sperme soit établie. Pour la préparation de la semence congelée, il serait préférable de faire en sorte que l'intervalle de collecte de la semence soit d'au moins 48 h, bien que cela doive être adapté à chaque étalon [18]. Le prélèvement de sperme doit être réalisé selon une technique adaptée (type vagin artificiel,

Par conséquent, la motilité du sperme après décongélation et les taux de gestation peuvent varier considérablement d'un étalon à l'autre. Les mécanismes sous-jacents aux différences de cryosensibilité entre les différents individus doivent encore être élucidés. Ces différences pourraient être d'origine génétique, et la

la sélection génétique des étalons pour une congélation réussie pourrait être une possibilité. D'autre part, la différence pourrait être non génétique et à cet égard il serait particulièrement souhaitable d'être lubrifiant, collector) and a fixed time interval between collections to minimize intra-individual differences between ejaculates.

After semen collection, the gelatinous portion is removed by filtration, and then the semen is diluted and centrifuged to remove the seminal plasma. The first dilution employs either saline/sugar or skim milk extenders used to dilute fresh semen in a rate 1:1 or the semen is diluted to a concentration of ≈ 50 million spermatozoa per ml [4]. The success of centrifugation depends on duration (10–15 minutes) and force ($350\text{--}700 \times g$) [19]. To increase sperm recovery, the use of high-speed/time centrifugation (20 minutes, $1000 \times g$) through a liquid cushion has been introduced into laboratory practice [20], with no detrimental effect on fertility [21]. Regarding seminal plasma, Moore et al [22] demonstrated their deleterious effect on stallion spermatozoa during cryopreservation; however, retention of 5–20% of seminal plasma in the suspension after centrifugation has been considered to be essential for cryosurvival [23].

Most cells are lethally damaged during the freezing and warming processes of cryopreservation in the absence of protective agents. Therefore, in order to minimize damage due to freezing and thawing, cryoprotective agents are added to the extender in which sperm are cryopreserved. Freezing extenders used for cryopreservation of stallion sperm typically include skim milk, egg yolk and glycerol as cryoprotective agents. Cryoprotectants play a role in affecting ice formation, minimizing exposure to

osmotic stress, preserving biomolecular and cellular structures, and limiting the damaging reactions of reactive oxygen species [15; 24; 25]. The effectiveness of a given cryoprotective agent for a given cell type usually depends on the permeability of the cell membrane for the solute and the toxicity of the solute [14].

Glycerol has been the major penetrating cryoprotectant routinely used to freeze stallion semen at a concentration of 2.5-5% [26]. In the presence of this cryoprotectant, the point où la concentration totale de soluté (glycérol et autres solutés) devient suffisamment élevée

pour arrêter la formation de glace, est atteint à une concentration en sel plus faible qu'en l'absence de cryoprotecteur. Par conséquent, la taille de la fraction non congelée sera plus grande et le degré de rétrécissement des cellules sera limité [27]. Le glycérol est un agent cryoprotecteur qui peut traverser membranes cellulaires. Le glycérol et l'eau peuvent interagir l'un avec l'autre via une liaison hydrogène interactions [28], ce qui a pour effet d'abaisser la température à laquelle se produit la formation de glace.

Cela facilite un temps plus long pour que la cellule réponde osmotiquement. De plus, le glycérol est décrit pour former des liaisons hydrogène avec les groupes de tête phospholipidiques membranaires lors élimination de l'eau, censée stabiliser les membranes [29]. Le gel bien tassé phase qui se forme lors de la formation de glace extracellulaire indique cependant que les cryoprotecteurs ne remplacent pas les molécules d'eau interagissant avec les têtes phospholipidiques ni ne facilitent le piégeage de l'eau autour des têtes phospholipidiques à l'état congelé [30 ; 31]. Il a été rapporté que d'autres cryoprotecteurs tels que le diméthylsulfoxyde, l'éthylène glycol, le méthylformamide ou le diméthylformamide, peuvent donner des résultats similaires voire supérieurs [9 ; 26]. Le jaune d'oeufs frais de poulet ou de canard à une concentration de 10 à 20% v: v est resté la source préférée de protéines dans le mélange de congélation. Des sucres (généralement une combinaison de fructose et de glucose, alternativement du raffinose ou du tréhalose) sont souvent ajoutés aux milieux qui agissent comme des cryoprotecteurs non pénétrants [26].

Les prolongateurs de congélation pour le sperme ont plusieurs fonctions. Ils doivent protéger les spermatozoïdes de tout dommage qui pourrait diminuer la capacité fécondante des spermatozoïdes. Ils peuvent avoir besoin de fournir de l'énergie pour le métabolisme des cellules. Enfin, il augmente le volume total d'une dose de sperme à un niveau utilisable et pratique [14]. De plus, la composition du prolongateur de congélation peut influencer la durée de la phase de refroidissement nécessaire avant la congélation. Les comparaisons entre les prolongateurs de congélation des étalons sont mal

documentées [32]. Il a également été rapporté que le prolongateur de sperme le plus efficace pour un étalon n'est pas nécessairement le plus efficace pour un autre [16].

Une grande variété d'extendeurs associant divers composants (sucres, électrolytes, tampons, jaune d'œuf, lait et produits laitiers), ont été proposés et utilisés pour allonger le sperme [32 ; 34–37].

Les micelles de caséine et le lactose ont été décrits comme des composants protecteurs du lait, agissant de la même manière que les protéines liant les lipides [38]. Le lait et les diluants à base de lait sont connus pour être pratiques et efficaces pour protéger les spermatozoïdes. Le jaune d'œuf contient des lipoprotéines de basse densité

qui sont décrits comme responsables de l'action cryoprotectrice du jaune d'œuf. Ces protéines peuvent séquestrer les protéines de liaison aux lipides présentes dans le plasma séminal pour empêcher l'efflux de cholestérol et de phospholipides et la déstabilisation consécutive de la membrane du sperme [38]. De plus, le jaune d'œuf est décrit comme ayant des propriétés de piégeage des radicaux libres [39].

Ensuite, la semence centrifugée et étendue est couramment conditionnée pour être congelée dans des pailles françaises de 0,5 mL, refroidies à 4°C avant d'être congelées dans de la vapeur d'azote liquide en suspendant le rack de pailles pré-remplies à quelques centimètres au-dessus de l'azote liquide dans un congélateur spécialement adapté. bain, ou dans une machine de congélation automatisée contrôlée par ordinateur [37]. Selon la méthode de traitement et de stockage, plusieurs auteurs [40–42] ont rapporté que la congélation optimale le débit pour la semence d'étalon peut varier entre 20 °C et 100 °C/min.

Certaines méthodes alternatives telles que la technique de congélation unique (UFT) [43 ; 44], congélateurs ultra-basse température [45], technologie « Multi-Thermal-Gradient » (MTG) [46 ; 47] ont également été utilisés et ont montré des résultats comparables à ceux de la méthodologie conventionnelle à base d'azote liquide.

Dans la congélation directionnelle, après une étape initiale d'ensemencement, l'échantillon de sperme est avancé à une vitesse constante à travers un gradient de température linéaire. De cette manière, la propagation des cristaux de glace peut être contrôlée afin d'optimiser la morphologie des cristaux, d'obtenir un ensemencement continu et une vitesse de refroidissement homogène tout au long du processus de congélation [46 ; 47]. Ces techniques peuvent convenir pour remplacer la méthode traditionnelle.

Par la suite, les pailles sont stockées dans de l'azote liquide (- 196°C) pour être décongelées au moment de l'insémination de la jument. Le sperme congelé-décongelé doit survivre aux rigueurs du

gel processus décongelé et répondre aux exigences de la fertilisation. En pratique, la filière équine utilise 2 principaux taux de décongélation. Le taux de décongélation le plus populaire, 37 °C pendant 30 secondes, provient des premières études sur les bovins et est utilisé par les éleveurs de chevaux et les chercheurs. Le taux de décongélation de 75 °C pendant 7 secondes suivi d'une immersion à court terme dans un bain-marie à 37 °C a suscité un intérêt et a été noté pour améliorer la motilité, la viabilité et la capacitation prématurée des spermatozoïdes, mais n'est pas encore souvent pratiqué [48].

1.1.3. Déterminants cryobiologiques de la fonction spermatique équine

Pour un protocole de congélation/décongélation réussi, la cryoconservation des spermatozoïdes équins doit être effectuée dans certaines conditions physiques et biologiques, car : (1) les spermatozoïdes doivent être congelés de manière à ce que peu ou pas de leur eau gèle de manière intracellulaire et ils doivent être réchauffés de telle manière que toute eau intracellulaire non gelée reste non gelée pendant le réchauffement ; (2) la plupart des spermatozoïdes ne survivront que si des concentrations substantielles d'agents cryoprotecteurs sont présentes et que le soluté s'infiltré. Ces agents cryoprotecteurs doivent être introduits avant congélation et retirés après décongélation de manière à ne pas dépasser les limites osmotiquement tolérables. Leurs concentrations ne doivent pas être toxiques [14 ; 49].

Bien que ces limites générales soient nécessaires, elles peuvent ne pas être suffisantes pour une ou plusieurs raisons possibles. La première est que les cellules peuvent être lésées par des facteurs tels que le choc dû au froid qui n'ont rien à voir avec la formation de glace ou les dommages causés par les agents cryoprotecteurs. Une autre raison est que les limites de viabilité cellulaire sont définies principalement en termes de membrane plasmique intacte qui conserve des propriétés normales et semi-perméables. Il est possible que les conditions qui permettent à la membrane plasmique de « survivre » ne permettent pas la « survie » d'organites critiques tels que l'acrosome ou le système mitochondrial-axonémique responsable de la motilité [50].

