

Actualité en technologie de la semence d'étalon : mise au point d'un milieu pour la cryoconservation de la semence équine et mécanismes de cryoprotection impliqués

Par :

- E. PILLET^{1,5}, F. MEA-BATELLIER², C. LABBE³, G. DUCHAMP⁴, S. DESHERCES⁵, E. SCHMITT⁵, M. MAGISTRINI¹
- Avec la collaboration technique d'I. COUTY¹, B. BRUNEAU⁴, Y. GAUDE⁴, JM. YVON⁴
- ¹ INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France ; CNRS, F-37380 Nouzilly, France ; Université de Tours, F-37041 Tours, France ; Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France
- ² IFCE, Haras National de Blois, BP 14309, 41043 Blois
- ³ INRA, Unité SCRIBE, Campus de Beaulieu, 35000 Rennes
- ⁴ INRA, Unité PAO, 37380 Nouzilly
- ⁵ IMV-Technologies, 61300 Saint Ouen sur Iton

Résumé

La composition du milieu de congélation est un facteur clef pour la réussite de l'insémination artificielle de semence congelée. Les objectifs de cette étude ont donc été 1) de mettre au point un milieu prêt à l'emploi et de composition optimisée; 2) d'acquérir des connaissances en cryobiologie des gamètes. Ainsi, nous avons démontré que le milieu INRA96® comparé au milieu INRA82, tous deux supplémentés de 2% de jaune d'œuf (JO) et de 2,5% de glycérol, améliore significativement la fertilité (71% de fertilité/cycle vs 40%, $p < 0,01$, $n = 84$ cycles). Dans un second temps, nous avons montré que le pouvoir cryoprotecteur de la fraction plasma de JO stérilisée est équivalent à celui du JO entier (69% de fertilité/cycle vs 60%, $p > 0,05$, $n = 70$ cycles). L'ensemble de ces résultats a permis la mise au point d'un milieu prêt à l'emploi, l'INRA-Freeze® commercialisé par la société IMV-Technologies. Dans le but d'optimiser le milieu et d'identifier précisément les molécules impliquées dans la cryoprotection, nous avons testé *in vivo* le pouvoir cryoprotecteur de liposomes composés de phospholipides de JO. Les résultats encourageants obtenus (55% de fertilité/cycle avec les liposomes vs 68% avec le JO, $p > 0,05$, $n = 80$ cycles) restent à être améliorés.

Mots clés : congélation / semence / milieu INRA96® / milieu INRA Freeze/ fertilité / étalon

Summary

The composition of the freezing extender is a key factor for the success of artificial insemination of frozen semen. The aims of this study were 1) to develop a freezing extender of optimized composition and ready to use; 2) to acquire knowledge in gametes' cryobiology. We showed that INRA96® extender compared to INRA82, both supplemented with 2% egg yolk (EY) and 2,5% glycerol improved significantly the fertility rate (fertility/cycle of 71% versus 40%, $p < 0,01$, $n = 84$ cycles). Then, we demonstrated that the cryoprotection afforded by the sterilized plasma fraction of EY was similar to the one of whole EY (fertility/cycle of 69% versus 60%, $p > 0,05$, $n = 70$ cycles). All these results conducted to a ready to use extender, named INRA-Freeze®, commercialized by IMV-Technologies. In order to optimize the extender and to precisely identify the molecules implicated in the cryoprotection, we tested *in vivo* the cryoprotective ability of liposomes composed of EY phospholipids. The encouraging results we got (fertility/cycle of 55% with liposomes versus 68% with EY, $p > 0,5$, $n = 80$ cycles) remain to be improved.

Key-words : freezing / semen / INRA96® extender / INRA Freeze extender/ fertility / stallion

Introduction

Tout éleveur possédant un étalon de haute valeur génétique souhaite valoriser son animal à la fois par une carrière sportive et par une carrière de reproducteur. Cette double valorisation est possible grâce à la technique d'insémination artificielle de semence congelée (IAC). En effet, cette biotechnologie est une technique de reproduction à fort potentiel en élevage et elle est particulièrement adaptée pour la conservation de longue durée ou le transport de la semence. Cependant, les taux de fertilité en IAC, dans l'espèce équine, ont toujours été inférieurs à ceux de l'Insémination Artificielle de semence Fraîche (IAF).

