



**44<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Équine**  
**Jeudi 15 mars 2018**

## **Amélioration des biotechnologies de la reproduction dans l'espèce asine : congélation de la semence, insémination artificielle, collecte et maturation *in vitro* d'ovocytes**

M. Halgrain<sup>1</sup>, I. Couty<sup>1</sup>, F. Reigner<sup>2</sup>, C. Douet<sup>1</sup>, P. Barrière<sup>2</sup>, T. Blard<sup>2</sup>, T. Gascogne<sup>2</sup>, Y. Gaudé<sup>2</sup>, A. Garot<sup>3</sup>, G. Goudet<sup>1</sup>, M. Magistrini<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly, France

<sup>2</sup> INRA, Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière, 37380 Nouzilly, France

<sup>3</sup> IFCE, Direction Appui à la Filière et Animation des Territoires, 383 Avenue Emile Gounin, CS 70380, 37400 Amboise, France

### **Résumé**

Aujourd'hui, les sept races d'ânes françaises sont menacées d'extinction. Dans le cadre du projet « Infrastructure CRB-Anim », nos travaux se sont portés sur la conservation du matériel génétique de cette espèce. Notre laboratoire a ainsi travaillé sur la mise au point d'une technique de congélation efficace de la semence de baudet afin d'assurer des taux de gestation acceptables pour les éleveurs (fertilité/cycle actuelle < 15%). Les objectifs ont donc été 1) de tester les milieux mis au point et brevetés chez le cheval; 2) d'étudier l'effet de la descente de température lors de la congélation sur la qualité de la semence. Ainsi, nous avons démontré que les spermatozoïdes d'ânes étaient plus sensibles que ceux de l'étalon et qu'ils nécessitaient donc une protection supplémentaire pouvant être apportée par du plasma de jaune d'œuf (JO) ou des liposomes de phospholipides (PL) de JO. La voie femelle a également été explorée : la physiologie et la réactivité du col de l'utérus de l'ânesse lors de l'IA ont été évaluées et une technique de collecte d'ovocytes par ponction folliculaire transvaginale sous échographie sur ânesse tranquilisée et de maturation *in vitro* des ovocytes a été mise au point.

**Mots clés : Congélation, semence, milieux, utérus, ovocytes.**

### **Summary**

Today, the seven donkey breeds in France are endangered. In the CRB-Anim project, our studies focus on the conservation of genetic material in this species. Our lab has worked on the development of a freezing method for donkey semen in order to obtain reasonable pregnancy rates (at present, fertility per cycle <15%). The aims were 1) to test extenders developed in the stallion and 2) to study the effect of decrease in temperature in the cryopreservation procedure, on semen quality. Thus, we demonstrated that donkey spermatozoa need more protection than stallion spermatozoa that can be improved by the addition of sterilized egg yolk plasma or by liposomes of egg yolk phospholipids. Moreover, some female specificities were studied: the physiology and the reactivity of jenny cervix have been evaluated throughout insemination and a technique of oocyte collection using transvaginale ultrasound guided follicular puncture on standing jenny and oocyte *in vitro* maturation has been developed.

**Key-words: Freezing, semen, extenders, uterus, oocytes.**



## Introduction

A l'heure actuelle, la plupart des races d'ânes sauvages telles que l'âne sauvage d'Asie (*Equus asinus hemionus*) ou celui d'Afrique (*Equus asinus africanus*) sont en voie d'extinction. De nombreuses races d'ânes domestiques sont également menacées. En effet, en France, les sept races que nous comptons sont en cours d'extinction avec moins de 100 femelles à la reproduction en 2016 et un nombre de naissances par an qui ne cesse de diminuer (924 naissances en 2012 vs 538 en 2016) (d'après IFCE, 2016). La préservation de ce patrimoine génétique est donc aujourd'hui primordiale et passe notamment par la cryoconservation de la semence, des ovocytes ou des embryons via la mise en place de projet comme celui de l'infrastructure CRB-Anim. Ce dernier vise à lever les verrous technologiques des techniques de cryopréservation afin d'enrichir les collections de la Cryobanque Nationale.