La cryoconservation nécessite une exposition des spermatozoïdes à des variations extrêmes de température et d'osmolalité. La survie après décongélation des spermatozoïdes cryoconservés présente un maximum à une vitesse de refroidissement optimale présumée, et la vitesse de refroidissement optimale dépend également de la vitesse de réchauffement, les vitesses optimales étant vraisemblablement dues aux propriétés de perméabilité des spermatozoïdes. Les taux de refroidissement et de réchauffement optimaux peuvent également dépendre de manière significative

de l'additif cryoprotecteur spécifique et de la solution tampon dans laquelle les spermatozoïdes sont cryoconservés [51].

Le défi majeur que doivent subir les spermatozoïdes est la létalité d'une zone de température intermédiaire (entre le point de congélation et jusqu'à -60°C) que les cellules doivent traverser deux fois : une fois lors du refroidissement et une fois lors du réchauffement, plutôt que leur capacité à tolérer le stockage à basse température [52]. Les principaux événements physiques survenant dans le sperme équin lors de la congélation sont représentés schématiquement présentés à la figure 1.

Lorsque le sperme est refroidi en dessous du point de congélation du diluant, il reste exempt de glace à des températures sensiblement inférieures au point de congélation. C'est ce qu'on appelle la « surfusion ».

Selon le mode d'emballage du sperme, la nucléation spontanée de la glace se produira dans la plupart des cas entre -5 et ~-15 °C. Pour éviter une surfusion importante, la nucléation de la glace peut être induite (par exemple en touchant le paquet de sperme avec une tige métallique très froide). La glace va

se former alors dans le prolongateur externe mais le contenu des cellules reste non congelé et surfondu, probablement parce que la membrane plasmique bloque la croissance des cristaux de glace dans le cytoplasme [53]. La croissance extracellulaire de la glace entraîne une augmentation rapide de la concentration de soluté extracellulaire et une diminution correspondante de la "concentration" de l'eau.

En conséquence, l'eau s'écoule des cellules par osmose et gèle à l'extérieur.

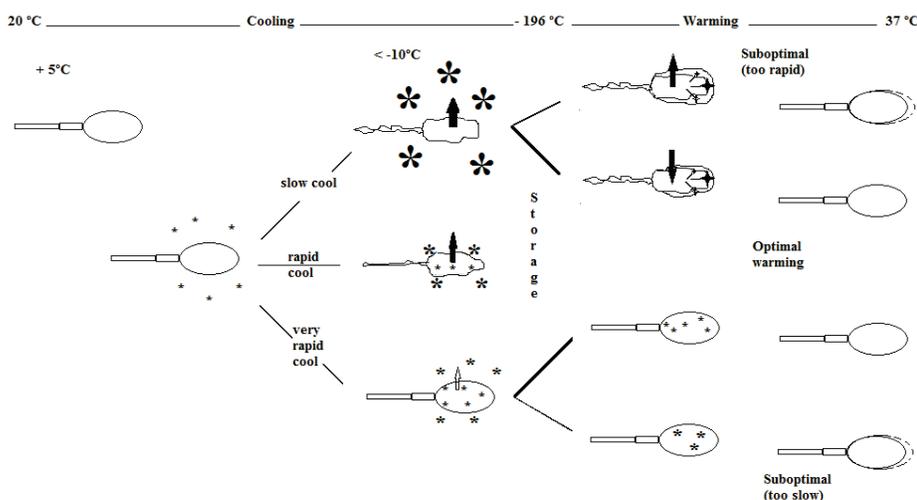


Figure 1.1 : Modifications putatives du sperme et de la charge pendant la congélation et la décongélation. Les effets de diverses vitesses de refroidissement sur la formation de cristaux de glace

et de microcristaux et le mouvement des solvants et des solutés pénétrants (flèches lourdes ou légères) et illustrés. Après une formation de refroidissement initiale de microcristaux extracellulaires à environ -5°C , le refroidissement à vitesse variable affecte à la fois la vitesse de déplacement de l'eau hors de la cellule et l'étendue de la formation de glace intracellulaire. Ainsi, lorsque le sperme arrive à -196°C , les milieux intracellulaire et extracellulaire diffèrent selon la vitesse de congélation. Des dommages peuvent survenir si le taux de décongélation choisi est inapproprié. Les valeurs extrêmes sont illustrées : en haut à droite, où une décongélation excessive entraîne des taux déséquilibrés d'efflux de cryoprotecteur et d'afflux d'eau, et en bas à droite, où une décongélation lente entraîne une recristallisation de microcristaux d'eau intracellulaire et des dommages résultants aux organites cellulaires (adapté de [14]).

Les événements physiques ultérieurs dans les cellules dépendent de la vitesse de refroidissement. Si la congélation progresse à un rythme très lent, la déshydratation se déroulera sur une période de temps plus longue, entraînant un degré élevé de rétrécissement, une déshydratation extrême du cytoplasme associée à une perturbation cellulaire mortelle [54]. De plus, à de faibles vitesses de refroidissement, les cellules peuvent être endommagées par une longue exposition à la concentration élevée de soluté de la solution extracellulaire avant d'atteindre des températures auxquelles les cellules se stabilisent finalement à l'état vitreux. Néanmoins, la vitesse de refroidissement doit être suffisamment lente pour permettre à l'eau de sortir des cellules par osmose en quantité suffisante. Si le refroidissement est suffisamment lent, les spermatozoïdes perdront de l'eau suffisamment rapidement pour concentrer suffisamment la solution intracellulaire pour éliminer la surfusion. En conséquence, les cellules ne gèlent pas intracellulaire. Si la congélation progresse à des vitesses de refroidissement rapides, l'eau n'est pas perdue assez rapidement pour maintenir l'équilibre; les cellules deviennent de plus en plus surfondues, ce qui augmente la probabilité de formation de nucléation de glace intracellulaire. Cependant, aucune preuve directe de glace intracellulaire n'a été observée dans le processus de cryoconservation du sperme d'étalon. Dans l'étude développée par Morris et al [55], il a été conclu que les dommages cellulaires aux spermatozoïdes équins, à des vitesses de refroidissement allant jusqu'à $3000^{\circ}\text{C} / \text{min}$, n'est pas causée par la formation de glace intracellulaire, mais les cellules sont soumises à un choc osmotique lorsqu'elles sont décongelées. Les différences observées dans les mesures de viabilité et de motilité suggèrent que différents mécanismes de lésion cellulaire peuvent se produire à des vitesses de refroidissement

« lente » et « rapide ». La décongélation du sperme doit généralement être effectuée à un rythme très rapide pour réduire le risque de dommages dus à la croissance extracellulaire des cristaux de glace [56].

Par conséquent, des taux de refroidissement trop élevés ou trop faibles peuvent tuer les cellules, bien que les mécanismes sous-jacents aux dommages cellulaires soient différents. Sur cette base, un taux de refroidissement optimal pour la cryosurvie cellulaire devrait exister entre les taux "élevé" et "faible". Le fait qu'un taux de refroidissement connu soit trop "élevé" ou "faible" pour un type de cellule donné dépend de la capacité de l'eau à traverser la membrane cellulaire [14]. Lors de la congélation et de la formation des cristaux de glace, les spermatozoïdes sont exposés à des contraintes mécaniques ainsi qu'à des défis osmotiques [15; 24; 56]. Avec des vitesses de refroidissement lentes, de la glace extracellulaire se forme, ce qui entraîne une augmentation de la concentration de soluté dans la fraction d'eau non congelée, ce qui expose les spermatozoïdes à des conditions hypertoniques. Afin de maintenir l'équilibre entre les concentrations de soluté intra- et extracellulaire, les spermatozoïdes réagissent par le mouvement de l'eau hors de la cellule. Lors de la décongélation et de l'insertion dans l'appareil reproducteur féminin, le processus inverse a lieu et les spermatozoïdes sont exposés à des conditions hypotoniques. Lorsque la vitesse de refroidissement est trop rapide, il n'y a pas assez de temps pour que l'eau quitte la cellule et la glace intracellulaire est formée, ce qui est préjudiciable aux cellules. Ainsi, la cryosurvie des spermatozoïdes dépend de la vitesse de refroidissement utilisée : à des vitesses de refroidissement élevées, les pertes de survie cellulaire sont associées à la formation de glace intracellulaire, alors qu'à des vitesses de refroidissement lentes, la déshydratation cellulaire prévaut et les dommages sont attribués à des « blessures d'effets de solution ». Au taux de refroidissement optimal, les dommages dus à la formation de glace intracellulaire et à la déshydratation cellulaire sont minimes et la survie cellulaire après décongélation est maximale [56]. Cependant, Morris et al [57] n'ont observé aucune preuve de formation de glace intracellulaire dans le sperme à des vitesses de refroidissement rapides. Ils ont conclu que lors d'un refroidissement rapide, une matrice vitreuse se forme dans laquelle les spermatozoïdes ainsi que les cristaux de glace sont intégrés.

1.1.4. Particularités de la composition lipidique de la membrane plasmique du sperme équin

De nombreux aspects de la cryoconservation de la semence des étalons sont encore restés empiriques et relativement peu d'informations sont disponibles sur les contraintes cryobiologiques et biophysiques de base imposées lors des processus de congélation et de décongélation.

