

# Caractérisation du sperme de lapin congelé en milieux synthétiques

L. GAVIN-PLAGNE<sup>1</sup>, L. COMMIN<sup>1</sup>, E. MOCE<sup>2</sup>, M.P. VIUDES-DE-CASTRO<sup>2</sup>, P. BRUYERE<sup>1</sup>, S. BUFF<sup>1</sup>, T. JOLY<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>UPSP 2011.03.10 (ICE), VetAgro Sup (Université de Lyon), Marcy l'étoile, France,

<sup>2</sup>Centro de Tecnología Animal – Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA), Polígono La Esperanza, Segorbe, Castellón, Spain

<sup>3</sup>Département des productions animales, ISARA-Lyon, Lyon, France

**Résumé.** L'utilisation de produits d'origine animale (lait, jaune d'œuf) dans les milieux de cryoconservation perturbe l'évaluation *in vitro* de la semence et augmente le risque de contaminations dans les échantillons. Cette étude a pour objectif de caractériser deux milieux de congélation synthétiques de semence de lapin. Un milieu témoin DMSO-sucrose utilisé depuis une vingtaine d'années a été comparé à un milieu composé de DMSO-sucrose supplémenté de CRYO3. Ce produit synthétique a montré de bons résultats en cryoconservation de semence ovine et d'embryons lapins. Les analyses *in vitro* (viabilité, activité mitochondriale, intégrité membranaire et motilité) ne montrent aucune différence significative entre les deux milieux. Les méthodes d'évaluation de l'intégrité membranaire des spermatozoïdes par cytométrie en flux et le test HOS peuvent être appliquées en routine. Ces résultats montrent l'intérêt du CRYO3 (20% de taux de gestation) qui offre plus de protection par rapport au milieu témoin (9,8% de taux de gestation).

**Abstract. Characterisation of rabbit sperm frozen in synthetic media.** The use of animal-derived products in freezing extenders disturbs *in vitro* assessment and increases risks of contamination in samples. The aim of this study is to characterise two synthetic media for rabbit sperm cryopreservation. A control medium DMSO-sucrose used for twenty years has been compared to a medium composed of DMSO-sucrose supplemented with CRYO3. This synthetic product (CRYO3, Stem Alpha) showed interesting results for ovine semen and rabbit embryo cryopreservation. *In vitro* (viability, mitochondrial activity, membrane integrity and motility) do not show significant differences between media. Methods for the characterisation of the membrane integrity can be routinely used with flow cytometry and the HOS test. These results confirmed the interest of CRYO3-based extender (20% fertility rate) for freezing rabbit sperm which offers more protection compared to the control medium (9,8% fertility rate).

## Introduction

Aujourd'hui, la congélation de semence de lapin, et de mammifères en général, est réalisée dans des milieux à risques d'un point de vue sanitaire. En effet, la plupart de ces milieux sont composés de lait et jaune d'œuf pour ses propriétés de surfactant (protection physique des membranes des spermatozoïdes) et pour prévenir le choc thermique lors de la congélation. Ces produits d'origine animale sont sources de contamination potentielle par des pathogènes (Bousseau *et al.*, 1998) et ont une composition biochimique variable. De plus, la présence de jaune d'œuf en particulier rend l'évaluation de la qualité de la semence au microscope plus difficile (Paz *et al.*, 2010).

Bruyère *et al.* (2013) ont pu mettre en évidence l'intérêt d'utiliser un milieu chimiquement défini pour la congélation d'embryons notamment, le CRYO3. Ce produit a les mêmes propriétés thermodynamiques

que le jaune d'œuf et protège aussi bien les embryons que le Foetal Calf Serum.

L'objectif de cette étude est de supprimer les produits d'origine animale dans les milieux de congélation de sperme de lapin. Deux milieux de congélation (DMSO-sucrose vs. CRYO3-DMSO-sucrose), ont été comparés sur des paramètres *in vitro* et *in vivo*.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Animaux

Quatre-vingt huit mâles (Hypharm, Roussay, France) ont été collectés une fois dans la journée à l'aide d'un vagin artificiel. Un total de 162 femelles (Hycole, Marcoing, France) d'un élevage privé ayant des taux de fertilité supérieurs à 85 %, a été utilisé pour l'insémination artificielle.

