



Vers un milieu de congélation de la semence d'étalon de composition optimisée et définie

Pour la réussite de l'insémination artificielle de semence congelée, la composition du milieu de congélation est un facteur clef. Une thèse menée à l'INRA de Nouzilly en partenariat avec la société IMV-Technologies (contrat de thèse CIFRE d'Elodie Pillet) a porté sur la composition du milieu de congélation de la semence d'étalon et a permis, au terme du travail, des avancées techniques certaines.

L'objectif premier de la thèse a été de mettre au point un milieu prêt à l'emploi et de composition optimisée. L'objectif plus fondamental à la base de cette finalité concrète a été d'acquérir des connaissances en cryobiologie des gamètes.

Un nouveau milieu de congélation prêt à l'emploi : l'INRA-freeze®

Ainsi, dans ce cadre nous avons démontré que le pouvoir cryoprotecteur d'un milieu à base de phosphocasinat natif (l'INRA96®) supplémenté de 2% de jaune d'œuf et de 2.5% de glycérol, était significativement supérieur à celui du milieu habituel (l'INRA82), à base de lait supplémenté également de 2% de jaune d'œuf et de 2.5% de glycérol : 71% de fertilité/cycle versus 40% (p<0.01, n=84 cycles de juments) (Pillet et al., 2008a ; 2008b). Nous avons ensuite démontré que le pouvoir

cryoprotecteur de la fraction plasma de jaune d'œuf stérilisée était équivalent à celui du jaune d'œuf entier : 69% de fertilité/cycle avec le plasma versus 60% avec le jaune d'œuf entier (p>0.05, n=70 cycles de juments) (Pillet et al., 2009). Le plasma de jaune d'œuf (illustration 1) est une fraction du jaune d'œuf obtenue après élimination des granules présents dans le jaune d'œuf par ultra-centrifugation.

Le plasma présente l'avantage de pouvoir être stérilisé ; il peut par conséquent être ajouté à un milieu qui sera disponible prêt à l'emploi. L'ensemble de ces résultats a donc permis la mise au point d'un milieu sans lait ni jaune d'œuf entier, de formulation standardisée, stérile et commercialisable prêt à l'emploi : le milieu INRA-Freeze®. L'INRA-Freeze a été breveté (brevet FR2925917) et est désormais commercialisé par la société IMV-Technologies (illustration 2).

Illustration 1 : fractionnement du jaune d'œuf

Jaune d'œuf entier

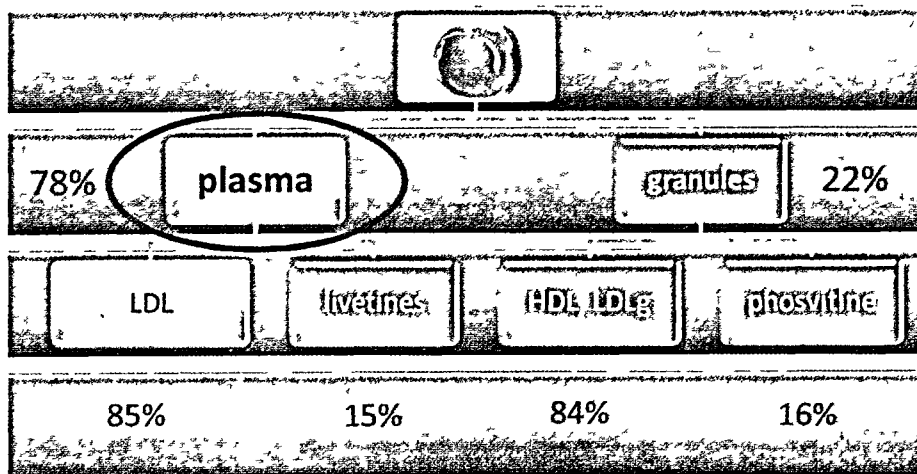
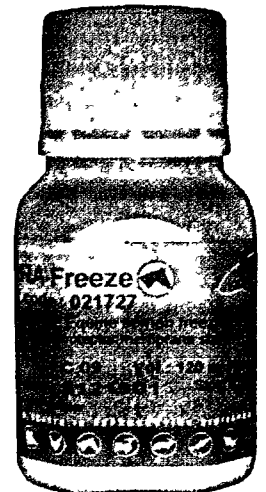


Schéma du fractionnement du jaune d'œuf. Le plasma de jaune d'œuf est obtenu après dilution et ultracentrifugation (Pillet et al., 2009). Source : Elodie Pillet.