Actuellement, il n'existe pas de méthode efficace pour congeler la semence asine permettant d'assurer des taux de gestation acceptables pour les éleveurs (fertilité / cycle actuelle <15%). Le but de nos travaux, dans un premier temps, a donc été la mise au point d'une méthode de congélation adaptée pour les spermatozoïdes de baudet. En effet, la cryoconservation de la semence s'accompagne de différents phénomènes assimilables à des stress, tels que la descente de température (« le cold shock »), la déshydratation ou bien encore la formation de cristaux. Ces stress induisent ensuite des dommages cellulaires irréversibles (perturbation de la membrane plasmique, altération de l'acrosome et des mitochondries, modification du contenu lipidique, etc...) qui vont affecter le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. La composition du milieu ainsi que la méthode de congélation doivent donc être les plus protectrices possible afin d'assurer une fertilité optimale après congélation. La réussite de l'insémination de semence congelée (IAC) est donc conditionnée par ces facteurs.

En raison des particularités du tractus génital de l'ânesse et des difficultés rencontrées lors de l'insémination artificielle, nous avons développé une nouvelle technique d'insémination. De plus, pour pallier aux problèmes de fertilité rencontrés après IAC, une technique de collecte d'ovocytes par ponction folliculaire transvaginale sous échographie sur ânesse tranquilisée debout et de maturation *in vitro* des ovocytes a été mise au point. Ces techniques sont les premières étapes pour la congélation du patrimoine génétique femelle. Nos travaux se sont donc articulés autour de deux grands axes présentés ci-dessous.

### 1 L'optimisation des milieux de conservation de la semence

La première étape a consisté à tester les milieux Inra96 et InraFreeze (INF), mis au point et brevetés chez le cheval, sur les spermatozoïdes de baudets. Les paramètres de mobilité après congélation dans le milieu InraFreeze étaient très encourageants et équivalents à ceux obtenus chez l'étalon. Cependant, les premières données de fertilité ont été décevantes (fertilité / cycle : 14%, 1/7). Nous avons alors analysé les effets des différents composants du milieu de congélation InraFreeze (INF = Inra96 + 2% de plasma de JO + 2,5% de glycérol) et ainsi évalué leur protection respective.

#### 1.1 Le plasma de jaune d'œuf : un « cryoprotecteur » déterminant

##### 1.1.1 Matériel et méthodes

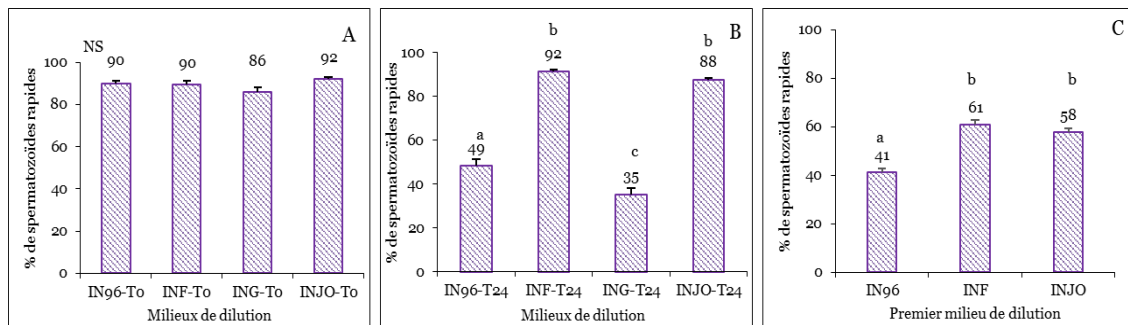
Les premières analyses ont porté sur de la semence fraîche conservée à 4°C pendant 24h. La semence de deux baudets a été collectée et diluée selon le protocole INRA-Haras Nationaux. Lors du refroidissement, la descente de température utilisée dans le protocole de congélation INRA-Haras Nationaux a été appliquée. Chaque éjaculat a été dilué soit dans le milieu Inra96 seul (IN96), dans l'Inra96 + 2% de plasma de JO (p/v) (INJO), dans l'Inra96 + 2,5% de glycérol (ING) ou dans l'InraFreeze (INF). La semence a ensuite été analysée par analyse automatisée de mobilité (IVOS, Hamilton Thorne) et par cytométrie en flux (Guava EasyCyte) à l'aide des tests d'intégrité membranaire (sondes CFDA-IP) et d'activité mitochondriale (kit EK2, IMV-Technologies, L'Aigle) immédiatement après la collecte (TO) et après 24h de conservation à 4°C (T24).

##### 1.1.2 Résultats

Afin de simplifier la présentation des résultats, seuls ceux concernant le pourcentage de spermatozoïdes rapides (%RAP, pourcentage de spermatozoïdes dont la vitesse moyenne est supérieure à 40µm/sec) sont représentés dans les figures ci-dessous. Ce critère a été utilisé pendant de nombreuses années par les Haras Nationaux lors de la sélection des éjaculats des étalons nationaux.