### 1.2. Procédure de congélation et de décongélation

Onze mélanges hétérospermiqes ont été réalisés à partir des quatre-vingt huit éjaculats. Chaque mélange a été divisé en deux aliquots égaux et dilués 1 :1 dans

deux milieux de congélation différents. Chaque milieu est composé de tris – acide citrique – glucose (TCG) (Viudes de Castro et Vicente, 1996) dans lequel est dilué les cryoprotecteurs. Le milieu témoin est composé de TCG, 3,5 M DMSO et 0,1 M sucrose et le milieu testé CRYO3 de TCG, 40% de CRYO3 (Ref. 5617, Stem Alpha, France), 3,5 M DMSO et 0,1 M sucrose. La congélation a été réalisée selon le protocole de Moce et al, (2003). Brièvement, chaque échantillon est conditionné en paillettes de 0,5 mL (IMV, L'aigle, France) à température ambiante. Les paillettes sont ensuite équilibrées pendant 45 minutes à 4°C. Enfin, elles sont placées 5 cm au-dessus de la surface d'azote liquide pendant 10 minutes avant d'être plongées dans l'azote. Pour l'évaluation de la semence *in vitro* et *in vivo*, les paillettes ont été décongelées dans un bain-marie à 50°C pendant 10 secondes.

### 1.3. Évaluation de la semence fraîche et congelée

La viabilité et l'activité mitochondriale de la semence fraîche et décongelée a été effectuée par cytométrie en flux (Accuri C6, BD, Ann Harbor, MI, Etats-Unis). L'intégrité de la membrane plasmique est évaluée à l'aide du Kit *Sperm Viability* (Invitrogen, OR, Etats-Unis) contenant deux sondes : SYBR-14 marquant les cellules à membranes intactes (fluorescence verte) et l'iodure de propidium (IP) marquant les cellules à membranes lésées (fluorescence rouge). L'échantillon de semence ( $100 \times 10^6$  spz/mL) a été dilué dans du TCG et incubé pendant 5 min à 37°C avec 2,5 µL d'IP (solution stock) et 2,5 µL de SYBR-14 (dilué 1/100 dans du DMSO). Le potentiel transmembranaire mitochondrial a pu être évalué à l'aide de la sonde JC1 (0,75 mM, Invitrogen, Eugen, OR, Etats-Unis). L'échantillon de semence ( $5 \times 10^6$  spz/mL) a été incubé avec 0,5 µL de JC-1 pendant 15 min à 37°C. Le pourcentage de cellules avec un haut potentiel transmembranaire mitochondrial (hMMP) montrant une fluorescence orange a été enregistré.

Un test hypo-osmotique a également été réalisé en semence fraîche et décongelée afin d'analyser l'intégrité membranaire. Brièvement, 10 µL de semence est diluée dans 100 µL d'une solution hypoosmotique à 75 mOsmol (35,5 mM fructose, 12,5 mM citrate de sodium). Un frottis est réalisé après 30 min d'incubation à 37°C. Un total de 100 spermatozoïdes est compté et observé sous microscope à contraste de phase. Les spermatozoïdes montrant des flagelles enroulés sont considérés comme ayant des membranes fonctionnelles.

La mobilité a été analysée après décongélation à l'aide du Sperm Class Analyser (SCA2013, Microptic S.L, Barcelone, Espagne) et d'un microscope à contraste de phase (grossissement x10). Pour chaque échantillon, 5 µL a été déposé sur une chambre préchauffée à 37°C (20 µm de profondeur, Leja Products, Nieu-Venep, Pays-Bas). Un total de 10 champs a été analysé et le réglage est de 50 frames/s. Les paramètres évalués sont : pourcentage de spermatozoïdes motiles et progressifs, vitesse de trajectoire moyenne en µm/s (VAP), amplitude de déplacements latéraux de la tête des spermatozoïdes en µm (ALH), vitesse moyenne de déplacement linéaire en µm/s (VSL), vitesse curviligne en µm/s (VCL), linéarité de la trajectoire en % (LIN=VSL/VCL), fréquence des rythmes de croisements des trajectoires en Hz (BCF), rectitude de trajectoire en % (STR=VSL/VAP) et oscillation autour de la trajectoire moyenne en % (WOB = VAP/VCL).

### 1.4. Insémination artificielle

Les femelles ont été inséminées à l'aide de pipettes courbées (IMV Technologies, L'Aigle, France). Les paillettes décongelées ont été diluées 1:2 afin d'inséminer 60 à 80.10<sup>6</sup> de spermatozoïdes par femelle. En même temps que l'insémination, une injection en intramusculaire de 0,2 mL de Réceptal (Intervet, Beaucouze, France) a été effectuée sur chaque lapine afin d'induire l'ovulation. Les 11 lots congelés dans le milieu témoin et le milieu CRYO3 ont permis d'inséminer 82 et 80 femelles respectivement. Le taux de gestation (nombre de femelles gestantes/nombre d'insémination), les nés totaux (nombre de lapereaux/femelle) et les nés vivants sont les variables *in vivo* observées.

### 1.5. Analyse statistique

Les analyses statistiques sont réalisées sur le logiciel R (R software, <http://cran.r-project.org>). Avant toute procédure statistique, les conditions d'applications des tests sont vérifiées pour la normalité et l'homoscédasticité. Les paramètres *in vitro* sont comparés à l'aide d'un t-test. Le taux de gestation et le taux de mise bas sont analysés grâce à un chideux. Les nés totaux et les nés vivants font l'objet d'une procédure GLM avec le milieu de congélation comme facteur fixe suivant une loi de poisson.

