Cryoconservation du sperme et des embryons de poissons

Gérard Maisse, Catherine Labbé, Bénédicte Ogier de Baulny, Silvia Leveroni Calvi, Pierrick Haffray

▶ **To cite this version:**

Gérard Maisse, Catherine Labbé, Bénédicte Ogier de Baulny, Silvia Leveroni Calvi, Pierrick Haffray. Cryoconservation du sperme et des embryons de poissons. Productions Animales, 1998, 11 (1), pp.57-65. 10.20870/productions-animales.1998.11.1.3916 . hal-02691783

HAL Id: hal-02691783
https://hal.inrae.fr/hal-02691783

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

INRA Prod. Anim.,
1998, 11 (1), 57-65

G. MAISSE, C. LABBÉ,
*B. OGIER DE BAULNY, S. LEVERONI CALVI, P. HAFFRAY **

INRA, Laboratoire de Physiologie des Poissons, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex

** SYSAAF, Cellule Aquacole, Complexe Agronomique, 65, rue de St-Brieuc, 35042 Rennes Cedex*

Cryoconservation du sperme et des embryons de poissons

La congélation du sperme et des embryons de poissons a deux objectifs primordiaux : la conservation des génotypes des espèces d'intérêt aquacole, d'une part, et la conservation ex situ de la biodiversité de l'ichtyofaune sauvage, d'autre part. Cet article fait le point sur les technologies utilisées et sur les paramètres qu'il est nécessaire de maîtriser pour chaque espèce cible.

Avec une production mondiale de 13 millions de tonnes en 1994 (source FAO 1996), la pisciculture est une production animale importante et en expansion (augmentation de 10 % de 1993 à 1994). Au niveau européen, la production, qui concerne principalement les Salmonidés (Truite et Saumon) en Europe occidentale et septentrionale et la Carpe en Europe Centrale, se diversifie au profit d'espèces marines à haute valeur ajoutée (Turbot, Bar, Daurade, etc), principalement en Méditerranée. Une des caractéristiques de la pisciculture européenne est sa haute technicité (gestion de l'eau, alimentation artificielle, contrôle de la date de reproduction et synchronisation des pontes, reproduction artificielle, stérilisation des poissons par triploïdisation, sélection génétique, vaccins, etc). Les exigences du marché amènent les éleveurs européens à être de plus en plus attentifs à la nature et à la qualité des produits. Dans ce cadre, la sélection génétique connaît aujourd'hui un essor important, plus particulièrement en salmoniculture. Activité récente, pratiquée actuellement par des pisciculteurs plus producteurs que sélectionneurs, la sélection génétique pose dès maintenant la question de la conservation des souches. La conservation *in situ* d'une souche de poissons, et en particulier de Salmonidés, est souvent délaissée en raison de son coût en eau. Cette situation, qui prive le sélectionneur de références génétiques initiales, n'est pas satisfaisante car elle entraîne l'impossibilité d'un retour aux souches de départ, retour qui peut être rendu nécessaire par la sélection fortuite d'un caractère indésirable dans un environnement fluctuant. Dans ces conditions, la conservation *ex situ* au moyen de la congélation des gamètes et des embryons apparaît comme une solution intéressante.

Par ailleurs, une des particularités de la pisciculture, par rapport aux autres productions animales, est la coexistence géographique de souches domestiques et sauvages de la même espèce. C'est le cas, en particulier, des Salmonidés dont des individus d'élevage peuvent être libérés dans le milieu naturel, soit volontairement pour le soutien à la pêche, soit involontairement par des échappements, et se reproduire avec des géniteurs sauvages. Ce phénomène, qui a été observé chez le Saumon atlantique en Ecosse et en Norvège, pose la question de la conservation de la biodiversité génétique. Ce problème se pose, bien entendu, aussi en terme d'espèces menacées. Si, dans la très grande majorité des cas, c'est d'abord en s'intéressant à l'habitat piscicole et à la qualité de l'eau que cette question doit être abordée, il n'en demeure pas moins que la situation critique de certaines espèces (certains Esturgeons par exemple) nécessiterait la mise en place de procédures d'urgence de conservation *ex situ*. La mise en place de cryo-

Résumé

Le développement des programmes de sélection génétique en pisciculture et la protection de la biodiversité de l'ichtyofaune sauvage justifient la création de cryo-banques de sperme et d'embryons de poissons. Les travaux sur la formulation des dilueurs de congélation montrent que l'on doit tenir compte à la fois de l'espèce cible, du type cellulaire concerné et des interactions entre les différents composants du dilueur. L'aptitude à la cryoconservation du sperme est très variable suivant les espèces, la congélation du sperme des Salmonidés étant particulièrement difficile à maîtriser. La congélation des œufs embryonnés entiers n'apparaît pas possible dans l'état actuel des connaissances. Par contre, les premiers essais de congélation des blastomères isolés sont très prometteurs.

banques de sperme et d'embryons, qui a débuté en Norvège pour le Saumon atlantique, apparaît donc comme un outil intéressant pour la conservation de la biodiversité de l'ichtyofaune.

1 / Cryoconservation du sperme

Depuis les premiers travaux de Blaxter (1953, cité par Mounib *et al* 1968) sur du sperme de Hareng (*Clupea harengus*), de nombreuses études ont porté sur la congélation du sperme de poissons et plus particulièrement de Salmonidés. Cette famille de poissons étant la plus étudiée, cela permet de disposer de nombreuses connaissances sur la physiologie testiculaire et sur la biologie des spermatozoïdes (Maisse 1990) et d'avoir ainsi une vision assez cohérente des problèmes posés par la conservation à très basse température. Pour les autres espèces, les études restent trop souvent ponctuelles, portant sur un très faible effectif d'individus, pour que les conclusions soient définitives.

