



3 mars 2004

LES HARAS NATIONAUX

## LE GLYCEROL EST-IL UN FACTEUR LIMITANT POUR LA CONSERVATION DE LA SEMENCE DANS LES ESPECES ASINE ET EQUINE ?

- P. VINCENT<sup>1</sup>, J.M. YVON<sup>2</sup>, F.X. MARTIN<sup>3</sup>, B. BRUNEAU<sup>2</sup>, V. CINQUALBRE<sup>1</sup>, C. BERLAND<sup>1</sup>, B. BITEAU<sup>4</sup>, M. VIDAMENT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Haras national, avenue de Jourdan, BP 305, 17 017 Saintes

<sup>2</sup>Haras nationaux, I.N.R.A., Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37 380 Nouzilly

<sup>3</sup>Sabaud, BP200, 210 avenue de la Venise verte, 79 000 Niort

<sup>4</sup>Asinerie du Baudet du Poitou, Parc du Marais Poitevin, La Tillauderie, 17 470 Dampierre / Boutonne

### Résumé

Dans une première série d'études, où le sperme de baudet était congelé dans de l'I.N.R.A.82 + 2 % jaune d'œuf + 2,5% de glycérol (0,34 M), il a été constaté que le sperme décongelé était très peu fertile pour les anesses (moins de 13% de fertilité par cycle) et normalement fertile pour les juments (environ 40%). A la décongélation, la dilution du sperme dans le lait ou le lavage des spermatozoïdes par centrifugation n'a pas amélioré la fertilité chez l'anesse. Dans une deuxième série d'études, le sperme de baudet a été utilisé frais mais après différentes étapes de la préparation pour la congélation. La chute de fertilité chez l'anesse ne s'est pas produite après le contact avec le jaune d'œuf du dilueur, ni après la centrifugation et la descente à 4°C. Elle s'est produite après contact avec le glycérol (0,34 M). Par contre, la fertilité a été restaurée si le glycérol était remplacé par le diméthylformamide (0,34 M) ou l'éthylène glycol (0,34 M). Chez la jument, dans les mêmes conditions de préparation du sperme, on a observé une chute importante de fertilité du sperme frais d'étalon entre 0 et 5,5% de glycérol. Le glycérol est donc bien un facteur limitant de la fertilité dans ces 2 espèces.

**Mots-clés :** âne, baudet, spermatozoïdes, congélation, glycérol

### Summary

In a first series of studies, when semen of jackass was frozen in I.N.R.A.82 + 2 % egg yolk + 2.5% glycerol (0,34 M), it was observed that the thawed semen was poorly fertile for jennies (less than 13% of fertility per cycle) and normally fertile for mares (around 40%). After thawing, the dilution of semen in milk or the washing of the spermatozoa by dilution/centrifugation did not improved the fertility in jennies.

In a second series of studies, the semen of jackass was used fresh (unfrozen), after different steps of preparation of semen before freezing. The loss of fertility in jennies did not occur after the contact with egg yolk nor after the step of centrifugation (seminal plasma elimination) and cooling to 4°C. It occurred after the contact with glycerol (0,34M). The fertility was restored if glycerol was replaced with dimethylformamide (0,34 M) or ethylene glycol (0,34 M). For mares, if the fresh semen of stallion was prepared in the same way, a marked loss of fertility was observed between 0 et 5,5% of glycerol. Glycerol is a true limiting factor for fertility in these two species.

**Key-words :** donkey, jack, spermatozoa, cryopreservation, glycerol

## INTRODUCTION

La recherche sur la congélation du sperme des espèces équines et asines est essentiellement tournée sur celle des équins. Le cryoprotecteur quasi-unanimement utilisé est le glycérol (2 à 6 %) et le milieu de congélation contient toujours du jaune d'œuf (2 à 20%) (MAGISTRINI et al., 99). Très peu d'articles ont été publiés sur la congélation du sperme d'âne (ou baudet) : PIAO et al. (88) et TRIMECHE et al (96a, 96b, 97, 98). L'objectif de ce travail a été d'améliorer la congélation du sperme de baudet, ce qui nous a conduit à étudier l'effet du glycérol sur la fertilité de l'anesse et de la jument.

