

CONTACT: Secrétariat exécutif de la Cryobanque nationale

Delphine DUCLOS, Institut de l'Elevage, Département Génétique 149 rue de Bercy 75595 Paris Cedex 12

Tél.: 05 61 75 44 59 – méil: delphine.duclos@idele.fr

Site Internet de la Cryobanque nationale: <http://www.cryobanque.org>

UN NOUVEAU SITE DE CONTACT AVEC LA CRYOBANQUE NATIONALE GRACE A L'OUVERTURE DU PORTAIL WEB DE CRB-ANIM LE 1^{ER} SEPTEMBRE

La Cryobanque Nationale est un des Centres de Ressources Biologiques membre de l'infrastructure nationale CRB-Anim, financée par le projet ANR-11-INBS-0003 du Programme Investissements d'Avenir de 2013 à 2019 (programme PIA1).

Le portail web de CRB-Anim a été élaboré depuis août 2016 avec l'appui d'un prestataire informatique afin de constituer un guichet unique pour les demandes d'entrée et de sortie des échantillons, ainsi que pour les demandes de renseignements sur les collections. Il donne accès aux informations sur les échantillons présents dans la Cryobanque Nationale mais aussi sur les échantillons présents dans les autres Centres de Ressources Biologiques pour les animaux domestiques. Ainsi, en recherchant quelle race est présente en Cryobanque, il sera possible non seulement d'identifier quels animaux ont de la semence stockée mais aussi s'ils ont du sang, de l'ADN ou d'autres tissus stockés dans un CRB génomique.



Comme actuellement, chaque CRB validera l'envoi ou la réception des échantillons après signature d'un Accord de Transfert de Matériel (MTA) et les mouvements seront suivis sur la base de données centrale du portail pour établir les statistiques d'utilisation.

Dans le cas de la Cryobanque, la procédure de droit de véto du déposant est inchangée et le conseil de groupement devra valider toute demande d'entrée ou de sortie comme c'est le cas actuellement. Les demandes d'entrée en collection devront respecter la liste des descripteurs minimaux établie pour l'ensemble des espèces représentées dans CRB-Anim.

Veuillez noter l'adresse : www.crb-anim.fr/access-to-collection

Le plan d'action à 6 mois va consister à :

- développer une aide en ligne pour faciliter la prise en main par les utilisateurs
- maximiser la proportion des données des CRB affichée sur le portail en complétant les informations qui seraient manquantes
- actualiser les tables de référence, notamment pour les noms de race
- améliorer le portail en continu par l'écoute des utilisateurs

DES AVANCEES SUR LES TECHNIQUES DE CRYOPRESERVATION DE LA SEMENCE ET SUR SON UTILISATION EN INSEMINATION ANIMALE

M. Magistrini, M. Halgrain, I. Grasseau, I. Couty, A. Thélie, E. Blesbois
Equipe « Gonade, Conservation, Valorisation », INRA-UMR-PRC, 37380 Nouzilly, France

En collaboration avec : pour la partie asine, Fabrice Reigner et son équipe (UE PAO, INRA, 37380 Nouzilly),
Pour la partie oiseaux, Isabelle Grimaud, Joël Delaveau, Christophe Rat, Karine Anger et son équipe (UE-PEAT, INRA, 37380 Nouzilly),

Congeler de la semence à mettre en cryobanque pour conserver durablement le patrimoine génétique semble une opération assez simple chez des espèces/races où une méthode existe depuis longtemps, où les pères sont très fertiles et où l'insémination animale (IA) est de pratique courante.

Baucoup d'espèces et de races échappent cependant à cette sécurité ! Il est en est ainsi pour une espèce de mammifère dite « orpheline », l'âne mais aussi pour de nombreuses espèces d'oiseaux (ex, la caille). Grâce à l'infrastructure nationale CRB-anim, nous avons pu, dans notre équipe, étudier d'un peu plus près ces cas « difficiles ». Nous avons mis en évidence l'importance de facteurs multiples qui conditionnent la réussite de la cryopréservation et de l'IA, facteurs sans doute très importants pour l'ensemble des espèces, même les plus « faciles ». Parmi eux, la conduite d'élevage et de traitement des animaux, la qualité initiale de la semence et la méthode de cryopréservation sont des points critiques majeurs.