En conditions de terrain, en France, les taux de fertilité par cycle en IAC sont de 45-48%, comparés à 57-59% en IAF. La cryoconservation s'accompagne en effet de différents phénomènes assimilables à des stress, tels que la descente de température (« le cold shock »), la déshydratation, la formation des cristaux. Ces stress induisent des dommages cellulaires (perturbation de la membrane plasmique, altération de l'acrosome, modification du contenu en cholestérol, dommages oxydatifs, etc..) qui vont affecter le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Le milieu de congélation est essentiel pour protéger les spermatozoïdes lors du processus de congélation et assurer une fertilité optimale après insémination. Ainsi la réussite de l'IAC dépend en grande partie du milieu de congélation dont les composants interviennent dans la protection des spermatozoïdes contre les dommages induits.

Récemment dans le cadre d'un partenariat CIFRE, un programme de thèse a été conduit entre l'INRA et la société IMV-Technologies. Les objectifs du projet ont été 1) d'optimiser la composition et la praticité du milieu de congélation dans l'espèce équine, 2) d'acquérir des connaissances en cryobiologie.

En effet la plupart des milieux de congélation, dont ceux utilisés actuellement dans les laboratoires de congélation des Haras Nationaux et de certains haras privés, doivent être en totalité ou en partie préparés par l'utilisateur. De plus, la présence de produits d'origine animale (lait et/ou jaune d'œuf) dans ces milieux présente potentiellement des risques sanitaires et impose par conséquent un certain nombre de contraintes lors de l'exportation de semence congelée.

Pour mener à bien ce projet nous avons suivi 3 grandes étapes présentées ci-dessous. Lors de chacune de ces trois étapes, des études *in vitro* portant sur différentes caractéristiques des spermatozoïdes (mobilité, intégrité de la membrane plasmique, de l'acrosome...) ont été menées en parallèle des études *in vivo*. Nous ne développerons ci-dessous que les résultats obtenus lors des études *in vivo*.

1. Etape 1 : le milieu INRA96[®] est une excellente base de milieu de congélation.

La première étape a consisté à s'affranchir du lait dans la composition du milieu de congélation. Pour cela nous avons comparé le milieu INRA82, utilisé en routine dans notre laboratoire ainsi que dans les laboratoires de congélation des Haras Nationaux, au milieu INRA96[®], tous deux supplémentés de jaune d'œuf (JO) et de glycérol (G) (Pillet *et al.*, 2008a, 2008b). En effet, le milieu INRA96[®] ne contient que la fraction caséines du lait alors que le milieu INRA82 contient du lait écrémé UHT.

1.1. Matériel et Méthodes

La semence de trois étalons poney welsh du troupeau expérimental de l'INRA de Nouzilly a été collectée et congelée selon le protocole INRA-Haras Nationaux (7 éjaculats/étalon). Chaque éjaculat a été congelé soit dans le milieu INRA82+2%JO+2,5%G soit dans le milieu INRA96[®]+ 2%JO+ 2,5%G.

Seuls les éjaculats présentant plus de 35% de spermatozoïdes rapides (vitesse > 40 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) à la décongélation (37°C, 30s) pour chacun des 2 milieux ont été conservés pour insémination.

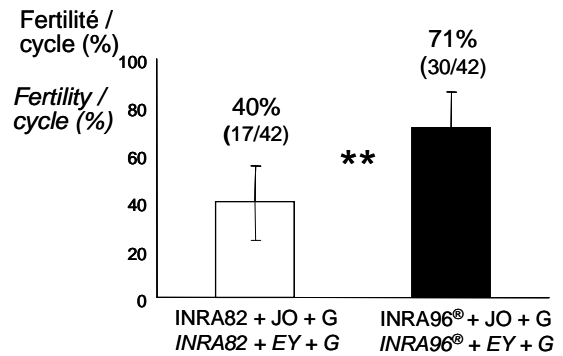
Le protocole de suivi et d'insémination des juments a été le suivant. Quand le follicule en croissance a atteint un diamètre supérieur à 33 mm, l'ovulation a été induite à 10h par 15 mg de CEG (extrait hypophysaire équin : Crude Equine Gonadotropin) (Jour J0) et l'insémination a été réalisée le lendemain à 16h (J1), soit 30 heures après l'induction de l'ovulation. L'intervalle insémination-ovulation a ainsi été de 6 heures. La fertilité par cycle est exprimée en pourcentage et correspond au nombre de cycles positifs/nombre total de cycles inséminés.

1.2. Résultats

Les résultats de l'étude *in vivo* sont présentés Figure I et montrent que la fertilité par cycle a été significativement améliorée lorsque la semence a été congelée dans le milieu INRA96[®]+JO+G comparé au milieu INRA82+JO+G (71% *versus* 40%, $p < 0,01$). L'amélioration de la fertilité après congélation de la semence dans le milieu INRA96[®]+JO+G a été observée pour chacun des 3 étalons.