Premièrement, la membrane plasmique des spermatozoïdes n'est pas une simple barrière semi-perméable. C'est une structure dynamique complexe composée de lipides et de phospholipides distribués en bicouche par l'activité métabolique. Dans la membrane se trouvent des protéines et des glycoprotéines intégrées avec accès à l'environnement extérieur, ainsi qu'à l'intérieur. Une classe de ces protéines, les aquaporines, est impliquée dans le transport de l'eau. Autres fonctions en tant que canaux ioniques avec spécificité pour des espèces ioniques particulières ; certains des canaux sont des pompes nécessitant de l'énergie qui transportent les ions contre des gradients de concentration. La structure physique et chimique de la membrane plasmique et son activité métabolique associée sont complexes et affectées par la température : les changements dans la structure moléculaire à des températures plus profondes modifieront le transport du soluté et de l'eau à travers les pores et les canaux. Les modifications de la mobilité et de la distribution des lipides affecteront la diffusion à travers la bicouche lipidique [58].

Deuxièmement, la membrane plasmique des spermatozoïdes joue un rôle très actif dans la fécondation des spermatozoïdes et dans le dialogue spermatozoïde-ovocyte. La fluidité de la membrane spermatique est une condition préalable aux fonctions cellulaires normales, et la fluidité et la flexibilité des membranes spermatiques dépendent principalement de leur composition lipidique [59]. Il existe des variations considérables dans la composition lipidique de la membrane plasmique du sperme chez différentes espèces de mammifères. Dans le sperme des étalons, il y a une teneur relativement élevée en cholestérol (37 % des lipides totaux), par rapport à la membrane du sperme des verrats (24 %) [60 ; 61]. Les lipides du sperme jouent un rôle majeur dans les caractéristiques de mouvement, la sensibilité au choc froid et la capacité de fécondation des spermatozoïdes. Il est important de noter que la distribution des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI) dans le sperme des étalons est plus similaire à celle des verrats que celle des taureaux. Les taureaux produisent des spermatozoïdes plus résistants au choc froid et se congèlent bien, alors que les spermatozoïdes des verrats et des étalons ont une très faible tolérance au choc froid et, en général, se congèlent mal. Le sperme des taureaux a des niveaux plus élevés d'acides gras docosahexanoïques (22:6), tandis que le sperme des étalons et

des verrats a des niveaux beaucoup plus élevés d'acides gras docosapentanoïques (22:5) [61; 62]. La variation de la fluidité de la membrane pourrait être une explication de la variabilité de la capacité de congélation du sperme observée entre les étalons individuels. La principale variable est la quantité de cholestérol dans la membrane plasmique du sperme entre différents mâles et même entre différents éjaculats d'un même mâle.

De plus, la teneur en cholestérol semble être liée au taux de capacitation, peut-être parce que le cholestérol doit être épuisé de la membrane plasmique au cours de ce processus [60]. La membrane plasmique du sperme sert de principale barrière physique à l'environnement extérieur et est le principal site de dommages après décongélation. Ces dommages comprennent la déstabilisation de la membrane due au réarrangement lipidique latéral, la perte de lipides de la membrane et peroxydation des lipides membranaires (LPO), résultant de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [63].

1.1.5. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme le déséquilibre entre la manifestation systémique des ROS et la capacité d'un système biologique à détoxifier facilement les intermédiaires réactifs ou à réparer les dommages qui en résultent. Dans un corps sain, les pro-oxydants et les antioxydants restent en équilibre. Les spermatozoïdes sont équipés de mécanismes de défense antioxydants et sont susceptibles d'éteindre les ROS, protégeant ainsi les cellules gonadiques et les spermatozoïdes matures des dommages oxydatifs. Cependant, dans des conditions pathologiques, la production incontrôlée de ROS dépasse la capacité antioxydante du plasma séminal entraînant un stress oxydatif [64]. La génération de ROS peut se produire comme une conséquence normale du métabolisme oxydatif ou peut résulter de mécanismes spécifiques au sein de types cellulaires particuliers, tels que l'explosion oxydative des leucocytes. Ce déséquilibre peut entraîner des dommages à la structure des cellules et des macromolécules telles que les composants de la membrane plasmique, les protéines et l'ADN [65].

Les spermatozoïdes ont été le premier type de cellule signalé à montrer une sensibilité potentielle au stress oxydatif. Dans certaines situations, les dommages causés par les oxydants peuvent être réparés. Malheureusement, les spermatozoïdes sont incapables de réparer les dommages induits par le stress oxydatif car ils ne disposent pas des systèmes de réparation enzymatiques cytoplasmiques nécessaires. C'est l'une des caractéristiques qui rendent les spermatozoïdes uniques dans leur sensibilité à l'insulte oxydative [66]. Cela est principalement dû au fait que leurs membranes cellulaires

sont riches en AGPI, ce qui les rend très sensibles aux dommages induits par l'oxygène et, par conséquent, à la LPO. Par la suite, une perte rapide d'adénosine triphosphate (ATP) intracellulaire à partir de la LPO provoque des lésions axonémiques, une diminution la viabilité des spermatozoïdes et l'augmentation des défauts morphologiques des spermatozoïdes à mi-pièce, qui contribuent tous à une diminution de la motilité des spermatozoïdes [64 ; 66].

La sensibilité des spermatozoïdes équins aux dommages oxydatifs est attribuée aux différences individuelles dans la composition en acides gras de la membrane spermatique des spermatozoïdes d'étalon (dépend de la proportion de saturés (par exemple C16: 0 palmitique, C18: 0 stéarique et C20: 0 arachidique) et AGPI dans les phospholipides de la membrane spermatique), qui sont sensibles à la LPO et, en outre, au déficit inné des spermatozoïdes en ce qui concerne la disponibilité des enzymes protectrices cytoplasmiques [61]. Les effets du stress oxydatif sont particulièrement importants lors de la cryoconservation du sperme, car une grande partie de la capacité antioxydante du sperme réside dans le plasma séminal, et celle-ci est éliminée lors du processus de congélation [65].

1.1.6. Récupérateurs de ROS dans la semence équine

Les principaux piègeurs de ROS décrits dans le sperme sont la catalase, la superoxyde dismutase et le système glutathion-peroxydase-réductase [67]. Selon Ball [65], les spermatozoïdes semblent contenir des quantités très limitées de piègeurs de ROS, tandis que le plasma séminal est une source puissante de piègeurs de ROS dont les fonctions sont de protéger le sperme éjaculé des effets indésirables des ROS. En plus des piègeurs d'enzymes, un certain nombre d'autres composants du plasma séminal sont susceptibles de contrecarrer le stress oxydatif et peuvent agir comme antioxydants. Ces les antioxydants de faible poids moléculaire sont l'albumine, l'urate, la taurine, l'hypotaurine, le pyruvate, le lactate, l'acide ascorbique, le tocophérol et l'ergothioniène. Cependant, l'élimination du plasma séminal pendant le processus de cryoconservation du sperme d'étalon peut augmenter la sensibilité du sperme au stress oxydatif, car une grande partie de la capacité antioxydante (capteurs d'enzymes et antioxydants) du sperme réside dans le plasma séminal.

1.1.7. Génération de ROS par les spermatozoïdes

Les ROS, également connus sous le nom de radicaux libres, ont au moins un électron non apparié. Ce sont des agents oxydants générés en tant que sous-produits du métabolisme de l'oxygène et, en raison de l'électron non apparié dans la coque externe, ils forment des molécules hautement réactives. Les ROS représentent une collection d'une large gamme de radicaux (par exemple, l'ion hydroxyle

[OH⁻], l'ion superoxyde [O₂⁻], l'oxyde nitrique [NO], le peroxyde [RO₂], le peroxyde lipidique [LOO] et le thiyle [RS⁻]) et des molécules non radicalaires (oxygène singulet [⁻¹O₂], peroxyde d'hydrogène [H₂O₂], acide hypochlorique [HOCL], peroxyde lipidique [LOOH] et ozone [O₃]) [66]. La recherche a montré que les ROS provoquent une fuite d'électrons des spermatozoïdes respirant activement, médiée par les activités redox intracellulaires. Le mécanisme de production de ROS par les spermatozoïdes n'est pas encore clair. Il semble provenir soit d'une nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase spécifique du sperme (NADPH oxydase) (NOX5) présente dans la membrane plasmique de la tête du sperme, soit des mitochondries du sperme [68; 69]. La génération de ROS dans les spermatozoïdes peut se produire via deux méthodes : (1) le système NADPH oxydase au niveau de la membrane plasmique du sperme et/ou (2) la nicotinamide adénine dinucléotide oxydoréductase dépendante réaction au niveau mitochondrial. Ce dernier mécanisme semble être la principale source de ROS. Les spermatozoïdes sont riches en mitochondries car un apport constant d'énergie est nécessaire à leur motilité [66]. Par conséquent, la présence de spermatozoïdes dysfonctionnels dans le sperme augmente considérablement la production de ROS, ce qui affecte à son tour sa fonction mitochondriale et, par la suite, la fonction des spermatozoïdes telle que la motilité. La génération de ROS est significativement augmentée en présence de cryolésions, de spermatozoïdes non viables ou morphologiquement anormaux, en particulier de spermatozoïdes caractérisés par la présence de gouttelettes cytoplasmiques proximales ou d'anomalies de la pièce médiane [70]. Dans ces conditions, la génération de plus grandes quantités de ROS est principalement due à la fuite d'électrons de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale avec réduction ultérieure de l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde [68]. Bien que l'anion superoxyde (O₂⁻) semble être le principal ROS généré par le sperme équin, cette espèce à vie courte se dismute rapidement pour former du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) [70; 71], et c'est probablement H₂O₂ qui explique l'effet cytotoxique majeur dans le sperme [72]. La suggestion que H₂O₂ est particulièrement pernicieux, en ce qui concerne les spermatozoïdes, a été confirmée par Aitken et al [73] dans une expérience impliquant l'exposition de spermatozoïdes humains à un mélange de ROS généré par la xanthine oxydase in vitro. Dans cette expérience, l'ajout de superoxyde dismutase, ou de piègeurs de radicaux hypochloreux et hydroxyles, n'a eu aucun impact sur la perte de motilité. Cependant, les effets cytotoxiques des ROS pourraient être complètement éliminés par la présence de catalase, confirmant à nouveau la vulnérabilité des spermatozoïdes de mammifères aux attaques de H₂O₂. De plus, cette étude a également démontré que d'autres aspects de la fonction des spermatozoïdes, tels que la fusion

spermatozoïdes-ovocytes, étaient encore plus sensibles aux attaques de peroxyde que la motilité. Le même paradigme expérimental a ensuite été reproduit en utilisant des spermatozoïdes équins, avec exactement le même résultat. Ainsi, l'exposition des spermatozoïdes équins au mélange de ROS généré par la xanthine oxydase in vitro s'est avérée supprimer de manière significative la motilité des spermatozoïdes équins via des mécanismes qui pourraient être complètement inversés par la catalase mais pas par la superoxyde dismutase [72]. Ces études ont démontré que (i) les spermatozoïdes de mammifères sont sensibles au stress oxydatif et que (ii) l'un des initiateurs les plus puissants de ce stress est H₂O₂.

