

## CRYOPRESERVATION DE SEMENCES DES ESPÈCES AVICOLES ET ILLUSTRATION D'UN EXEMPLE DE VALORISATION.

**Reverchon Maxime<sup>1</sup>, Bailliard Amélie<sup>1</sup>, Seigneurin François<sup>1</sup>, Gourichon David<sup>2</sup>,  
Baumard Yannick<sup>2</sup>, Zerjal Tatiana<sup>3</sup>, Duclos Delphine<sup>4</sup>, Grasseau Isabelle<sup>5</sup>, Blesbois  
Elisabeth<sup>5</sup>, Tixier-Boichard Michèle<sup>3</sup>, Guémené Daniel<sup>1</sup>, Thélie Aurore<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>*SYSAAF, Centre INRA Val de Loire, UMR BOA, 37380 NOUZILLY*

<sup>2</sup>*INRA, UE PEAT, Centre Val de Loire, 37380 NOUZILLY*

<sup>3</sup>*INRA, UMR GABI, 78352 JOUY-EN-JOSAS*

<sup>4</sup>*Secrétariat exécutif de la Cryobanque Nationale, IDELE, 149 rue de Bercy, 75595 PARIS  
CEDEX 12*

<sup>5</sup>*INRA, UMR PRC, Centre Val de Loire, 37380 NOUZILLY*

[maxime.reverchon@inra.fr](mailto:maxime.reverchon@inra.fr)

### RESUME

Le programme d'infrastructure CRB-Anim soutient l'enrichissement des collections de la cryobanque nationale, dont la cryoconservation de ressources génétiques aviaires. Les collections d'espèces avicoles stockées dans la cryobanque nationale sont majoritairement constituées de semence de coqs de l'espèce Gallus, mais concernent aussi 4 autres espèces, la pintade, le canard de Barbarie, le canard Pékin et l'oie. La collection de semence aviaire compte aujourd'hui 47 383 paillettes. Les procédures de congélation de la semence avicole sont régulièrement testées et optimisées par les acteurs de la cryobanque. Dans cette étude, le taux (1/3 ou 1/4) de dilution de la semence avant congélation et la quantité (100, 200 ou 400 millions) de spermatozoïdes utilisés lors des inséminations artificielles (IA) ont été ré-évalués. Les résultats obtenus montrent de meilleurs taux de fertilité pour une dilution au 1/4. Les concentrations de 200 millions et de 400 millions de spermatozoïdes donnent des résultats de fertilité équivalents ; il est donc dorénavant recommandé d'utiliser la dose de 200 millions de spermatozoïdes pour des inséminations de sperme congelé. Les différentes améliorations apportées aux procédures de congélation du sperme de coq permettent aujourd'hui l'obtention de taux de fertilité par IA après décongélation compris entre 70 et 90%, en fonction des populations. L'intérêt de constituer ces collections est illustré par un exemple consistant en une réintroduction de diversité génétique au sein d'une population expérimentale ; la lignée INRA R+.

### ABSTRACT

The CRB-Anim infrastructure program support the enrichment of the national cryobank collections for domestic species, including the poultry genetic resources cryopreservation. The poultry collections is mainly constitute of Gallus species samples, however collection from 4 others poultry species, namely Guinea fowl, Muscovy duck, Pekin duck and geese are also present. The National Cryobank collection of poultry species sperm samples count nowadays 47 383 straws. Poultry semen freezing and defrosting prior AI procedures are regularly tested in order to optimized collection stock use and management. In this study the sperm dilution rate (1/3 or 1/4) before freezing and sperm number (100, 200 ou 400 millions) used for artificial insemination (AI) have been re-evaluated within the CRB-Anim program. Thus fertility rate of hens inseminated either with frozen/thawed semen diluted prior freezing at 1/3 or 1/4 or at final concentrations (100, 200 or 400 million of spermatozoas/ml) has been determinated. Results show that the best fertility rate were obtained for the 1/4 sperm dilution. On the other hand, the concentration of 200 million and 400 million spermatozoa give equivalent fertility results, so the 200 millions spermatozoa dose is recommended for artificial insemination with frozen sperm. Consequently, rooster sperm freezing process and usage procedure improvement currently allow for fertility rates after thawing ranging between 70 to 90%, depending upon the genotype. One value of compiling these collections is illustrated by an example consisting in a genetic diversity reintroduction within an experimental population; the INRA R+ line.

