

Congélation de la semence de lapin : approche calorimétrique

P. SALVETTI¹, A. BAUDOT², T. JOLY¹

¹ ISARA-Lyon, 31 place Bellecour, 69288 Lyon Cedex 02, France.

² Centre de Recherches sur les Très Basses Températures (CNRS), 25 avenue des Martyrs, BP 166, 38042 Grenoble Cedex 9, France.

Résumé : La cryoconservation de la semence est un outil efficace et sûr pour conserver les ressources génétiques animales et pour diffuser le progrès génétique ; cependant, cette technique n'est pas encore maîtrisée chez le lapin. L'objectif de cette étude est de caractériser le comportement thermodynamique des trois principaux milieux de congélation de la semence de lapin en utilisant la technique de calorimétrie différentielle à balayage (DSC7 Perkin-Elmer). Les cinétiques réelles de refroidissement et de réchauffement sont présentées pour chacune de ces méthodes de congélation. De plus, le phénomène de cristallisation dans les solutions cryoprotectrices a été caractérisé par les mesures précises de la température d'apparition des premiers cristaux de glace et les estimations de la quantité totale de glace formée. Cette première approche calorimétrique pose les bases nécessaires pour définir les cinétiques optimales de congélation de la semence de lapin.

Abstract: Freezing of rabbit semen: a calorimetric approach. The cryoconservation of the semen is an effective and safe tool to preserve animal genetic resources and to diffuse the genetic progress; however, this technique is not controlled yet for the rabbit. The aim of this study is to characterize the thermodynamic behavior of the three main mediums of rabbit semen freezing using differential scanning calorimetry (DSC₇ Perkin-Elmer). The real freezing and thawing rates are presented for each freezing method. The crystallization phenomenon in the cryoprotective solutions are characterized by temperatures measurements of the first ice crystals appearance and estimations of the total quantity of ice formed. Our first calorimetric approach establishes the bases necessary to define the optimal rates for the rabbit semen freezing.

Introduction

La congélation de la semence présente de nombreux intérêts dont la possibilité de conserver à très long terme les potentialités des spermatozoïdes en vue d'une utilisation ultérieure. Ainsi, la dissociation spatio-temporelle entre la collecte et l'utilisation de la semence, son fractionnement et sa dilution entraînerait une meilleure valorisation du travail de sélection et une diffusion plus efficace du progrès génétique par la voie mâle (Theau-Clément, 2001). Par ailleurs, face à l'érosion croissante de la biodiversité et à la perte irréversible de gènes potentiellement utiles, la congélation serait une méthode efficace et sûre de conservation de la diversité génétique naturelle. De la même façon, la diversité génétique créée par les nouvelles biotechnologies comme la transgénèse pourrait être conservée, limitant ainsi les coûts de production des animaux transgéniques (Joly, 1997).

Les résultats satisfaisants obtenus pour la congélation de la semence bovine ont permis de développer cette technique en routine dans les élevages. Cependant, chez beaucoup d'autres espèces domestiques dont le lapin, les résultats restent assez décevants, aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Courtens, 1995). Pourtant, la mise en place de semence congelée chez le lapin a parfois donné des résultats prometteurs proches de ceux obtenus en fertilité et prolificité après insémination de semence fraîche (Andrieu et Courot, 1976 ; Chen et Foote, 1989 ; Mocé *et al.*, 2003). Cependant, ces résultats sont difficilement reproductibles avec une grande variabilité de réponse à la congélation entre les différentes populations,

entre individus d'une même population et entre éjaculats d'un même individu (Salveti, 2004). Ainsi, ces méthodes ne constituent pas un outil suffisamment fiable pour la diffusion du progrès génétique dans les élevages de production ou pour conserver les ressources génétiques chez le lapin.

Les méthodes de congélation existantes ne sont pas définies de manière suffisamment précise pour être reproductibles ce qui explique partiellement les variabilités observées. Par conséquent, il semble nécessaire de standardiser les protocoles expérimentaux et de s'intéresser tout particulièrement aux cinétiques de refroidissement et de réchauffement directement liées au taux de survie cellulaire. La vitesse de refroidissement optimale doit être assez basse pour permettre une déshydratation partielle de la cellule et éviter la cristallisation intracellulaire, mais suffisamment élevée pour limiter « l'effet de solution » caractéristique des faibles vitesses de refroidissement (Mazur, *et al.*, 1972).