## LES DIFFERENTES ETUDES

### Dispositions communes aux expériences

Le sperme congelé et frais a été préparé de la manière suivante : après une première dilution dans le dilueur D1 (INRA82 + 2% jaune d'œuf) et descente à 22°C pendant 10 minutes, le sperme est centrifugé et resuspendu dans le dilueur D2 (D1 + 2,5% (0,34 M) glycérol) à la concentration de  $100.10^6$  spermatozoïdes/ml, puis descendu à 4°C pendant 1h 15. Lors de la congélation, le sperme est ensuite mis en paillette de 0,5 ml et congelé (technique de base A). Cette technique est applicable à 85% des étalons et permet une fertilité quasi-similaire à l'IA de sperme frais en utilisation intra-espèce (variante VIDAMENT et al. 98 de la technique PALMER 83). Dans la technique B, la seule modification est l'addition de 20 mMole de glutamine au dilueur D2. Une paillette contient 50 millions de spermatozoïdes. La décongélation des paillettes se fait au bain-marie à 37°C pendant 30 secondes. Les femelles sont inséminées immédiatement, sans traitement supplémentaire de la semence, que ce soit en sperme frais ou congelé, sauf quand cela est mentionné.

### 1 - Utilisation du sperme congelé de baudet sur des anesses et des juments

En 1999, 2 étalons Baudet du Poitou (BdP) du Haras national de Saintes et 2 étalons BdP de la Sabaud (Association pour la Sauvegarde du Baudet du Poitou) ont été sélectionnés sur leur spermogramme pour la congélation, suivant les critères habituellement utilisés sur les étalons. Puis leur semence a été congelée au Haras national d'Hennebont avec la technique B. Tous les éjaculats (98%) ont eu une mobilité post-décongélation de plus de 35% (seuil utilisé pour la sélection des éjaculats pour les étalons).

Pour tester la fertilité de cette semence, la Sabaud a institué une opération visant à promouvoir l'utilisation de cette technique auprès des éleveurs d'anesses et de juments (remboursement de la majorité des frais en cas d'anesse vide) dans 2 centres de mise en place (asinerie de Dampierre et station de Niort). Quelques anesses et juments hors protocole Sabaud ont été inséminées dans d'autres stations des Haras nationaux.

Les juments et anesses ont reçu 800 millions de spermatozoïdes par IA (soit 16 paillettes). Le nombre de 800 millions avait été choisi pour se conformer au protocole appliqué sur les juments de trait. Le sperme était inséminé dès sa décongélation sans préparation particulière, conformément à la technique utilisée pour le sperme d'étalon. Les résultats de fertilité par cycle ont été de 12% sur 18 anesses (4 cycles positifs /34 cycles), de 0% sur 4 juments de trait (0/12) et de 64% sur 7 juments de selle (7/11).

A partir de cette année-là, les doses de BdP n'ont été proposées dans les stations HN que pour des croisements avec des juments.

En 2001, le sperme congelé de 2 BdP (technique de congélation B) a été utilisé sur 16 juments de trait dans 2 stations de Haras Nationaux. La fertilité par cycle a été de 40% (25 cycles).

**Ainsi du sperme congelé de Baudet de Baudet du Poitou peut être fertile pour des juments mais très peu pour des anesses. Un des éléments du dilueur ou le déficit en plasma séminal pourrait-il interférer avec l'appareil génital de l'anesse ?**

## 2 - Lavage des spermatozoïdes de baudet après décongélation en vue de l'IA chez l'anesse

Pour limiter les effets du dilueur, il a été décidé de descendre à 8 le nombre de paillettes par IA car l'utérus d'une anesse n'est pas plus grand que celui d'une jument de selle et de diluer la dose ou de laver les spermatozoïdes avant l'IA.

En 2000, à l'Asinerie de Dampierre, avant chaque IA, 8 paillettes (soit 400 millions de spermatozoïdes) ont été décongelées à 37°C et mises dans un tube, puis 10 ml de lait ½ écrémé UHT portés à 37°C ont été ajoutés goutte à goutte dans le sperme. L'IA était réalisée aussitôt. Cinq baudets BdP ont été utilisés. Aucune gestation n'a été observée sur 14 cycles, que le sperme provienne de 3 baudets dont la semence avait été congelée en 1999 avec la technique B (11 cycles) ou de 2 baudets dont la semence avait été congelée en 2000 avec la technique A (4 cycles).

Après ce constat, il a été décidé d'inséminer quelques cycles avec 16 paillettes de ces mêmes baudets, sans dilution. Aucune gestation sur 4 cycles d'anesse n'a été obtenue, alors qu'on obtenait une gestation dès l'utilisation du 1<sup>er</sup> cycle d'une jument mulassière.

