

EVALUATION DE L'UTILISATION DU GLYCEROL DANS LA CRYOPRESERVATION DE LA SEMENCE DE CAILLES (COTURNIX JAPONICA)

Isabelle Grasseau¹, Isabelle Couty¹, Isabelle Jottreau Grimaud², Anaïs Vitorino
Carvalho¹

¹ INRAE, CNRS, IFCE, Université de Tours, PRC, 37380, Nouzilly, France ;

² INRAE, PEAT, 37380, Nouzilly, France

anais.carvalho@inrae.fr

RÉSUMÉ

La cryopréservation des spermatozoïdes est actuellement la méthode la plus répandue et la plus simple, pour sauvegarder le patrimoine génétique des espèces sauvages ou domestiques chez les oiseaux. Actuellement, le glycérol est l'agent protecteur le plus efficace pour protéger les spermatozoïdes de coqs des dommages de la cryopréservation. Cependant, l'utilisation de cet agent protecteur n'a jamais été étudiée pour une autre espèce à fort intérêt agronomique et scientifique, la caille.

A partir de semences de cailles Robin collectées par massage dorso-abdominal comme précédemment décrits au sein du laboratoire, l'innocuité de cet agent pour la fertilité a été évaluée à l'aide d'inséminations artificielles de semences fraîches en présence de différentes concentrations de glycérol (2, 6 et 12 %). Des expériences de cryoconservation de la semence de cailles en présence de 12 % de glycérol ont été menées et l'efficacité de deux techniques de retrait (dilutions sériées ou centrifugation sur Percoll) évaluées sur des critères de mobilité et fertilité.

La présence de glycérol dans des semences fraîches induit une totale infertilité, suggérant la nécessité de son élimination avant les inséminations. Parmi les deux techniques de retrait testées, celle qui permet d'obtenir le plus grand nombre de spermatozoïdes mobiles est la dilution sériée. Cependant, après l'insémination, aucune fertilité n'a pu être observée. En conclusion, l'utilisation du glycérol ne semble pas être adaptée à la semence de caille et d'autres cryoprotecteurs doivent être envisagés.

ABSTRACT

Evaluation of glycerol use to cryopreserve quail semen

Sperm cryopreservation is currently the most widespread and simplest method for *ex situ* genetic conservation in avian species. Currently, glycerol is the most efficient cryoprotectant for avoiding cryodamages in chicken sperm. But, its use for another avian species with agronomic and scientific interests, i.e. the quail, was never evaluated.

Using Japanese quail semen collected by abdominal massage as previously determined in our lab, the negative impacts of this agent on fertility was evaluated using artificial inseminations with fresh semen in the presence of different concentrations of glycerol (2, 6 and 12%). Cryopreservation experiments with quail semen in the presence of 12% glycerol were carried out and the efficiency of two removal techniques (serial dilutions or Percoll centrifugation) was evaluated in terms of sperm motility and fertility.

The presence of glycerol in fresh semen induced infertility, suggesting the need for its removal before insemination. Among the two tested removal approaches, the most efficient for sperm motility was serial dilutions. However, after insemination, no fertility could be observed. In conclusion, the use of glycerol does not seem to be suitable for quail semen and other cryoprotectants must be considered.

INTRODUCTION

La cryoconservation des spermatozoïdes est aujourd'hui l'approche la plus courante pour développer des programmes de conservation *ex situ* des oiseaux (1). Malgré les efforts de plusieurs laboratoires (2,3), cette technologie n'est actuellement pas disponible chez la caille, une espèce à forts intérêts agronomiques et scientifiques (4–6). Bien que plusieurs agents cryoprotecteurs aient été testés, l'utilisation du glycérol, le cryoprotecteur le plus efficace chez le poulet (7), n'a jamais été évalué pour cette espèce. Avec ces travaux, nous étudions les bénéfices potentiels du glycérol sur la cryoconservation de la semence de caille.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

Les cailles japonaises (*Cortunix japonica*, Robin, Maché, France) ont été hébergées au centre expérimental avicole PEAT INRAe (2018, <https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12>). De l'éclosion jusqu'à huit semaines, les animaux ont été élevés collectivement puis les mâles ont été hébergés individuellement et les femelles par groupe de deux dans des cages. À partir de huit semaines, les animaux ont été maintenus sous un éclairage de huit heures de lumière et 14 heures d'obscurité, avec température contrôlée de 21°C, avec une alimentation standard et de l'eau à volonté. Les cailles impliquées dans ce programme (12 mâles et 24 femelles) étaient âgées de 25 à 60 semaines.

