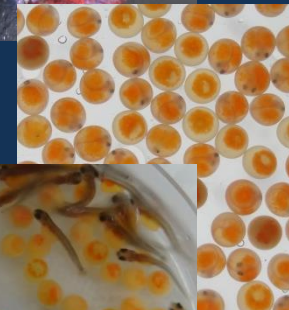
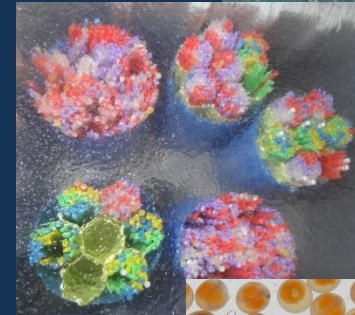




CRYOCONSERVATION DU SPERME DE SALMONIDES :

EVOLUTION DES PRATIQUES ET AMELIORATION DES FECONDANCES



Labbé Catherine, Delhomme Guy, Depincé Alexandra,
Gavin-Plagne Lucie, Goardon Lionel, Kica Stéphanie,
Leboucher Richard, Morvezen Romain, Na Li.

Pourquoi changer les pratiques de cryoconservation du sperme ?

Projet FEAMP Biogerm (Coord Jean-Jacques Lareyre)



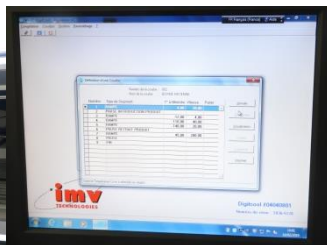
Objectif : Modifier les procédures de cryoconservation du sperme pour une amélioration des pratiques pour la profession et pour l'industrie

- Standardisation de la phase de congélation
 - Augmentation des quantités de sperme traitées
- Rendu possible par la centralisation des cryoconservations (site CryoAqua, 35) = plus de technicité possible



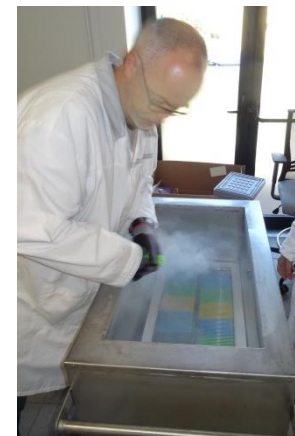
Quelle stratégie expérimentale

- Tester la congélation en **congélateur programmable** grands volumes (800- 1600 paillettes / 10min)



.... VERSUS méthode traditionnelle en **radeau**
(200 paillettes / 10 min)

- Augmenter les **concentrations** dans les paillettes / adapter le **cryoprotecteur**

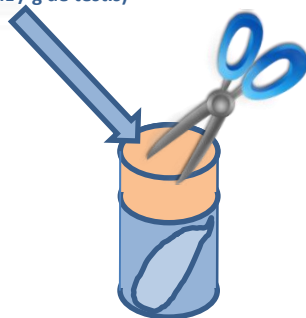


Préparation de la semence (INRA PEIMA)



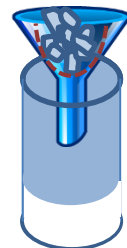
1. Pesée des 2 testicules
($\pm 35 \text{ g} \times 2$)

2. Ajouter le Storfish (4°C)
(0,5 mL / g de testis)



3. Dilacération dans le Storfish
(4°C)

4. Filtration sur nylon
(mailles 50 μm)



5. Conditionnement en sac, sous O_2 , grande surface d'échange.

6. Boîtes sur glace pilée + papier bulle (pas de contact direct) en glacière.

7. Envoi par transporteur 24h



Cryoconservation

Sperme + CRYOPROTECTEUR : MeOH/DMSO – saccharose – Liposomes

Remplissage paillettes 500 μ L ($1,5$ à 5.10^9 /mL)

Congélations (Radeau / congélateur programmable)

Stockage azote liquide (-196°C)