En 2001, d'autres races d'âne ont aussi été utilisées, au cas où le problème aurait été lié à la race BdP. Deux techniques de lavage post-décongélation ont été comparées. Le sperme d'un nouveau Baudet du Poitou et d'un Grand Ane Noir du Berry a été congelé à Hennebont en 2001 suivant la technique A. La mise en place s'est effectuée sur 6 anesses de race commune x 2 ou 3 cycles, stationnées à l'Asinerie de Dampierre. Soit le sperme était préparé de manière standard pour l'IA (8 paillettes, volume de la dose : 4 ml) (Témoin), soit la décongélation était suivie d'un lavage dans du lait ½ écrémé (22 ml pour une dose de 9 paillettes (1 paillette de plus pour compenser les pertes en spermatozoïdes dues à la centrifugation)), puis d'une centrifugation et d'une resuspension des spermatozoïdes dans un faible volume de lait (4 ml au total) (Essai). A chaque IA, les anesses recevaient donc une dose de 400 millions. Les résultats de fertilité par cycle ont été similaires : respectivement 0/8 (Témoin) et 1/8 (Essai).

Les 6 anesses ont ensuite été inséminées avec du sperme frais dans du lait écrémé ou saillies en liberté. Leur fertilité par cycle a été respectivement de 2/2 après IA et de 4/5 après saillie.

**Les spermatozoïdes de Baudet (Baudet du Poitou ou non) congelés par la technique habituelle et baignant dans le dilueur de congélation perdent leur pouvoir fécondant pour les anesses. L'élimination partielle ou en majorité du dilueur de congélation ne suffit pas à restaurer la fertilité.**

## 3 - Etude de certaines étapes de la congélation sur la fertilité du sperme frais de baudet chez l'anesse

La diminution quasi-totale du pouvoir fécondant du sperme congelé chez l'anesse provient-elle :

- d'éléments néfastes présents dans le dilueur de congélation (lait, jaune d'œuf, glycérol), même en faible quantité ?
- de l'élimination partielle du plasma séminal lors de la centrifugation ?

La fertilité du sperme frais ayant subi quelques étapes de la préparation du sperme en vue de la congélation a été mesurée, afin de déterminer le ou les facteurs incriminés.

En 2002, la semence fraîche de 2 baudets BdP a été préparée à l'Asinerie de Dampierre pour inséminer des doses de 400 millions de spermatozoïdes sous un volume de 4 ml, suivant 4 lots :

- lot 1 : première dilution dans du lait ½ écrémé et IA immédiate
- lot 2 : première dilution dans le lait, descente à 22°C, centrifugation, redilution dans du lait et descente à 4°C pendant 1 h 15, puis IA
- lot 3 : première dilution dans le D1, descente à 22°C, centrifugation, redilution dans du D1 et descente à 4°C pendant 1 h 15, puis IA
- lot 4 : première dilution dans le D1, descente à 22°C, centrifugation, redilution dans du D2 (donc avec du glycérol) et descente à 4°C pendant 1 h 15, puis IA.

Des anesses de races commune et BdP ont été utilisées sur 2 à 3 cycles successifs. Des gestations ont été obtenues dans tous les lots pour les 2 baudets sauf dans le lot 4. La fertilité par cycle pour les 2 étalons a été de 6/7\*\*\* (lot 1), 7/9 (lot 2), 5/8 (lot 3) et 0/8\*\*\* (lot 4) (\*\*\*) différence très significative avec le pourcentage moyen ajusté pour tous les lots,  $P < 0,0001$ ).

**Ces résultats montrent que c'est bien la présence de glycérol qui rend la semence infertile pour les anesses.**

#### **4 - Effet de différents cryoprotecteurs sur la fertilité du sperme frais de baudet chez l'anesse**

Etant donné que dans le processus de préparation du sperme à la congélation, il a été obtenu des gestations après la centrifugation (élimination du plasma séminal), après dilution dans le D1 (contact avec 2% de jaune d'œuf) et après la descente à 4°C, il a été conclu que ces étapes n'étaient pas néfastes à la fertilité. Par contre, la présence de glycérol a empêché toute gestation. L'étape suivante était de trouver d'autres cryoprotecteurs qui pouvaient être moins néfastes pour la fertilité chez l'anesse.

