

## Comparaison de l'effet cryoprotecteur de différents glucides sur le sperme de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Gérard Maisse

INRA, Laboratoire de Physiologie des Poissons, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France.

Reçu le 6 janvier 1994; accepté le 11 février 1994.

---

Maisse G. *Aquat. Living Resour.*, 1994, 7, 217-219.

*Comparison of different carbohydrates for the cryopreservation of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) sperm.*

---

### INTRODUCTION

La congélation du sperme de salmonidés a fait l'objet de nombreuses études rapportées dans les synthèses bibliographiques réalisées par Horton et Ott (1976), Scott et Baynes (1980), Stoss (1983) et plus récemment par Leung et Jamieson (1991). La plupart des auteurs s'accordent sur la très grande variabilité des résultats obtenus avec le sperme de salmonidés congelé. Les dilueurs de congélation contiennent souvent des sucres à des concentrations variables : le saccharose est employé à 125 mM chez le saumon atlantique, *Salmo salar*, (Mounib, 1978) et chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, (Legendre et Billard, 1980) et à 600 mM chez la truite arc-en-ciel (Holtz *et al.*, 1991); le glucose est utilisé à une concentration de 300 mM chez le saumon atlantique (Stoss et Refstie, 1983), chez la truite commune, *Salmo trutta*, et l'omble chevalier, *Salvelinus alpinus*, (Piironen, 1993) et 600 mM chez la truite arc-en-ciel (Holtz *et al.*, 1991). Cependant il n'existe pas d'étude comparative entre les différents glucides ni d'essai systématique sur d'autres sucres alors qu'ils présentent un grand intérêt en cryoconservation. En effet, Anchordoguy *et al.* (1987) ont montré que le saccharose et le tréhalose interagissent avec les phospholipides de la membrane et augmentent la stabilité de cette dernière pendant la congélation et la décongélation, et concluent que les disaccharides pourraient être de meilleurs cryoprotecteurs que le glycérol et le diméthylsulfoxyde.

Dans cette étude nous avons voulu comparer l'effet cryoprotecteur de différents sucres en remplacement du saccharose dans le dilueur de Mounib (1978).

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le sperme éjaculé a été collecté sur 5 mâles de truite arc-en-ciel, d'une souche à reproduction automnale, âgés de 2 ans, en fin de période de spermiation. Chaque sperme a été traité individuellement pendant la suite de l'expérimentation; la densité en spermatozoïdes différait peu d'un sperme à l'autre et a été estimée à  $6 \times 10^9$  cellules par ml.

Les dilueurs testés avaient tous pour base le dilueur de Mounib (1978) : 125 mM de saccharose, 100 mM de bicarbonate de potassium, 6,5 mM de glutathion réduit; dans notre essai le saccharose a été remplacé par le galactose, le fructose, le glucose, le maltose ou le tréhalose, et pour chacun des sucres trois concentrations ont été testées : 125 mM, 250 mM, 500 mM. En outre, suivant Legendre et Billard (1980), nous avons rajouté à chaque dilueur du jaune d'œuf au tellurite de potassium (Sanofi diagnostics Pasteur, 10% du volume final) et du diméthyl sulfoxyde (DMSO, 8% du volume final). Le rapport volume de sperme/volume de dilueur était 1/3.

La congélation a été réalisée dans des paillettes de 5 ml (IMV, ref. AA 303) disposées horizontalement 3 cm au-dessus de l'azote liquide pendant 20 minutes

(temps nécessaire pour que la température de l'échantillon atteigne  $-80^{\circ}\text{C}$ ), puis immergées dans l'azote liquide. La décongélation a été effectuée en immergeant les paillettes dans un bain-marie à  $35^{\circ}\text{C}$  pendant 30 secondes (la température de l'échantillon atteint alors  $+4^{\circ}\text{C}$ ).

La fécondance a été testée après une semaine de conservation. Les fécondations ont été réalisées en mélangeant 8 g d'œufs (mélange de 8 pontes), 8 ml de dilueur d'insémination (Billard, 1977) à  $12^{\circ}\text{C}$  et  $320\ \mu\text{l}$  du mélange, décongelé, sperme-dilueur de congélation. Dans ces conditions la concentration réelle en sperme congelé est  $10^{-2}$ , valeur préconisée par Legendre et Billard (1980) et le nombre de spermatozoïdes par œuf était environ  $3,2 \times 10^6$  ce qui est légèrement supérieur à la valeur minimale de  $3 \times 10^6$  recommandée par Stoss et Holtz (1981 a).

Le taux d'embryonnement à 100 degré-jours a été calculé pour chaque lot, puis rapporté au taux d'embryonnement observé sur deux lots témoins fécondés dans les mêmes conditions mais avec du sperme frais provenant de 5 mâles (dilution du sperme dans la solution fertilisante :  $10^{-2}$ ).

La signification des différences observées entre les différents traitements a été analysée à l'aide du test t de Student sur les séries appariées.

## RÉSULTATS, CONCLUSION

Les résultats présentés dans le *tableau 1* confirment la très grande variabilité de l'aptitude à la congélation du sperme de truite arc-en-ciel suivant les mâles, déjà observée antérieurement (Maisse *et al.*, 1988; Maléjac *et al.*, 1990).