La cryomicroscopie, grâce à l'observation visuelle du comportement cellulaire et des phénomènes de cristallisation et de fusion, pourrait permettre de déterminer les cinétiques optimales. Cependant, cette technique semble limitée dans le cas des cellules non sphériques comme les spermatozoïdes de lapin du fait des sources d'erreurs liées aux projections en deux dimensions. En revanche, l'utilisation de la calorimétrie différentielle à balayage permet de réaliser des mesures quantitatives et dynamiques de la quantité de glace cristallisée et fondue, indépendamment de la forme et de la taille cellulaire (Devireddy *et al.*, 1998). De ce fait, les premières

applications pour la congélation de semence ont été effectuées dans le but d'optimiser les cinétiques de refroidissement utilisées pour la congélation de la semence de plusieurs espèces : souris (Devireddy *et al.*, 1999), homme (Devireddy *et al.*, 2000), étalon (Devireddy *et al.*, 2002), verrat (Devireddy *et al.*, 2004).

L'objectif de cette étude est de caractériser le comportement thermodynamique des principales solutions cryoprotectrices utilisées dans trois méthodes de congélation de semence : Andrieu et Courot (1976), Chen et Foote (1989) et Mocé *et al.* (2003).

1. Matériel et méthodes

1.1. Origine de la semence

Les semences de lapin utilisées pour les mesures calorimétriques ont été fournies par « Grimaud Frères SA ». Les échantillons de semence pure et diluée au tiers dans du Galap (IMV, France) ont été acheminés par voie postale dans des boîtes maintenues à 5°C. Les études ont été réalisées, en homospermie, 24 à 48h après collecte.

1.2. Confection des milieux de congélation

Les milieux de congélation testés sont : Andrieu et Courot (1976) [eau, jaune d'œuf (20%), DMSO (2,5%), glycérol (0,65%), lactose, D-Glucose, tampon Tris], Chen et Foote (1989) [eau, jaune d'œuf (20%), acétamide (5%), lactose, glucose, raffinose], Mocé *et al.* (2003) [eau, DMSO (12,43%), saccharose, D-Glucose, tampon Tris].

Tous les milieux ont été réalisés à partir de produits chimiques de Fisher Scientific SAS et de jaune d'œufs BIO « Matines ». Les pH ont été ajustés à 6,8.

1.3. Mesures des cinétiques

Les cinétiques exactes de refroidissement et de réchauffement ont été déterminées en suivant l'évolution de la température de semences collectées à la Station d'Amélioration Génétique des Animaux (Centre INRA de Toulouse). L'utilisation de thermocouples a permis le suivi de la température à l'intérieur même des paillettes (0,5 ml, IMV France). Ainsi, quatre thermocouples préalablement étalonnés ont été reliés à un scanner de température multicanaux CONSORT T851 permettant l'acquisition informatique des données avec une fréquence d'enregistrement élevée (1 enregistrement/seconde). Le nombre de répétitions est variable selon l'étape de la méthode considérée : deux répétitions jusqu'au conditionnement en paillettes (semence dans le tube de collecte), huit depuis la mise en paillettes jusqu'au stockage dans l'azote liquide puis quatre pour l'étape de réchauffement. Les valeurs présentées résulteront de la moyenne des mesures effectuées pour chaque répétition.

1.4. Mesures calorimétriques

Afin d'évaluer le comportement thermodynamique des milieux de congélation, les mesures calorimétriques (quantité de glace formée ;

température de début de cristallisation) ont été réalisées au calorimètre différentiel à balayage (DSC₇, Perkin Elmer) avec ou sans semence. Pour chaque méthode de congélation, les échantillons « milieux seuls », « milieux seuls + semence pure » ou « milieux seuls + semence diluée » ont été soumis aux cinétiques précédemment mesurées et programmées sur le calorimètre. Les dilutions de la semence dans les milieux de congélation ont été effectuées selon les modalités décrites par les auteurs. Pour la technique de Andrieu et Courot (1976) qui utilise une double dilution de la semence avec deux milieux de compositions différentes, les mesures calorimétriques ont débuté à 5°C. Les limites techniques du calorimètre n'ont pas permis de descendre au-delà de -180°C ni de reproduire les cinétiques de réchauffement mesurées (vitesse limite : 300°C/min).