1.2. Collecte de semence et motilité

La semence était collectée deux fois par semaine à l'aide d'une femelle bout-en-train (8), sur 20 µl de milieu de collecte (NaCl 150 mM, TES 20 mM, glucose 35 mM, pH 7,4 et 330 mOsm) (9). Après collecte, le volume de sperme a été immédiatement évalué par pesée et la concentration en spermatozoïdes déterminée par absorption de lumière avec un photomètre (photomètre Accucell, IMV Technologies, L'Aigle, France) à une longueur d'onde de 530 nm (10). La motilité des spermatozoïdes a été évaluée à l'aide d'un système CASA (HTM-IVOS - Hamilton-Thorn Motility Analyser, IVOS, IMV Technologies). Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles a été retenu pour des analyses ultérieures.

1.3. Inséminations artificielles

Avant expérimentations, le taux de ponte des femelles a été contrôlé et supérieur à 85%. L'insémination artificielle a été réalisée comme décrit précédemment (10), à une dose de 60.10^6 spermatozoïdes/femelle en cas de semence fraîches et de 50 µl/femelle pour les échantillons de semence congelée. Le même échantillon de semence ($n = 3$ /expérience) a été utilisé pour inséminer deux femelles (deux inséminations à 3 jours d'intervalle). Les œufs ont été collectés quotidiennement à partir du deuxième jour après la première IA pendant neuf à 12 jours, puis incubés. Le taux de fertilité (% d'œufs embryonnés/incubés) a été mesuré par mirage après neuf jours d'incubation.

1.4. Cryopréservation de la semence

La semence de six mâles a été collectée sur 20 µl de milieu de collecte comme décrit précédemment. La semence a ensuite été diluée au demi dans le milieu de collecte et conservée à température ambiante pendant 3 minutes. Le milieu Lake PC (11) contenant 24 % de glycérol (v/v) a été ajouté aux échantillons pour obtenir la dilution finale de glycérol de 2, 6 et 12 %, puis équilibré à +4°C sous agitation douce pendant 10 min. Les échantillons ont été par la suite transférés dans des paillettes de congélation de 0,25 ml (IMV Technologies, L'Aigle, France), qui ont été scellées. Les paillettes ont été congelées dans un congélateur automatique (MiniDigitCool, IMV Technologies) suivant la descente en température suivante : de 4°C à -35°C, -7°C/min puis de -35 à -140°C, -60 °C/min. Les paillettes ont ensuite été plongées et stockées dans de l'azote liquide au minimum 14 jours avant décongélation (3 min dans de l'eau à 4°C).

1.5. Retrait du glycérol

Deux procédures connues pour limiter les effets négatifs du glycérol ont été évaluées sur de la semence de caille congelée avec 12% de glycérol : dilutions en série (12) ou la centrifugation sur Percoll 40% en PBS (13).

1.6. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées sur GraphPad Prism 6. Les différences entre les taux de fertilité ont été explorées par Chi2. Les impacts des procédures d'élimination du glycérol sur la motilité des spermatozoïdes ont été étudiés par Kruskal-Wallis, suivi par des tests de comparaisons multiples de Dunn.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

En raison de ses intérêts agronomiques et scientifiques, des efforts internationaux sont déployés pour inclure l'espèce caille dans les programmes de cryobanques spermatiques, malheureusement sans succès (2,3). Ici, nous proposons d'évaluer l'utilisation du glycérol comme agent protecteur pour la cryoconservation des spermatozoïdes de caille.

Malgré son efficacité pour protéger les cellules des dommages liés à la cryoconservation, le glycérol est également associé à la réduction de la fertilité des coqs, conduisant à son élimination obligatoire avant l'insémination (14–16). Pour explorer l'existence possible d'un tel phénomène chez les cailles, de la semence fraîchement collectée a été inséminée en présence de différentes concentrations de glycérol (2, 6, 12%). La présence de glycérol est toujours associée à une infertilité (Figure 1), ce qui suggère que son élimination est également obligatoire dans cette autre espèce aviaire. Les impacts négatifs du glycérol sur la fertilité semblent plus drastiques chez les cailles que chez les poules, chez qui la présence de 2 % de glycérol n'induit qu'une réduction de fertilité d'environ 50 % et non une infertilité totale comme observée ici chez les cailles (17).

