



Vers la mise au point d'un nouveau milieu de congélation pour la semence équine : le plasma de jaune d'œuf gamma-irradié peut remplacer le jaune d'œuf

E. Pillet^{1,2}, F. Batellier¹, G. Duchamp¹, B. Bruneau¹, J.M. Yvon¹, S. Desherces², E. Schmitt², M. Magistrini¹

1) INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly, France ;
2) IMV-Technologies, 61 302 L'Aigle, France.

Résumé

Dans le but de substituer le jaune d'œuf des milieux de congélation de la semence, nous avons testé l'effet cryoprotecteur d'une fraction de jaune d'œuf, le plasma, après l'avoir gamma-irradiée, pour garantir sa stérilité. La semence de 2 étalons (8 éjaculats/étalon) a ainsi été congelée dans les milieux INRA96[®] supplémentés de 2% de jaune d'œuf (v/v) et 2,5% de glycérol (v/v) (utilisé comme milieu témoin) ou de 2% de plasma de jaune d'œuf gamma-irradié (w/v) et 2,5% de glycérol (v/v). Une expérience de fertilité a été conduite sur un total de 70 cycles de juments. Les taux de fertilité obtenus ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre le plasma de jaune d'œuf gamma-irradié (69% ; 24/35) et le jaune d'œuf frais (60% ; 21/35) ($p > 0.05$). De même, aucune différence notable des paramètres de mobilité n'a été mise en évidence. Le plasma de jaune d'œuf gamma-irradié offre donc un pouvoir cryoprotecteur équivalent à celui du jaune d'œuf frais. Il pourra ainsi remplacer le jaune d'œuf et permettre la mise au point d'un milieu disponible prêt à l'emploi, pour congeler la semence équine sur le terrain.

Mots-clés : cryoprotection / jaune d'œuf / milieu / spermatozoïde / étalon

Summary

To find a substitute for egg yolk in freezing extenders we tested the cryoprotective effect of a fraction of egg yolk, egg yolk plasma, which was irradiated to assure its sterility. Thus semen from 2 stallions (8 ejaculates/stallion) was frozen in INRA96[®] extenders either supplemented with 2% egg yolk (v/v) and 2.5% glycerol (v/v) (used as the control extender) or with 2% irradiated egg yolk plasma (w/v) and 2.5% glycerol (v/v). A fertility trial was conducted on a total of 70 mare cycles. Fertility rates shown no significant difference between irradiated egg yolk plasma (69%; 24/35) and fresh egg yolk (60%; 21/35) ($p > 0.05$). Similarly, no noteworthy difference of motility parameters was observed. So, irradiated egg yolk plasma offers a cryoprotective effect equivalent to fresh egg yolk. Thus it would replace egg yolk and permit the development of an extender, available ready to use, to freeze equine semen on the fields.

Key-words : cryopreservation / egg yolk / extender / spermatozoa / stallion

Introduction

Le jaune d'œuf présente une kyrielle de propriétés intéressantes : des propriétés émulsifiantes, gélifiantes, colorantes, aromatiques... mais aussi des propriétés cryoprotectrices reconnues. Ainsi, depuis plus de 60 ans, le jaune d'œuf est classiquement utilisé dans les milieux de congélation de la semence de nombreuses espèces, notamment de l'espèce équine. Il est utilisé avec succès en tant qu'agent protecteur des spermatozoïdes lors de la congélation. Pourquoi vouloir le remplacer ?

Utiliser du jaune d'œuf dans les milieux de congélation présente en réalité trois inconvénients majeurs. Premièrement, le jaune d'œuf est un produit d'origine animale. Il constitue un risque de contamination bactérienne pour la semence. Les produits d'origine animale souffrent de plus d'une mauvaise image dans la société actuelle et peuvent poser des problèmes réglementaires au niveau de certains pays importateurs de milieux. Deuxièmement, le jaune d'œuf est un produit extrêmement complexe, de composition variable selon son origine. En effet, sa composition varie avec le régime alimentaire des poules par exemple. Le jaune d'œuf renferme ainsi une mine de molécules, et peut contenir à la fois des molécules bénéfiques et des molécules délétères pour les spermatozoïdes. Troisièmement, le jaune d'œuf doit être habilement séparé du blanc, puis consciencieusement purifié de toute trace de blanc, avant de subir une étape de centrifugation et d'être enfin ajouté au milieu de congélation. L'utilisateur sur le terrain est donc contraint de procéder à des «séances de cuisine», coûteuses en temps. Compte-tenu de ces différents inconvénients, la demande pour trouver une alternative à l'utilisation du jaune d'œuf dans les milieux de congélation se fait de plus en plus soutenue.