D'une manière générale, la cryoconservation du sperme de poisson est une technique qui donne des résultats satisfaisants au niveau expérimental, mais qui ne s'est pas encore développée dans la pratique en raison principalement de la trop grande variabilité des résultats. La réussite de la congélation du sperme dépend de plusieurs facteurs. Il est indispensable de 1) disposer d'un dilueur préservant les fonctions du spermatozoïde, 2) maîtriser les techniques de congélation, décongélation et fécondation, 3) n'utiliser, si possible, que des éjaculats dont les spermatozoïdes sont capables de subir sans dommage majeur les contraintes de la cristallisation-décristallisation des milieux extra et intracellulaires.

La proportion de spermatozoïdes mobiles et leur durée de mobilité sont affectées par la congélation-décongélation.

1.1 / Les dommages subis par les spermatozoïdes

Peu d'études systématiques ont été menées dans le but de décrire les dommages subis par les spermatozoïdes lors de la congélation-décongélation. Cependant nous disposons d'analyses ultrastructurales qui montrent que, même en présence d'un cryoprotecteur, de nombreuses atteintes à l'intégrité des spermatozoïdes sont visibles à plusieurs niveaux (Billard 1983). La membrane plasmique apparaît souvent soulevée, voire rompue, au niveau de la tête. La pièce intermédiaire est particulièrement atteinte avec une déstructuration de la (des) mitochondrie(s). Le flagelle apparaît fréquemment déformé suite à une rupture de la membrane plasmique et (ou) une lésion de l'axonème. Dans certains cas le noyau présente un décollement de la membrane nucléaire et (ou) une altération de la chromatine. Utilisant la cytométrie en flux à double fluorescence, chez la Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), Ogier de Baulny *et al* (1997a) ont quantifié simultanément les altérations membranaires et mitochondriales : après congélation en présence de diméthyl sulfoxide (10 % v/v), ces auteurs ont noté que 17 % des spermatozoïdes avaient à la fois la membrane plasmique intacte et la mitochondrie fonctionnelle et que 28 % présentaient la membrane plasmique intacte et la mitochondrie altérée.

La première conséquence de ces dommages, visible au microscope optique, concerne la mobilité des spermatozoïdes. Tous les auteurs s'accordent pour dire qu'indépendamment de la baisse du pourcentage de spermatozoïdes mobiles, leur durée de mobilité après décongélation est le premier paramètre affecté ; ainsi chez le Zebrafish (*Brachydanio rerio*), Harvey *et al* (1982) observent que la mobilité est réduite à 15 secondes avec le sperme décongelé alors qu'elle peut se maintenir une heure avec le sperme frais. Par contre il ne semble pas que le type de mouvement des spermatozoïdes ayant résisté à la congélation-décongélation soit modifié (Mounib 1978, chez le Saumon atlantique, *Salmo salar*, et la Morue, *Gadus morhua*). Cependant, chez la Truite arc-en-ciel, la vitesse de déplacement des spermatozoïdes est nettement plus faible, ce qui peut être mis en relation avec une consommation importante d'énergie (jusqu'à 70 % du niveau initial) pendant la congélation-décongélation (Ogier de Baulny *et al* 1997a).

Les spermatozoïdes des poissons d'élevage, dont la plupart appartiennent à la classe des Téléostéens, ont en commun l'absence d'acrosome, à l'exception des spermatozoïdes d'esturgeons, poissons appartenant à la classe des Chondrostéens (Mattei 1991). Indépendamment des problèmes liés à l'intégrité cellulaire, les altérations de la membrane plasmique vont donc concerner essentiellement sa capacité à fusionner avec celle de l'ovule. Nous ne disposons pas d'étude directe sur ce sujet, mais nous pouvons noter que dans plusieurs travaux les auteurs observent une bonne motilité après décongélation avec cependant de mauvais taux de fécondation ; c'est le cas en particulier de la carpe (*Cyprinus carpio*) pour laquelle Cognié *et al* (1989) notent des pourcentages de spermatozoïdes mobiles de l'ordre de 80 % par rapport au témoin frais alors que le pouvoir fécondant ne représente que 40 % de celui obtenu avec ce même témoin. Une altération du génome n'est cependant pas à exclure compte tenu des observations de Billard (1983) qui rapportait des modifications importantes de la structure de la chromatine dans les spermatozoïdes de Truite arc-en-ciel après décongélation. Il faut cependant préciser que, chez cette dernière espèce, il n'a jamais été rapporté de cas d'avortement d'œufs fécondés avec du sperme décongelé.

1.2 / Les dilueurs de congélation

a / Les solutions minérales

La composition des solutions minérales est extrêmement variable, allant de la simple

solution de NaCl à des solutions plus élaborées mimant la composition minérale du fluide séminal de l'espèce étudiée. Les auteurs ayant comparé les différents dilueurs s'accordent pour dire qu'il y a peu ou pas de différences de performances suivant les compositions minérales (Stein et Bayrle 1978). On peut noter à travers la littérature que la tendance est à la suppression des solutions minérales. La composition des dilueurs se rapproche de celle des dilueurs formulés pour les mammifères : ce sont des mélanges tamponnés de cryoprotecteurs internes et externes et de stabilisants de membranes, comme par exemple le dilueur *Cryofish* (licence INRA-IMV-SYSAAF) qui a été testé sur plusieurs espèces de poisson.

b / Les tampons

Le pH des dilueurs est très variable (5,2 à 8,5) et son importance est mal élucidée. Les diverses expérimentations menées chez la Truite arc-en-ciel donnent des résultats variables et ne permettent pas de conclure sur l'existence d'un pH optimum. Chez le Saumon atlantique, Mounib (1978) montre cependant l'importance du tampon bicarbonate de potassium qu'il préfère aux tampons phosphate et Tris.