1.1.8. Vulnérabilité des spermatozoïdes au stress oxydatif

Les spermatozoïdes sont vulnérables au stress oxydatif car ils contiennent une abondance d'AGPI, tels que les acides arachidonique et docosahexaénoïque, dans leur membrane plasmique qui sont sensibles à la LPO [61]. Dans des situations normales, la présence de ces acides gras semble donner fluidité à la membrane du sperme, favorisant l'activité d'enzymes clés, telles que les ATPases de la membrane plasmique, et facilitant les événements de fusion membranaire pendant la fécondation.

Cependant, ces PUFA sont vulnérables à l'attaque oxydative, car les énergies de dissociation du carbone et de l'hydrogène sont les plus faibles à la position du méthylène bis-allylique. En conséquence, l'événement d'abstraction d'hydrogène qui initie la LPO est favorisé, déclenchant une cascade de LPO qui conduit à la génération d'aldéhydes électrophiles de petite masse moléculaire tels que l'acroléine, le 4HNE et le malondialdéhyde. Ces composés sont très toxiques pour les spermatozoïdes et submergent finalement les capacités défensives limitées de ces cellules, provoquant une mort lipoperoxydative [74].

Il est connu que les spermatozoïdes sont très vulnérables à la LPO et que ce processus peut être favorisé par la présence concomitante de métaux de transition tels que le fer et le cuivre. Une petite quantité de Fe (II) dans le milieu de culture peut déclencher une cascade de LPO qui entraînera une perte de motilité des spermatozoïdes et d'autres fonctions dépendantes de la membrane telles que la fusion spermatozoïdes-ovocytes [75; 76].

La manière précise dont la LPO entraîne une perte de compétence fonctionnelle n'est toujours pas claire. En général, ce processus implique l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂), afin d'effectuer l'élimination de l'acide gras oxydé du phospholipide parent pour un traitement ultérieur par le système glutathion peroxydase et la conversion du peroxyde lipidique toxique en un alcool inoffensif. Le résultat de l'action de PLA₂ est de créer un lysophospholipide, qui déstabilise la membrane plasmique et facilite

une perte d'intégrité membranaire. Une fois que l'acide gras peroxydé a été clivé de la membrane par la PLA2, il peut également être efficacement séquestré par l'albumine. Ce dernier est très efficace pour protéger les spermatozoïdes du stress oxydatif grâce à sa capacité à lier et à neutraliser les hydroperoxydes lipidiques cytotoxiques [77 ; 78]. L'élimination de ces peroxydes lipidiques de la membrane plasmique est essentielle car sinon ils serviront propager la réaction en chaîne de la LPO à travers la membrane plasmique, en particulier si des quantités catalytiques de Fe (II) sont disponibles [79]. Une autre conséquence de la LPO est la stimulation de la génération de ROS supplémentaires par les mitochondries du sperme [80 ; 81]. Comme indiqué ci-dessus, les aldéhydes lipidiques tels que le 4HNE sont capables de former des adduits avec plusieurs protéines, y compris des constituants clés de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. L'une des conséquences de cette activité d'adduction est une stimulation significative de la génération de ROS mitochondriales suite au ciblage direct de l'acide succinique déshydrogénase [82; 83]. Par conséquent, tout facteur stimulant la génération de ROS et de LPO déclenchera encore plus de génération de radicaux libres à partir des mitochondries et amplifiera les niveaux de LPO.

Cette cascade lipoperoxydative sous-tend le processus de sénescence des spermatozoïdes et est l'un des principaux facteurs déclenchant le défaut des spermatozoïdes vers la voie intrinsèque de l'apoptose [84].

1.1.9. Prévention et gestion du stress oxydatif : effets de certains antioxydants sur la cryoconservation de la semence équine

La sensibilité apparente des spermatozoïdes équins au stress oxydatif a stimulé l'intérêt pour l'utilisation d'antioxydants pour contrecarrer ce processus, en tant qu'aide à la fertilité in vivo et in vitro. De plus, il est important de rétablir des niveaux optimaux d'antioxydants dans le sperme en les ajoutant au prolongateur. Divers antioxydants ont été utilisés pour prolonger la durée de vie des spermatozoïdes d'étalons dans diverses circonstances. Plusieurs essais ont été réalisés chez divers mammifères sur l'effet de l'ajout de vitamine E (α -tocophérol) [85 – 89] et de vitamine C (acide ascorbique) [70 ; 90 – 95] dans les prolongateurs de congélation dans le but d'améliorer la qualité de la semence, mais des résultats incohérents ont été observés à ce jour concernant la cryoconservation des spermatozoïdes d'étalons. Un effet positif de l'ajout d'acide ascorbique sur la préservation de l'intégrité membranaire du sperme équin refroidi a été observé [90]. Selon Agüero et al [96], l'ajout de la vitamine E avant le stockage du sperme refroidi (5°C) a exercé un effet protecteur sur la membrane plasmique et a maintenu une motilité progressive, indépendamment de la présence ou de l'absence de plasma

séminal. Néanmoins, Baumber et al [97] ont observé que l'ajout d' α tocophérol et d'acide ascorbique au prolongateur de cryoconservation n'améliorait pas la qualité des spermatozoïdes équins après décongélation ; à défaut de démontrer un effet clair et positif sur le maintien de la motilité ou de la fertilité des spermatozoïdes pendant le stockage liquide. Néanmoins, l'évaluation de la capacité antioxydante totale du plasma séminal suggère que l'acide ascorbique et l' α -tocophérol pourraient constituer l'essentiel de la capacité antioxydante du sperme [98].

On pense que la vitamine E ou α -tocophérol est le composant principal du système antioxydant des spermatozoïdes et qu'elle est considérée comme le principal protecteur membranaire contre les ROS et la LPO membranaire [89; 99]. Cet antioxydant de faible poids moléculaire peut inhiber la réaction LPO dans la membrane en éliminant le peroxyde (ROO), l'alcoxyde (RO) et d'autres radicaux dérivés de lipides [100]. De plus, la vitamine E peut être recyclée pour fonctionner à nouveau, même lorsque sa concentration est faible [99]. Cet antioxydant à petite molécule est un antioxydant de rupture de chaîne et non un antioxydant de piégeage présent dans la membrane cellulaire du sperme [101], et agit en neutralisant le H₂O₂ et en éteignant les radicaux libres, stoppant ainsi les réactions en chaîne qui produisent des peroxydes lipidiques et protégeant la membrane des dommages induite par les ROS [64]. La capacité de l' α -tocophérol à maintenir un régime permanent de réduction des radicaux peroxydes dans la membrane plasmique dépend du recyclage de l' α -tocophérol par des agents réducteurs externes tels que l'ascorbate ou les thiols [67]. De plus, il améliore l'activité d'autres oxydants de piégeage [102], aidant à préserver à la fois la motilité et la morphologie des spermatozoïdes [103].

L'acide ascorbique (vitamine C) est un antioxydant briseur de chaîne qui joue un rôle important (jusqu'à 65%) dans la lutte contre le stress oxydatif dans le plasma séminal. C'est un piègeur d'origine naturelle et, en tant que tel, sa présence aide divers autres mécanismes à réduire de nombreux processus de radicaux libres perturbateurs, notamment la LPO [91 ; 104]. Il réagit avec OH⁻, O₂⁻, et H₂O₂ dans le liquide extracellulaire, protégeant ainsi la viabilité et la motilité des spermatozoïdes [105].

Cependant, la vitamine C n'est qu'un faible piègeur de ROS dans la membrane cellulaire et, par conséquent, n'a presque aucun effet dans la cellule [64].