Trouver des molécules alternatives au jaune d'œuf s'avère toutefois d'autant plus difficile que le mécanisme précis par lequel le jaune d'œuf protège les spermatozoïdes lors de la congélation est inconnu. La congélation s'accompagne de différents phénomènes assimilables à des stress pour les spermatozoïdes, tels que la descente de température (« le cold shock »), la déshydratation, la formation des cristaux de glace. Ces stress engendrent des dommages sur les spermatozoïdes, notamment des perturbations de leur membrane plasmique, des altérations de leur acrosome, ou encore des dommages oxydatifs. Or il est essentiel de protéger les spermatozoïdes de ces dommages pour préserver leur pouvoir fécondant. L'effet protecteur du jaune d'œuf est reconnu et largement attribué à ses lipoprotéines de faible densité (LDL pour Low Density Lipoprotein). Bien que les interactions mises en jeu entre les LDL et les spermatozoïdes restent à élucider, l'intérêt des LDL a en effet été démontré dans différentes espèces, notamment bovine (Moussa et *al.*, 2002) ou encore très récemment dans l'espèce canine (Bencharif et *al.*, 2008). Les LDL constituent le composant majeur du jaune d'œuf et sont présents dans la fraction plasma du jaune, fraction qui s'obtient en éliminant les granules du jaune d'œuf.

Techniquement, la possibilité de produire cette fraction plasma à l'échelle industrielle, et de lui faire subir un traitement de gamma-irradiation pour garantir sa stérilité existe. L'objectif de ce travail a donc été de tester le pouvoir cryoprotecteur du plasma de jaune d'œuf gamma-irradié, comparé au jaune d'œuf frais entier, habituellement utilisé sur le terrain. Pour cela, une analyse *in vitro* des paramètres de mobilité des spermatozoïdes à la décongélation, ainsi qu'une expérience de fertilité ont été réalisées.



1. Matériels et méthodes

1.1 Préparation du plasma de jaune d'œuf gamma-irradié

Dans cette expérience, pour préparer la fraction plasma nous avons utilisé du jaune d'œuf de grand mélange industriel. Ce jaune d'œuf se présente sous forme liquide et a subi un traitement de pasteurisation qui garanti sa sécurité microbienne, pour une Date Limite de Consommation (DLC) de 50 jours. La préparation du plasma de jaune d'œuf consiste en l'élimination des granules, et comporte les étapes suivantes : le jaune d'œuf est dilué volume à volume avec une solution de chlorure de sodium (0.17 M NaCl) et mis à agiter pendant une heure à 4°C. Puis cette solution de jaune d'œuf dilué est centrifugée à 10 000g pendant 45 min à 4°C. Le surnageant, correspondant au plasma, est isolé du culot correspondant aux granules. Le plasma est centrifugé à nouveau à 10 000g pendant 45 min à 4°C, afin d'éliminer toute trace de contamination par les granules. Ce plasma a ensuite été envoyé à la société Ionisos (Dagneux, 01) pour subir un traitement de gamma-irradiation, qui garanti sa stérilité.

1.2 Préparation des milieux de congélation

Le milieu de congélation testé se compose du milieu INRA96[®] supplémenté de 2% de plasma gamma-irradié (w/v) et de 2.5% de glycérol (v/v), alors que le milieu témoin se compose lui du milieu INRA96[®] supplémenté de 2% de jaune d'œuf frais (v/v) (obtenu en cassant manuellement des œufs) et de 2.5% de glycérol (v/v). Le milieu INRA96[®] a été utilisé comme base des milieux de congélation suite aux excellents résultats de fertilité obtenus en 2007 (Pillet et *al.*, 2008). Le milieu INRA96[®] est fabriqué industriellement (IMV-Technologies, L'Aigle, France), il est stérile, prêt à l'emploi et contient des antibiotiques et un antifongique. Il doit être conservé à 4°C avant l'ouverture du flacon. Lors du processus de congélation, la première dilution des spermatozoïdes a été réalisée dans le milieu INRA96[®], puis la deuxième dilution et la congélation, dans le milieu INRA96[®] supplémenté, soit de 2% de jaune d'œuf (v/v) soit de 2% de plasma de jaune d'œuf gamma-irradié (w/v), et de 2.5% de glycérol (v/v) (milieu Témoin, et milieu Plasma respectivement). La fabrication des milieux supplémentés a été réalisée en une fois, les milieux ont été aliquotés et stockés au congélateur à -20°C jusqu'à l'utilisation.