1- Des exemples d'avancées sur la conduite d'élevage et du traitement des animaux

Chez l'âne, il était d'abord important de mieux connaître les aspects physiologiques de la cyclicité des ânesses, en particulier l'induction d'ovulation ainsi que les procédures possibles d'IA afin de les maîtriser pour une utilisation efficace de la semence congelée. Des dosages de progestérone ont été réalisés et la dose de l'analogue du GnRH, le Suprefact, a été adaptée à l'espèce asine. La fertilité de notre troupeau expérimental de 10 ânesses a ainsi pu être évaluée après insémination de semence fraîche à 70% (7/10).

L'IA de l'ânesse pose par ailleurs de réels problèmes à cause de l'anatomie du col de l'utérus. Pour y pallier, nous avons commencé depuis peu à utiliser un appareil d'aide à l'insémination, « l'Alpha Vision » (IMV-Technologies, L'Aigle, France) qui permet de passer le col de l'utérus de la femelle dans des conditions optimales. Nous avons pu mettre en évidence la différence anatomique du col de l'utérus entre l'ânesse et la jument et ainsi mieux appréhender la technique d'IA dans cette espèce. C'est une évolution technologique très prometteuse.

Chez la caille, les conditions d'élevage n'étaient pas du tout optimisées pour la conduite du prélèvement et de l'utilisation de semence congelée. De plus, cette espèce distribue avec la semence une sécrétion abdominale nommée « la mousse » qui impacte l'utilisation des gamètes. Nous avons successivement mis en place, à l'aide de massages, un système de collecte et de conditionnement de la semence puis un mode d'insémination efficaces respectant le bien être optimal des animaux. Dans ce système, la mousse est écartée afin de ne pas impacter la qualité de la semence et un milieu spécifique de dilution de la semence a été mis au point.

2- Un nouveau test diagnostique de la fertilité

Un des points les plus importants pour obtenir une bonne fertilité avec de la semence cryopréservée (en complément de la méthode de congélation elle-même et de son mode d'utilisation après décongélation) est la qualité initiale de la semence. Une mauvaise qualité initiale entraîne, dans tous les cas, une très mauvaise fertilité après décongélation. Mais la qualité de la semence est un critère très difficile à évaluer et aucun des nombreux tests classiques existants ne permet de l'approcher suffisamment. Nous avons utilisé les nouveaux apports des méthodes protéomiques pour effectuer une véritable rupture technologique dans ce domaine et nous avons mis en place un test simple d'évaluation de la fertilité des pères. Ce test est basé sur l'évaluation du profil des protéines des semences dans une gamme restreinte de poids moléculaire (1000-20000 daltons) puis ce profil est associé à une modélisation

mathématique adaptée (figure 1). Mis en place sur l'espèce poule pour laquelle nous pouvons disposer d'évaluations très précises de la fertilité, ce test s'est avéré bien plus efficace que toutes les autres méthodes existantes (Soler et al., 2016).

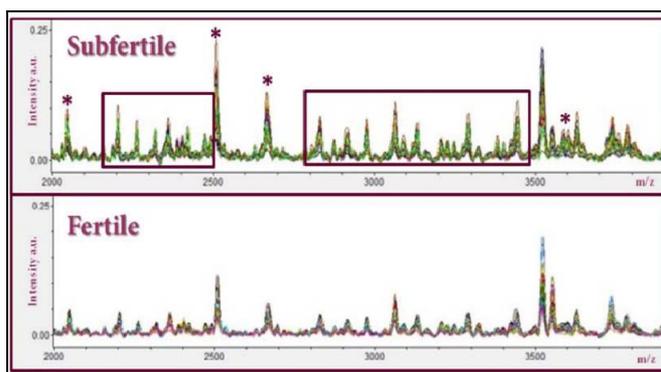


Figure 1. Exemples d'un profil de semence subfertile et d'un profil de semence très fertile

3- Des améliorations des méthodes de cryopréservation

Chez l'âne, nous avons testé, sur les spermatozoïdes de baudets, les milieux mis au point et brevetés chez le cheval : le milieu INRA96® pour une conservation optimale à la température de 4°C et le milieu INRA Freeze, pour la congélation de la semence.

Les résultats de mobilité des gamètes étaient très encourageants (équivalents à ceux obtenus chez l'étalon). Cependant, nous avons observé des discordances lorsque ce paramètre était associé à d'autres critères de qualité in vitro dont l'intégrité membranaire des spermatozoïdes (figure 2). Le milieu INRA Freeze a cependant présenté les résultats in vitro les plus élevés même si la fertilité obtenue après insémination artificielle a été faible (14% de fertilité par cycle ; n= 14 cycles exploités).