Nos tests de cryoconservation de sperme avec différentes concentrations de glycérol (2, 6 et 12 %) ont montré que 12 % était le seul apte à maintenir l'intégrité des spermatozoïdes (c'est-à-dire les flagelles liés à la tête du spermatozoïde, résultats non montrés). Ainsi, des conditions similaires de congélation de la semence de poulet pourraient être utilisées pour la caille, sur la base du seul critère de l'intégrité cellulaire. Pour limiter la toxicité du glycérol, nous avons évalué l'efficacité de deux protocoles utilisés chez le coq : la dilution sériée (12) et la centrifugation sur Percoll (13). Toutes les procédures ont réduit considérablement le pourcentage de spermatozoïdes mobiles par rapport à la semence avant traitement (Figure 2).

Bien qu'aucune différence significative n'ait été observée entre les protocoles de retrait du glycérol, la dilution sériée est associée à de plus forts taux de mobilité (+38 % par rapport à la technique avec Percoll ; Figure 2). Chez les poulets, l'utilisation du Percoll seul n'est pas adaptée à la sélection de spermatozoïdes mobiles après cryoconservation (16). Cet objectif est atteint avec succès grâce à l'ajout de sels, afin d'éviter les chocs osmotiques lors de la procédure de décongélation (16). Une approche similaire devrait également être testée pour la semence de caille.

Le processus de cryoconservation de la semence de caille et du retrait du glycérol après décongélation a révélé moins de 5 % de spermatozoïdes mobiles (Figure 2), ce qui pourrait être insuffisant pour fertiliser les ovocytes. Pour vérifier cette hypothèse, des inséminations artificielles ont été réalisées avec de la semence de caille cryoconservée avec 12% de glycérol et traitées par dilutions sériées (Figure 3). Aucun œuf fécondé n'a été obtenu lors de ces expériences, prouvant que cette procédure ne permet pas maintenir les capacités fécondantes de la semence de caille.

CONCLUSION

Collectivement, cette étude conclut que le glycérol, comme les autres cryoprotecteurs testés précédemment (2,3), n'est pas adapté à la cryoconservation de la semence de caille. Il est intéressant de noter que tous ces agents cryoprotecteurs, bien que testés à différentes concentrations (2,3), ont toujours été testés indépendamment les uns des autres. De plus, ils appartiennent tous à la catégorie des cryoprotectants intracellulaires. Le mélange de plusieurs agents cryoprotecteurs et/ou l'utilisation de cryoprotectants extracellulaires devraient par la suite être envisagés pour le développement de la cryoconservation de la semence de caille, comme cela a été fait pour d'autres espèces animales (18).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Santiago-Moreno J, Blesbois E. Animal board invited review: Germplasm technologies for use with poultry. *animal* [Internet]. 2022 Mar;16(3):100475. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100475>
2. Kowalczyk A. The effect of cryopreservation process on morphology and fertilising ability of japanese quail (*Coturnix japonica*) spermatozoa. 2008;29(3):199–208.
3. Chełmońska B, Łukaszewicz E, Kowalczyk A, Jerysz A. The effect of DMA level on morphology and fertilising ability of Japanese quail (*Coturnix japonica*) spermatozoa. *Theriogenology*. 2006;65(2):451–8.
4. Le Douarin NM. Developmental patterning deciphered in avian chimeras. *Dev Growth Differ*. 2008;50(SUPPL. 1).
5. Guerrero-Bosagna C, Morisson M, Liaubet L, Rodenburg TB, de Haas EN, Košťál L, et al.

- Transgenerational epigenetic inheritance in birds. *Environ Epigenetics*. 2018;4(2):dvy008.
6. El-gawad AHA, El-daly EF, El-azeem NAA. Alleviating the Effect of Some Environmental Stress Factors on Productive Performance in Japanese Quail 1 . *Growth Performance*. 2008;4(5):605–11.
7. Thelie A, Bailliard A, Seigneurin F, Zerjal T, Tixier-Boichard M, Blesbois E. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources. *Poult Sci*. 2019;98(1):447–55.
8. Chełmońska B, Jerysz A, Łukaszewicz E, Kowalczyk A, Malecki I. Semen collection from Japanese quail (*Coturnix japonica*) using a teaser female. *Turkish J Vet Anim Sci*. 2008;
9. Farooq U, Cho S, Rybnik-Trzaskowska PK, Singh RP, Malecki IA. Effect of proctodeal gland foam on sperm kinetics in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Theriogenology* [Internet]. 2015;83(2):162–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.006>
10. Thélie A, Grasseau I, Grimaud-Jottreau I, Seigneurin F, Blesbois E. Semen biotechnology optimization for successful fertilization in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Theriogenology*. 2019;139:98–105.
11. Lake PE, Ravie O. An attempt to improve the fertility of stored fowl semen with certain additives in a basic diluent. *Reprod Nutr Dev*. 1981;21(6B):1077–84.
12. Lake PE, Stewart JM. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen—an improved method. *Br Poult Sci*. 1978;
13. Lin HL, Chen YH, Lin DY, Lai YY, Wu MC, Chen LR. Silica-based colloid centrifugation enhances sperm quality in cockerel semen. *Br Poult Sci*. 2020;
14. Polge C. Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79°C. [14]. *Nature*. 1951.
15. Lin HLH, Blesbois E, Vitorino Carvalho A. Chicken semen cryopreservation: importance of cryoprotectants. *World's Poultry Science Journal*. 2022.
16. Lin HH, Grasseau I, Mermillod P, Chen L, Blesbois E, Vitorino A. Cryobiology A simple and fast alternative method to remove glycerol from chicken semen after cryopreservation. *Cryobiology* [Internet]. 2023;112(January):104567. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.104567>
17. Lin HH, Mermillod P, Grasseau I, Brillard J, Nadine G, Reynaud K, et al. Is glycerol a good cryoprotectant for sperm cells ? New exploration of its toxicity using avian model. 2023;258(June):1–15.
18. Montoya Páez JD, Úsuga Suarez A, Restrepo Betancur G. Donkey semen cryopreservation: Alternatives with permeable, non-permeable cryoprotectants and seminal plasma. *Reprod Domest Anim*. 2023;