1.3 Etalons et collecte de la semence

Deux étalons poneys adultes de type Welsh, logés en box individuel à l'INRA de Nouzilly, et de fertilité connue ont été utilisés. La semence de ces étalons a été collectée au mois de juin, sur un rythme régulier de trois fois par semaine, en utilisant un vagin artificiel de modèle INRA. Huit éjaculats par étalon ont été collectés. Après la collecte, la semence a été filtrée sur de la gaze chirurgicale afin d'éliminer le gel éventuel, et l'éjaculat a été immédiatement traité.

1.4 Congélation et décongélation de la semence

La semence a été congelée dans les milieux Plasma ou Témoin, en éjaculat partagé. Le protocole de congélation appliqué correspond au protocole préconisé par les Haras Nationaux, à la différence que la première dilution des spermatozoïdes a été réalisée dans le milieu INRA96[®] et non dans le lait. Pour chaque éjaculat, la semence filtrée a ainsi été diluée dans le milieu INRA96[®], dans le bain-marie à 37°C. La dilution a été de ¼ de sperme pour ¾ de milieu (dilution minimum : 1/3 de sperme pour 2/3 de milieu). La semence diluée a ensuite été refroidie (22°C, 10 min) puis centrifugée à température ambiante (600g, 10 min). Le culot de spermatozoïdes a été resuspendu soit dans le milieu Témoin soit dans le milieu Plasma afin d'obtenir une concentration de 100 x 10⁶ spermatozoïdes.mL⁻¹. La semence ainsi diluée a ensuite été placée à la chambre froide pour être refroidie à 4°C pendant 75 min. Puis la semence a été mise en paillettes de 0.5



mL (IMV-Technologies, L'Aigle, France) fermées par de la poudre à polymériser. La congélation a été réalisée en utilisant un congélateur programmable (-60°C.min⁻¹ de +4°C à -140°C). Les paillettes ont ensuite été stockées dans une cuve d'azote liquide à -196°C. Lors de la décongélation, les paillettes ont été plongées dans un bain-marie (37°C, 30s) immédiatement avant la réalisation des analyses *in vitro* ou des inséminations.

1.5 Analyse de mobilité des spermatozoïdes

La semence des 8 éjaculats de chacun des 2 étalons a été décongelée et diluée à la concentration de 20×10^6 spermatozoïdes.mL⁻¹ dans le milieu INRA96[®]. Trois paillettes par éjaculat et par étalon ont été décongelées pour chacun des deux milieux de congélation testés. Après 10 min d'incubation à 37°C, la mobilité des spermatozoïdes a été analysée au moyen d'un analyseur automatisé de mobilité assisté par ordinateur (IVOS, version 10, Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA). Les paramètres de mobilité analysés ont été la vitesse moyenne des spermatozoïdes (VAP, $\mu\text{m.s}^{-1}$), le pourcentage de spermatozoïdes progressifs (PROG : vitesse moyenne supérieure à 30 $\mu\text{m.s}^{-1}$ et rectitude de trajectoire supérieure à 80%), et les pourcentages de spermatozoïdes rapides (RAP30 : vitesse moyenne supérieure à 30 $\mu\text{m.s}^{-1}$ et RAP40 : vitesse moyenne supérieure à 40 $\mu\text{m.s}^{-1}$). L'analyse a été réalisée sur 2 gouttes/paillette, et sur 3 champs optiques/goutte (soit 6 observations/paillette et 18 observations/éjaculat/étalon). Dans les Haras Nationaux, comme dans notre laboratoire, seuls les éjaculats présentant plus de 35% de spermatozoïdes rapides (RAP40) à la décongélation sont conservés pour insémination.