Les mesures au DSC₇ étant reproductibles (Devireddy *et al.*, 1998), deux mesures par échantillon ont été suffisantes pour garantir une bonne fiabilité des résultats.

2. Résultats

2.1. Mesures des cinétiques

La figure 1 met en évidence les cinétiques moyennes de congélation et de décongélation des trois méthodes de congélation qui seront reproduites pour les mesures calorimétriques. On observe que la méthode de Mocé *et al.* est plus rapide que les deux autres méthodes du fait de la rapidité du refroidissement à 5°C qui est effectué sur de la semence déjà conditionnée en paillettes. En effet, contrairement aux autres méthodes où le conditionnement de la semence en paillettes de 0,5 ml (IMV France) est réalisé à 5°C, il est effectué à température ambiante pour la méthode de Mocé *et al.* (2003). De plus, on remarque que les cinétiques de réchauffement, pour ces trois méthodes, sont proches (630 à 730°C/min) même si les conditions expérimentales diffèrent.

2.2. Mesures calorimétriques

On observe que les mesures calorimétriques sur la quantité de glace formée (Q) ou sur la température de début de cristallisation (T_c) présentent une variabilité assez importante, notamment en présence de semence pure ou diluée (figure 2 et 3).

D'après la figure 2, on remarque que la méthode de Andrieu et Courot permet de minimiser la quantité de glace formée en présence de semence pure ou diluée (~ 30%) suivie de Mocé *et al.* (~ 34%) puis de Chen et Foote (~ 43%). De plus, la méthode de Andrieu et Courot présente peu de différences entre les résultats obtenus pour les différents échantillons (milieu seul ou avec semence pure ou diluée).

Au niveau des mesures réalisées sur T_c (figure 3), les valeurs moyennes toutes solutions confondues (milieu avec ou sans semence) montrent que les méthodes de Andrieu et Courot et de Mocé *et al.* semblent cristalliser à des températures plus basses que la solution de Chen et Foote.

Figure 1 : Cinétiques moyennes de refroidissement et de réchauffement mesurées respectivement pour Andrieu et Courot (1976), Chen et Foote (1989) et Mocé *et al.* (2003).

N.B : Les axes des abscisses présentent des ruptures d'échelles afin de mieux visualiser les étapes rapides des méthodes de congélation. Pour les deux premières méthodes, la durée de refroidissement jusqu'à 5°C a été écourtée.