Figure I: Pourcentage de spermatozoïdes rapides à T0 (après collecte) (A) et T24h (24h de conservation à 4°C) (B) et à la décongélation (C) pour chacun des milieux : IN96 = INRA96, INF = InraFreeze, ING = INRA96 + glycérol (2,5%) et INJO = INRA96 + plasma de jaune d'œuf (2% p/v) (a,b,c :  $p < 0,05$ ).  
 Figure I: Percentage of rapids spermatozoa at T0 (after semen collection) (A) and T24h (24h after storage at 4°C) (B) and after thawing (C) for each of the extenders: IN96 = INRA96, INF = InraFreeze, ING = INRA96 + glycérol (2,5%) and INJO = INRA96 + egg yolk plasma (2% p/v) (a,b,c :  $p < 0,05$ ).



Aucune différence n'est observée au moment de la dilution (T0) entre chacun des lots. Cependant, après conservation pendant 24h à 4°C (T24), les lots INJO et INF sont nettement supérieurs aux lots IN96 et ING. Par contre, le lot ING apporte la moins bonne protection ; il semble donc que le glycérol ait un effet négatif sur la mobilité des spermatozoïdes de baudets et que cet effet soit supprimé en présence de plasma de JO (Figure IB : INF-T24 > ING-T24 ;  $p < 0,05$ ). Les résultats obtenus après analyses de l'intégrité membranaire et de l'activité mitochondriale (non présentés dans cet article) montrent les mêmes différences entre milieux. La figure I-C montre que si le milieu de dilution à la collecte contient du plasma de JO (INF et INJO), la mobilité à la décongélation est significativement améliorée ( $p < 0,05$ ).

L'ensemble des résultats obtenus nous a alors incités à utiliser le milieu INRA96 + 2% de plasma de JO (INJO) pendant la descente de température à 4°C et à conserver le milieu InraFreeze pour la congélation proprement dite.

## 1.2 Les liposomes de phospholipides de jaune d'œuf : une alternative à considérer

Chez l'étalon, Pillet *et al.*, en 2012, ont démontré que des liposomes de phospholipides (PL) de JO apportaient une protection équivalente au plasma de JO. Les résultats obtenus chez le baudet, tant lors de conservation à 4°C qu'après congélation-décongélation nous ont donc incité à tester l'effet de liposomes de PL. Cette piste est aujourd'hui envisagée et des travaux sont en cours au sein de notre laboratoire afin d'évaluer leur impact sur la protection des spermatozoïdes de baudets que ce soit lors de la conservation à 4°C ou lors de la congélation.

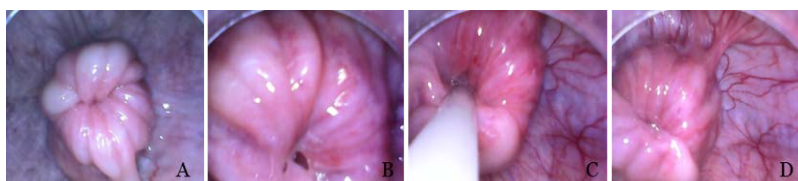
## 2 La voie femelle

### 2.1 Visualisation du tractus femelle à l'aide d'un nouvel outil : l'AlphaVision

L'AlphaVision est un outil d'aide à l'insémination artificielle (IA) conçu à l'origine pour l'espèce bovine et commercialisé par la société IMV-Technologies. Il permet, à l'aide d'une caméra à son extrémité, de visualiser le col de l'utérus de la femelle. Nous travaillons actuellement sur son adaptation pour la jument et l'ânesse (en collaboration avec la société concernée). Grâce à cet appareil, nous avons pu optimiser le geste d'insémination en prenant en compte les particularités anatomiques et physiologiques du tractus génital de l'ânesse et limiter ainsi les éventuels traumatismes du col de l'utérus au moment de l'IA.