1.6 Expérience de fertilité : Juments et Inséminations

Le tractus génital des juments a été examiné quotidiennement, par échographie transrectale, du début de l'œstrus à l'ovulation. Quand le follicule en croissance a atteint un diamètre supérieur à 33 mm, l'ovulation a été induite à 10h du matin par 15 mg de CEG (extrait hypophysaire équin : Crude Equine Gonadotropin) (Jour J0) (Duchamp et al., 1987) et l'insémination a été réalisée le lendemain à 16h (J1), soit 30 heures après l'induction de l'ovulation. L'intervalle attendu entre l'insémination et l'ovulation était de 6 heures. Les juments ont été réparties au hasard dans l'un ou l'autre des lots Témoin ou Plasma. Les juments ont été inséminées avec une seule dose de semence contenant 400×10^6 spermatozoïdes.mL⁻¹, soit le mélange du contenu de 8 paillettes décongelées. Immédiatement avant l'insémination, la mobilité des spermatozoïdes a été contrôlée à nouveau, au microscope. Toutes les inséminations ont été réalisées par la même personne du 20 juin au 20 juillet 2008. La semence a été déposée dans le corps de l'utérus. Tous les cycles pour lesquels l'ovulation n'a pas été constatée à J2 ont été éliminés du protocole. Un total de 70 cycles de juments a ainsi été inséminé : 35 cycles ont été inséminés avec de la semence congelée dans le milieu Témoin et 35 cycles avec de la semence congelée dans le milieu Plasma. Les diagnostics de gestation ont été réalisés par échographie, 14 jours après l'ovulation constatée (J16). Le taux de fertilité par cycle a été calculé en rapportant le nombre de cycles fécondés au nombre de cycles inséminés.

1.7 Analyses Statistiques

Les données ont été comparées, en fonction du milieu de congélation testé, en utilisant le logiciel SAS (SAS, Institute, Inc., Cary, NC, USA). Les variables de mobilité (VAP, PROG et RAP) ont été soumises à une analyse de variance en utilisant la procédure GLM de SAS. Les résultats de fertilité ont eux été soumis à un modèle linéaire généralisé, en utilisant la procédure GENMOD de SAS. Dans chacune de ces procédures l'effet du milieu de congélation, l'effet de l'étalon, ainsi que les différentes interactions entre ces facteurs ont été pris en compte. Les différences ont été considérées significatives pour $p < 0.05$.

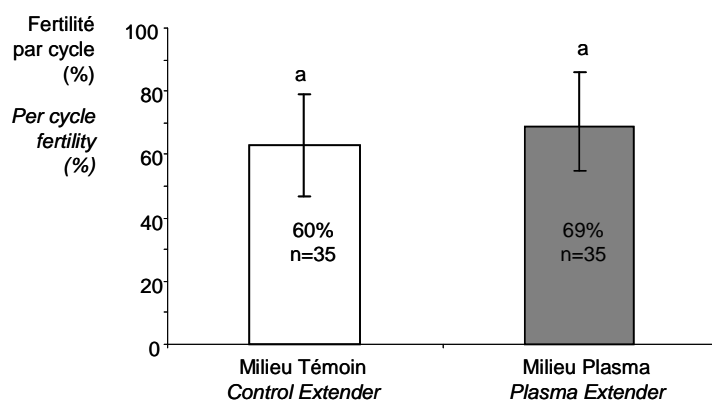
2. Résultats

2.1 Des taux de fertilité excellents

Les taux de fertilité obtenus ont montrés qu'il n'y a pas de différence significative entre le plasma de jaune d'œuf gamma-irradié et le jaune d'œuf frais. Les résultats ont été de 69% de fertilité par cycle (24/35) après insémination de semence congelée dans le milieu Plasma, contre 60% (21/35) pour le milieu Témoin ($p > 0.05$). Nous avons en effet obtenus 24 juments gestantes sur 35 inséminées avec le milieu Plasma contre 21 juments gestantes sur 35 inséminées avec le Témoin (Figure I). Les résultats obtenus en fonction de chacun des deux étalons utilisés sont détaillés Figure II.