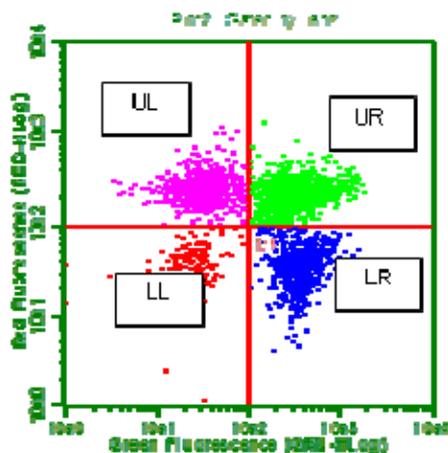


Figure 2. Exemple d'histogramme bi-paramétrique obtenu en cytométrie en flux après marquage des spermatozoïdes asins avec les 2 sondes fluorescentes CFDA (di-acétate de fluorescéine) et IP (iodure de propidium) permettant d'évaluer la viabilité des cellules. Les populations d'intérêt sont celles dans les cadrans « LR » et « UR », c'est-à-dire les populations de spermatozoïdes présentant une viabilité de bonne à moyenne. Chaque point représente un spermatozoïde.

Le milieu INRA Freeze étant issu de l'association du milieu INRA96 au plasma de jaune d'œuf (JO) et au glycérol, nous avons voulu évaluer la part de chacun de ces composants dans la protection apportée aux spermatozoïdes de baudet. De plus, nous avons évalué l'impact de la descente de température de 37°C à 4°C utilisée lors du processus de congélation. Des analyses de mobilité, d'intégrité membranaire et acrosomique et d'activité mitochondriale ont été réalisées. Nous avons ainsi mis en évidence le rôle protecteur du plasma de JO sur les spermatozoïdes de baudets et constaté l'effet néfaste du glycérol sur ces derniers en l'absence de plasma de JO. Nos travaux se poursuivent donc dans ce sens.

Par ailleurs, il a été démontré, sur la semence d'étalon (Pillet et al., 2011), que les liposomes de phospholipides de JO pouvaient remplacer le plasma de JO dans les milieux de congélation. Cette hypothèse est en cours de validation dans notre laboratoire sur la semence de baudets.

Chez le coq, plusieurs méthodes de congélation de semence existent mais leurs résultats sont très variables. Dans le cadre de CRB-Anim, deux types d'améliorations ont été apportées : un raffinement de la méthode employée au laboratoire (augmentation de la précision de chaque étape de congélation, de décongélation, y compris celle des inséminations), et l'apport dans le milieu de congélation d'un

composé antioxydant qui limite l'altération des gamètes liée aux stress thermiques et osmotiques du processus (N Guyen et al., 2016).

En conclusion, l'infrastructure de recherche nationale CRB-Anim a permis quelques avancées marquantes pour les biotechnologies de la semence destinées à la conservation des ressources génétiques. Parmi celles-ci, la mise en place de méthodes fonctionnelles de gestion des semences/inséminations chez des espèces qui n'en disposaient pas et un test innovant de fertilité constituent des progrès au moins aussi importants que ceux portés aux méthodes de congélation elles-mêmes.

Remerciements :

Ce travail a pu être réalisé grâce aux financements de l'INRA et de l'Infrastructure Nationale de Recherche CRB-anim financée sur Projet Investissement d'Avenir ANR-11-INBS-0003.

Nous tenons à remercier chaleureusement les éleveurs et les Associations nationales de races (ACO, ANO) qui ont participé de façon active au projet. Nous remercions également Mr. Philippe Hubert de l'association Grand Noir du Berry et Mr. FX Martin de l'association Baudet du Poitou. Nous souhaitons associer également nos collègues de l'IFCE et en particulier Alain Garot (Direction Appui à la Filière et Animation des Territoires, délégué national trait, ânes et chevaux de territoire) et Guillaume Blanc (Direction Appui à la Filière et Animation des Territoires). Enfin nous remercions la société IMV-Technologies (L'Aigle, France) pour le prêt de l'Alpha Vision et la prise en mains de l'appareil (Guy Delhomme et Andrés Gonzales).

ENQUETE SUR LES COLLECTIONS DE RESSOURCES GENETIQUES ANIMALES EN EUROPE

Dans le cadre du projet H2020 [IMAGE](http://www.imageh2020.eu/) (Innovative Management of Animal Genetic Resources) coordonné par l'INRA, une enquête a été envoyée à tous les pays européens pour savoir s'il existait chez eux des collections de matériel reproductif et/ou de collections génomiques. Ce sont en tout une soixantaine de responsables de collection qui ont répondu provenant d'une vingtaine de pays. Le but de cette enquête était de dresser un état des lieux non exhaustif des collections de ressources génétiques animales en Europe et de mieux connaître les différentes organisations existantes. Nous présentons ici quelques résultats issus de cette étude, l'ensemble du rapport sera disponible sur le site du projet : <http://www.imageh2020.eu/>.

