

ÉLIMINATION DU GLYCÉROL DE LA SEMENCE DÉCONGELÉE DE COQ PAR CENTRIFUGATION DANS UN GEL COLLOÏDAL SYNTHÉTIQUE

Lin Hsiu-Lien Herbie¹², Grasseau Isabelle¹, Mermillod Pascal¹, Blesbois Elisabeth¹,
Vitorino Carvalho Anaïs¹

¹PRC, UMR085, INRAE, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

²Physiology Division, Livestock Research Institute, COA, 71246 Tainan, Taiwan
Anaïs.Carvalho@inrae.fr

RÉSUMÉ

La cryoconservation des spermatozoïdes est une méthode cruciale dans la conservation de la biodiversité des espèces et des races, mais aussi pour assurer la restauration des lignées lors de catastrophes sanitaires. Actuellement, le glycérol est l'agent cryoprotecteur le plus utilisé pour la cryoconservation des spermatozoïdes de coq, étant le plus efficace dans le maintien des fonctions du spermatozoïde, mais il est associé à un taux de réussite faible voir une totale stérilité lors de l'insémination. Par conséquent, nous cherchons à développer une méthode simple d'élimination du glycérol par centrifugation dans un gel colloïdal synthétique, le Percoll®. Après collecte, la semence de coqs a été congelée en glycérol 11% en paillettes avec un congélateur programmable. Lors de la décongélation, la semence a été déposée sur une solution de sucre (200 mM) en présence de Percoll® (Solution Sucre-Percoll®, SSP) dans du PBS puis centrifugée 15 min. Afin de définir les meilleures conditions, différentes concentrations de SSP (40, 50, 60 ou 70%) ainsi que deux températures (4 ou 20°C) ont été testées. La concentration de glycérol et la mobilité individuelle des spermatozoïdes ont été évaluées après centrifugation respectivement par le kit Glycerol Assay et par Computer-Assisted Sperm Analysis system (CASA). Nos données montrent que toutes les concentrations de SSP réduisent la présence de glycérol à moins de 120 mM (soit une élimination de 94% du glycérol initial). La centrifugation à 20°C permet une bonne sélection des spermatozoïdes mobiles et progressifs, en particulier pour SSP 40 et 70%. Notre nouvelle méthode permet donc d'éliminer efficacement le glycérol des semences de coq cryopréservées tout en sélectionnant les spermatozoïdes présentant une bonne mobilité. Comparée à la méthode conventionnelle de dilutions successives, elle permet de gagner 44% de temps de traitement des échantillons lors de l'élimination du glycérol.

ABSTRACT

Sperm cryopreservation is a crucial method not only to conserve the biodiversity of species and breeds, but also to restore animal populations during emergent epidemics. Currently, glycerol is the most widely used cryoprotectant to freeze chicken sperm due to its effectiveness for maintaining sperm functions, but it is associated with a reduction of fertility or a total infertility during insemination. Therefore, we tried to develop a simple method to remove glycerol from frozen-thawed chicken semen with a centrifugation in a synthetic colloidal gel, the Percoll®. After collecting, chicken semen was frozen in a diluent of 11% glycerol in straws with a programmable freezer. Thawed semen was layered on the solution containing 200 mM sucrose and Percoll® (Solution Sucrose-Percoll®, SSP) in PBS and centrifuged 15 min after. Different concentrations of SSP (40, 50, 60 or 70%) combined with two different temperatures (4 or 20°C) were tested to determine the best conditions of SSP centrifugation. Glycerol concentration and sperm individual motility were evaluated respectively by Glycerol Assay kit and Computer-Assisted Sperm Analysis system (CASA). Our results showed that all concentrations of SSP efficiently reduce glycerol concentration to less than 120 mM (equal to remove 94% of glycerol from thawed semen). Centrifugation at 20°C allowed an efficient selection for motile and progressive sperm especially with SSP 40 and 70%. It indicated that our novel method can efficiently remove glycerol from post-thaw chicken semen with a positive selection of motile sperm. Compared to the conventional method of serial dilutions, it can save 44% of time of glycerol removal process.