Figure 1. Fertilité après traitement de la semence fraîche de caille avec différentes concentrations de glycérol.

24 femelles ont été utilisées par conditions (2 femelles/mâle). Les bars noires représentent le pourcentage de fertilité. Le nombre d'œufs inclus dans l'étude est noté sur les bars (sur fond noir, les œufs embryonnés et sur fond blanc, les œufs clairs). P-valeur du test Chi2 < 0.0001.

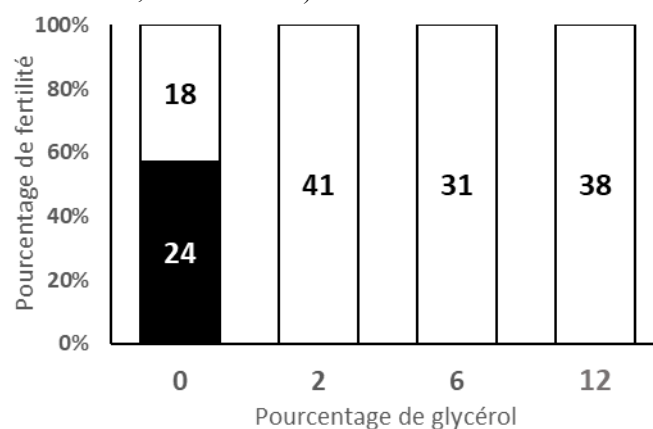


Figure 2. Pourcentage de spermatozoïdes mobile suite à différents traitements de la semence suite à la congélation avec 12% de glycérol.

n=3 mâles/condition. La semence fraîche correspond à la semence juste après collecte. Les données sont représentées avec chaque valeur individuelle mais également les moyennes et les SEM. P-valeur du test Kruskal-Wallis < 0.05.

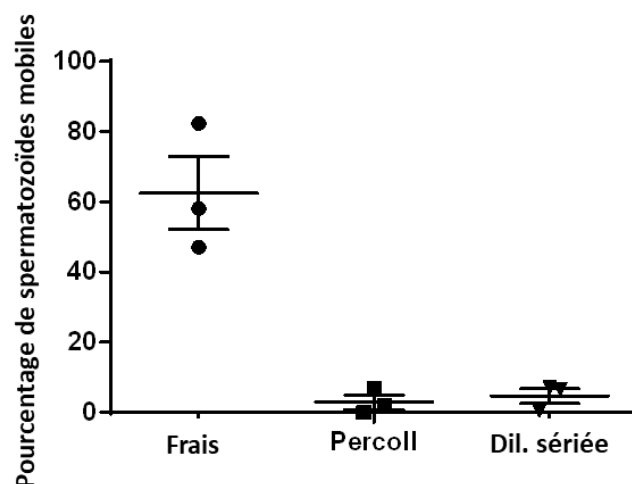


Figure 3. Fertilité après cryoconservation de la semence de caille avec 12% de glycérol et traitement après décongélation par dilution sériée.

24 femelles ont été utilisées par conditions (2 femelles/mâle). Les bars noires représentent le pourcentage de fertilité. Le nombre d'œufs inclus dans l'étude est noté sur les bars (sur fond noir, les œufs embryonnés et sur fond blanc, les œufs clairs). P-valeur du test Chi2 < 0.0001.