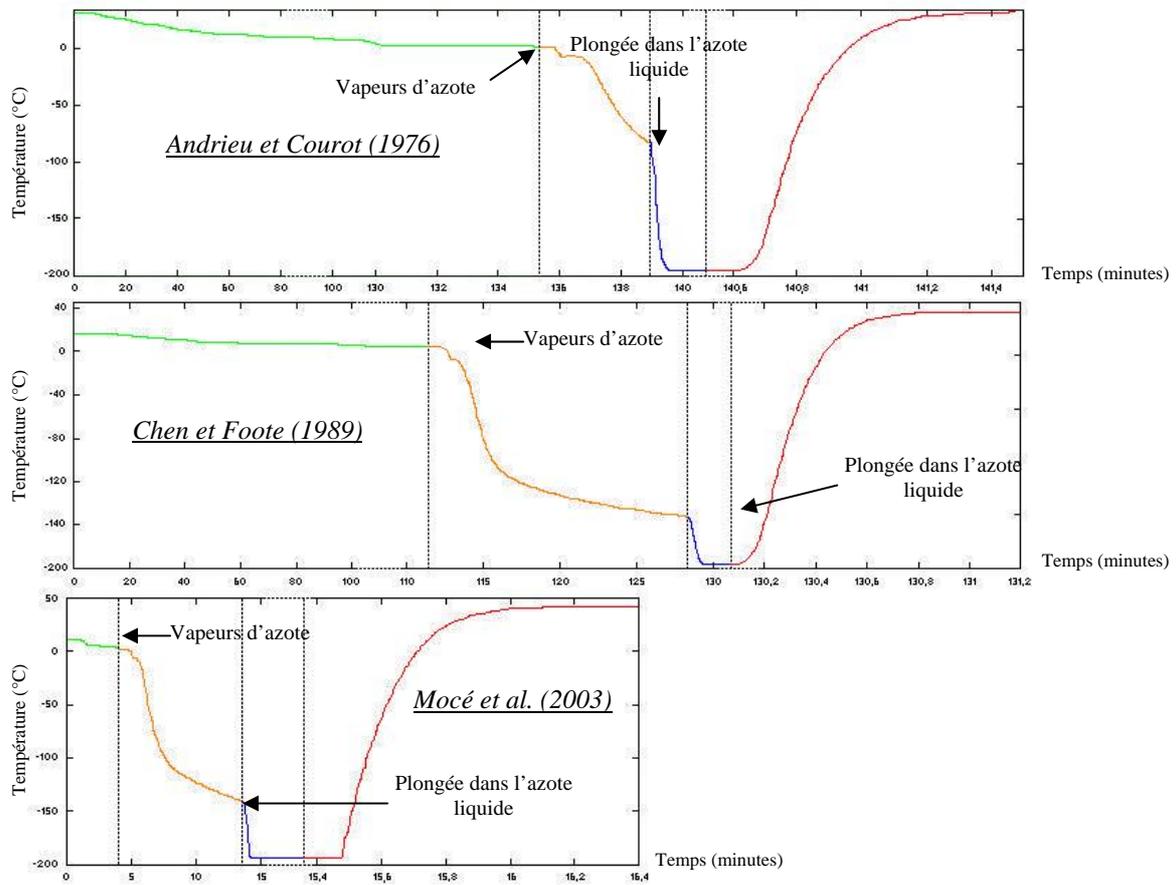


Figure 2 : Quantité de glace formée (Q) dans les solutions avec ou sans semence (diluées ou non) pour chaque méthode de congélation.

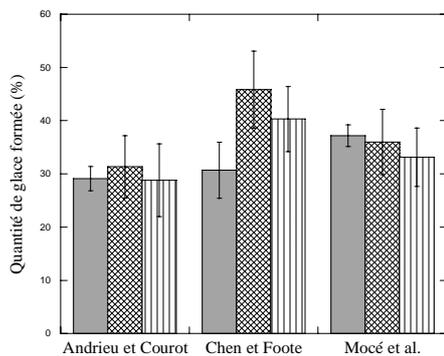
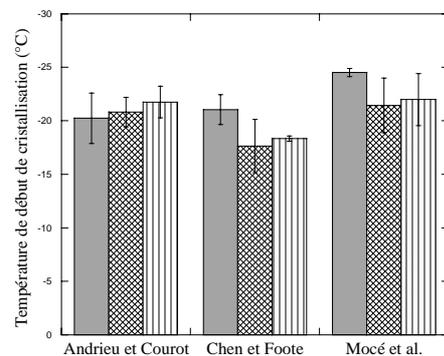


Figure 3 : Température de début de cristallisation (T_c) des solutions avec ou sans semence (diluée ou non) pour chaque méthode de congélation.



Milieu seul
 Milieu + semence pure
 Milieu + semence dilué

3. Discussion

Les mesures calorimétriques montrent que la phase critique de la congélation se situe autour de -20°C lorsque les premiers cristaux de glace apparaissent. D'après les mesures de cinétiques, on observe que ce phénomène se déroule, pour les trois méthodes étudiées, dès que les paillettes de semence sont placées dans les vapeurs d'azote. Contrairement aux idées reçues, les dommages ne sont pas infligés aux spermatozoïdes pendant la plongée dans l'azote liquide mais lors de la période qui la précède. Il est important et nécessaire de mieux maîtriser le refroidissement des paillettes dans les vapeurs d'azote qui reste une étape encore empirique. C'est pourquoi la pratique du « seeding » (technique permettant d'induire la cristallisation dans un milieu en surfusion) permettrait de mieux contrôler la formation de la glace et d'optimiser les résultats comme Chen et Foote, (1994) ont déjà pu le mettre en évidence. De plus, le contrôle des vitesses de refroidissement autour des -20°C (congélateur programmable) permettrait une meilleure maîtrise du phénomène de cristallisation. Ces améliorations pourraient peut être permettre de diminuer une partie de la variabilité des résultats en congélation de semence de lapin.