c / Les glucides

Le fructose, que l'on trouve dans la plupart des fluides séminaux, est souvent présent en faible quantité (5 mM) dans les dilueurs à base minérale importante. Ce glucide est alors utilisé comme composant d'un milieu mimant le fluide séminal plutôt que comme cryoprotecteur. Dans les milieux dépourvus de sels minéraux, les auteurs lui préfèrent le saccharose (125 mM chez le Saumon atlantique - Mounib 1978), et le glucose (300 mM chez le Corégone, *Coregonus muksun* - Piironen 1987). Maisse (1994), dans une étude comparative menée chez la Truite arc-en-ciel, a montré que les effets du saccharose, du maltose, du tréhalose, du galactose, du fructose et du glucose, incorporés à la concentration de 125 mM dans le dilueur de Mounib, sont semblables. Chereguini *et al* (1997) ont montré la supériorité d'un dilueur à base de saccharose sur un dilueur minéral chez le Turbot (*Scophtalmus maximus*) (figure 1).

d / Les composés stabilisant la membrane

Les lipoprotéines sont classiquement utilisées dans les dilueurs de congélation du sperme. Elles se lient à la membrane plasmique et en assurent une meilleure stabilité pendant la congélation-décongélation. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque l'on ajoute au dilueur environ 15 % de lait écrémé en poudre (Harvey 1983a) ou 10 à 20 % de jaune d'œuf (Legendre et Billard 1980). Chez le Turbot, Chereguini *et al* (1997) n'ont montré aucune différence d'effet entre le jaune d'œuf et le lait écrémé (figure 1). Par contre, chez la Truite arc-en-ciel, B. Ogier de Baulny *et al* (figure 2, non publié) obtiennent de

Figure 1. *Motilité du sperme de Turbot avant (sperme frais) et après congélation dans un milieu contenant 125 mM de saccharose ou dans un milieu minéral, en présence de jaune d'œuf ou de lait écrémé. Les résultats obtenus avec le milieu minéral sont significativement (à 5 %) les moins bons (d'après Chereguini* et al *1997).*

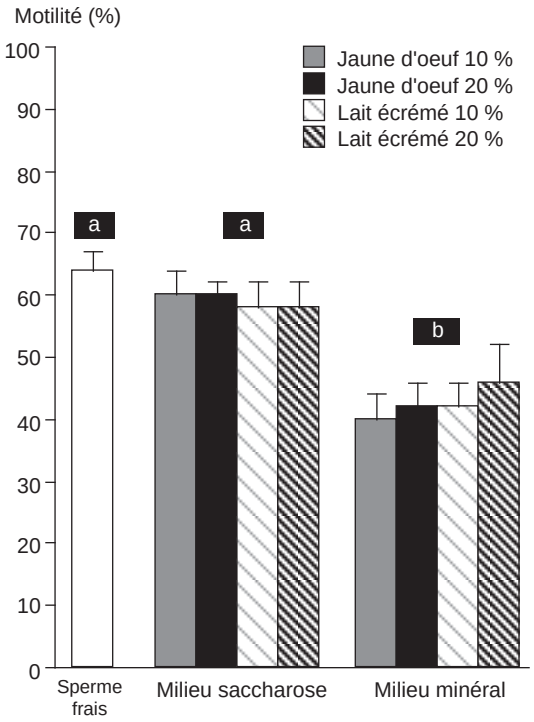
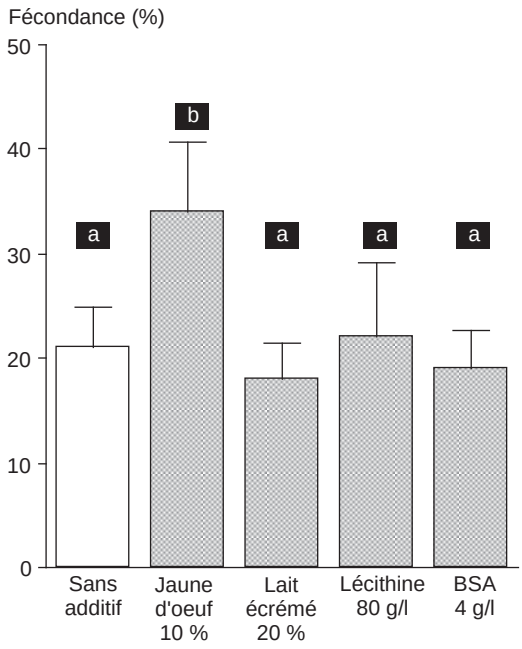


Figure 2. *Fécondance du sperme de Truite arc-en-ciel (n = 8 mâles) après congélation dans le dilueur de Mounib (1978) complémenté par du jaune d'œuf, du lait écrémé, de la lécithine de soja (20 % PC) ou de la sérum albumine bovine (BSA). Seul le jaune d'œuf a un effet bénéfique significatif (test* T *de Wilcoxon, à 5 %) (B. Ogier de Baulny, non*



meilleurs résultats avec le jaune d'œuf en comparaison avec d'autres additifs (lait écrémé, lécithine de soja, sérum albumine bovine). Un substitut au jaune d'œuf, mis au point par la Société IMV (L'Aigle, France) a donné, chez la Truite arc-en-ciel, des résultats comparables à ceux obtenus avec le jaune d'œuf (G. Maisse, non publié).

e / Les cryoprotecteurs « perméants »

L'agent cryoprotecteur le plus couramment utilisé pour la congélation du sperme de poisson est le diméthyl sulfoxide (DMSO) à des concentrations n'excédant pas en général 10 %. Le glycérol donne de bons résultats avec le sperme de certaines espèces comme les Corégones (Piironen 1987), dont le fluide séminal est naturellement riche en glycérol. Chez les poissons tropicaux d'eau douce, c'est le méthanol qui est retenu pour les Tilapias, *Oreochromis* sp, (Rana et Mc Andrew 1989) et le Zebrafish, *Brachydanio rerio*, (Harvey *et al* 1982). Dans tous ces travaux les dilueurs de base sont différents, il est donc difficile de savoir ce qui relève du facteur espèce ou des interactions entre les cryoprotecteurs et les autres composants du dilueur.

Le choix du cryoprotecteur diffère selon les espèces.