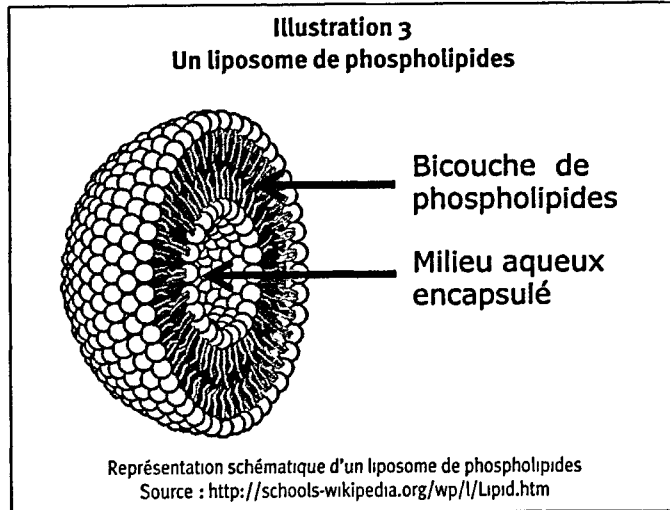
Illustration 2
Le milieu INRA-Freeze®



Le milieu INRA-Freeze® (Pillet et al., 2009), commercialisé prêt à l'emploi (IMV-Technologies, L'Aigle) Source : Elodie Pillet.

Les liposomes de phospholipides de jaune d'œuf : une solution d'avenir ?

La démarche de fractionnement du jaune d'œuf mise en œuvre ensuite a été poursuivie dans le but d'optimiser la composition du milieu et d'identifier précisément les molécules impliquées dans la cryoprotection. Suite à des analyses *in vitro*, nous avons testé *in vivo* le pouvoir cryoprotecteur de liposomes composés de deux phospholipides majoritairement présents dans le plasma de jaune d'œuf : la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine. Les liposomes (illustration 3) sont des vésicules de phospholipides pouvant encapsuler un milieu aqueux ; ils sont largement employés dans le domaine de la biopharmacie par exemple. Les résultats obtenus ont été encourageants : 55% de fertilité/cycle en présence de liposomes versus 68% en présence de jaune d'œuf entier ($p > 0.05$, $n = 80$ cycles de juments). Ces résultats restent toutefois encore à améliorer, ceci en modulant la composition en phospholipides des liposomes et notamment en augmentant le degré d'insaturation des acides gras composants ces phospholipides.



Quel(s) impact(s) sur la technique de congélation de la semence ?

Les améliorations techniques obtenues au cours de ces travaux de thèse ont donc porté non seulement sur l'efficacité du milieu mais également sur sa praticité. En effet, alors que les résultats de fertilité par cycle après insémination de semence congelée sont de l'ordre de 45% sur le terrain, nous avons pu obtenir des

résultats allant de 40 à 71% tout au long de la thèse avec les différents milieux testés (Pillet *et al.*, 2008b ; 2009). La praticité du milieu a aussi été largement améliorée puisque le milieu INRA-Freeze® est désormais commercialisé prêt à l'emploi et que l'utilisation des liposomes ouvre des perspectives d'industrialisation très intéressantes.

Enfin, la biosécurité a également été améliorée puisque ce travail a permis de s'affranchir du lait puis du jaune d'œuf entier dans les milieux de congélation.

L'utilisation des liposomes pourrait permettre une formulation encore plus synthétique du milieu.

**Elodie Pillet¹, Florence Méa-Batellier²,
Guy Duchamp³, Michèle Magistrini⁴**

¹ UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements (PRC), INRA, 37380 Nouzilly

² Délégue régionale Centre, Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE) Haras national de Blois, BP 14309, 41 043 Blois Cedex

³ Unité expérimentale UE PAO, INRA, 37380 Nouzilly

Remerciements :

Elodie Pillet a mené ce projet dans le cadre d'une thèse financée par la société IMV-Technologies et l'ANRT (Association Nationale de la Recherche Technique). Nous remercions également toute l'équipe de l'unité expérimentale de Nouzilly.

Pour en savoir plus :

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 with INRA82. Dairy Science and Technology, vol 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. Actes de la 34^{ème} Journée de la Recherche Equine (JRE), février 2008, Paris, 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. Actes de la 35^{ème} Journée de la Recherche Equine (JRE), février 2009, Paris, 79-86.