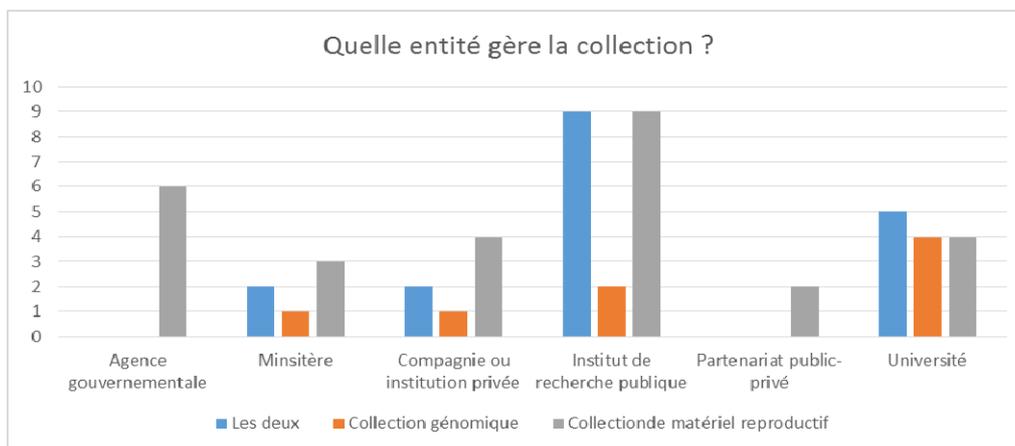


La majorité des réponses reçues concernent des collections de matériel reproductif.

Remarque : 29 réponses ont été reçues de collections espagnoles, dont une grande part concerne du matériel reproductif. Ce grand nombre de collections en Espagne peut s'expliquer par son fonctionnement très régionalisé qui induit un grand nombre de structures pour ce pays.

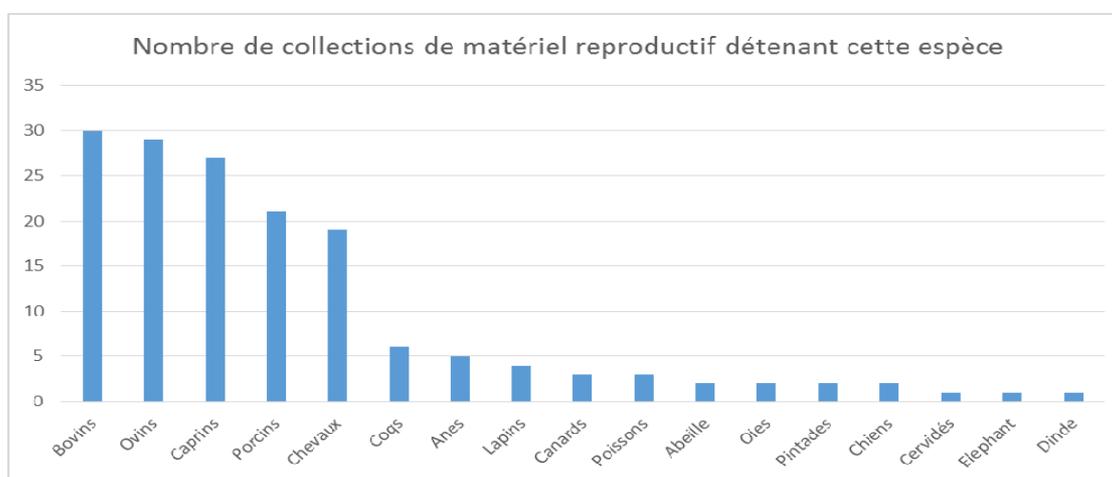
La question était également posée de savoir qui gère la collection.

Comme le montre le graphique suivant, on retrouve le plus souvent des organismes de recherche publique ou un peu moins fréquemment des universités en charge des collections.