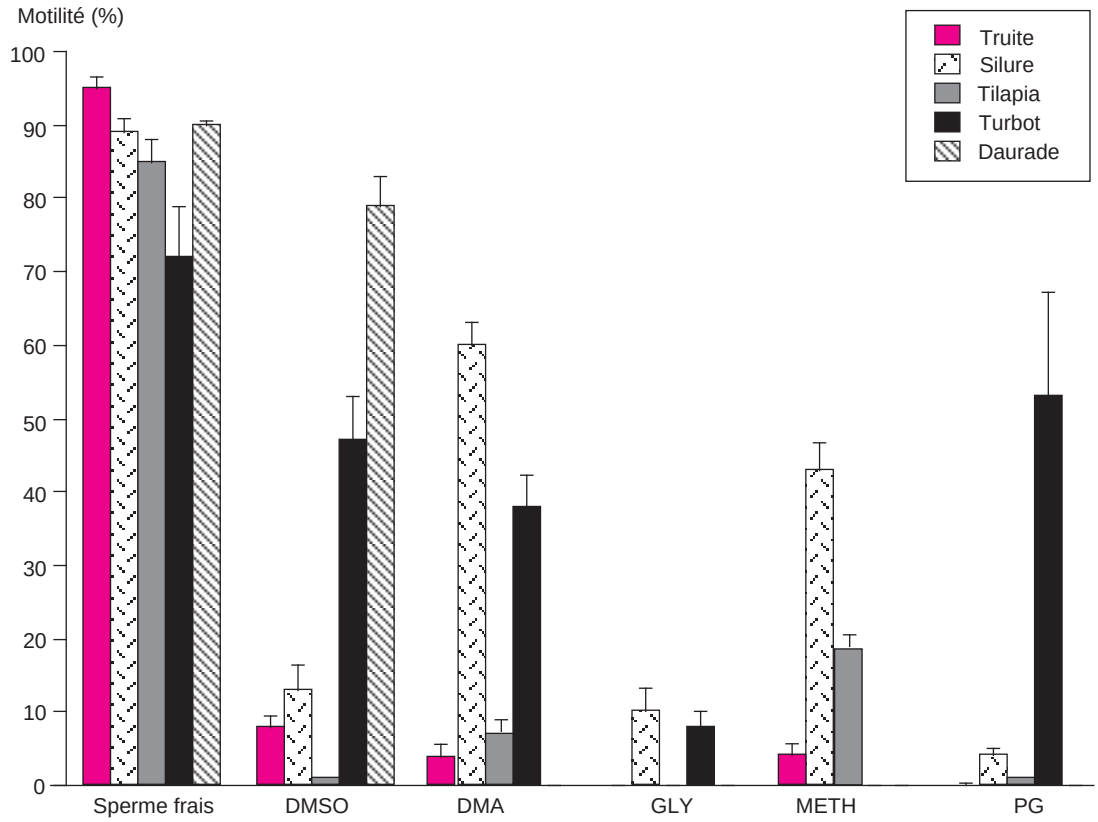
Dans une analyse comparative utilisant la solution de Mounib (1978) comme dilueur de base, Ogier de Baulny *et al* (1997b, figure 3) ont montré que le choix du cryoprotecteur perméant doit être adapté à l'espèce : DMSO pour la Truite arc-en-ciel, DMSO et propylène glycol pour le Turbot, dimethylacetamide et méthanol pour le Silure glane et méthanol pour le Tilapia. Cependant les interactions entre le cryoprotecteur « perméant » et les composants du dilueur existent : ainsi, Labbé *et al* (1997), travaillant avec des liposomes préparés à partir de membranes plasmiques de spermatozoïdes de Truite, ont observé une diminution du pouvoir cryoprotecteur du DMSO en présence d'un tampon phosphate.

1.3 / Technologie de la congélation-décongélation

a / La manipulation du sperme avant congélation

La réussite de la technique dépend en premier lieu de la qualité du sperme traité. Nous verrons plus loin les facteurs influençant l'aptitude du sperme à la congélation, ici nous abordons les conditions de prélèvement, de stockage et de manipulation du sperme avant la congélation proprement dite.

Figure 3. *Motilité du sperme de Truite arc-en-ciel (n = 6 mâles), de Silure (n = 6 mâles), de Tilapia (n = 30 mâles, traités en 3 mélanges de 10 spermes) et de Turbot (n= 6 mâles, traités en 3 mélanges de 2) avant (sperme frais) et après congélation dans le dilueur de Mounib (1978) complémenté par du jaune d'œuf (10 %) et en présence de 10 % de dimethyl sulfoxyde (DMSO), dimethylacetamide (DMA), glycérol (GLY), méthanol (METH) ou propylène glycol (PG) (d'après Ogier de Baulny* et al *1997b). La motilité du sperme de Daurade (n = 7 mâles), pour lequel seul le DMSO a été testé, est présentée à titre indicatif (P. Haffray et G. Maisse, non publié).*



Classiquement chez les poissons, le prélèvement du sperme se fait par pression des flancs du mâle préalablement anesthésié. L'éjaculat est recueilli dans un tube à essai et l'important à cet instant est de maintenir les spermatozoïdes immobiles afin qu'ils n'épuisent pas rapidement leur réserve d'ATP. Cette technique, qui a l'avantage d'être simple, pose cependant le problème de la contamination du sperme par l'urine. Pour le Silure glane (*Silurus glanis*), chez lequel la contamination du sperme par l'urine peut activer les spermatozoïdes, Linhart *et al* (1993) obtiennent de bons résultats avec du sperme recueilli directement dans une solution d'immobilisation (200 mM NaCl, 30 mM Tris, pH 7) avant d'être soumis à la congélation. Chez la Truite arc-en-ciel et le Turbot, nous conseillons aujourd'hui de recueillir directement le sperme dans le milieu de congélation.

Après prélèvement, le sperme doit être stocké en faible épaisseur (< 5 mm), à une température inférieure à 10 °C. La durée de stockage doit être la plus courte possible afin d'éviter une perte de qualité du sperme avant la congélation.