Figure I : Fertilité par cycle après insémination de semence congelée dans les milieux INRA96[®] supplémentés, soit de jaune d'œuf soit de plasma de jaune d'œuf gamma-irradié, et de glycérol: 21 gestations/35 inséminations (60%) *versus* 24 gestations/35 inséminations (69%). Les résultats de fertilité sont représentés avec les intervalles de confiance à 95%.

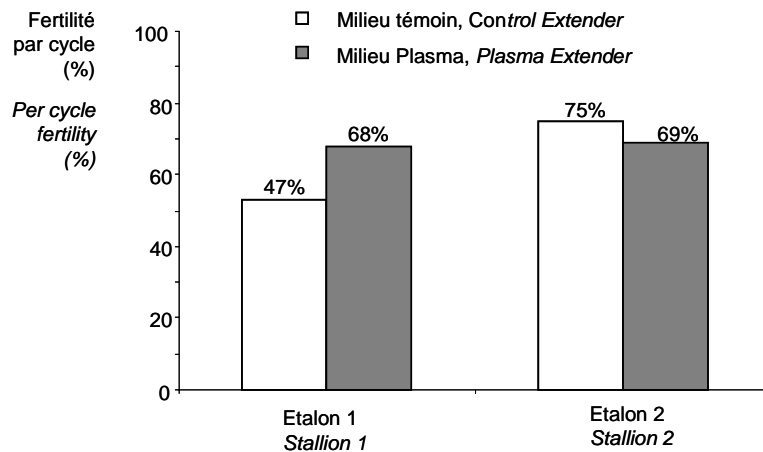
Figure I: Per-cycle pregnancy rates after artificial insemination with semen frozen in INRA96[®] extenders supplemented with, either egg yolk or gamma-radiated egg yolk plasma, and glycerol: 21 pregnancies/35 inseminations (60%) *versus* 24 pregnancies/35 inseminations (69%). Fertility results and the 95% confidence interval are displayed.



NS : $p > 0.05$

Figure II : Fertilité par cycle après insémination de semence congelée dans les milieux INRA96[®] supplémentés, soit de jaune d'œuf soit de plasma de jaune d'œuf gamma-irradié, et de glycérol, pour chacun des deux étalons.

Figure II: Per-cycle pregnancy rates after artificial insemination with semen frozen in INRA96[®] extenders supplemented with, either egg yolk or gamma-radiated egg yolk plasma, and glycerol for each of the two stallions.

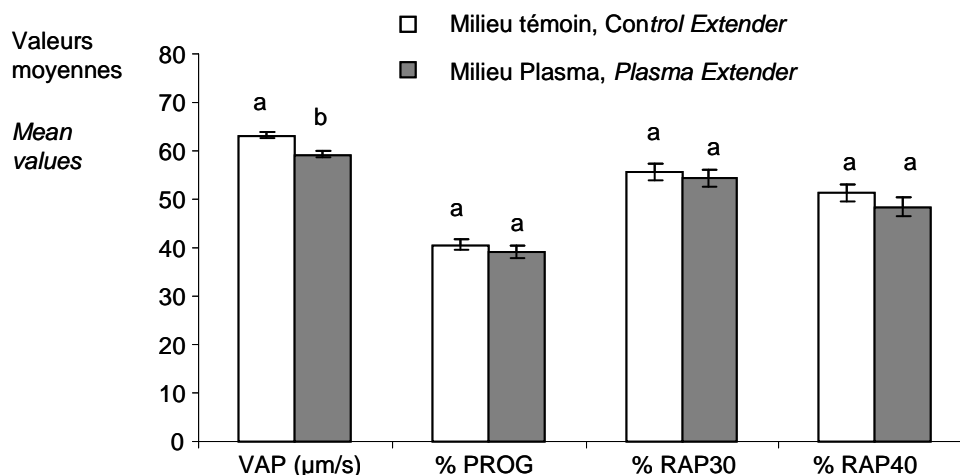


2.2 Aucune différence notable de mobilité

Les résultats de mobilité ont également montré qu'il n'y a pas de différence importante de mobilité à la décongélation, entre le plasma de jaune d'œuf gamma-irradié et le jaune d'œuf frais. Seule la vitesse moyenne (VAP), a été légèrement inférieure après congélation dans le milieu Plasma, comparé au milieu Témoin (VAP : $59 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ versus $63 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, $p < 0.001$). Pour cette variable un effet significatif du facteur étalon a été observé. Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs (PROG), ainsi que les pourcentages de spermatozoïdes rapides (RAP30 et RAP40) n'ont présenté aucune différence significative entre le milieu Plasma et le milieu Témoin (PROG: 39% versus 41%, $p > 0.05$; RAP30 : 54% versus 56%, $p > 0.05$; RAP40 : 48% versus 51%, $p > 0.05$) (Figure III). Pour ces variables, aucun effet du facteur étalon n'a été mis en évidence.