INTRODUCTION

La conservation des ressources génétiques est une stratégie cruciale pour protéger la biodiversité, restaurer des espèces ou races menacées et contrer les épidémies ou les accidents de reproduction (Morrell and Mayer, 2017; Svoradová *et al.*, 2018). Trois types cellulaires sont actuellement disponibles pour la cryobanque chez les oiseaux : les spermatozoïdes, les cellules germinales primordiales et le tissu gonadique. Parmi toutes ces méthodes, la cryoconservation des spermatozoïdes reste encore l'approche la plus répandue car elle se base sur la collecte de grandes quantités de cellules, le respect du bien-être animal, et la possibilité d'un stockage long ainsi que d'échanges de ressources à longue distance (Çiftci and Aygün 2018; Thélie *et al.*, 2019; Cardoso *et al.*, 2020). Actuellement, le glycérol est le cryoprotecteur le plus utilisé pour congeler les spermatozoïdes de coq (Abouelezz *et al.*, 2015 ; Lin *et al.*, 2021). Il fournit une excellente protection des spermatozoïdes leur permettant de résister aux impacts négatifs du processus congélation/décongélation (Blesbois and Brillard, 2007; Blesbois *et al.*, 2007). Cependant, il est associé à une baisse de la fertilité pouvant être totale et il doit donc être éliminé avant l'insémination (Seigneurin and Blesbois, 1995; Thélie *et al.*, 2019). Néanmoins jusqu'à présent, le processus d'élimination du glycérol est compliqué et se base sur des équipements particuliers (dont une chambre froide). Par conséquent, nous cherchons à développer une nouvelle méthode simple d'élimination du glycérol de la semence de coq décongelée, se basant sur le Percoll®, un gel classiquement utilisé pour sélectionner les spermatozoïdes mobiles chez les mammifères mais également sur de la semence fraîche de coq (Lin *et al.*, 2020).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

18 coqs adultes (entre 32 et 42 semaines d'âge) de lignée T44 (*Gallus gallus domesticus*, Sasso, France) ont été utilisés comme donneurs de semence. Tous les coqs ont été hébergés en cages individuelles à l'unité expérimentale INRAe UE-PEAT (2018, <https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12>), nourris avec un régime standard, de l'eau à volonté et élevés à 20°C et sous un cycle lumineux de 14h de lumière et 10h d'obscurité par jour. Ce protocole expérimental a été approuvé par le Ministère de l'Éducation Supérieure, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) et le comité d'éthique Val-de-Loire (N° APAFIS #4026-2016021015509521).

1.2. Collecte, congélation et décongélation de la semence

La semence de coq a été collectée régulièrement deux fois par semaine par la méthode de massage abdominal (Burrows et Quinn, 1937). Trois groupes de 6 animaux ont été formés de façon aléatoire pour regrouper les semences dans un volume de Lake PC similaire à celui de collecte puis mélangés doucement et refroidis à 4°C pendant 10 min. Un volume égal de Lake PC contenant 22% de glycérol a été ajouté pour atteindre une concentration finale de 11% de glycérol, puis l'échantillon a été équilibré à 4°C avec une agitation douce pendant 10 min. Par la suite, la semence a été déposée dans des paillettes de 0,5 mL (IMV Technologies, France). Toutes les paillettes ont été scellées, transférées dans un congélateur programmable (MiniDigitcool, IMV Technologies, France) et congelées à vitesse contrôlée de 4 à -35°C à -7 °C/min puis de -35 à -140°C à -20 °C/min. Finalement, les paillettes ont été plongées dans de l'azote liquide pour une conservation d'au moins 14 jours et décongelées au bain-marie à 4°C pendant 3 min pour la suite des expériences.

1.3. Préparation de Solution Sucrose-Percoll® et élimination du glycérol

La solution de Sucrose-Percoll® (SSP) a été préparée en ajoutant du Percoll® (Sigma-Aldrich, USA) isotonique et du sucrose 200 mM pour composer 40, 50, 60 ou 70% de SSP dans du PBS, puis 2 mL de SSP ont été transférés dans un tube conique de 15 mL. La semence décongelée (5 répliques) a été déposée sur 2 mL de SSP et centrifugée 15 min à 800×g à 4 ou 20°C. Le culot de spermatozoïdes a été collecté et remis en suspension avec le dilueur Lake 7.1. Les témoins étaient la semence décongelée sans élimination du glycérol.

1.4. Évaluation de la concentration de glycérol et de la mobilité individuelle des spermatozoïdes

La concentration de glycérol a été mesurée selon les instructions du kit Glycerol Assay (Sigma-Aldrich, USA) sur 10 µL d'échantillon. La mobilité individuelle des spermatozoïdes a été mesurée au Computer-Assisted Sperm Analysis system (CASA, IVOS, IMV Technologies, France) sur 2 µL d'échantillon à 30×10⁶ cellules/mL. Quatre champs d'observation ont été capturés pour chaque échantillon. La trajectoire de chaque spermatozoïde a été enregistrée afin de calculer sa vitesse moyenne (velocity average path, VAP). Les résultats de mobilité ont été exprimés en pourcentage de spermatozoïdes mobiles et progressifs qui ont présenté respectivement une VAP > 5 mm/s et VAP > 50 mm/s.