Le mélange avec le dilueur de congélation se fait généralement dans le rapport de un volume de sperme pour trois volumes de dilueur. La pénétration du cryoprotecteur dans les cellules étant généralement rapide, les auteurs s'accordent sur la possibilité de débuter le refroidissement immédiatement après ce mélange.

b / La congélation

La congélation est pratiquée selon deux techniques :

- en granules de 100 µl congelés directement sur un bloc de carboglace, puis transférés au bout de 5 minutes dans l'azote liquide ;
- en paillettes (250 µl, 500 µl, 5 ml) congelées horizontalement (3 cm au dessus du niveau d'azote liquide) dans la vapeur d'azote pendant 20 minutes puis transférées dans l'azote liquide.

La température atteinte avant le transfert dans l'azote liquide doit être inférieure à – 80 °C (Billard 1984)

c / La décongélation et la fécondation

La décongélation doit être rapide. Dans la pratique, la décongélation des granules se fait généralement dans le milieu de fécondation (solution saline) parmi les œufs. Les paillettes, quant à elles, sont plongées dans un bain-marie à 37 °C, pendant 35 secondes pour les paillettes 5 ml, ou 6 secondes pour les paillettes 500 µl, avant d'être vidées directement sur les œufs.

La dépense énergétique importante liée à la congélation-décongélation doit être impérativement prise en considération dans la formulation du milieu de fécondation. Chez les Salmonidés ce milieu doit être une solution saline (osmolarité 250 mOsmoles, pH 9, voir revue de Maisse 1990) ; Scheerer et Thorgaard (1989) y ajoutent de la théophylline et observent une augmentation de la fécondance des spermes de Truite arc-en-ciel les moins bons après décongélation ; de même, le dilueur mis au point par B. Ogier de Baulny et G. Maisse (*Actifish*-300, licence INRA-IMV-SYSAAF) améliore les performances du sperme de Truite arc-en-ciel après congélation, en augmentant la vitesse des spermatozoïdes (figure 4).

Chez la Truite arc-en-ciel, l'utilisation de sperme congelé nécessite de travailler à des concentrations 10 fois plus importantes qu'avec du sperme frais (Legendre et Billard 1980), alors que chez le Turbot il n'est pas indispensable d'augmenter le nombre de spermatozoïdes par œuf lorsque l'on pratique la fécondation avec du sperme congelé (Chereguini *et al* 1997). Ces résultats sont cohérents avec les analyses de motilité rapportés dans la figure 3.

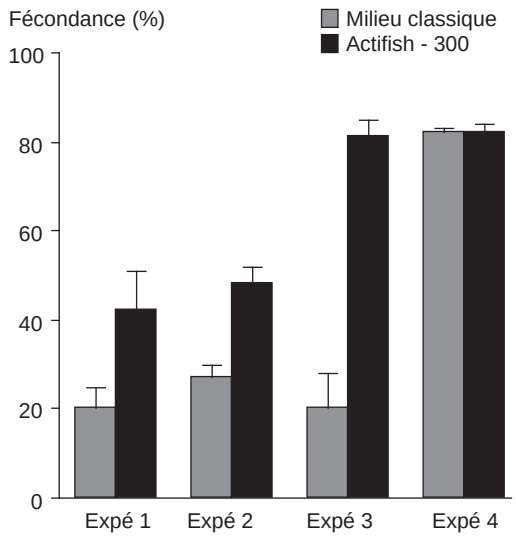
1.4 / L'aptitude du sperme à la cryoconservation

L'ensemble des travaux décrits dans la littérature montre une très grande variabilité des résultats, indépendante de la technique utilisée. Il en ressort que l'aptitude du sperme à la cryoconservation est variable et dépend d'un certain nombre de facteurs spécifiques, individuels, et zootechniques.

a / Les facteurs liés à l'espèce

D'une manière générale il est rapporté classiquement que le sperme des poissons marins

Figure 4. *Influence de la nature du milieu de fécondation artificielle sur la fécondance du sperme de Truite arc-en-ciel congelé (n = 8 mâles dans chaque expérience). Le milieu classique est une solution saline tamponnée (voir revue de Maisse 1990). Le milieu Actifish-300 (licence INRA-IMV-SYSAAF) a été mis au point par B. Ogier de Baulny et G. Maisse. Dans les expériences 1, 2 et 3 les différences sont significatives (test* T *de Wilcoxon, à 5 %).*



résiste mieux à la congélation-décongélation que celui des poissons d'eau douce (Scott et Baynes 1980). Cependant les résultats obtenus par Ogier de Baulny *et al* (1997b) montrent, avec l'exemple du Silure glane (espèce d'eau douce dont le sperme résiste bien à la congélation, cf. figure 3), que le choix du cryoprotecteur doit être impérativement fait en fonction de l'espèce ; établir une hiérarchie des espèces de poissons selon le paramètre « aptitude à la congélation » est donc très aléatoire tant que l'on n'a pas essayé les différents cryoprotecteurs disponibles. Ceci étant dit, il n'en demeure pas moins que pour l'ensemble des cryoprotecteurs testés, les Salmonidés représentent un cas particulièrement difficile (cf. figure 3).

b / La variabilité individuelle

Quelle que soit l'espèce étudiée, mais plus particulièrement chez les Salmonidés, les auteurs ayant travaillé avec des éjaculats individuels ont montré que les mâles d'un même lot donnent des éjaculats dont les performances après congélation varient très fortement d'un individu à l'autre et, pour un même individu, d'un éjaculat à l'autre (Maisse 1996). Chez la Truite arc-en-ciel, Labbé et Maisse (1996) ont montré que les spermes se congelant le mieux étaient ceux dont le rapport molaire membranaire cholestérol / phospholipides était le plus faible. Ce facteur peut être influencé par des paramètres zootechniques comme le régime lipidique et la température d'élevage des mâles.

L'aptitude du sperme à la cryoconservation varie suivant l'espèce, l'individu et l'éjaculat.