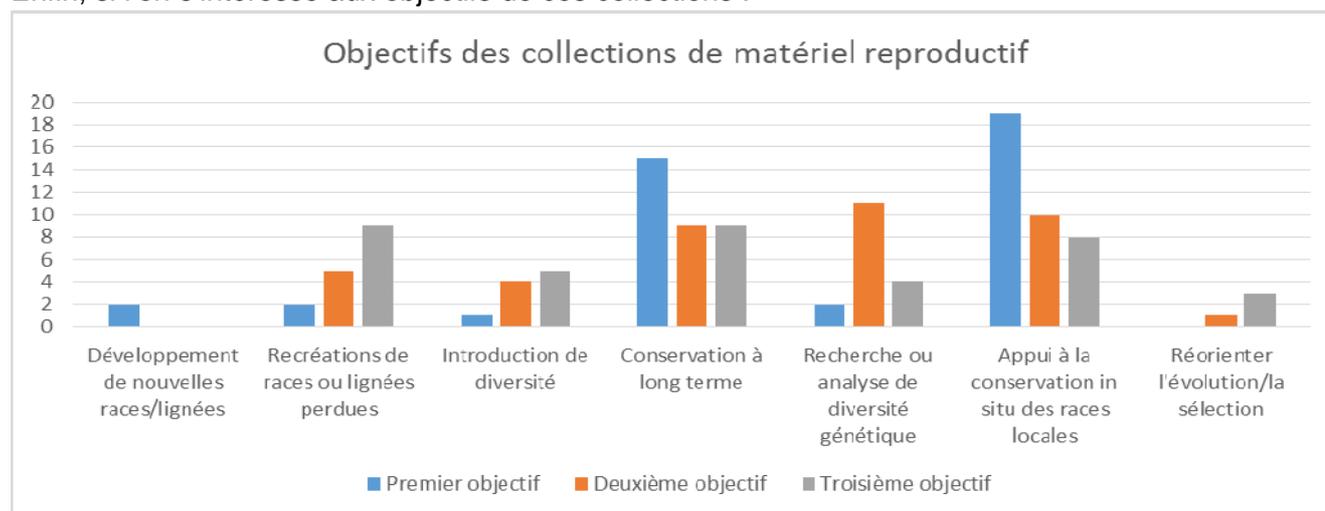
Pour la suite, seules les réponses provenant des collections de matériel reproductif seront prises en compte.

D'abord concernant la fréquence de présence des différentes espèces dans les collections :



Ce sont les ruminants, en particulier bovin et ovin qui sont les plus représentés dans les collections, suivis par les porcins et les chevaux.

Enfin, si l'on s'intéresse aux objectifs de ces collections :



Les deux plus fréquemment cités sont l'appui à la conservation *in situ* des races locales ainsi que la conservation à long terme.

Cette étude montre bien la grande diversité de structures et d'organisation entre les différentes collections en Europe.

VISITE DU SITE PRIMAIRE PAR HARVEY BLACKBURN, RESPONSABLE DE LA CRYOBANQUE ANIMALE AMERICAINE

Harvey Blackburn (NCGRP - National Center for Genetic Resources Preservation) a profité de sa venue à Paris à l'occasion du séminaire international de CRB-Anim pour visiter le site primaire de la Cryobanque nationale (situé dans les locaux de l'ACSEDIATE à Maisons-Alfort). Après avoir été accueilli par la directrice de l'ACSEDIATE, Edith Authié, David Briganti, responsable de la gestion de la collection, a fait visiter les locaux et montré quelques-uns de ses « trucs et astuces » pour manipuler plus confortablement les paillettes.



David Briganti montrant l'intérieur d'une cuve de la Cryobanque à Harvey Blackburn

(Crédit photo : C. Danchin-Burge idele)

La cryobanque américaine, pour la partie animale, est née en 1999 comme sa version française, mais bénéficie d'une logistique largement plus importante. Aujourd'hui, pour les collections animales et végétales, ce sont plus de 60 containers qui sont détenus à Fort Collins (Colorado) sous l'égide du Ministère de l'Agriculture américain (USDA). Contrairement à la collection française, la majorité des échantillons sont transportés en frais jusqu'à Fort Collins où ils sont analysés, conditionnés puis stockés. Aujourd'hui ce sont approximativement 800 000 échantillons (semence, embryons, ponction d'ovaires et de testicules, sang) provenant de 25 000 animaux différents. Le panel d'espèces conservé est également large : on y retrouve les espèces classiques (ruminants, équidés etc.) mais aussi du wapiti ou encore du bison. A noter que la majorité des races conservées ne sont pas originaires des USA, leur biodiversité en la matière étant relativement pauvre, la majorité des espèces d'élevages étant arrivées récemment en Amérique du Nord, avec l'arrivée des européens. Il est intéressant de noter que la cryobanque américaine fait preuve d'originalité en soutenant de nombreux projets d'utilisation de ses collections de semence congelée pour des applications variées.