1.5. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (version 1.4.1717) par ANOVA à deux facteurs. Les résultats sont exprimés en moyennes et écart-type. Une différence significative est révélée par une p-valeur inférieure à 0,05%.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Concentration de glycérol après centrifugation

Nos données révèlent une réduction significative de la concentration de glycérol après traitement de la semence par une solution SSP (quelque soit la concentration de Percoll)(Tableau 1). En effet, alors que la concentration moyenne de glycérol de la semence décongelée est de 1866,3 mM, après centrifugation dans SSP, elle est réduite à moins de 120 mM dans tous les traitements (Tableau 2). Ces résultats révèlent que notre nouvelle méthode d'élimination du glycérol peut éliminer au moins 93,6% du glycérol de la semence décongelée. Des expériences antérieures indiquent que 2% de glycérol (soit environ 273.4 mM) est le seuil maximal pour obtenir la capacité maximale de fécondation (Polge, 1951; Neville *et al.*, 1971). Ainsi, notre méthode permet d'obtenir une concentration de glycérol compatible avec de bonnes conditions d'insémination.

2.2. Mobilité des spermatozoïdes après centrifugation

La mobilité des spermatozoïdes décongelés est un indicateur de leur capacité fécondante chez les poulets (Blesbois *et al.*, 2008). C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier ce critère comme prédicteur potentiel de la fertilité. La concentration de SSP, la température mais également l'interaction de ces deux facteurs ont un impact significatif sur la mobilité des spermatozoïdes (Tableau 1). La mobilité des spermatozoïdes dans l'échantillon témoin diminue de façon importante à 20°C mais pas à 4°C dans les 15 min suivant la décongélation (Tableau 2). L'élimination du glycérol par notre protocole à 4°C ne montre aucune différence significative de la mobilité des spermatozoïdes. Cependant, le même protocole à 20°C améliore la mobilité des spermatozoïdes, en particulier dans le traitement SSP 70% qui maintient le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et progressifs à respectivement de 25,1% et 15,2% plus élevés que le témoin. Cette observation est en accord avec celle précédemment rapportée par Lin *et al.*, (2020) qui signalent que la centrifugation de semence sur une solution de Percoll® est bénéfique pour sélectionner les spermatozoïdes mobiles d'une semence fraîche de coq. En outre, un protocole basé sur un autre gel colloïdal, le gel Accudenz (AD), est déjà utilisé pour éliminer le glycérol de la semence décongelée de coq par centrifugation dans la solution

AD discontinue (12% sur 30%) à 5°C (Purdy *et al.*, 2009). Cependant, nos données suggèrent une meilleure mobilité des spermatozoïdes. La comparaison des deux protocoles dans les mêmes conditions permettrait d'identifier la méthode plus efficace.

De plus, les taux de mobilité observés à 20°C après centrifugation en SSP sont équivalents à ceux obtenus à 4°C, suggérant que ce protocole peut facilement être développé à température ambiante.

2.3. Durée du protocole d'élimination du glycérol

Actuellement, la centrifugation avec dilutions en série (CDS) est la méthode la plus courante pour réduire la concentration de glycérol de la semence décongelée de coq (Blesbois and Brillard, 2007). Toutefois, cette méthode nécessite de travailler pendant de long temps (Tableau 3). De plus, cette méthode ainsi que celle précédemment présentée basée sur le gel AD nécessite de travailler à 4°C, et donc la présence d'une chambre froide, ce qui est difficile à mettre en pratique dans les élevages. Au contraire, notre nouvelle méthode d'élimination du glycérol n'a pas besoin de la chambre froide et la centrifugation ne prend que 15 min, ce qui permet gagner respectivement 40% et 44,4% de temps par rapport à la méthode d'AD et de CDS.

CONCLUSIONS

Nos données montrent l'efficacité d'une nouvelle méthode d'élimination du glycérol de la semence décongelée de coq basée sur le gel Percoll®. Cette méthode permet d'éliminer efficacement le glycérol de la semence décongelée tout en sélectionnant les spermatozoïdes présentant une meilleure mobilité. Par rapport à la méthode CDS conventionnelle ou celle basée sur le gel AD, elle est plus économique, à la fois en temps et en équipement car elle peut être employée à température ambiante et éviter donc la nécessité d'une chambre froide. Actuellement, des expériences sont en cours pour déterminer l'impact de cette méthode sur la réussite de l'insémination artificielle.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Philippe Didier, Joël Delaveau et Jérémy Bernard (INRAe UE-PEAT) pour leur investissement dans la gestion des animaux. Ce projet est financé par le projet [ANR-11- INBS-0003].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abouelezz F. Castaño C. Toledano-Díaz A. Estes M. López-Sebastián A. Campo J. and Santiago-Moreno J., 2015. *Theriogenology*, (83), 1541–1547.
- Blesbois E. and Brillard J. P., 2007. *Animal*, (1), 1472-1481.
- Blesbois E., 2007. *World's Poult. Sci. J.*, (63), 213-222.
- Blesbois E. Grasseau I. Seigneurin F. Mignon-Grasteau S. Saint Jalme M. and Mialon M. M., 2008. *Theriogenology*, (69), 252–261.