2. Altérations structurelles suite à la cryoconservation du sperme

Malgré les efforts déployés pour améliorer les milieux et les protocoles de congélation, considérant principalement l'ajout de cryoprotecteurs, élucider comment les basses températures provoquent des lésions sur le sperme, sachant que la qualité du sperme congelé-décongelé repose essentiellement sur sa capacité à résister aux changements de température sans perdre son fonctions principales [4], est encore nécessaire. Les dommages qui surviennent lors de la cryoconservation résultent de l'exposition des spermatozoïdes à des variations de température (stress thermique), ce qui entraîne la formation de cristaux de glace à l'intérieur de la cellule et dans le milieu environnant [57]. De plus, il y a des changements dans l'osmolalité (stress osmotique) qui comprennent : a) la formation d'un milieu extracellulaire hyperosmotique pendant la congélation, auquel la cellule répond en perdant de l'eau et par conséquent il y a un volume cellulaire moindre afin d'équilibrer les teneurs en soluté extracellulaire et intracellulaire [106]. la submersion des spermatozoïdes dans un milieu extracellulaire hypotonique lors de la décongélation, permettant ainsi à l'eau de pénétrer dans la cellule par diffusion passive avec l'augmentation conséquente du volume de sperme [107]. Avec tous ces processus, la membrane plasmique du sperme est la principale structure affectée de manière irréversible [108], en raison d'altérations des complexes lipides-protéines lors de la congélation et de la décongélation [109]. (**Figure 2**). Avec la baisse de température, la configuration des phospholipides est modifiée car ces composés se déplacent latéralement dans la membrane, ce qui permet l'adhésion des protéines. Cela rend le plasmalemm du sperme plus rigide et fragile, en raison de la conversion d'un état liquide en gel [110], entraînant une augmentation de la perméabilité du plasmalemm et une diminution du métabolisme des spermatozoïdes [111].

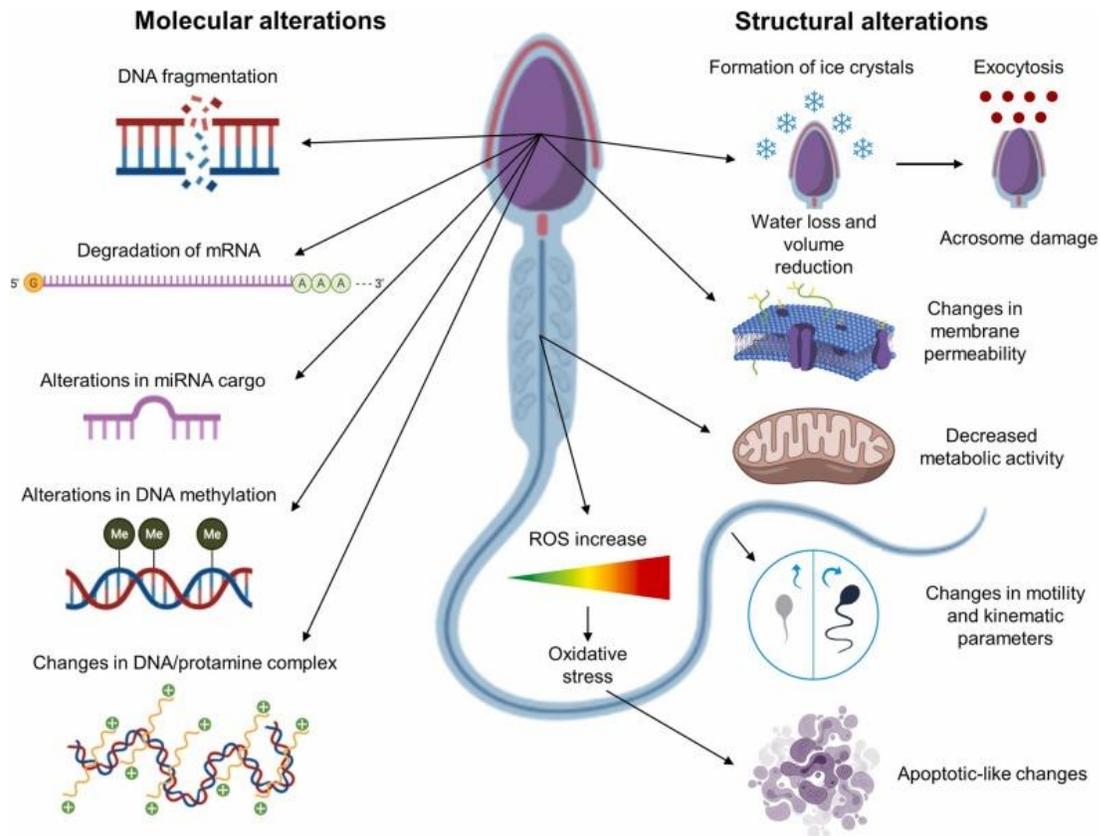


Figure 2 : Altérations structurelles et moléculaires du sperme de mammifère après cryoconservation . La congélation-décongélation diminue l'intégrité de la membrane plasmique et de l'acrosome , la motilité, l'activité métabolique et mitochondriale, et augmente la production de ROS. De plus, la cryoconservation augmente la fragmentation de l'ADN , peut affecter la signature de méthylation de l'ADN, conduit à la dégradation des ARNm et des miARN et induit des altérations de l'intégrité de la structure nucléoprotéique (complexes ADN/protamine et translocation de H1).

3. Altérations moléculaires dues à la cryoconservation du sperme

Même avec les lésions de la membrane du sperme lors des processus de congélation et de décongélation, les dommages aux composants moléculaires induits par la cryoconservation peuvent être supérieurs à ceux résultant de cette procédure (figure 2). Il faut déterminer l'étendue des dommages à la chromatine résultant de la congélation-décongélation qui entraînent la fragmentation de l'ADN [112]. Il a été suggéré que la structure de la nucléoprotéine , qui est composée de protamine 1 (P1) et de protamine 2 (P2), et d'histones (5 % à 15 %), pourrait être responsable du cryodommage de l'ADN car la

congélation et la décongélation ont été rapporté pour perturber le disulfure des ponts entre les résidus de cystéine [113]. L'ampleur plus ou moins grande de cette perturbation dépend du type de protamines (P1 et P2) dans la chromatine des spermatozoïdes [114]. Alors que P1 mais pas P2 est présent dans toutes les espèces, il existe des différences dans les proportions (P1:P2) et la teneur relative en protamines, ainsi que dans la quantité d'histones retenues [115]. De plus, d'autres mécanismes, tels que la diminution de la température, le stress oxydatif induit par la production de grandes quantités d'ERO [116], et le stress mécanique causé par la contraction cellulaire qui compacte la chromatine dans certaines régions du génome [117]. pourrait également perturber l'intégrité de la double hélice de l'ADN. Les effets des dommages aux molécules lors de la cryoconservation sont susceptibles de se répercuter sur la capacité fécondante des spermatozoïdes congelés-décongelés.

3. 1. Effets sur le pouvoir fertilisant

Un aspect important découlant de la cryoconservation est lié aux processus se produisant lors de la fécondation. Lors de la fécondation, le spermatozoïde libère des ARN messagers (ARNm) au sein de l'ovocyte. La cryoconservation, cependant, peut affecter le contenu en ARNm des spermatozoïdes [118]. et ainsi altérer la fonction de ces ARNm, qui sont connus pour avoir une fonction pendant les premiers stades du développement embryonnaire lorsqu'il existe des processus de traduction qui entraînent la synthèse de protéines par l'ovocyte [119]. Il convient donc de noter que les spermatozoïdes sont des cellules transcriptionnellement « silencieuses » et n'ont pas la capacité de remplacer les ARNm perdus lors de la cryoconservation (Figure 2). De plus, [120]. et [121]. ont décrit que les facteurs épigénétiques impliqués dans l'expression des gènes, tels que l'ARN non codant (ARNnc), la méthylation de l'ADN, le remodelage de la chromatine et les modifications post-traductionnelles des histones, pourraient également être affectés par les procédures de congélation et de décongélation. Chez les bovins, la cryoconservation entraîne des différences dans la teneur en ARNnc telles que déterminées lors de comparaisons entre le sperme congelé-décongelé et le sperme frais (R1A10, R1C4, R4A1 et R4D2) [122]. De plus, les résultats d'une autre étude, également menée sur des bovins, ont indiqué qu'il y avait

une abondance différentielle de 86 microARN(miARN, un type de petit ARNnc) dans le sperme congelé-décongelé ; 40 de ces miARN étaient liés à la fonction des spermatozoïdes (motilité, viabilité), aux changements de type apoptotique et aux voies métaboliques [123].. De même, [124]. ont rapporté que 135 miARN étaient en abondance différentielle entre le sperme de porc frais et congelé-décongelé, 34 étant impliqués dans des changements de type apoptotique et des voies métaboliques. On pense donc que la cryoconservation altère les miARN impliqués dans l'expression de gènes liés à des changements de type apoptotique, qui incluent des altérations du potentiel membranaire mitochondrial , l'externalisation de la phosphatidylsérine , la fragmentation de l'ADN et l'activation de la [124-125].. Comme décrit précédemment dans cet article de synthèse, les spermatozoïdes sont des cellules transcriptionnellement « silencieuses » ; des études supplémentaires dans ce domaine sont donc justifiées pour déterminer les effets sur des molécules spécifiques qui modulent la fonction des spermatozoïdes.

3. 2. Effets sur l'embryon

Une autre facette importante qui peut être altérée par la congélation-décongélation est la méthylation de l'ADN du sperme, qui est connue pour être essentielle au développement de l'embryon avant l'implantation [126].. Fondamentalement, ce processus implique l'ajout covalent d'un groupe méthyle aux cytosines des régions CpG (5'-cytosine-phosphate-guanine-3') [127 -128].. L'étendue de la méthylation de l'ADN dans le sperme de cheval est nettement plus importante après la cryoconservation (5,4 % dans le sperme congelé-décongelé contre 0,6 % dans le sperme frais) [129].. L'échec de la fécondation lorsque du sperme congelé-décongelé est utilisé pour l'insémination artificielle pourrait s'expliquer par une méthylation aberrante de l'ADN lors de la cryoconservation. De même, les procédures de cryoconservation pourraient avoir des effets sur le développement embryonnaire précoce car il existe un héritage épigénétique par l'ovocyte des quelques nucléosomes spermatiques et de l'ADN méthylé, et la chromatine paternelle contribue également à l'épigénome embryonnaire [130-131]..