En 2003, la semence fraîche de 3 baudets BdP a été préparée à l'Asinerie de Dampierre pour inséminer des doses de 400 millions de spermatozoïdes sous un volume de 4 ml, suivant 4 lots :

- lot 1 : première dilution dans le D1, descente à 22°C, centrifugation, redilution dans du D1 et descente à 4°C pendant 1 h 15, puis IA (= idem lot 3 de l'expérience précédente)
- lots 2, 3, 4 : première dilution dans le D1, descente à 22°C, centrifugation, redilution dans du D1 additionné de 0,34 M glycérol (lot 2) ou 0,34 M diméthylformamide (lot 3) ou 0,34 M éthylène glycol (lot 4) puis descente à 4°C pendant 1 h 15, puis IA

Des anesses de races commune et BdP ont été utilisées sur 2 à 4 cycles successifs. La fertilité par cycle a été respectivement de 7/11\* (lot 1), 1/12\*\*\* (lot 2), 8/12\* (lot 3) et 5/11 (lot 4) ) (\* différence très significative avec le pourcentage moyen ajusté pour tous les lots,  $*P < 0,03$ ,  $***P < 0,0001$ ).

**Le glycérol est bien la cause de l'infertilité des doses de sperme congelé chez l'anesse. La fertilité est restaurée si le glycérol est remplacé par le diméthylformamide ou l'éthylène glycol.**

#### **5 - Etude de différentes concentrations du glycérol sur la fertilité de la jument**

L'hypothèse a été que le phénomène de « toxicité » du glycérol pourrait exister chez les équins, mais à un degré moindre.

En 2003, à l'I.N.R.A. de Nouzilly, la semence fraîche de 3 étalons a été préparée pour inséminer des doses de 400 millions de spermatozoïdes sous un volume de 4 ml, suivant 4 lots : après une première dilution dans le D1, descente à 22°C, centrifugation, le sperme a été redilué dans du D1 additionné de différentes concentrations de glycérol : 0% (lot 1), 2,5% (lot 2), 4% (lot 3) ou 5,5% (lot 4), avant descente à 4°C pendant 1 h 15, et IA.

Des ponettes ont été utilisées pour cette étude de fertilité. Une seule IA a été réalisée par cycle, 24 h avant l'ovulation.

La fertilité par cycle a été respectivement de 13/15\*\*\* (lot 1), 8/15 (lot 2), 8/15 (lot 3) et 2/15\*\*\* (lot 4) (\*\*\*) différence très significative avec le pourcentage moyen ajusté pour tous les lots,  $P < 0,0001$ ).

**Le glycérol est nettement toxique pour le sperme frais d'étalon et/ou l'utérus de la jument à partir de 5,5%.**

## DISCUSSION

Les différentes études et observations rapportées ici de l'utilisation du sperme de baudet sans plasma séminal et préparé avec 2,5% de glycérol et 2% de jaune d'œuf ont toutes abouti aux mêmes conclusions : ce sperme est très peu fertile pour des anesses, alors qu'il l'est pour des juments. La dilution de la dose dans un volume au moins double de lait ou le lavage des spermatozoïdes dans du lait (par centrifugation, ce qui permet de diminuer de 10 fois l'apport de jaune d'œuf et de glycérol) n'entraîne pas plus de gestations chez l'anesse que la technique sans dilution. Nous avons observé ce phénomène autant sur la race BdP que sur d'autres races d'âne. Ces résultats confirment ceux de TRIMECHE (96a) où celui-ci obtient des gestations avec des juments et des ponettes et pas avec des anesses en utilisant du sperme congelé de BdP avec 4% glycérol, puis décongelé tel quel sans préparation. En revanche, TRIMECHE et al. (97, 98) obtiennent des gestations en rediluant la semence avant sa remise en place, ce que nous ne confirmons pas dans notre étude.

Les études présentées ici sur les effets des différentes étapes de la congélation et des différents cryoprotecteurs se complètent et mettent en évidence que c'est bien la présence de glycérol qui empêche la fécondation chez l'anesse. Ni l'élimination du plasma séminal, ni la présence de jaune d'œuf dans les dilueurs, ni la descente à 4°C n'ont empêché la fécondation.