Dans tous les cas on observe un effet délétère de la concentration en sucre la plus élevée (500 mM). Ce résultat n'est pas en accord avec ceux de Holtz *et al.* (1991) qui obtiennent une très bonne protection avec 600 mM de glucose ou de saccharose dans des dilueurs ne contenant que le sucre et du DMSO (10%). Holtz *et al.* (1991) observent une chute des performances lorsqu'ils ajoutent du KCl au dilueur de congélation; on peut donc penser que dans notre expérience c'est la présence de potassium qui a été néfaste, mais dans leurs conditions expérimentales la quantité de KCl ajoutée est telle (2,1 g/100 ml soit 282 mM) que la concentration en potassium que l'on retrouve dans le milieu de fécondation (21 mM d'après nos calculs, contre 3 mM dans nos conditions) est encore suffisante pour maintenir les spermatozoïdes immobiles. Il ne semble donc pas que, dans notre essai, ce soit le

**Tableau 1.** – Fécondance (%) du sperme congelé de 5 mâles de truite arc-en-ciel en fonction de la nature et de la concentration du sucre dans le dilueur de congélation.

Fertilization rate (%) of 5 frozen rainbow trout sperm in relation to the sugar and its level in the extender.

Glucide	mM	mâle A	mâle B	mâle C	mâle D	mâle E
saccharose	125	37	94	14	3	71
	250	23	83	7	3	46
	500	0	4	0	0	0
maltose	125	33	94	4	9	39
	250	33	100	7	10	33
	500	1	0	1	0	0
tréhalose	125	46	79	20	3	37
	250	20	90	10	13	29
	500	0	1	0	0	0
galactose	125	44	81	9	4	57
	250	33	93	13	9	50
	500	0	1	0	0	1
fructose	125	27	69	10	10	50
	250	54	100	20	4	43
	500	0	3	1	0	0
glucose	125	50	79	10	4	69
	250	50	73	14	6	26
	500	0	1	0	0	0

potassium qui puisse expliquer les mauvais résultats enregistrés pour les fortes concentrations de sucre. L'osmolarité ne paraît pas non plus être le facteur à incriminer car dans le cas du dilueur de Holtz *et al.* (1991) nous l'avons mesurée à 1725 mOsmoles/kg et dans celui du dilueur à 500 mM de saccharose elle était de 1575 mOsmoles/kg. Enfin le pH pourrait fournir un élément d'explication car, dans le dilueur à 500 mM de saccharose, il était de 8,4 contre 6,7 pour le dilueur de Holtz *et al.* (1991); cependant ces deux valeurs restent dans la gamme de pH donnant de bons résultats selon Stoss et Holtz (1981 b)).

Pour les molarités plus faibles les différences sont moins nettes, 125 mM paraissant suffisant pour les 6 sucres testés. En ce qui concerne plus particulièrement le saccharose il faut noter les meilleurs résultats enregistrés pour 125 mM comparés à ceux obtenus avec 250 mM (significatif à 5%) ce qui confirme les observations de Mounib (1978) chez le saumon atlantique.

En conclusion, il apparaît que le dilueur mis au point par Mounib (1978) ne peut pas être amélioré en substituant au saccharose l'un des 5 autres glucides testés isolément.

---

**Remerciements**

La présente étude a bénéficié d'une aide financière de la part de la région Bretagne dans le cadre du programme BRITTA. Elle a été réalisée avec la collaboration technique de Micheline Heydorff. Les paillettes de congélation ont été fournies gracieusement par la société IMV, 61302 L'Aigle.

---

**RÉFÉRENCES**

- Anchordoguy T. J., A. S. Rudolph, J. F. Carpenter, J. H. Crowe, 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, **24**, 324-331.
- Holtz W., R. Schmidt-Baulain, M. Meiners-Gefken, 1991. A simple saccharide extender for cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. Proc. 4th Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish, 7-12 July 1991, Norwich, U. K., 250-252.
- Horton H. F., A. G. Ott, 1976. Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**, 995-1000.
- Legendre M., R. Billard, 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **20**, 1859-1868.
- Leung L. K. P., B. G. M. Jamieson, 1991. Live preservation of fish gametes. In: Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa, B. G. M. Jamieson, ed., Cambridge University Press, Cambridge, U. K., 245-269.
- Maisse G., A. Pinson, M. Loir, 1988. Caractérisation de l'aptitude à la congélation du sperme de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) par des critères physico-chimiques. *Aquat. Living Resour.*, **1**, 45-51.
- Maléjac M.-L., M. Loir, G. Maisse, 1990. Qualité de la membrane des spermatozoïdes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*); relation avec l'aptitude du sperme à la congélation. *Aquat. Living Resour.*, **3**, 43-54.
- Mounib M. S., 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **53**, 13-18.
- Piironen J., 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta m. lacustris* L.) and arctic char (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture*, **116**, 275-285.
- Scott A. P., S. M. Baynes, 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.*, **17**, 707-739.
- Stoss J., 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: *Fish physiology*, W. S. Hoar, D. J. Randall, E. M. Donaldson, eds., vol. IXB, Acad. Press, New York, London, 305-350.
- Stoss J., W. Holtz, 1981a. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture*, **22**, 97-104.
- Stoss J., W. Holtz, 1981b. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. II. Effect of pH and presence of buffer in the diluent. *Aquaculture*, **25**, 217-222.
- Stoss J., T. Refstie, 1983. Short-term storage and cryopreservation of milt from atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, **30**, 229-236.