Les facteurs de transcription présents dans l'embryon ont des fonctions essentielles dans le développement embryonnaire [132].. Il y a 0,78% des transcrits qui ont été identifiés dans

les embryons de cheval qui sont régulés négativement (avec la présence de 84 facteurs de transcription, par exemple : *NF-1*, *KLF13*, *CPBP*, *BTEB3*, *TCF7L1* et *KLF3*) lorsque le sperme congelé-décongelé est utilisé pour l'insémination artificielle [132]. La régulation à la baisse de ces facteurs de transcription pourrait être associée au retard du développement embryonnaire et à la plus grande mortalité, qui sont attribués aux inséminations avec du sperme cryoconservé [131]. Chez les bovins, la cryoconservation modifie les profils d'ARNm et de miARN car 526 ARNm et 55 miARN sont en abondance différentielle lorsqu'il y a des évaluations de sperme frais et congelé-décongelé [133]. Les cryodommages des spermatozoïdes survenant lors de la congélation et de la décongélation pourraient expliquer l'altération de ces profils d'ARNm et de miARN due à la dégradation des ARNm et des miARN (Figure 2). De plus, les miARN transmis par le sperme pourraient réguler la fonction maternelle des ARNm impliqués dans le clivage, la reprogrammation épigénétique et l'apoptose embryonnaire [134]. La cryoconservation des spermatozoïdes pourrait donc modifier davantage le profil de l'ARNm dans les embryons car certaines fonctions pertinentes sont affectées par la modulation des miARN des gènes, ce qui induirait des effets négatifs sur le développement de l'embryon [135]. Des changements dans le profil des miARN ont également été observés dans le sperme de porc congelé-décongelé, car lorsqu'il y a cryoconservation avec et sans glycérol, il y a respectivement 23 et 14 miARN différentiellement abondants, mais seulement deux sont significativement diminués avec et sans l'inclusion de glycérol comme cryoprotecteur . [136]. Parce que ces miARN sont principalement associés à des processus métaboliques et cellulaires, ces variations décrites précédemment pourraient également affecter le développement embryonnaire.

4. Équilibre redox et fonction mitochondriale

Comme décrit précédemment dans cet article de synthèse, le déséquilibre entre le système de défense antioxydant cellulaire et la production de ROS pendant la cryoconservation conduit à un stress oxydatif . Les ROS comprennent des radicaux libres d'oxygène, tels que le radical hydroxyle (OH^-), l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [137-139]. Bien que les ROS soient nécessaires pour que les spermatozoïdes aient un fonctionnement physiologique homéostatique, la congélation

entraîne une augmentation des conséquences létales de concentrations de ROS supérieures à l'optimum en raison de l'activation de voies de type apoptotique [140]. De plus, les spermatozoïdes peuvent également subir des dommages structurels marqués, principalement au niveau de l'ADN, ce qui a des conséquences néfastes sur la fertilité de certains individus [141-144].

Parmi les effets résultant de la production de ROS pendant la cryoconservation figurent les changements qui se produisent dans le potentiel membranaire mitochondrial des spermatozoïdes [145]. En plus des humains, il y a eu le plus d'études sur les effets sur le sperme d'une concentration de ROS supérieure à la concentration optimale chez les chevaux. Les recherches axées sur la détermination de la balance redox ont conduit à mesurer le potentiel statique d'oxydo-réduction (sORP) dans le sperme cryoconservé [146]. Rosiglitazone l'inclusion dans des milieux de cryoconservation peut améliorer la fonction mitochondriale du sperme congelé-décongelé en raison de la réduction de l'activité de la caspase-3, retardant par conséquent l'activation des voies de type apoptotique. Plus précisément, l'ajout de rosiglitazone au milieu de cryoconservation conduit au maintien de l'homéostasie redox, ce qui entraîne la poursuite de la phosphorylation de la protéine AKT. Cette protéine est impliquée dans l'équilibre entre la survie et les voies apoptotiques [147].

Par rapport aux chevaux, la pertinence des ROS produites chez d'autres espèces lors de la cryoconservation du sperme est moins claire. Chez les porcs, Flores [148] ont rapporté que la capacité de production de ROS au niveau des mitochondries est peu avant la congélation [149]. De même, [150] et [151] ont observé des concentrations intracellulaires de ROS et une peroxydation lipidique membranaire, à la fois dans les spermatozoïdes congelés-décongelés viables et non viables, ne diffèrent pas entre les éjaculats ayant une capacité de congélation relativement plus grande et moindre. Chez les buffles et les bovins, les effets des ERO sur la peroxydation lipidique, le potentiel de la membrane mitochondriale et l'intégrité de l'ADN dans le sperme congelé-décongelé ne sont pas aussi apparents que dans l'échantillon frais du même éjaculat [153].

conclusion

La congélation de la semence équine a pris du retard sur son espèce pour un certain nombre de raisons : 1) difficultés à en réaccorder un nombre adéquat, 2) jusqu'à récemment, un moratoire sur l'IA et le transfert d'embryons et 3) la faible concentration d'hommes dans la plupart des installations, ce qui rend très coûteux l'équipement CP peu pratique pour la plupart des installations.

Par conséquent, l'industrie équine serait un grand bénéficiaire de tout nouveau système peu coûteux, portable et fiable.

Actuellement, la méthode la plus efficace est un congélateur électrique à débit contrôlé, qui nécessite de l'électricité, une grande quantité d'azote liquide, et donc difficilement déplaçable, ce qui nécessite de déplacer des étalons ou de la semence vers des installations centralisées.

Bibliographie

- [1] Hussain J, Salam A, Gohar A. A Study on the Cryopreservation of Stallion Semen with Alpha Lipoic Acid. *Intl R J of Pharmaceuticals* 2011;1:21–6.
- [2] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:481–592.
- [3] Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V, Torner H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non breeding season. *Anim Reprod Sci* 2001;65:75–88.
- [4] Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci* 2008;107:276–92.
- [5] Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Morrell JM, Salazar Sandoval C, Macías García B, Rodríguez-Martinez H, Tapia JA, Peña FJ. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stalliondependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction* 2009;138:55– 63.
- [6] Mara L, Casu S, Carta A, Dattena M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim Reprod Sci* 2013;138:2–38.
- [7] Smith AU, Polge C. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature* 1960;166:668–9.
- [8] Barker CA, Gandier JC. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med Vet Sci* 1957;21:4–51.
- [9] Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros AS. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Anim Reprod Sci* 2005;89:105– 13.
- [10] Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci* 2008;105:119–28.
- [11] Morrel JM. Stallion sperm selection: past, present, and future trends. *J Equine Vet Sci* 2012;32:436–40.

- [12] Katila T. In vitro evaluation of frozen–thawed stallion semen: a review. *Acta Vet Scand* 2001;42:199–217.
- [13] Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T. Fertility of frozen–thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet Scand* 2006;48:14.
- [14] Chaveiro A. Bull sperm cryopreservation: fundamental and applied aspects. PhD thesis. Utrecht University, 2005.
- [15] Amann RP, Pickett BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 1987;7:145–73.
- [16] Samper JC, Morris CA. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 1998;49:895–903.
- [17] Janett F, Thun R, Niederer K, Burger D, Hässig M. Seasonal changes of semen quality and freezability in the warm blood stallion. *Theriogenology* 2003;60:453–61.
- [18] Sieme H, Katila T, Klug E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 2004;61:769–84.
- [19] Hoogewijs M, Rijsselaere T, De Vlieghe S, Vanhaesebrouck E, De Schauwer C, Govaere J, Thys M, Hoflack G, Van Soom A, de Kruif A. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology* 2010;74:118–26.
- [20] Knop K, Hoffmann N, Rath D, Sieme H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Anim Reprod Sci* 2005;89:294–7.
- [21] Ecot P, Decuadro-Hansen G, Delhomme G, Vidament M. Evaluation of cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. *Anim Reprod Sci* 2005;89:245–8.
- [22] Moore AI, Squires EL, Graham JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2005;63:2372–81.
- [23] de Andrade AF1, Zaffalon FG, Celeghini EC, Nascimento J, Tarragó OF, Martins SM, Alonso MA, Arruda RP. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: what is the effect on sperm cell viability? *Reprod Domest Anim* 2011;46:682–6.

- [24] Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Andrology* 1990;11:73–88.
- [25] Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:871–91.
- [26] Squires EL, Keith SL, Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2004;62:1056–65.
- [27] Mazur P, Rigopoulos N. Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate. *Cryobiology* 1983;20:274–89.
- [28] Dashnau J L, Nucci NV, Sharp KA, Vanderkooi JM. Hydrogen Bonding and the Cryoprotective Properties of Glycerol/Water Mixtures. *J Phys Chem B* 2006;110:13670–7.
- [29] Aanchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 1987;24:324–31.
- [30] Oldenhof H, Friedel K, Sieme H, Glasmacher B, Wolkers WF. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 2010;61:115–22.
- [31] Akhoondi M, Oldenhof H, Sieme H, Wolkers WF. Freezing-induced cellular and membrane dehydration in the presence of cryoprotective agents. *Mol Membr Biol* 2012;29:197–206.
- [32] Heitland AV, Jasko DJ, Squires EL, Graham JK, Pickett BW, Hamilton C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet J* 1996;28:47–53.
- [34] Martin JC, Klug E, Gunzel AR. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fertil* 1979;27(Suppl):47–51.
- [35] Loomis PR, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. *J Anim Sci* 1984;56:687–93.