En sperme frais, des baudets de différentes races sont utilisés en IA de sperme frais dans les Haras nationaux. La technique utilisée est la technique standard : dilution directe à  $20 \cdot 10^6$  spermatozoïdes/ml dans du lait  $\frac{1}{2}$  écrémé avant descente à 4°C et IA de doses de 200 millions. Peu de résultats sont disponibles, car la majorité de la clientèle est composée de juments. Mais dans la station de Lannemezan, en cumulant les résultats de 3 baudets x saison de monte, la fertilité par cycle estimée a été de 45% (n=20) pour les anesses et de 45% (n=73) pour les juments. Donc le sperme de baudet dilué dans du lait et descendu à 4°C garde son pouvoir fécondant pour les deux espèces. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec ceux des études rapportées ici. Ceci est confirmé par les résultats de TRIMECHE (96a) qui, dans une autre expérimentation, obtient des gestations avec des juments, des ponettes et des anesses quand le sperme frais de BdP est préparé dans du lait uniquement.

Ainsi une quantité très faible de glycérol semble diminuer très fortement la fertilité chez les anesses. Cela provient-il d'un effet du glycérol sur les spermatozoïdes ou sur le tractus génital de l'anesse ? Dans la mesure, où, en croisement avec les juments, les spermatozoïdes de baudet gardent leur pouvoir fécondant, on peut supposer qu'ils ne sont pas altérés et que c'est le tractus génital et/ou l'ovocyte de l'anesse qui est (sont) très sensible(s) à cette substance.

Des résultats de grande sensibilité au glycérol ont été rapportés chez les oiseaux, notamment chez la poule (voir revue de HAMMERSTEDT et al, 92). En effet, les spermatozoïdes de coq se congèlent très bien avec le glycérol (mobilité conservée) mais n'entraînent pas de fécondation avec des IA intra-vaginales, à moins de diluer fortement la dose ou de laver les spermatozoïdes puis de les centrifuger, pour éliminer le glycérol. Le glycérol est contraceptif s'il est déposé 5 minutes avant jusqu'à 10 minutes après l'IA. Par contre, les IA dans l'oviducte sont fertiles. D'après ces auteurs, les explications de ce phénomène sont que, sur les spermatozoïdes, le glycérol pourrait affecter la viscosité et l'organisation du cytoplasme (notamment le cytosquelette), la perméabilité membranaire (avec intégration du glycérol dans les membranes), l'attachement des protéines à la surface des spermatozoïdes ainsi que le métabolisme. Il pourrait aussi interagir avec le tractus femelle : changement de l'osmolarité, modifications : du liquide utérin, des mouvements ciliaires, du stockage dans l'oviducte, du relargage des spermatozoïdes et de la reconnaissance de l'ovocyte. Il a été montré que des spermatozoïdes en présence de cellules vaginales de poule entraînent la production d'une fraction protéique particulière que l'on ne retrouve pas si le sperme est additionné de glycérol (DELEE et al, 91).

L'utilisation d'autres cryoprotecteurs tels que le DMA (Diméthylacetamide) a permis d'obtenir des gestations sans avoir à rediluer la semence à la décongélation dans cette espèce (CHALAH et al., 99)

Dans notre étude, la baisse observée de la fertilité du sperme frais d'étalon en présence d'un taux de glycérol de 5,5% est cohérente avec d'autres études concernant ce type de sperme chez l'étalon : cette baisse a été observée lorsque le sperme est dilué directement dans des dilueurs (donc avec plasma séminal) contenant

5,3 % (PICKETT et al., 75) et 7% de glycérol (DEMICK et al., 76) par rapport aux mêmes dilueurs sans glycérol. Dans les mêmes conditions mais après conservation 24 h à 4°C, Bedford et al. 95 mesurent une baisse de fertilité avec 4% de glycérol par rapport à 0%.

Les résultats de fertilité sur juments du sperme d'étalon congelé avec la technique A (2,5% glycérol) donnent des résultats très satisfaisants de fertilité sur le terrain en France (VIDAMENT et al., 1998). Les résultats de fertilité publiés dans la littérature suite à l'utilisation des autres techniques de congélation sont en général en-dessous de ces résultats (MAGISTRINI & VIDAMENT, 99). Dans la plupart des autres techniques, le taux de glycérol utilisé est de 4 à 5% (MARTIN et al. 79, COCHRAN et al. 84, ALVARENGA et al., 00, GRAHAM et al., 00). Pour expliquer cet écart de fertilité, une des hypothèses est que le taux de glycérol utilisé est plus (trop ?) élevé dans les autres techniques. Nos résultats montrent qu'effectivement la fertilité est plus élevée sans glycérol, qu'elle reste d'un niveau acceptable avec 2,5 et 4% de glycérol, mais que, par contre, la fertilité diminue significativement avec 5,5%.