1.5 / Conclusion

La cryoconservation du sperme des poissons est une technique dont la fiabilité est variable suivant l'espèce. Pour des espèces comme le Turbot, la Daurade (*Sparus auratus*) et la Silure glane, l'utilisation en routine du sperme congelé peut être envisagée. Par contre, compte tenu de la grande variabilité individuelle de l'aptitude à la congélation du sperme des Salmonidés, l'utilisation de la cryoconservation de la semence de ces espèces demeure réservée à la constitution de conservatoires génétiques. Dans une perspective de développement de cette technique dans le cadre d'une politique de conservation *ex situ* de la biodiversité, nos résultats démontrent la nécessité d'adapter le choix du cryoprotecteur « perméant » à l'espèce.

2 / Cryoconservation des embryons de poisson

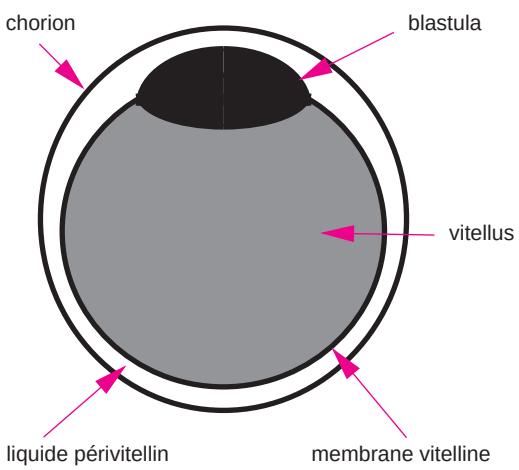
La congélation du sperme est une solution partielle à la cryoconservation d'une souche de poisson car, l'ADN mitochondrial étant un héritage maternel, la conservation du génome mitochondrial ne peut pas être assurée par cette technique. Seule la congélation des embryons permettrait donc à la fois la conservation génétique d'une souche et la conservation du génome mitochondrial de cette souche. La cryoconservation des œufs embryonnés de poissons se heurte à la complexité de leur structure, comprenant le chorion, le liquide périvitellin, l'embryon et le vitellus (figure 5), alliée à des tailles très différentes suivant les espèces (de moins d'un millimètre à plusieurs millimètres voire centimètres). Plusieurs auteurs ont cependant essayé de congeler des œufs intacts, y compris en pratiquant la vitrification (absence de cristallisation), alors que d'autres s'intéressent à la cryoconservation de blastomères isolés.

2.1 / Les essais de congélation d'œufs embryonnés intacts

L'ensemble des travaux sur la congélation des œufs embryonnés de poissons concernent plus l'étude de la toxicité de différents cryoprotecteurs et leur effet sur la résistance temporaire des œufs aux températures négatives après une réfrigération très lente, que l'étude d'une véritable cryoconservation, puisqu'aucun auteur n'a réussi à conserver des œufs vivants dans l'azote liquide.

Comme dans le cas du sperme, le choix du cryoprotecteur est variable suivant les espèces. Pour la Truite arc-en-ciel, le propylène glycol 2,5M (G. Maisse, non publié) n'est pas toxique et protège efficacement les œufs embryonnés maintenus pendant une heure à – 7 °C. Pour le Zebrafish, le méthanol permet une protection des embryons de cette espèce pendant 3 heures à – 5 °C (Zhang et Rawson 1995). Les œufs de Carpe peuvent être maintenus pendant au moins 10 heures à – 5 °C en présence de DMSO (Zhang *et* al 1989). Les résultats obtenus sur différentes espèces, avec des tailles d'œufs très différentes montrent que la survie diminue rapidement avec la température (figure 6). Dans l'ensemble des travaux publiés, les embryons ne peuvent être maintenus que quelques heures à des températures négatives, dans un état de surfusion (Harvey et Ashwood-Smith 1982). Zhang et Rawson (1996) ont appliqué sans succès la

Figure 5. *Représentation schématique d'un œuf embryonné de Truite arc-en-ciel au stade 6 de développement (d'après Ballard 1973).*



technique de vitrification à des œufs embryonnés de Zebrafish, la décongélation provoquant une formation de glace intraembryonnaire.

Hagedorn *et al* (1996) ont étudié, chez le Zebrafish, la perméabilité des différents compartiments de l'œuf embryonné déchorionné, au DMSO, au propanediol et au méthanol. Après 2 heures d'incubation, le DMSO et le propanediol ont pénétré dans l'embryon mais pas dans le vitellus, alors que dès 45 minutes le méthanol a pénétré dans la totalité de l'œuf. Ces résultats illustrent bien la complexité du problème de la congélation de l'œuf embryonné entier liée à sa structure particulière.

2.2 / La cryoconservation des blastomères isolés

Compte tenu des échecs répétés de la congélation d'œufs entiers, certains auteurs ont orienté leurs travaux vers la congélation de blastomères isolés. Harvey (1983b) a congelé avec succès (85 % de survie) des cellules embryonnaires de Zebrafish. Chez la Truite arc-en-ciel, Nilsson et Cloud (1993), ont montré qu'il était possible de dissocier les blastomères de blastulas au stade 7 de développement, de les cryoconserver en présence de DMSO puis de les décongeler avec un taux de survie de 36 %.

Leveroni Calvi et Maisse (1997, figure 7) ont amélioré très significativement ces résultats (95 % de survie), en utilisant le propylène glycol. Afin d'éviter les chocs osmotiques, le cryoprotecteur doit être additionné en plusieurs étapes au milieu contenant les blastomères et, de la même manière, après décongélation, le retrait du cryoprotecteur doit se faire très progressivement. Contrairement au cas du sperme, la vitesse de congélation doit être programmée très soigneusement (– 1 °C/min jusqu'à -6,6 °C, température d'induction de la cristallisation de l'eau, puis – 0,3 °C/min jusqu'à – 40 °C et enfin – 2 °C/min jusqu'à – 80 °C avant transfert dans l'azote liquide).