## INTRODUCTION

L'objectif du programme CRB-Anim est d'intégrer et de renforcer les Centres de Ressources Biologiques (CRB) conservant du matériel reproductif et du matériel génomique pour les espèces d'animaux domestiques élevées en France, mammifères, oiseaux, poissons et coquillages. Le réseau CRB-Anim associe des organismes publics de recherche et deux plateformes privées. Cette infrastructure nationale conserve aujourd'hui environ 530 000 échantillons biologiques (semence, embryons, cellules, tissus, ADN et ARN).

Dans le cadre du projet CRB-Anim, une collection de semence de volailles d'intérêt agronomique issues de populations expérimentales ou commerciales, ainsi que de races locales a été constituée et stockée dans la cryobanque nationale. Aujourd'hui, cette collection de semence concerne 5 espèces de volailles (Gallus, pintade, canard de Barbarie, canard Pékin et oie).

La procédure de congélation de la semence de coqs Gallus a été établie en 1995 (Seigneurin et Blesbois, 1995). Elle assure la qualité et la traçabilité des échantillons collectés. Grâce à la mise au point de méthodes de congélation spécifiques de la semence du jar, des canards Pékin et de Barbarie, puis de celle des pintades, la collection a été élargie à ces 4 autres espèces avicoles (Lemoine *et al.*, 2011 ; Seigneurin *et al.*, 2013). Afin d'optimiser la qualité de la semence cryopréservée, deux paramètres du protocole ont été ré-évalués ; le taux de dilution de la semence lors de la congélation et la quantité de spermatozoïdes utilisés lors des inséminations artificielles (IA).

Les utilisateurs réguliers de la congélation de sperme diluent l'éjaculat au 1/4 avant congélation. Ils ont souvent fait remarquer qu'une réduction du taux de dilution du sperme de 1/4 à 1/3 présenterait de nombreux avantages pour des raisons pratiques (diminution du nombre de paillettes, diminution du coût du processus ...). Etant donné que la quantité de cryopréservateur utilisée pour la congélation de semence est dépendante du volume final (11% du volume final), si le taux de dilution final est diminué, la quantité de cryoprotecteur sera également réduite. Ainsi, les taux de fertilité obtenus avec du sperme congelé/décongelé aux dilutions de 1/4 et 1/3 ont été comparés.

La quantité de sperme inséminé affecte le nombre de spermatozoïdes stockés dans les glandes utéro-vaginales du tractus femelle, une augmentation de cette quantité entraîne une baisse

de la fertilité et une diminution de la durée de la période fertile (Taneja et Gowe, 1962; Blesbois et Brillard, 2007). Avec de la semence fraîche, l'optimum de fertilité est obtenu avec 100 à 200 millions de spermatozoïdes par insémination (Brillard, 1986; Brillard *et al.*, 1989). Il est estimé que la moitié du sperme meurt lors des étapes de congélation/décongélation et Lofti *et al.* (2017) ont mis en évidence que le nombre de 100 millions de spermatozoïdes congelés/décongelés par IA induit un taux de fertilité inférieur (40%). A l'inverse, une forte concentration en spermatozoïdes inséminés frais ou décongelés (500 à 700 millions) peut être problématique, car elle cause un rejet partiel de la semence par la femelle après IA et se solde par un faible taux de fertilité. La dose habituellement recommandée lors des IA avec de la semence congelée/décongelée étaient de 400 millions de spermatozoïdes. Cette dose a été comparée avec les doses de 100 et 200 millions afin d'étudier quelle quantité permettrait d'obtenir les meilleurs résultats de fertilité.

L'intérêt de constituer cette banque est illustré par un exemple de l'utilisation de semences cryopréservées qui a eu lieu en 2016. Il s'agissait de sauvegarder la lignée INRA R+, une population expérimentale précieuse, mais fortement consanguine et, pour ce motif, difficile à maintenir *in vivo*. Afin de pallier à ces difficultés de reproduction, il a été décidé de réintroduire de la diversité génétique en utilisant des paillettes de semence cryopréservées depuis 2003.

L'objectif de cet article est d'informer sur l'état des stocks de semences des espèces avicoles présents dans les collections de la cryobanque nationale et de présenter quelques évolutions récentes des modalités techniques d'utilisation.

## MATERIELS ET METHODES

### Cryopréservation de semences aviaires

Avant collecte de la semence pour cryopréservation, les mâles sont sélectionnés sur différents critères de qualité (pourcentage de spermatozoïdes viables, motiles, morphologiquement normaux et la motilité massale). Ces données ont une valeur prédictive quant à l'aptitude des spermatozoïdes à la cryopréservation (Blesbois *et al.*, 2008).