- [36] Ecot P, Vidament M, de Mornac A, Perigault K, Clément F, Palmer E. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;56:141–50.
- [37] Allen WR. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod Dom Anim* 2005;40:310–29.
- [38] Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 2006;73:1338–44.
- [39] Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev* 2001;59:451–8.
- [40] Cristanelli MJ, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. Effects of egg yolk and glycerol level in lactose–EDTA–egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen–thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1985;23:25–38.
- [41] Devireddy RV, Swandlund DJ, Olin T, Vincente W, Troedsson MHT, Bischof JC, Roberts KP. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol Reprod* 2002a;66:222–31.
- [42] Devireddy RV, Swandlund DJ, Alghamdi AS, Duoos LA, Troedsson MHT, Bischof JC, Roberts KP. Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. *Reproduction* 2002b;124:643–8.
- [43] Vartorella HA. Cryopreservation of equine and porcine spermatozoa with a unique freezing technology (UFT). PhD thesis. Texas Tech University, 2003.
- [44] Goolsby HA, Elanton JR, Prien SD. Preliminary comparisons of a unique freezing technology to traditional cryopreservation methodology of equine spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 2004;24:314–8.
- [45] Álamo D, Batista M, Gonzalez F, Rodriguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of –152 °C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology* 2005;63:72–82.

- [46] Zirkler H, Gerbes K, Klug E, Sieme H. Cryopreservation of stallion semen collected from good and poor freezers using a directional freezing device (Harmony CryoCare – Multi thermal Gradient 516). *Anim Reprod Sci* 2005;89:291–4.
- [47] Saragusty J, Gacitua H, Pettit MT, Arav A. Directional freezing of equine in large volumes. *Reprod Domest Anim* 2007;42:610–5.
- [48] Bradford LL, Buhr MM. Function of cryopreserved horse semen is improved by optimized thawing rates. *J Equine Vet Sci* 2002;22:546–50.
- [50] Karow AM, Critser JK. *Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles*. Academic Press. USA, 1997.
- [51] Leibo SP. Cryobiology of spermatozoa: principles, species differences and individual variations. 10th International Symposium on Spermatology, Madrid, 2006;17-22:48.
- [52] Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963;47:347–69.
- [53] Mazur P. Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. In *Cryobiology*, Academic Press, London, 1966;213-315.
- [54] Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 1972;71:345–55.
- [55] Morris GJ, Faszer K, Green JE, Draper D, Grout BW, Fonseca F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology* 2007;68:804–12.
- [56] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984;247:124–42.
- [57] Morris GJ, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology* 2012;64:71–80.
- [58] James PS, Wolfe CA, Mackie A, Ladha S, Prentice A, Jones R. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;14:1827–32.
- [59] Ladha S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell: the mammalian spermatozoon. *J Membr Biol* 1998;165:1–10.

- [60] Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci* 2001;68:249–65.
- [61] Macias García BM, Fernández LG, Ferrusola CO, Salazar-Sandoval C, Rodríguez AM, Martínez HR, Tapia JA, Morcuende D, Peña FJ. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reprod Domest Anim* 2011;46:141–8.
- [62] Parks, JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 1992;29:255–66.
- [63] De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 1990;27:171–83.
- [64] Agarwall A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* 2014;32:1–17.
- [65] Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci* 2008;107:257–67.
- [66] Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* 2011;2011:686137.
- [67] Moreira da Silva F, Marques A, Chaveiro A. Reactive oxygen species: a double-edged sword in reproduction. *The Open Veterinary Science Journal* 2010;4:126–32.
- [68] Sabeur K, Ball BA. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reproduction* 2007;134:263–70.
- [69] Sabeur K, Ball BA. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. *Am J Vet Res* 2006;67:701–6.
- [70] Ball BA, Vo AT, Baumber J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res* 2001;62:508–15.
- [71] Burnaugh L, Sabeur K, Ball BA. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology* 2007;67:580–9.
- [72] Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl* 2000;21:895–902.

- [73] Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993;97:441–50.
- [74] Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987;8:338–48.
- [75] Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989;41:183–97.
- [76] Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. Relationship between iron catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil* 1993;98:257–65.
- [77] Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995;42:334–46.
- [78] Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998;13:1429–36.
- [79] Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1993;35:302–15.
- [80] Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993;97:441–50.
- [81] Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3199–207.
- [82] Aitken RJ, Whiting S, De Iuliis GN, McClymont S, Mitchell LA, Baker MA. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2012;287:33048–60.

- [83] Aitken RJ, Smith TB, Lord T, Kuczera L, Koppers AJ, Naumovski N, Connaughton H, Baker MA, De Iuliis GN. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. *Andrology* 2013;1:192–205.
- [84] Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J* 2011;436:687–98.
- [85] Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* 2003;2458:621–8.
- [86] Hatamoto LK, Batista Sobrinho CA, Nichi M, Barnabe VH, Barnabe RC, Cortada CNM. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology* 2006;66:1610–44.
- [87] Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Saratsis P, Boscoc C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 2007;68:204–12.
- [88] O’Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 1997;29:269–75.
- [89] Contri A, Amicis ID, Molinari A, Faustini M, Gramenzi A, Robbe D, Carluccio A. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion *Theriogenology* 2011;75:1319–26.
- [90] Aurich JE, Schönherr U, Hoppe H, Aurich C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology* 1997;48:185–92.
- [91] Hu JH, Tian WQ, Zhao XL, Zan LS, Wang H, Li QW, Xin YP. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Anim Reprod Sci* 2010;121:72–7.
- [92] Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscoc CM. Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. *Theriogenology* 2008;70:827–35.

- [93] Donnelly ET, McClure N, Lewis EM. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertil Steril* 1999;72:484–95.
- [94] Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 2002;71:13–23.
- [95] Beconi MT, Francia CR, Mora NG, Affranchino MA. Effect of natural antioxidants in frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 1993;40:84–51.
- [96] Agüero A, Miragaya MH, Mora NG, Chaves MG, Neild DM, Beconi MT. Effect of vitamin E addition on equine sperm preservation. *Comunicaciones Biologicas* 1995;13:343–56.
- [97] Baumber J, Ball BA, Linfor JJ. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res* 2005;66:772–9.
- [98] Thiele JJ, Friesleben HJ, Fuchs J, Ochsendorf FR. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum Reprod* 1995;10:110–5.
- [99] Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79:829–43.
- [100] Silva PFN. Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. PhD thesis. Utrecht University, Ridderprint. Ridderkerk, 2006.
- [101] Dad S, Bisby RH, Clark IP, Parker AW. Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. *Free Radic Res* 2006;40:333–8.
- [102] Mora-Esteves C, Shin D. Nutrient supplementation: improving male fertility fourfold. *Semin Reprod Med* 2013;31:293–300.
- [103] Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004;8:616–27.
- [104] Knight JA, Blaylock RC, Searles DA. The effects of vitamins C and E on lipid peroxidation in stored erythrocytes. *Ann Clin Lab Sci* 1993;23:51–6.
- [105] Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996;48:835–50.

- [106]. M. Yeste Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs *Theriogenology*, 85 (2016), pp. 47-64
- [107]. A.C. Pommer, J. Rutllant, S.A. Meyers role of osmotic resistance on equine spermatozoal function *Theriogenology*, 58 (2002), pp. 1373-1384
- [108]. la cryosurvie des mâles et réponse du sperme d'étalon aux protocoles de congélation personnalisés *Anim. Repr. Sci.* , 105 (2008) , p. 119 - 128
- [109]. P. Mazur , SP Leibo , EHY Chu Une hypothèse à deux facteurs de blessure par congélation. Preuve de cellules de culture tissulaire de hamster chinois *Exp. Cell Res* , 71 (1972) , pages 345 - 355
- [110]. FE De Leeuw , HC Chen , B. Colenbrander , AJ Verkleij Changements ultrastructuraux induits par le froid dans les membranes plasmiques du sperme de taureau et de verrat *Cryobiologie* , 27 (1990) , p. 171 - 183
- [111]. RH Hammerstedt , JK Graham Cryoconservation du sperme de volaille : l'énigme du glycérol *Cryobiologie* , 29 (1992) , p. 26 - 38
- [112]. L. Fraser , J. Strzezek Existe-t-il une relation entre le statut chromatinien et la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes de verrat après congélation-décongélation ? *Thériogénologie* , 68 (2007) , pp. 248 - 257
- [113]. E. Flores , L. Ramió-Lluch , D. Bucci , JM Fernández-Novell , A. Peña , JE Rodríguez-Gil La congélation-décongélation induit des altérations de la liaison de l'histone H1 à l'ADN et la rupture des liaisons disulfure protéine-ADN dans le sperme de verrat *Thériogénologie* , 76 (2011) , pp. 1450 - 1464
- [114]. J. Ribas-Maynou, E. Garcia-Bonavila, C.O. Hidalgo, J. Catalán, J. Miró, M. Yeste Species-specific differences in sperm chromatin decondensation between eutherian mammals underlie distinct lysis requirements *Front. Cell Dev. Biol.*, 9 (2021), p. 1143
- [115]. J. Gosálvez , C. López-Fernández , JL Fernández , A. Gouraud , WV Holt Relations entre la dynamique des dommages iatrogènes à l'ADN et la conception génomique dans les spermatozoïdes de mammifères de onze espèces *Mol. Repr. Dév.* , 78 (2011) , p. 951 - 961

[116]. MJ McCarthy , J. Baumber , PH Kass , SA Meyers Le stress osmotique induit des dommages cellulaires oxydatifs aux spermatozoïdes des macaques rhésus Biol. Repr. , 82 (2010) , p. 644 - 651

[117]. J. Kopeika , A. Thornhill , Y. Khalaf L'effet de la cryoconservation sur le génome des gamètes et des embryons : principes de la cryobiologie et évaluation critique des preuves Hum. Repr. Mise à jour , 21 (2015) , p. 209 - 227

[118]. M. Stoeckius, D. Grün, N. Rajewsky Paternal RNA contributions in the *Caenorhabditis elegans* zygote EMBO J., 33 (2014), pp. 1740-1750

[119]. P. Wang, Y.F. Wang, H. Wang, C.W. Wang, L.S. Zan, J.H. Hu, Q.W. Li, Y.H. Jia, G.J. Ma HSP90 expression correlation with the freezing resistance of bull sperm Zygote, 22 (2014), pp. 239-245

[120]. Ortiz-Rodriguez et al., 2019

[121]. R. Urrego, N. Rodriguez-Osorio, H. Niemann Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle Epigenetics, 9 (2014), pp. 803-815

[122]. C. Zeng, W. Peng, L. Ding, L. He, Y. Zhang, D. Fang, K. Tang A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation Cryobiology, 69 (2014), pp. 119-127

[123]. X. Chen , Y. Wang , H. Zhu , H. Hao , X. Zhao , T. Qin , D. Wang Profilage comparatif des transcriptions de l'expression génique du sperme de taureau frais et congelé-décongelé Thériogénologie , 83 (2015) , pp. 504 - 511

[124].