Figure 7. *Survie des blastomères de Truite arc-en-ciel isolés, congelés puis conservés dans l'azote liquide. Les stades de développement 6A, 6B et 6C (selon Ballard 1973) correspondent respectivement à 48, 60 et 72 heures d'incubation à 10 °C avant congélation (n = 9 femelles). Les mortalités induites par la congélation sont significatives (à 1 %) pour les stades 6A et 6B (d'après Leveroni Calvi et Maisse 1997).*

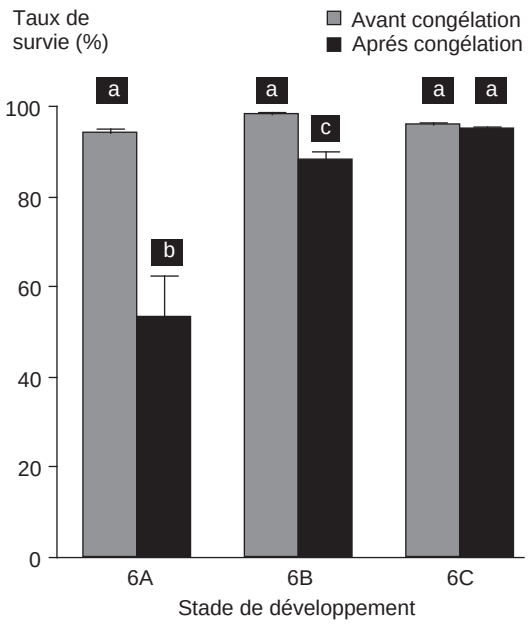
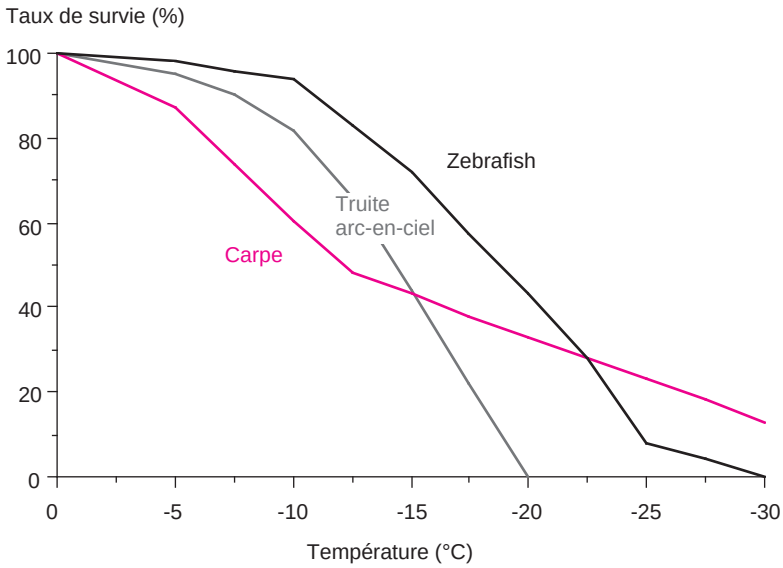


Figure 6. *Survie (observée au stade alevin) des œufs embryonnés de Zebrafish (d'après Zhang et Rawson 1995), de Truite arc-en-ciel (G. Maisse, non publié) et de Carpe (d'après Zhang* et al *1989) à des températures négatives en présence respectivement de méthanol, propylène glycol, et DMSO.*



Leveroni Calvi et Maisse (1997) ont, de plus, mis en évidence que les blastomères (en particulier le stade 6B), congelés suivant leur technique conservaient *in vitro*, leur potentiel de multiplication et de réagrégation entre eux et avec des blastomères frais provenant d'une autre femelle. Ces observations sont intéressantes dans la mesure où, chez la Truite arc-en-ciel, l'injection de blastomères (stade 6 à 7) diploïdes frais dans un embryon triploïde de même stade de développement a permis la réalisation de chimères se développant normalement, au moins jusqu'à l'éclosion après laquelle ils ont été sacrifiés pour analyse (Nilsson et Cloud 1992). Utilisant une technique semblable, Lin *et al* (1992) ont démontré, chez le Zebrafish, qu'il est possible d'obtenir une lignée germinale de type chimère par cette voie. Ce dernier résultat est particulièrement important car il montre la possibilité théorique de régénérer la souche donneuse de blastomères cryoconservés par croisement de ces chimères entre elles.

La congélation d'oeufs entiers de poissons n'a pas encore abouti. En revanche, la congélation de blastomères isolés est possible.

2.3 / Conclusion

La cryoconservation des œufs embryonnés de poissons se heurte à l'existence de plusieurs compartiments dont la perméabilité

aux cryoprotecteurs est variable. Aucune réponse n'ayant été apportée à ce problème, l'ambition de recourir à la congélation en routine d'œufs embryonnés excédentaires semble devoir être abandonnée. Par contre, la réussite de la congélation des blastomères isolés ouvre des perspectives intéressantes dans la mesure où la technique d'intégration dans un œuf receveur sera maîtrisée. Compte tenu de sa complexité, cette technique ne semble devoir être envisagée que dans le cadre de la conservation de caractères génétiques précieux à des fins strictement génétiques.

Conclusion générale

La congélation du sperme et des blastomères de poissons est aujourd'hui suffisamment maîtrisée pour être proposée comme outil pour la constitution de conservatoires génétiques dans le cadre de programmes de sélection en pisciculture ou de conservation de la biodiversité de l'ichtyofaune sauvage. L'ensemble des résultats présentés démontre la nécessité de choisir le cryoprotecteur selon l'espèce, tant pour le sperme que pour les blastomères. Par ailleurs, il est intéressant de noter que, chez la Truite arc-en-ciel, le meilleur cryoprotecteur pour les blastomères est le propylène glycol qui ne protège pas les spermatozoïdes : le choix du cryoprotecteur doit donc se faire aussi en fonction du type cellulaire.

Dans la pratique piscicole courante, l'utilisation de sperme congelé peut être envisagée pour certaines espèces (Daurade, Turbot, Silure). Pour les Salmonidés les résultats restent pour le moment trop incertains pour une application en routine.