La récolte du sperme est effectuée par un massage dorso-abdominal (Burrows et Quinn, 1935). Le sperme est déposé dans un tube collecteur contenant 200 µl de dilueur Lake PreCongélation (LPC ; Lake et Stewart, 1978). Il est recommandé de ne pas

collecter plus de 8 coqs par série de congélation car le sperme de coqs se dégrade très rapidement. Le sperme est ensuite dilué au 1/2 puis placé à 4°C sous agitation pendant 10 minutes. Il est alors dilué au 1/4 et mélangé au cryoprotecteur glycérol sous agitation à 4°C pendant 10 minutes. Pour finir, le sperme est introduit par aspiration dans des paillettes de 500µl. Ces paillettes sont préalablement gravées avec un identifiant intégrant le numéro du coq, l'espèce, la lignée et l'année de naissance. Après remplissage des paillettes, une bulle d'air est placée à l'extrémité de chacune d'entre elles grâce à un peigne à bulle sur lequel elles sont déposées. Les paillettes sont ensuite scellées avec de la poudre d'alcool polyvinylique, puis placées sur un rack, prêtes à être congelées. La vitesse de congélation est égale à 7°C/min de 4°C à -35°C, puis à 60°C/min de -35°C à -140°C. La température du congélateur est ensuite descendue manuellement jusqu'à -160°C et les paillettes stockées dans un container d'azote liquide. Une fois la collection de paillettes terminée, ces dernières sont transférées vers les sites de stockage primaire et secondaire (Thélie *et al.*, 2018).

#### **Optimisation de la procédure de congélation/décongélation de la semence de coq**

La procédure de congélation/décongélation décrite par Thélie *et al.*, (2018), a été reprise et deux dilutions de la semence juste avant congélation ont été testées (1/3 et 1/4). Le taux de fertilité obtenu avec ces paillettes après décongélation et IA a été mesuré.

La quantité de spermatozoïdes cryopréservés optimale à utiliser lors des IA a également été réévaluée. La dose habituellement préconisée de 400 millions de spermatozoïdes par IA a été comparée aux doses 100 et 200. Des poules T55 (SASSO) ont été inséminées deux fois, à 72h d'intervalle, avec du sperme congelé-décongelé en intravaginale (4cm de profondeur). Les œufs ont été collectés à partir des jours 2 à 5 après insémination. Les taux de fertilité (œufs fertiles / œufs incubés × 100) ont été évalués par un mirage des œufs 7 jours après le début de l'incubation.

#### **Exemple d'utilisation de la cryobanque : réintroduction de diversité génétique dans la lignée expérimentale de Gallus INRA R+**

Des coqs adultes de la lignée expérimentale R+ de l'INRA (Bordas *et al.*, 1992, Morisson *et al.*, 1997) ont été hébergés au sein de l'unité UE-PEAT (Centre INRA Val de Loire, Nouzilly, France) selon les modalités décrites précédemment (Thélie *et al.*, 2018). Afin de préserver cette lignée, des IA

ont été effectuées avec de la semence de coqs R+ congelée antérieurement (Thélie *et al.*, 2018).

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

La collection du site primaire de la cryobanque nationale de sperme de coqs Gallus contient 44 populations, correspondant à la semence de 894 coqs, soit 21426 paillettes. Une collection miroir équivalente est stockée à des fins de sécurisation sur le site secondaire du Centre INRA Val de Loire à Nouzilly. Le stock global, pour les 2 sites, représente 43207 paillettes de semences individuelles de coqs Gallus. Cette collection est complétée par de la semence de 4 autres espèces avicoles (canards de Pékin et de Barbarie, pintade et oie), ce qui fait un stock total de 47 383 paillettes de semence aviaire cryopréservées (Tableau 1).

L'amélioration des procédures de congélation du sperme de coq avec glycérol permet d'obtenir aujourd'hui des taux de fertilités par IA après décongélation très encourageants, puisqu'ils sont compris entre 70 et 90%, suivant les populations (Thélie *et al.*, 2018). Les améliorations récemment apportées au protocole concernent la dilution finale de la semence avant cryopréservation et la quantité de spermatozoïdes inséminés.

De meilleurs taux de fertilité après IA, mais non significativement différents, ont été obtenus avec la dilution au 1/4 (93%) comparée à la dilution au 1/3 (80%). Un tel résultat était inespéré et même s'il nécessite d'être confirmé, il permet cependant d'envisager l'utilisation de cette dilution au 1/4 en routine afin d'optimiser les stocks présents en cryobanque. Il suggère néanmoins la forte sensibilité du sperme de coq à l'environnement physicochimique. Il a été montré que le glycocalyx qui entoure et protège le sperme lors de l'éjaculation est en quantité moindre chez les oiseaux par rapport aux mammifères (Froman et Engel, 1989 ; Tecle et Gagneux, 2015). Cela pourrait contribuer à expliquer la grande sensibilité du sperme de coq. Une autre hypothèse est que la disponibilité d'agent cryoprotectant serait plus élevée avec une dilution de 1/4 comparé à 1/3, permettant un niveau de protection des spermatozoïdes plus élevé pendant le processus de congélation (Thélie *et al.*, 2018).