## 2. Résultats

### 2.1. Résultats *in vitro*

Les résultats *in vitro* avant et après cryoconservation sont représentés dans le tableau 1. La viabilité, l'activité mitochondriale et l'intégrité membranaire

ont été observés sur la semence fraîche après la collecte. Le taux de spermatozoïdes vivants était de  $84,9 \pm 4,1\%$ , le taux de spermatozoïdes à haut potentiel transmembranaire mitochondrial (hMMP) de  $61,5 \pm 14,7\%$  et les spermatozoïdes répondant positivement au test HOS étaient de  $65,3 \pm 7,9\%$ .

Le taux de viabilité et le taux d'intégrité membranaire

sont largement affectés par la congélation aussi bien pour le milieu témoin que pour le milieu CRYO3.

Néanmoins, le taux de spermatozoïdes à hMMP est similaire en frais et en congelé.

Aucune différence significative n'est observée entre les deux milieux pour les paramètres *in vitro*, sauf pour les paramètres LIN et STR ( $p < 0,05$ ).

**Tableau 1. Effet du milieu de congélation sur les paramètres de qualité de la semence avant et après congélation**

Outils d'analyse	Paramètres	Semence fraîche	Milieu Témoin	Milieu CRYO3	p-value	Significativité ( $p < 0,05$ )
<b>Cytométrie en flux</b>	Viabilité (%)	$84,9 \pm 4,1$	$23,8 \pm 6,6$	$26,1 \pm 4,8$	0,2806	NS
	hMMP (%)	$61,5 \pm 14,7$	$56,9 \pm 11,5$	$58,4 \pm 10,6$	0,1830	NS
<b>Test HOS</b>	Intégrité membranaire (%)	$65,3 \pm 7,9$	$16,8 \pm 5,0$	$16,2 \pm 3,7$	0,7679	NS
	Motilité totale (%)		$18,4 \pm 4,0$	$21,5 \pm 4,5$	0,0880	NS
	Motilité progressive (%)		$10,8 \pm 3,9$	$12,4 \pm 5,9$	0,3023	NS
<b>SCA</b>	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )		$119,4 \pm 23,5$	$114,1 \pm 31,3$	0,3328	NS
	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )		$27,3 \pm 5,6$	$29,1 \pm 8,3$	0,3943	NS
	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )		$51,5 \pm 9,9$	$50,4 \pm 13,8$	0,6741	NS
	ALH ( $\mu\text{m}$ )		$2,4 \pm 0,7$	$2,4 \pm 0,7$	0,7650	NS
	LIN (%)		$22,9 \pm 2,4$	$25,5 \pm 2,7$	0,0231	*
	STR (%)		$57,6 \pm 4,5$	$53,1 \pm 4,9$	0,0155	*
	WOB (%)		$43,2 \pm 1,6$	$44,2 \pm 1,6$	0,1872	NS
BCF (Hz)		$14,9 \pm 4,4$	$16,2 \pm 3,4$	0,3925	NS	

**Tableau 2. Effet du milieu de congélation sur la fertilité et la prolificité**

	Milieu Témoin	Milieu CRYO3	p-value	Significativité ( $p < 0,07$ )
Taux de gestation	9,8	20,0	0,0665	*
Taux de mise bas	9,8	17,5	0,1503	NS
Nés totaux	$1,6 \pm 1,1$	$1,9 \pm 1,1$	0,6063	NS
Nés vivants	$1,1 \pm 1,3$	$1,1 \pm 1,3$	0,9239	NS

## 2.2. Résultats *in vivo*

Les résultats *in vivo* sont présentés dans le tableau 2. Seulement 24 femelles sont gestantes dont 22 ont mis bas. Un total de 34 nés totaux et 24 nés vivants ont été observés. Le taux de gestation pour le milieu CRYO3 (20%) est significativement supérieur ( $p < 0,07$ ) au taux de gestation du milieu témoin (9,8%). La taille de portée est de  $1,6 \pm 1,1$  et  $1,9 \pm 1,1$  nés totaux et de  $1,1 \pm 1,3$  nés vivants et  $1,1 \pm 1,3$  nés vivants pour le milieu témoin et CRYO3 respectivement.

## 3. Discussion

Ces résultats permettent de comparer un milieu de congélation utilisé en routine (Viudes-de-Castro et Vicente, 1996) à un milieu similaire mais supplémenté du produit CRYO3.