Figure III : Paramètres de mobilité (analyse automatisée) après congélation dans les milieux INRA96[®] supplémentés, soit de jaune d'œuf soit de plasma de jaune d'œuf gamma-irradié, et de glycérol. (VAP : vitesse moyenne ; %PROG : pourcentage de spermatozoïdes progressifs ; %RAP30, %RAP40: pourcentages de spermatozoïdes rapides). Les valeurs moyennes sont représentées +/- l'erreur standard à la moyenne (SEM).

Figure III: Motility parameters (CASA) after freezing in INRA96[®] extenders supplemented with, either egg yolk or gamma-radiated egg yolk plasma, and glycerol (VAP: average path velocity ; %PROG : percent progressive sperm cells ; %RAP30, %RAP40 : percents rapid sperm cells). Mean values are displayed +/- standard error of the mean (SEM).



a,b : $p < 0.001$



3. Discussion

Nos résultats ont montré que le pouvoir cryoprotecteur du plasma de jaune d'œuf gamma-irradié est équivalent à celui du jaune d'œuf frais entier. Ces résultats suggèrent d'une part que les composants du jaune d'œuf responsables de l'effet protecteur sont présents dans le plasma et non dans les granules du jaune d'œuf, ce qui est conforme à la littérature qui met en avant les propriétés cryoprotectrices des LDL, effectivement présents dans le plasma (Moussa et *al.*, 2002 ; Bencharif et *al.*, 2008). Ces résultats suggèrent d'autre part que le traitement d'irradiation appliqué au plasma n'a pas affecté ces propriétés cryoprotectrices, ce qui paraît plus surprenant à la vue de la littérature. En effet, l'irradiation n'est pas sans conséquence sur l'état des phospholipides notamment (Badr, 2006). Or les LDL sont des assemblages de phospholipides et de protéines, contenant également des triglycérides et du cholestérol. La préparation de la fraction plasma et le traitement d'irradiation sont donc probablement responsables de modifications physico-chimiques. Ainsi, sur le plasma de jaune d'œuf gamma-irradié, des analyses telles que des dosages des produits d'oxydation, des électrophorèses, ou encore des mesures d'agrégations éventuelles des LDL, sont actuellement réalisées au laboratoire. Ces analyses nous permettront de préciser la composition du plasma de jaune d'œuf gamma-irradié, et de mieux caractériser les composants impliqués dans la cryoprotection. Par conséquent, ces analyses nous permettront aussi d'avancer dans notre compréhension des mécanismes de cryoprotection. Ces aspects plus fondamentaux s'avèrent utiles pour améliorer encore les résultats de fertilité en insémination artificielle de semence congelée, sur le terrain.

Les résultats de fertilité obtenus avec le milieu Témoin (60% de fertilité par cycle) permettent tout d'abord de confirmer les excellents résultats obtenus avec ce même milieu, le milieu INRA96[®] supplémenté de jaune d'œuf et de glycérol, lors de l'expérience de fertilité de 2007 (71% de fertilité par cycle). En 2008, en supplémentant le milieu INRA96[®] de plasma de jaune d'œuf gamma-irradié et de glycérol, nous nous approchons de notre objectif : un milieu de congélation ayant pour base l'INRA96[®], qui soit prêt à l'emploi et de composition chimique définie. L'étude du plasma de jaune d'œuf gamma-irradié nous permettra de définir mieux encore et donc d'optimiser la composition du milieu.