- Burrows W. and Quinn J., 1937. Poult. Sci., (16), 19-24.
- Cardoso B. Sánchez-Ajofrín I. Castaño C. García-Álvarez O. Estes M. C. Maroto-Morales A. Iniesta-Cuerda M. Garde J. J. Santiago-Moreno J. and Soler A. J., 2020. Animals, (10), 691., doi: 10.3390/ani10040691.
- Çiftçi H. and Aygün A., 2018. World's Poult. Sci. J., (74), 699-710.
- Lin H. Chen Y. Lin D. Lai Y. Wu M. and Chen L., 2020. Br. Poult. Sci., (61), 86-91.
- Lin H. H. Blesbois E. and Vitorino Carvalho A., 2021. World's Poult. Sci. J., doi: 10.1080/00439339.2022.1998816
- Moore S. and Hasler J., 2017. J. of Dairy Sci., (100), 10314-10331.
- Neville W. Macpherson J. and Reinhart B., 1971. Poult. Sci., (50), 1411-1415.
- Polge C., 1951. Nature, (167), 949-950.
- Purdy P. Song Y. Silversides F. and Blackburn H., 2009. Poult. Sci., (88), 2184-2191.
- Seigneurin F. and Blesbois E., 1995. Theriogenology, (43), 1351-1358.
- Svoradová A. Kuželová L. Vašíček J. Olexíková L. and Chrenek P., 2018. Biotechnol. Prog., (34), 778-783.
- Thélie A. Bailliard A. Seigneurin F. Zerjal T. Tixier-Boichard M. and Blesbois E., 2019. Poult. Sci., (98), 447-455.

Tableau 1. Effets de la température et la concentration de Solution Sucrose-Percoll® sur la concentration de glycérol, le pourcentage des spermatozoïdes mobiles et progressifs

	Statistique (p-valeur)		
	Température	Concentration de SSP	Température* Concentration de SSP
Concentration de glycérol	0.633	<0,001	0.460
Spermatozoïdes mobiles	<0,001	<0,001	<0,001
Spermatozoïdes progressifs	<0,001	<0,001	0.002

SSP : Solution Sucrose-Percoll®. Une p-valeur inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

Tableau 2. Effets sur la concentration de glycérol, le pourcentage des spermatozoïdes mobiles et progressifs de la semence décongelée de coq après centrifugation dans Solution Sucrose-Percoll®

	4°C					20°C				
	TEM	SSP 40%	SSP 50%	SSP 60%	SSP 70%	TEM	SSP 40%	SSP 50%	SSP 60%	SSP 70%
Concentration de glycérol (mM)	1885,1 ± 73,1 ^a	80.8 ± 10,5 ^b	79.1 ± 16,7 ^b	85.0 ± 17,9 ^b	118.8 ± 12,9 ^b	1847,5 ± 80,5 ^a	74.4 ± 20,3 ^b	76.8 ± 22,7 ^b	112.5 ± 19,5 ^b	111.9 ± 21,5 ^b
Spermatozoïdes mobiles (%)	44.0 ± 3,9 ^{ab}	46.1 ± 3,7 ^{ab}	43.1 ± 5,2 ^{ab}	42.5 ± 4,6 ^{ab}	46.4 ± 3,6 ^{ab}	25.4 ± 3,3 ^c	42.5 ± 3,4 ^{ab}	39.9 ± 4,4 ^a	40.1 ± 3,7 ^a	50.5 ± 5,5 ^b
Spermatozoïdes progressifs (%)	28.3 ± 2,0 ^{ab}	31.6 ± 3,1 ^a	28.5 ± 3,7 ^{ab}	27.6 ± 3,5 ^{ab}	30.6 ± 2,9 ^{ab}	16.5 ± 3,7 ^c	26.4 ± 2,6 ^{ab}	24.1 ± 3,5 ^b	24.9 ± 2,5 ^{ab}	31.7 ± 4,9 ^a

TEM : échantillon témoin ; SSP : Solution Sucrose-Percoll® ; Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n = 5) ; ^{abc} Des exposants différents indiquent des différences significatives (p-valeur<0,05).

Tableau 3. Comparaisons des méthodes d'élimination du glycérol entre la centrifugation par Sucrose-Percoll® solution, Accudenz et avec dilutions en série

	Solution	Dilution		Centrifugation		
		T (°C)	Time (min)	Force (g)	T (°C)	Time (min)
SPS	Sucrose-Percoll®	-	0	800	4 or 20	15
AD	Accudenz discontinu	-	0	300	5	25
CDS	Lake C	4	12	500	4	15

SSP : Solution Sucrose-Percoll® ; AD : Accudenz ; CDS : centrifugation avec dilutions en série.