Le glycérol altérerait-il plutôt les spermatozoïdes d'étalon ou plutôt le tractus génital ou l'ovocyte de la jument ? L'augmentation de la concentration en glycérol dans le dilueur, sans congélation, (de 0 à 2, 4, 6, 8 et 9%) entraîne des effets négatifs sur les spermatozoïdes frais d'étalon pour la mobilité, la vitalité, l'état des mitochondries et de l'acrosome (BALL & Vo, 01). Nous avons observé ce phénomène au laboratoire. Il a été décrit dans d'autres pays, lors de l'utilisation de sperme congelé chez la jument, des réactions inflammatoires assez prononcées (KOTILAINEN et al., 1994). Peut-être pourraient-elles être dues à un taux élevé de glycérol ? Dans notre expérimentation sur les juments, des échographies d'utérus réalisées juste avant l'IA, le jour de l'ovulation (J0), puis à J2, J4 et J8 n'ont pas permis de déceler d'effet particulier de la concentration croissante en glycérol sur la taille des cornes, sur l'aspect échographique de la muqueuse et sur la présence ou l'absence de liquide dans la lumière utérine.

Il est donc important de trouver pour les équins un taux de glycérol qui représente un compromis entre les effets de cryopréservation et les effets de toxicité (AMANN, 91). Pour les paramètres de mobilité des spermatozoïdes, l'optimum de concentration dans un dilueur lacté est difficile à déterminer mais pourrait se situer aux environs de 3%. (VIDAMENT et al, 2000). BURNS et al. (95) montrent que c'est le passage de 1 à 2% qui est le plus rentable en terme de cryoprotection. En conclusion, il ne nous semble donc pas du tout nécessaire d'aller au-delà de 2 à 3%.

Dans l'étude sur l'effet de différents cryoprotecteurs sur le sperme frais de baudet, nous avons montré que le diméthylformamide et l'éthylène glycol permettent de maintenir le pouvoir fécondant des spermatozoïdes chez l'anesse. Le diméthylformamide et l'éthylène glycol sont des cryoprotecteurs utilisables sur le sperme d'étalon (ALVARENGA et al. 00, GRAHAM et al. 00, MANTOVANI et al. 02). De même, dans notre laboratoire, nous avons montré que le diméthylformamide permettait de maintenir la fertilité post-décongélation chez la jument quand il est utilisé au taux de 2,2% (VIDAMENT et al., 2002). Nous confirmons que chez l'anesse, cela pourrait être le cas à la concentration de 2,5%.

Pour le développement d'une nouvelle technique de congélation chez les asins, il nous reste :

1. à tester le diméthylformamide et l'éthylène glycol sur la congélabilité des spermatozoïdes de baudet (actuellement en cours)
2. à inséminer des anesses avec le sperme congelé avec le cryoprotecteur choisi pour vérifier que la fertilité est bien maintenue (saison 2004)

## CONCLUSION

Nous avons confirmé que le glycérol est un facteur limitant pour la fertilité du sperme congelé chez les asins et les équins. Chez les asins, les doses ne doivent pas contenir de glycérol. Chez les équins, le taux ne doit pas dépasser 4%. Chez les asins, nous avons montré que l'éthylène glycol ou le diméthylformamide pourraient être des cryoprotecteurs de choix, il reste à finir de le démontrer.

## IMPACT ECONOMIQUE

Ce travail devrait permettre la mise au point d'une technique de congélation fertile chez les asins en modifiant le cryoprotecteur utilisé, donc une conservation et une meilleure diffusion du patrimoine génétique des différentes races asines, dont les plus menacées.

D'autre part, ces études mettent en évidence que le taux de 4% de glycérol dans le dilueur ne doit pas être dépassé lors de la production de doses de sperme congelé chez les équins, afin de préserver la fertilité des doses produites. Si cette recommandation était largement appliquée, elle contribuerait à une meilleure fertilité des doses proposées sur le marché.

## REMERCIEMENTS

Aux agents et vétérinaires de l'asinerie et des autres stations HN,  
A T. CLAUSSE, M. MAGISTRINI, P. ECOT, J.P. BRILLARD, E. BLESBOIS, C. de LARTIGUE, G. DUCHAMP, N. MONTAIGNE.