Figure II: Photos de col d'utérus d'ânesses obtenues avec l'AlphaVision, © INRA, 2017, A, B : avant IA, C : lors de l'IA, D: après IA

Figure II: Pictures of jennies cervix obtained with AlphaVision, © INRA, 2017, A, B: before AI, C: during AI, D: after AI



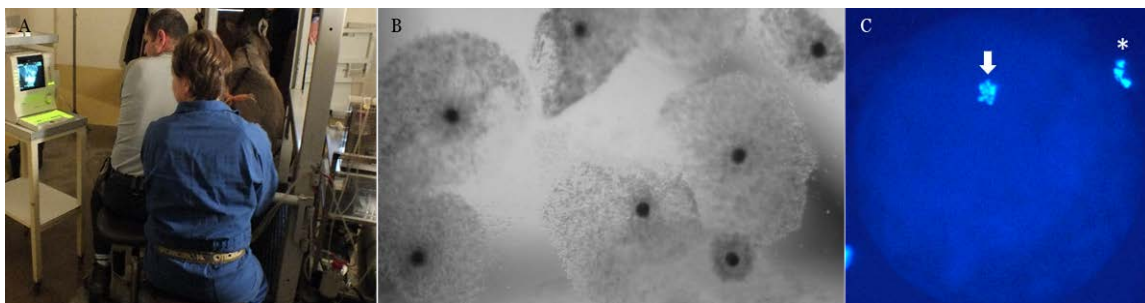


## 2.2 Collecte *in vivo* et maturation *in vitro* des ovocytes d'ânesses

Le personnel de l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière a mis au point pour la première fois au monde une technique de collecte d'ovocytes par ponction folliculaire transvaginale sous échographie sur ânesse tranquilisée debout, en accord avec le comité d'éthique en expérimentation animale (Figure III A). Depuis 3 ans, cette technique est utilisée en routine dans notre laboratoire. Nous avons collecté en moyenne 4,2 ovocytes par ânesse en 2015 (92 ovocytes collectés au cours de 22 ponctions), 3,3 ovocytes par ânesse en 2016 (39 ovocytes sur 12 ponctions) et 6,1 ovocytes par ânesse en 2017 (61 ovocytes sur 10 ponctions) (Figure III B). Les rendements de collecte d'ovocyte par follicule sont passés de 48% en 2015 à 55% en 2017. Ensuite, le personnel de l'unité de recherche de Physiologie de la Reproduction et des Comportements a adapté une technique de maturation *in vitro* des ovocytes équins aux ovocytes d'ânesses, permettant d'étudier pour la première fois la chronologie de la maturation des ovocytes d'ânesses. Ils ont ainsi mis au point une technique de maturation *in vitro* des ovocytes d'ânesses permettant d'obtenir 44% d'ovocytes matures après 34 heures de culture *in vitro* (Figure III C).

Figure III: A) ponction folliculaire transvaginale sous échographie sur ânesse tranquilisée debout; B) 7 ovocytes d'ânesses entourés de leurs cellules du cumulus (x50); C) un ovocyte d'ânesse mature avec des chromosomes en métaphase II (flèche) et un globule polaire (\*) (x400).

Figure III: A) transvaginale ultrasound guided follicular puncture on standing jenny; B) 7 donkey oocytes surrounded by their cumulus cells (x50); C) a donkey mature oocyte containing chromosomes in metaphase II (arrow) and a polar body (\*) (x400).



## 3 Conclusion

Nos résultats ont mis en évidence les propriétés cryoprotectrices du plasma de JO. Il semble également que le plasma de JO soit capable d'inhiber l'effet néfaste du glycérol (Figures IB et IC). Il serait alors intéressant de mieux cerner les mécanismes qui interviennent lors de cette interaction pour éventuellement optimiser cette protection. Par ailleurs, l'AlphaVision a permis d'optimiser le geste d'insémination chez l'ânesse. Enfin, nous avons développé une technique de collecte d'ovocytes sur ânesses par ponction folliculaire sous échographie et de maturation *in vitro* des ovocytes, deux étapes cruciales dans la conservation du patrimoine génétique femelle des espèces en cours d'extinction.

## Remerciements

Nous remercions l'infrastructure « Investissements d'avenir CRB-Anim » (Centre de Ressources Biologiques pour les Animaux Domestiques, ANR-11-INBS-0003,) pour les financements de l'ensemble des expérimentations ainsi que le CDD de Maeva Halgrain. Nous remercions également les associations nationales de races d'ânes (Grand Noir du Berry, Baudet du Poitou) et en particulier, les associations de l'Ane Normand et de l'Ane du Cotentin ainsi que l'IFCE. Enfin, nos remerciements s'adressent à la société IMV-Technologies pour le prêt de l'AlphaVision ainsi que pour la production de plasma de jaune d'œuf stérile.

## Références

Haras Nationaux, 2014. Insémination artificielle équine, 258p.

IFCE-SIRE, Haras Nationaux, 2016. Stats&Cartes. <http://statscheval.haras-nationaux.fr/core/tabbord.php>

Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M., 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 77, 268-279