Après insémination aux doses 100, 200 et 400 millions de spermatozoïdes cryopréservés par femelle, un taux de fertilité similaire a été obtenu lorsque la quantité de spermatozoïdes était divisée

par deux, de 400 à 200 millions (Thélie *et al.*, 2018). L'utilisation de cette dose de 200 millions de spermatozoïdes est donc maintenant recommandée par la cryobanque nationale. C'est un avantage notamment pour les populations à petits effectifs pour lesquelles le nombre de paillettes de semence disponibles peut-être limité. Les résultats de cette étude montrent qu'il est possible d'optimiser les conditions d'usage de la semence cryopréservée de coq tout en obtenant des taux de fertilité proches de ceux obtenus avec de la semence fraîche lors des IA. Néanmoins, il conviendra de s'assurer que ce résultat est reproductible avec des races locales de volailles dont la fertilité est plus faible.

Un exemple concret d'utilisation de la cryobanque a été réalisé grâce à l'opération de sauvegarde de la lignée expérimentale INRA R+. Pour réintroduire de la diversité génétique, la semence de 6 coqs cryopréservée en 2003 avec la méthode glycérol, représentant deux des trois familles perdues a été utilisée. Après IA de poules R+ âgées de 40 à 50 semaines, 23 poussins ont été obtenus en dépit d'un taux de fertilité très faible (8,7%), les 2 familles de la lignée R+ ont été récupérées. Ce faible taux de fertilité était attendu puisqu'il n'était que de 35 à 50% en sperme frais et s'explique par la forte consanguinité de cette lignée. Cette étude fait pour la première fois la preuve que les paillettes de semence peuvent être stockées plusieurs années et le sperme conserver son pouvoir fécondant chez l'espèce Gallus. Cet exemple, illustre bien l'intérêt de sécuriser les populations d'intérêt en cryobanque, mais montre une très forte variabilité individuelle de la fertilité de la semence décongelée (entre 1,8% et 16,2% pour l'exemple cité). Il est donc nécessaire de continuer les recherches pour mieux maîtriser la fertilité après décongélation, en particulier chez les populations consanguines, ou alors développer des méthodes de prédiction permettant de choisir les coqs sur leur aptitude à la cryopréservation.

## CONCLUSION

La constitution de collections n'étant pas une fin en soi pour les gestionnaires de la cryobanque, les objectifs de leur valorisation potentielle sont de (1) sécuriser des populations d'intérêts, (2) reconstituer des races ou des populations avec de la semence « ancienne », éventuellement pour retrouver des gènes d'intérêts perdus, (3) réintroduire de la variabilité génétique au sein de populations d'intérêt menacées de disparition, (4) ou encore constituer un éventuel mode de transport pour une utilisation à distance ou décalée temporellement.

L'exemple d'utilisation des stocks de la cryobanque mis en œuvre en 2016 pour la population INRA R+, illustre bien l'un de ces objectifs. Des collections de semence ont également été constituées, parfois dans l'urgence, pour des populations commerciales de l'espèce Gallus et pintade, ou encore pour des races locales comme la Géline de Touraine et la Coucou de Rennes, alors que leur renouvellement a été interrompu ou potentiellement menacé lors de la crise de l'influenza aviaire. En parallèle de chaque collecte de semence stockée en cryobanque, un échantillon de sang est collecté pour chaque donneur et stocké au CRB@BRIDGE localisé sur le Centre INRA de Jouy-en-Josas. Cette échantillon peut permettre au besoin la réalisation d'analyses génomiques sans nécessiter l'utilisation d'une paillette de semence pour extraire de l'ADN. En complément du programme CRB-Anim, les programmes, BioDivA (Financement CASDAR) et ValBioDi (Financement Région Centre) ont permis d'entrer en collection 12435 échantillons de sang, d'ADN et de tissus issus de 3953 animaux de 3 espèces (Gallus, dinde, pintade).