Les quantités de glace formées en présence de semence montrent que la méthode d'Andrieu et Courot (1976) semble la plus adaptée à la congélation de semence de lapin puisque elle permet de limiter la cristallisation. Cependant, la technique de calorimétrie différentielle à balayage ne précise pas la localisation de la glace dans la solution et en particulier les proportions de glace intra et extracellulaire. De plus, l'adjonction de semence pure ou diluée dans la solution de Andrieu et Courot ne semble pas modifier notablement ses propriétés thermodynamiques. Cet aspect est important pour prendre en compte l'hétérogénéité des éjaculats.

Ainsi, des études calorimétriques et cryomicroscopiques complémentaires doivent être menées pour déterminer les cinétiques optimales et améliorer les méthodes de congélation de la semence de lapin.

Conclusion

Cette étude a permis de caractériser d'un point de vue thermodynamique les méthodes de congélation de Andrieu et Courot (1976), Chen et Foote (1989) et Mocé *et al.* (2003). Ainsi, la détermination des cinétiques de refroidissement et de réchauffement et leur approche calorimétrique ont mis en évidence les phases critiques à étudier pour espérer rendre la cryoconservation de la semence de lapin applicable dans les élevages de production et en conservation des ressources génétiques lapin.

Remerciements

Cette étude a été menée au Centre de Recherches sur les Très Basses Températures (CNRS, Grenoble). Nous remercions vivement Grimaud Frères SA représenté par Jacques Hurtaud pour nous avoir généreusement fourni la semence nécessaire à la réalisation de cette étude ainsi que le personnel de la SAGA pour leur aide précieuse.

Références

- ANDRIEU R, COUROT M ; 1976. Congélation du sperme de lapin en vue de l'insémination artificielle. *1^{er} Congrès International Cunicole*, Dijon, communication n°67.
- CHEN Y, YANG X, FOOTE R.H, 1989. Timed breeding of rabbits with fresh and frozen-thawed semen and evidence of acrosome alteration following freezing and thawing. *Anim. Reprod. Sci.*, 18, 35-41.
- CHEN Y, FOOTE R.H, 1994. Survival of rabbit spermatozoa frozen and thawed at different rates with and without seeding. *Anim. Reprod. Sci.*, 35, 131-143.
- COURTENS J.L ; 1995. La congélation de la semence de lapin. *Cuniculture* n°123, 22 (3), 101-102.
- DEVIREDDY R.V, RAHA D, BISCHOF J.C, 1998. Measurement of water transport during freezing in cell suspensions using a differential scanning calorimeter. *Cryobiology*, 36, 124-155.
- DEVIREDDY R.V, SWANLUND D.J, ROBERTS K.P, BISCHOF J.C, 1999. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents. *Biol. Reprod.*, 61, 764-775.
- DEVIREDDY R.V, SWANLUND D.J, ROBERTS K.P, PRYOR J.L, BISCHOF J.C, 2000. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Hum. Reprod.*, 15 (5), 1125-1135.
- DEVIREDDY R.V, SWANLUND D.J, OLIN T, VINCENTE W, TROEDSSON M.H.T, BISCHOF J.C, ROBERTS K.P, 2002. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol. Reprod.*, 66, 222-231.
- DEVIREDDY R.V, FAHRIG B, GODKE R.A, LEIBO S.P, 2004. Subzero water transport characteristics of boar spermatozoa confirm observed optimal cooling rates. *Mol. Reprod. Dev.*, 67, 446-457.
- JOLY T, 1997. Etablissement d'une cryobanque de semence ou d'embryons pour la conservation ex situ de la diversité génétique chez les mammifères domestiques : l'exemple du lapin (*Oryctolagus cuniculus*). *Thèse doctorale en « Analyse et modélisation de systèmes biologiques »* : Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 143 p.
- MAZUR P, LEIBO S.P, CHU E.H.Y, 1972. A two factor hypothesis of freezing injury. *Exp. Cell Res.*, 71, 345-355.
- MOCE E, VICENTE J.S, LAVARA R, 2003. Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology*, 60, 115-123.
- SALVETTI P, 2004. Comparaison de deux méthodes de congélation de la semence de lapin. *Mémoire de Fin d'Etudes. ISARA-Lyon*, 97 p.
- THEAU-CLEMENT M, 2001. Etude de quelques facteurs de contrôle de l'interaction entre la lactation et la reproduction chez la lapine conduite en insémination artificielle. *Thèse doctorale en « Sciences agronomiques »*. Institut National Polytechnique de Toulouse, 103 p.