Après décongélation, les taux de viabilité des spermatozoïdes dans notre étude (23,8 % vs. 26,1 % ; milieu témoin et CRYO3 respectivement) sont en accord avec ceux de Mocé *et al.* (2014) (16,5 %) et de Viudes-de-Castro *et al.* (2014) (18,4 %). Cependant, les taux de viabilité de l'étude sont presque trois fois plus faible que ceux observés en semence fraîche. Également, le taux de spermatozoïdes ayant répondu positivement au test HOS après cryoconservation est presque quatre fois plus faible qu'en semence fraîche. Ces résultats vont dans la même direction que la viabilité. En effet, le kit *Sperm Viability* ciblant l'ADN permet de déceler l'intégrité membranaire au niveau de la tête du spermatozoïde et le test HOS permet également d'évaluer l'intégrité membranaire mais plutôt au niveau de la pièce intermédiaire et du

flagelle. De ce fait ces deux tests sont très complémentaires.

Le taux de hMMP pour les deux milieux est élevé et similaire aux taux observés en semence fraîche. Les milieux de congélation protègent donc efficacement les mitochondries et n'affectent pas leur activité. Le marquage JC-1 est très utilisé car il est fiable et précis et est souvent corrélé à la motilité de la semence (Paoli *et al.*, 2011).

Il est intéressant de remarquer que les paramètres LIN et STR diffèrent en fonction du milieu de congélation utilisé. Ces deux paramètres représentent la linéarité et la rectitude des trajectoires des spermatozoïdes. Pour LIN, le milieu CRYO3 est meilleur (25,5 vs 22,9;  $p < 0,05$ ) alors que pour STR, c'est le milieu témoin qui offre de meilleurs résultats (57,6 vs. 53,1 ;  $p < 0,05$ ). Ces résultats sont paradoxaux et ne sont pas en corrélation avec les résultats *in vivo*.

Les résultats *in vivo* sont très faibles comparés aux performances reproductives du lapin en frais. Ils restent également bien inférieurs à ceux d'autres études qui observent environ 70% de taux de gestation en moyenne (Mocé *et al.*, 2014 ; Viudes-de-Castro *et al.*, 2014). Ces résultats *in vivo* peuvent être expliqués par un non respect de la chaîne du froid lors du transport des paillettes. En effet, des tests préliminaires sur 165 femelles inséminées à Segorbe (Espagne) comparant le milieu témoin au milieu CRYO3 ont montré des taux de gestation de 57 % et 52 % respectivement.

Par ailleurs, le milieu CRYO3 offre un meilleur taux de gestation que le milieu témoin (20% vs. 9,8%, respectivement).

### Conclusion

Cette étude permet de disposer d'une méthode opérationnelle de caractérisation de la semence de lapin avant et après congélation. La viabilité par cytométrie en flux et l'intégrité membranaire via le test HOS sont des analyses pouvant être utilisées en routine sur le terrain. Le potentiel transmembranaire mitochondrial ainsi que l'utilisation du SCA peuvent apporter des informations complémentaires.

Les études *in vivo* semblent mettre en évidence que le milieu comportant 40% de CRYO3 augmente la protection de la semence lors de la congélation. De futures investigations sont en cours pour confirmer ces résultats.

### Remerciements

Nous remercions l'entreprise Hypharm pour nous avoir gracieusement fourni la semence pour ces expériences. Ce travail a été financé par le CRB-Anim (ANR11-INBS-0003).

### Références

- BOUSSEAU S, BRILLARD JP, MARQUANT LE GUIENNE B, GUERIN B, CAMUS A, LECHAT M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50 :699-706.
- BRUYERE P, BAUDOT A, JOLY T, COMMINS L, PILLET E, GUERIN P, LOUIS G. 2013. A chemically defined medium for rabbit embryo cryopreservation. *Plos One* 8 :e71547.
- DE PAZ P, ESTESO MC, ALVAREZ M, MATA M, CHAMORRO CA, ANEL L. 2010. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology* 74 :663-671.
- MOCE E, BLANCH E, TALAVAN A, VIUDES-DE-CASTRO MP. 2014. Reducing the time rabbit sperm are held at 5°C negatively affects their fertilizing ability after cryopreservation. *Theriogenology* 82 :1049-1053
- PAOLI D, GALLO M, RIZZO F, BALDI E, FRANCAVILLA S, LENZI A, LOMBARDO F, GANDINI L. 2011. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertility and Sterility* 95 :2315-2319.
- VIUDES-DE-CASTRO MP, ET VICENTE JS. 1996. A simple method for freezing rabbit semen with successful results on fertility and prolificity. *Animal Reproduction Science*, 44 :195-201.
- VIUDES-DE-CASTRO MP, LAVARA R, SAFAA HM, MARCO-JIMENEZ F, MEHAISEN GMK, VICENTE JS. 2014. Effect of freezing extender composition and male line on semen traits and reproductive performance in rabbits. *Animal* 8 :5 :765-770.