Remerciements

Les travaux réalisés par le Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA ont été financés en partie par la Région Bretagne, le SYSAAF, le CRITT Protagoras, le Bureau des Ressources Génétiques et la Société IMV (L'Aigle).

Références bibliographiques

Ballard W.W., 1973. Normal embryonic stages for salmonid fishes, based on *Salmo gairdneri* Richardson and *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). J. Exp. Zool., 184, 7-26.

Billard R., 1983. Ultrastructure of trout spermatozoa : changes after dilution and deep-freezing. Cell Tissue Res., 228, 205-218.

Billard R., 1984. La conservation des gamètes et l'insémination artificielle chez le bar et la daurade. *In :* G. Barnabé et R. Billard (eds), L'aquaculture du Bar et des Sparidés, 95-116. INRA, Paris.

Chereguini O., Cal R.M., Dréanno C., Ogier de Baulny B., Suquet M., Maisse G., 1997. Short-term storage and cryopreservation of turbot sperm. Aquat. Living Resour., (sous presse).

Cognié F., Billard R., Chao N.H., 1989. La cryoconservation de la laitance de la carpe, *Cyprinus carpio*. J. Appl. Ichthyol., 5, 165-176.

Hagedorn M., Hsu E.W., Pilatus U., Wildt D.E., Rall W.F., Blackband S.J., 1996. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartmental biological system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7454-7459.

Harvey B., 1983a. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. Aquaculture, 32, 313-320.

Harvey B., 1983b. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderm and intact embryos of zebrafish *Brachydanio rerio* to - 196 °C. Cryobiology, 20, 440-447.

Harvey B., Ashwood-Smith M.J., 1982. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. Cryobiology, 19, 29-40.

Harvey B., Kelley R.N., Ashwood-Smith M.J., 1982. Cryopreservation of Zebrafish spermatozoa using methanol. Can. J. Zool., 60, 1867-1870.

Labbé C., Maisse G., 1996. Influence of rainbow trout thermal acclimatation on sperm cryopreservation : relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. Aquaculture, 145, 281-294.

Labbé C., Crowe L.M., Crowe J.H., 1997. Stability of the lipid component of trout sperm plasma membrane during freeze-thawing. Cryobiology, 34, 176-182.

Legendre M., Billard R., 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. Reprod. Nutr. Dévelop., 20, 1859-1868.

Leveroni Calvi S., Maisse G., 1997. Cryopreservation of rainbow trout blastomeres. CRYO 97, 34th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Barcelona, Espagne, 8-12 juin 1997.

Lin S., Long W., Chen J., Hopkins N., 1992. Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4519-4523.

Linhart O., Billard R., Proteau J.P., 1993. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. Aquaculture, 115, 347-359.

Maisse G., 1990. Le sperme des salmonidés : le point sur les connaissances. Applications à la salmoniculture. INRA Prod. Anim., 3, 223-228.

Maisse G., 1994. Comparaison de l'effet cryoprotecteur de différents glucides sur le sperme de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Living Resour., 7, 217-219.

Maisse G., 1996. Cryopreservation of fish semen : a review. *In* Proceedings of Refrigeration and Aquaculture, Bordeaux, France, 443-466. Edition Institut International du Froid, Paris.

Mattei X., 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. Can. J. Zool., 69, 3038-3055.

Mounib M.S., 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. J. Reprod. Fert., 53, 13-18.

Mounib M.S., Hwang P.C., Idler D.R., 1968. Cryogenic preservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm. J. Fish. Res. Bd. Canada, 25, 2623-2632.

Nilsson E.E., Cloud J.G., 1992. Rainbow trout chimeras produced by injection of blastomeres into recipient blastulae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 9425-9428.

Nilsson E.E., Cloud J.G., 1993. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres. Aquat. Living Resour., 6, 77-80.

Ogier de Baulny B., Le Vern Y., Kerbœuf D., Maisse G., 1997a. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Cryobiology, 34, 141-149

Ogier de Baulny B., Le Vern Y., Labbé C., Maisse G., 1997b. Cryopreservation of fish semen : Why dœs the most effective cryoprotectant differ from one species to another ? CRYO 97, 34th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Barcelona, Espagne, 8-12 juin 1997.

Piironen J., 1987. Factors affecting fertilization rate with cryopreserved sperm of whitefish (*Coregonus muksun* Pallas). Aquaculture, 66, 347-357.

Rana K.J., McAndrew B.J., 1989. The viability of cryopreserved Tilapia spermatozoa. Aquaculture, 76, 335-345.

Scheerer P.D., Thorgaard G.H., 1989. Improved fertilization by cryopreserved Rainbow trout semen treated with theophylline. Prog. Fish-culturist, 51, 179-182.

Scott A.P., Baynes S.M., 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. J. Fish Biol., 17, 707-739.

Stein H., Bayrle H., 1978. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 18, 1073-1076.

Zhang T., Rawson D.M., 1995. Studies on chilling sensitivity of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. Cryobiology, 32, 239-246

Zhang T., Rawson D.M., 1996. Feasability studies on vitrification of intact Zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. Cryobiology, 33, 1-13.

Zhang X.S., Zhao L., Hua T.C., Zhu H.Y., 1989. A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos. Cryo Letters, 10, 271-278.

Abstract

Fish sperm and embryos cryopreservation.

The creation of fish sperm and embryos cryobanks is justified by the development of genetic selection programmes in fish farming together with the need for protection of biodiversity in wild fish populations. The studies undergone to elaborate freezing extenders point out how important are the considered species or cells and the interactions between components inside the extender. Sperm cryopreservation ability depends on the species, Salmonids being especially difficult to control. Cryopreservation of the whole fish embryos has not yet been successful with regards to the knowledge available today. However, preliminary observations on cryopreservation of isolated blastomeres are very promising.

Maisse G., Labbé C., Ogier de Baulny B., Leveroni Calvi S., Haffray P., 1998. Cryoconservation du sperme et des embryons de poissons. INRA Prod. Anim., 11, 57-65.