Outre la composition du milieu de congélation, les taux de fertilité élevés obtenus peuvent s'expliquer par les conditions expérimentales que nous nous sommes fixées. Il est à noter que la technique de congélation utilisée dans notre expérience diffère quelque peu de la technique Haras Nationaux, mise en œuvre sur le terrain : la première dilution de la semence a été réalisée dans le milieu INRA96[®] alors qu'elle est réalisée dans du lait dans les laboratoires de congélation des Haras Nationaux. De plus, nous avons fixé l'intervalle entre l'insémination et l'ovulation à 6 heures, alors qu'il est plus variable et compris entre 0 et 24 heures sur le terrain. Toutefois, par notre schéma expérimental nous avons aussi créé des conditions défavorables par rapport au terrain. En effet, nous avons inséminé une seule dose de 400×10^6 spermatozoïdes totaux, alors que deux doses de 400×10^6 spermatozoïdes sont inséminées 24 et 48h avant l'ovulation, dans la pratique des Haras Nationaux par exemple.

Il est maintenant important de confirmer l'efficacité du plasma de jaune d'œuf gamma-irradié sur un plus grand nombre d'étalons, et de cycles inséminés, dans des conditions de terrain. Pour cela, un protocole spécifique (protocole D2ElodieExpérimental) est actuellement mené dans les laboratoires de congélation des Haras Nationaux. Les résultats des Haras Nationaux consolideront ce travail.



4. Conclusion et Perspectives

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de conclure que le plasma de jaune d'œuf gamma-irradié peut remplacer le jaune d'œuf frais entier dans le milieu de congélation, puisqu'il offre un pouvoir cryoprotecteur équivalent. Ces résultats vont ainsi permettre la commercialisation prochaine d'un nouveau milieu de congélation, contenant du plasma de jaune d'œuf gamma-irradié et offrant l'avantage d'être disponible prêt à l'emploi.

Les mécanismes de protection mis en jeu, lors de la congélation, entre les composants du plasma de jaune d'œuf gamma-irradié et les spermatozoïdes restent bien sûr à élucider. La compréhension de ces mécanismes est essentielle pour poursuivre notre démarche de fractionnement du jaune d'œuf et aller jusqu'à identifier précisément une ou plusieurs molécules purifiées, alternatives au jaune d'œuf. L'impact à terme de ce projet est la mise au point d'un nouveau milieu de congélation, non seulement prêt à l'emploi, mais également de composition optimisée, dans un esprit de biosécurité.

Remerciements

Ce projet est mené dans le cadre de la thèse CIFRE d'Elodie Pillet ; nous remercions la société IMV-Technologies et l'ANRT pour leur soutien financier. Nous remercions également tous les membres de l'unité expérimentale équine de Nouzilly pour leur aide au cours de l'expérience de fertilité. Nous remercions enfin M. Alain Mouret-Laffage et tous les membres des laboratoires de congélation des Haras Nationaux pour avoir testé le milieu D2ElodieExpérimental sur le terrain.

Références bibliographiques

Badr H., Effect of gamma radiation and cold storage on chemical and organoleptic properties and microbiological status of liquid egg white and yolk, *Food Chemistry* 97 (2006), p.285-293.

Bencharif D., Amirat L., Anton M., Schmitt E., Desherces S., Delhomme G., Langlois M.L., Barrière P., Larrat M., Tainturier D., The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen, *Theriogenology* 70 (2008), p.1478-1488.

Duchamp G., Bour B., Combarous Y., Palmer E., Alternatives solutions to hCG induction of ovulation in the mare, *J. Reprod. Fert.* 35 (1987) p.221-228.

Moussa M., Martinet V., Trimèche A., Tainturier D., Anton M., Low Density Lipoproteins extracted from egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen, *Theriogenology* 57 (2002), p.1695-1706.

Pillet E., Batellier F., Duchamp G., Furstoss V., Le Vern Y., Kerboeuf D., Vidament M., Magistrini M., Freezing stallion semen in INRA96[®]-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82, *Dairy Sci. Technol.* 88 (2008) p.257-265.

Pillet E., Batellier F., Duchamp G., Bruneau B., Yvon J.M., Le Vern Y., Kerboeuf D., Vidament M., Magistrini M., Le milieu INRA96[®] supplémenté de jaune d'œuf et de glycérol améliore la fertilité en insémination artificielle de semence congelée, 34^{ème} Journée de la Recherche Equine, jeudi 28 février 2008, p39-48.