Figure I : Fertilité par cycle après insémination de semence congelée dans les milieux INRA82 ou INRA96®, supplémentés de jaune d'œuf (2%) et de glycérol (2,5%) ; (3 étalons, 7 éjaculats/étalon). Légende - JO : jaune d'œuf (2%) ; G : glycérol (2,5%) ; ** : $p < 0,1$

Figure I: Per-cycle pregnancy rates after artificial insemination with semen frozen in INRA82 or INRA96® extenders, both supplemented with egg yolk (2%) and glycerol (2,5%) (3 stallions, 7 ejaculates/stallion). Legend - EY: egg yolk (2%); G: glycerol (2,5%); **: $p < 0,1$



2. Etape 2 : le plasma de jaune d'œuf peut remplacer le jaune d'œuf

L'objectif de la seconde étape a été de remplacer le jaune d'œuf entier par une fraction de jaune d'œuf. Notre choix s'est porté sur le plasma du jaune d'œuf qui contient l'essentiel des phospholipides de l'œuf impliqués, selon la littérature, dans la cryoprotection et qui, de plus, peut être stérilisé (Pillet et al., 2009 ; 2010).

2.1. Matériel et Méthodes

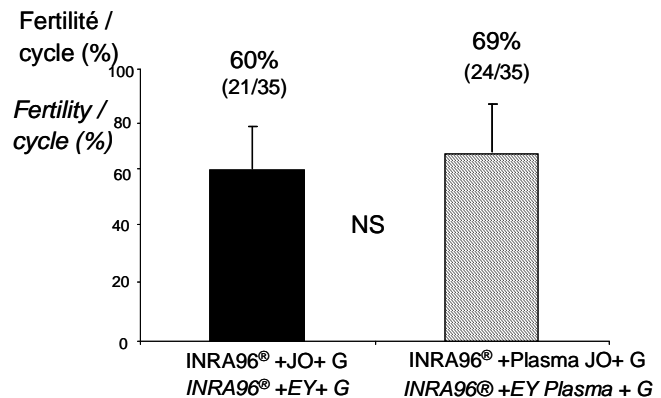
Les protocoles de congélation, de décongélation et de sélection de la semence, ainsi que de suivi et d'insémination des juments ont été strictement identiques à ceux de l'étape 1 ; Seuls les milieux de congélation ont été différents. Ainsi, nous avons comparé les milieux INRA96® + 2%JO + 2,5%G et INRA96® + 4% plasma de JO stérilisé + 2,5%G.

2.2. Résultats

Les données de fertilité présentées Figure II montrent que la protection apportée par le jaune d'œuf entier ou le plasma de jaune d'œuf stérilisé n'a pas été significativement différente (60% versus 69%, $p > 0,05$).

Figure II : Fertilité par cycle après insémination de semence congelée dans les milieux INRA96® supplémentés, soit de jaune d'œuf soit de plasma de jaune d'œuf gamma-irradié, et de glycérol (2 étalons, 8 éjaculats/étalon). Légende - JO : jaune d'œuf (2%) ; G : glycérol (2,5%) ; Plasma JO: plasma de jaune d'œuf stérilisé (2%, p/v) ; NS : $p > 0,5$

Figure II: Per-cycle pregnancy rates after artificial insemination with semen frozen in INRA96® extenders supplemented with, either egg yolk or gamma-radiated egg yolk plasma, and glycerol (2 stallions, 8 ejaculates/stallion). Legends- EY: egg yolk (2%); G: glycerol (2,5%); EY plasma: sterilized egg yolk plasma (2%, p/v) ; NS : $p > 0,5$



3. Etape 3 : les liposomes de phospholipides, une piste prometteuse

La troisième étape a permis de préciser quelles sont les molécules présentes dans le jaune d'œuf ou le plasma de jaune d'œuf qui sont directement impliquées dans la protection des spermatozoïdes lors de la congélation. Nous avons choisi d'apporter dans le milieu de congélation des phospholipides de jaune d'œuf. L'originalité a été d'apporter ces phospholipides sous la forme de liposomes. Les liposomes sont des vésicules artificielles formées d'une bicouche concentrique de phospholipides

3.1. Matériel et Méthodes

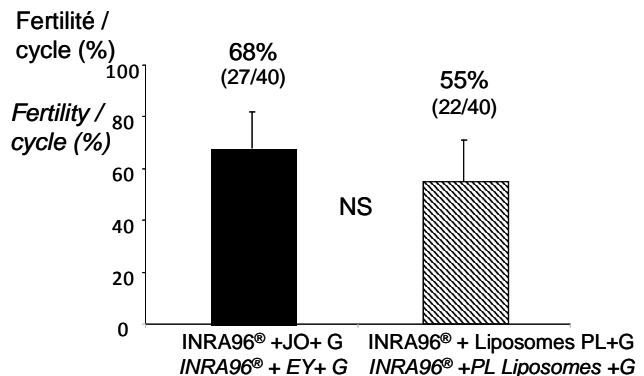
Les protocoles de congélation, de décongélation et de sélection de la semence, ainsi que de suivi et d'insémination des juments ont été strictement identiques à ceux des étapes 1 et 2 ; Seuls les milieux de congélation ont été différents. Nous avons ainsi comparé le milieu INRA96® + JO + G au milieu INRA96® + liposomes de phospholipides de JO + G.