Les travaux méthodologiques conduits dans le cadre du programme CRB-Anim permettront d'optimiser les conditions d'utilisation de ces collections (dilution finale 1/4, dose inséminée 200 millions de spermatozoïdes par femelle). D'autres travaux s'orientent vers le développement de critères d'évaluation de la qualité de semence plus précis et plus fiables, notamment avec des analyses diagnostiques ICM-MS (Intact Cell MALDI-TOFF Mass Spectrometry). Ainsi, les travaux de Soler *et al.* (2016) montrent qu'il est possible de diagnostiquer la fertilité des mâles par une analyse ICM-MS par l'identification de marqueurs prédicteurs de la fertilité qui dispense de la réalisation d'un test de fertilité chronophage et coûteux avant congélation. Des travaux complémentaires vont être conduits pour explorer un potentiel caractère prédictif précoce de ces marqueurs. D'autres travaux à vocation finalisée visent à développer des méthodologies de cryopréservation qui puissent être déployées sur le terrain, alors que le stockage en paillettes individuelles nécessite actuellement un dispositif expérimental. Par ailleurs, les techniques de congélation de semence restent à développer pour plusieurs espèces avicoles comme la dinde, la caille, le faisan, les perdrix rouge et grise, ou encore le pigeon, autant d'espèces dont des populations font l'objet de programmes de sélection ou de gestion génétique et de production en France. Enfin, d'autres approches de sécurisation de la diversité génétique, comme par exemple la cryopréservation de cellules germinales

primordiales (PGCs) permettant également de parallèlement (Tonus C *et al.*, 2017).  
préserver le chromosome W sont explorées

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blesbois E, Seigneurin F, Grasseau I, Limouzin C, Besnard J, Gourichon D, Coquerelle G, Rault P, Tixier-Boichard M., 2007. Poult. Sci. 86(3):555-564.
- Blesbois, E, et J. P. Brillard., 2007. Animal. 1(10):1472–1481.
- Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Mialon-Richard MM., 2008. Theriogenology. 69(2):252-261.
- Bordas A, Tixier-Boichard M, Merat M., 1992. Br. Poult. Sci. 33:741-754.
- Brillard, JP, 1986. Poult. Sci. 65(2):369– 374.
- Brillard, JP, McDaniel GR, De Reviers M, and Drane JW., 1989. Poult. Sci. 68(4):558–563.
- Burrows, WH, et JP Quinn., 1937. Poult. Sci. 16(1):19–24.
- Froman DP, et Engel H. N. Jr, 1989. Biol. Reprod. 40(3):615-621.
- Lake PE, Stewart JM., 1978. Br Poult. Sci. 19(2):187-94.
- Lake PE, et Ravie O, McAdam J., 1981. Br Poult. Sci. 22(1):71-7.
- Lemoine M, Mignon-Grasteau S, Grasseau I, Magistrini M, Blesbois E., 2011. Theriogenology. 75(1):122-30.
- Lofti S, Mehri M, Sharafi M. et Masoudi R., 2017. Anim. Reprod. Sci. 184:204–210.
- Morisson M, Bordas A, Petit J.M, Jayat-Vignoles C, Julien R, Minvielle F., 1997. Poult. Sci.76(3):425-431.
- Seigneurin F, et E Blesbois., 1995. Theriogenology. 43(8):1351-1358.
- Seigneurin F, Grasseau I, Chapuis H, Blesbois E., 2013. Poult Sci. 2013. 92(11):2988-96.
- Soler L, Labas V, Thélie A, Teixeira-Gomes AP, Grasseau I, Bouguereau L, Blesbois E., 2016. Mol. Cell. Proteomics. 15(6):1998-2010.
- Taneja GC, et RS Gowe., 1962. J. Reprod. Fertil. 4:161–174.
- Tecle E, et Gagneux P., 2015. Mol. Reprod. Dev. 82(9) :635-650.
- Thélie A, Bailliard A, Seigneurin F, Zerjal T, Tixier-Boichard M, Blesbois E., 2018. Poult Sci. 98(1) :447-455.
- Tonus C, Connan D, Waroux O, Vandenhove B, Wayet J, Gillet L, Desmecht D, Antoine N, Ectors FJ, Grobet L., 2017. Theriogenology. 15;88:197-206.

| Espèce             | Nombre de populations | Nombre de mâles | Nombre de paillettes | Modalité de stockage du sperme |
|--------------------|-----------------------|-----------------|----------------------|--------------------------------|
| Coq Gallus         | 44                    | 894             | 43207                | individuel                     |
| Pintade            | 2                     | 96              | 1614                 | mélangé                        |
| Canard Pékin       | 5                     | 155             | 1031                 | individuel                     |
| Canard de Barbarie | 9                     | 325             | 1164                 | individuel                     |
| Oie                | 2                     | 102             | 367                  | mélangé                        |

Tableau 1 : Bilan actualisé des collections de semence aviaire conservées dans la cryobanque nationale aviaire