E. Capra , F. Turri , B. Lazzari , P. Cremonesi , TM Gliozzi , I. Fojadelli , A. Stella , F. Pizzi Le séquençage de petits ARN de sperme cryoconservé d'un seul taureau a révélé une expression altérée des miARN et des piARN entre les populations de spermatozoïdes à mobilité élevée et faible

[125]. BMC Génom. , 18 (2017) , p. 14 , [10.1186/s12864-016-3394-7](https://doi.org/10.1186/s12864-016-3394-7)

- [126]. D.-H. Dai , I. Qazi , M.-X. Ran , K. Liang , Y. Zhang , M. Zhang , G.-B. Zhou , C. Angel , C.-J. Zeng Exploration des profils de miARN et d'ARNm dans le sperme de verrat frais et congelé-décongelé par transcriptome et séquençage de petits ARN *Int. J. Mol. Sci.* , 20 (2019) , p. 802
- [127]. T.M. Said, A. Gaglani, A. Agarwal Implication of apoptosis in sperm cryoinjury *Reprod. Biomed. Online*, 21 (2010), pp. 456-462
- [128]. A. Shangguan, H. Zhou, W. Sun, R. Ding, X. Li, J. Liu, Y. Zhou, X. Chen, F. Ding, L. Yang, S. Zhang Cryopreservation induces alterations of miRNA and mRNA fragment profiles of bull sperm *Front. Genet.*, 11 (2020), p. 419
- [129]. M. Benchaib , M. Ajina , J. Lornage , A. Niveleau , P. Durand , JF Guérin Quantification par analyse d'image de la méthylation globale de l'ADN dans les spermatozoïdes humains et sa valeur pronostique en fécondation in vitro : une étude préliminaire *Fertilité. Stérile.* , 80 (2003) , p. 947 - 953
- [130]. R. Urrego, N. Rodriguez-Osorio, H. Niemann Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle *Epigenetics*, 9 (2014), pp. 803-815
- [131]. M.R. Ugur, A. Saber Abdelrahman, H.C. Evans, A.A. Gilmore, M. Hitit, R.I. Arifiantini, B. Purwantara, A. Kaya, E. Memili Advances in cryopreservation of bull sperm *Front. Vet. Sci.*, 6 (2019), p. 268
- [132]. C. Aurich , B. Schreiner , N. Ille , M. Alvarenga , D. Scarlet Méthylation de la cytosine de l'ADN du sperme dans le sperme de cheval après cryoconservation *Thériogénologie* , 86 (2016) , pp. 1347 - 1352
- [133]. G.W. van der Heijden, L. Ramos, E.B. Baart, I.M. van den Berg, A.A. Derijck, J. van der Vlag, E. Martini, P. de Boer Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans *BMC Dev. Biol.*, 8 (2008), pp. 1-6
- [134]. J.M. Ortiz-Rodríguez, C. Ortega-Ferrusola, M.C. Gil, F.E. Martín-Cano, G. Gaitskell-Phillips, H. Rodríguez-Martínez, K. Hinrichs, A. Álvarez-Barrientos, Á. Román, F.J. Peña Transcriptome analysis reveals that fertilization with cryopreserved sperm downregulates

genes relevant for early embryo development in the horse PLoS One, 14 (2019), Article e0213420

[135]. G. Jia , X. Fu , K. Cheng , M. Yue , B. Jia , Y. Hou , S. Zhu La cryoconservation des spermatozoïdes modifie la formation pronucléaire et la déméthylation de l'ADN zygotique chez la souris Thériogénologie , 83 (2015) , pp. 1000 - 1006

[136]. J.M. Ortiz-Rodríguez, F.E. Martín-Cano, G. Gaitskell-Phillips, A. Álvarez Barrientos, H. Rodríguez-Martínez, M.C. Gil, C. Ortega-Ferrusola, F.J. Peña Sperm cryopreservation impacts the early development of equine embryos by downregulating specific transcription factors bioRxiv (2021) 2021.05.12.443855

[137].A. Shangguan, H. Zhou, W. Sun, R. Ding, X. Li, J. Liu, Y. Zhou, X. Chen, F. Ding, L. Yang, S. Zhang Cryopreservation induces alterations of miRNA and mRNA fragment profiles of bull sperm Front. Genet., 11 (2020), p. 419

[138]. M. Wang, Y. Gao, P. Qu, S. Qing, F. Qiao, Y. Zhang, J. Mager, Y. Wang Sperm-borne miR-449b influences cleavage, epigenetic reprogramming and apoptosis of SCNT embryos in bovine Sci. Rep., 7 (2017), pp. 1-12

[139]. Braga et al., 2015

[140]. Y. Zhang, D. Dai, Y. Chang, Y. Li, M. Zhang, G. Zhou, Z. Peng, C. Zeng Cryopreservation of boar sperm induces differential microRNAs expression Cryobiology, 76 (2017), pp. 24-33

[141]. M. Martínez-Cayuela Radicaux libres d'oxygène et maladies humaines Biochimie , 77 (1995) , p. 147 - 161

[142]. F.J. Peña, C. O'Flaherty, J.M. Ortiz Rodríguez, F.E. Martín Cano, G.L. Gaitskell-Phillips, M.C. Gil, C. Ortega Ferrusola Redox regulation and oxidative stress: the particular case of the stallion spermatozoa Antioxidants, 8 (2019), p. 567

[143]. L. Zhang, X. Wang, R. Cueto, C. Effi, Y. Zhang, H. Tan, X. Qin, Y. Ji, X. Yang, H. Wang Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation Redox Biol., 26 (2019), Article 101284

- [144]. S. Dutta , A. Majzoub , A. Agarwal Stress oxydatif et fonction spermatique : une revue systématique sur l'évaluation et la prise en charge Arabe J. Urol. , 17 (2019) , p. 87 - 97
- [145]. A. Januskauskas , A. Johannisson , H. Rodriguez-Martinez Modifications subtiles de la membrane du sperme de taureau cryoconservé en relation avec la viabilité du sperme, la structure de la chromatine et la fertilité au champ Thériogénologie , 60 (2003) , pp. 743 - 758
- [146]. K.E. Waterhouse, A. Gjeldnes, A. Tverdal, P.M. De Angelis, W. Farstad, M. Håård, E. Kommisrud Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen Anim. Reprod. Sci., 117 (2010), pp. 34-42
- [147]. E. Estrada , JE Rodríguez-Gil , LG Rocha , S. Balasch , S. Bonet , M. Yeste Compléter les milieux de cryoconservation avec du glutathion réduit augmente la fertilité et la prolificité des truies inséminées avec de la semence de verrat congelée-décongelée Andrologie , 2 (2014) , p. 88 - 99
- [148]. T.M. Said, A. Gaglani, A. Agarwal Implication of apoptosis in sperm cryoinjury Reprod. Biomed. Online, 21 (2010), pp. 456-462
- [149]. J.M. Ortiz-Rodriguez, C. Balao da Silva, J. Masot, E. Redondo, A. Gazquez, J.A. Tapia, C. Gil, C. Ortega-Ferrusola, F.J. Peña Rosiglitazone in the thawing medium improves mitochondrial function in stallion spermatozoa through regulating Akt phosphorylation and reduction of caspase 3 PLoS One, 14 (2019), Article e0211994
- [150]. E. Flores , E. Taberner , MM Rivera , A. Peña , T. Rigau , J. Miró , JE Rodríguez-Gil Effets de la congélation/décongélation sur les sous-populations de spermatozoïdes mobiles des éjaculats de sanglier et d'âne Thériogénologie , 70 (2008) , pp. 936 - 945
- [151]. J. Gómez-Fernández, E. Gómez-Izquierdo, C. Tomás, E. Mocé, E. De Mercado Is sperm freezability related to the post-thaw lipid peroxidation and the formation of reactive oxygen species in boars? Reprod. Domest. Anim., 48 (2013), pp. 177-182

[152]. M. Yeste, E. Estrada, I. Casas, S. Bonet, J.E. Rodríguez-Gil Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels *Theriogenology*, 79 (2013), pp. 929-939

[153]. G. Kadirvel , S. Kumar , A. Kumaresan Peroxydation lipidique, potentiel membranaire mitochondrial et intégrité de l'ADN des spermatozoïdes en relation avec les espèces intracellulaires réactives de l'oxygène dans la semence de buffle liquide et congelée-décongelée *Anim. Repr. Sci.* , 114 (2009) , p. 125 - 134