Le financement des expérimentations a été réalisé en partie par le Bureau des Ressources Génétiques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cochran JD, Amann RP, Froman DP, Pickett, BW 1984. Effects of Centrifugation, Glycerol Level, Cooling to 5°C, Freezing Rate and Thawing Rate on the Post-Thaw Motility of Equine Sperm. *Theriogenology*, 22: 25-38.
- Burns PJ, Reasner DS. 1995. Computerized analysis of sperm motion: effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. *J. Eq. Vet. Sc.* 15, 377-380.
- Amann RP. 1991. Pourquoi les spermatozoïdes de toutes les espèces ne donnent pas un taux élevé de fertilité après congélation ? *Contracept. Fertil. Sex.* 19, 10, 846-854.
- Alvarenga MA, Graham JK, Keith SL, Landim-Alvarenga FC, Squires EL. 2000a Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. 14<sup>th</sup> ICAR 2000, Abstracts, 2: 157.
- Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM 2000b. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethyleneglycol using two packaging systems. *Equine Vet. J.* 32 : 541-545.
- Ball BA, Vo A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *Journal Andrology*, 72: 1061-1069.
- Bedford SJ, Jasko DJ, Graham JK, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. 1995. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 43:955-967.
- Burns PJ, Reasner DS. 1995. Computerized analysis of sperm motion: effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. *J. Eq. Vet. Sc.* 15, 377-380.
- Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP. 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*. 39:185-91.
- Delee JA, Harris GC Jr, Macy LB. 1991. Research note: the in vitro responses of vaginal tissue and chicken spermatozoa to glycerol. *Poult Sci.* Jun;70(6):1441-3.
- Demick DS, Voss JL, Pickett BW. 1976. Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. *J. Animal Science*, 43: 633-637.
- Graham JK. 2000. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. 14<sup>th</sup> ICAR 2000, Abstracts, 2: 307.
- Hammerstedt RH, Graham JK. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29:26-38.
- Magistrini M, Vidament M, 1999. L'insémination artificielle équine : des technologies à géométrie variable. 25<sup>ème</sup> Journée d'Etude de la Recherche Equine, 117-128.

- Mantovani R, Rora A, Falomo ME, Bailoni L, Vincenti L. 2002. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa : semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reprod. Nutr Dev.* 42 : 217-226
- Martin JC, Klug E, Gunzel A. 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 27, 47-51.
- Pace MM, Sullivan JJ. 1975. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *J Reprod Fert Suppl* 23 : 115-121
- Palmer E. 1983. L'insémination artificielle des juments: bilan de cinq années de recherches et d'utilisation pratique. 9<sup>ème</sup> journée de la recherche équine : 90-109.
- Piao S, Wang Y. 1988. A study of the technique of freezing concentrated semen of horses (donkeys) and the aspect of insemination. In: Proc. 11th Int. Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, 3, Abst 286
- Pickett BW, Sullivan JJ, Byers WW, Pace MM, Remmenga EE 1975. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fert. and Ster.*, 26 (2), 167-174.
- Trimeche, A. Etude sur la fertilité et la cryopréservation du sperme du baudet du Poitou. Thèse d'Université de Rennes 1, 1996a.
- Trimeche A, Renard P, Tainturier D, 1997. Influence de la dilution post-décongélation du glycérol sur la mobilité et la fertilité du sperme du Baudet du Poitou. 23e journée de la recherche équine : 89-95.
- Trimeche, A., Renard, P., Le Lannou, D., Barrière, P., Tainturier, D. 1996b. Improvement of motility of post-thaw poitou jackass sperm using glutamine. *Theriogenology* 45, 1015-1027.
- Trimeche A, Renard P, Tainturier D. 1998. A procedure for poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology* 50, 793-806.
- Vidament M, Ecot P., Dupéré AM, Noue P, Bourgeois C, Couty C, Yvon JM, Magistrini M. & Palmer E, 1998. La semence congelée d'étalon : améliorations récentes. 24<sup>ème</sup> journée de la recherche équine : 25-38 .
- Vidament M, Yvon JM, Couty I, Arnaud G, Nguekam-Feugang J, Noue P, Cottron S, Le Tellier A, Noel F, Palmer E, Magistrini M. 2001. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim Reprod Sci* (3-4):201-218
- Vidament M, Daire C, Yvon JM, Doligez P, Bruneau B, Magistrini M, Ecot P. 2002. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology, Equine Reproduction VIII*, 58: 249-251.