3.2. Résultats

La figure III montre que la fertilité par cycle n'a pas été significativement différente entre les deux milieux de congélation utilisés même elle est légèrement plus basse en présence de liposomes de phospholipides dans le milieu.

Figure III : Fertilité par cycle après insémination de semence congelée dans le milieu INRA96® supplémenté, soit de jaune d'œuf soit de liposomes de phospholipides de jaune d'œuf et de glycérol ; (4 étalons, 6 éjaculats/étalon). Légende - JO : jaune d'œuf (2%) ; PL : phospholipides de jaune d'œuf ; G : glycérol ; NS : p=0.23

Figure III: Per-cycle pregnancy rates after artificial insemination with semen frozen in INRA96® extender supplemented with, either egg yolk or liposomes of egg yolk phospholipids and glycerol; 4 stallions, 6 ejaculates/stallion). Legends - EY: egg yolk; PL: egg yolk phospholipids; G: glycerol; NS: p = 0.23



Conclusion

Les différentes étapes de cette étude ont montré que le milieu INRA96®, qui a montré ses propriétés dans la conservation de longue durée à la température de 4°C, est également une excellente base de milieu de congélation et que la fraction plasma peut remplacer le jaune d'œuf entier sans diminuer la fertilité. De plus, l'apport de phospholipides de jaune d'œuf sous forme de liposomes est aussi une approche originale et prometteuse, non seulement pour optimiser la composition du milieu de congélation, mais également pour acquérir des connaissances sur les mécanismes de cryoprotection.

La contribution de ce programme de thèse a été de deux ordres : industriel et cognitif. 1) Un nouveau milieu de congélation a été mis au point. Il est composé de milieu INRA96®, de plasma de jaune d'œuf stérilisé et de glycérol et peut être produit à l'échelle industrielle, sous une forme prête à l'emploi. Il est commercialisé depuis septembre 2009 par la société IMV-Technologies sous le nom d'INRA Freeze®.

2) Des éléments de connaissances biochimiques ont également été apportés et ouvrent des pistes de recherche intéressantes pour comprendre les mécanismes de cryoprotection mis en jeu entre les spermatozoïdes et les composants du milieu lors de la congélation.

Remerciements

Ce projet a été mené dans le cadre de la thèse CIFRE d'Elodie Pillet ; nous remercions la société IMV-Technologies et l'ANRT pour leur soutien financier. Nous remercions également toute l'équipe de l'unité expérimentale équine de Nouzilly pour son aide lors de l'expérience de fertilité ainsi que les étudiants qui ont participé aux expériences au cours des 3 années : Mélanie Fontaine, Marie Hadba et Delphine Schnüriger.

Références

Pillet E. 2009. Mise au point d'un milieu pour la cryoconservation de la semence équine et mécanismes de cryoprotection impliqués. Thèse AGRO Campus Ouest, soutenue le 18 décembre 2009, 303p.

Pillet, E., Batellier, F., Duchamp, G., Furstoss, V., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Vidament, M., Magistrini, M. 2008a. Freezing stallion semen in INRA96® based extender improves fertility rates in comparison to INRA82. *Dairy Science and Technology*, 88 (2), 257-265.

Pillet E., Batellier F., Duchamp G., Bruneau B., Yvon J.M., Le Vern Y., Kerboeuf D., Vidament M., Magistrini M. 2008b. Le milieu INRA96® supplémenté de jaune d'œuf et de glycérol améliore la fertilité en insémination artificielle de semence congelée. *34^{ème} Journée de la Recherche Equine, jeudi 28 février 2008*, 39-48.

Pillet, E., Batellier, F., Duchamp, G., Bruneau, B., Yvon, J.M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M. 2009. Vers la mise au point d'un nouveau milieu de congélation pour la semence équine : le plasma de jaune d'œuf gamma-irradié peut remplacer le jaune d'œuf. *35^{ème} Journée de la Recherche Equine, jeudi 26 février 2009*, 79-86.

Pillet, E., Duchamp, G., Batellier, F., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M. 2010. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology* 75(1), 105-114.