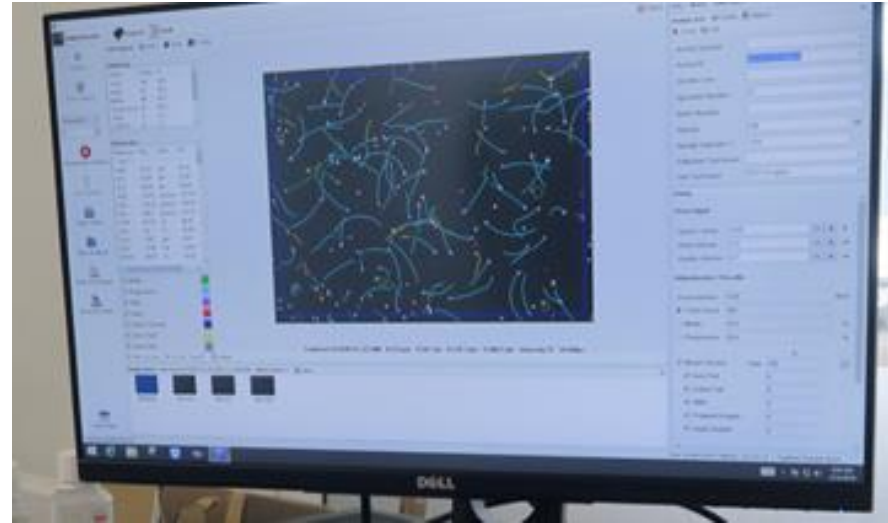
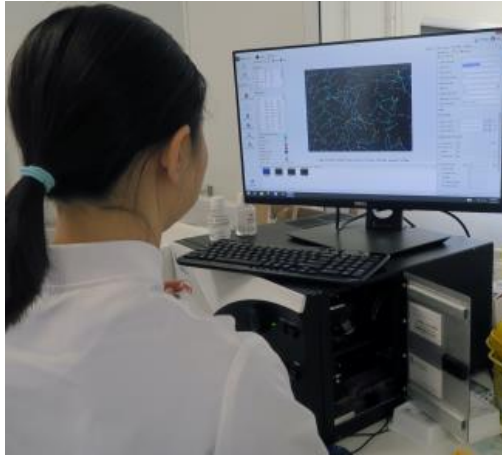
Décongélation bain marie 37°C

Conservation sur la glace (< 60 min)



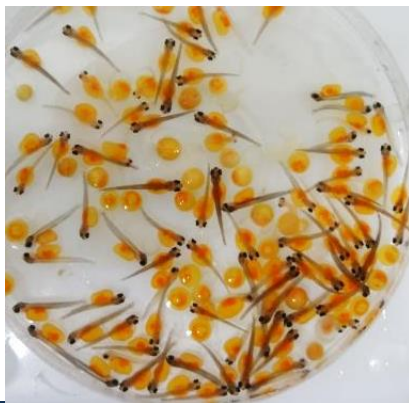
Evaluation de la qualité du sperme décongelé

- Par la motilité : « manuel » /automatique (analyse d'image)



Testage du sperme en fécondance

- Obtention d'ovules de qualités et maîtrise des FIV
- Incubation standardisée des embryons
- Maîtrise de l'évaluation du développement



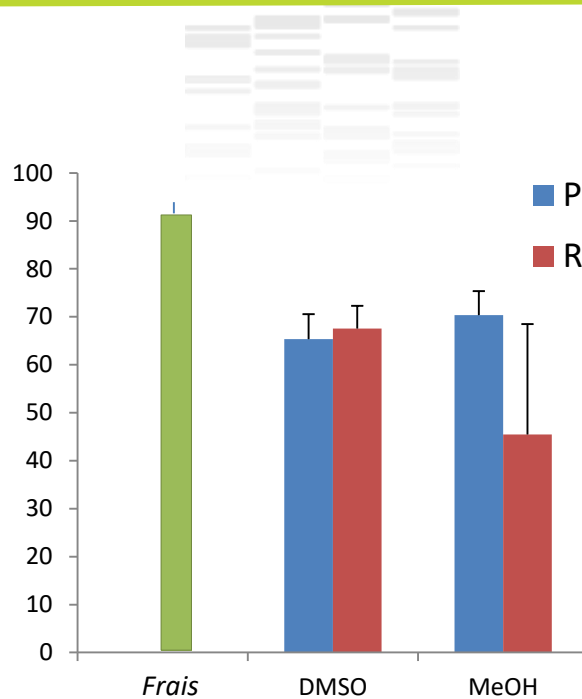
		n oeillés	n morts	total	% oeillés
1	6H FM DC	82	47	129	63.6
2	5H FD DC	96	50	146	65.8
3	6H HD DC	13	175	188	6.9
4	2H FM DC	111	45	156	71.2
5	6H FD DC	87	55	142	61.3
6	2H HD DC	21	146	167	12.6
7	5H HD DC	35	118	153	22.9
8	FRAIS	120	26	146	82.2
9	3H FD R	107	62	169	63.3
10	2H FD DC	116	66	182	63.7
11	4H FD DC	105	49	154	68.2
12	5H FM DC	123	37	160	76.9
13	4H FD R	122	60	182	67.0
14	1H FD DC	96	66	162	59.3
15	3H FM R	62	51	113	54.9
16	FRAIS	110	27	137	80.3
17	1	78	52	130	60.0
18	2	92	59	151	60.9
19	3	4	133	137	2.9
20	4	142	68	210	67.6
21	5	67	99	166	40.4
22	6	0	160	160	0.0
23	7	21	121	142	14.8
24	FRAIS	97	22	119	81.5
25	2H FM R	138	58	196	70.4
26	2H HD DC	12	154	166	7.2
27	2H FD R	103	50	153	67.3
28	2H HD R	13	134	147	8.8
29	3H HD R	14	189	203	6.9

		n oeillés	n morts	total	% oeillés
32	FRAIS	97	22	119	81.5
33	9	14	112	126	11.1
34	10	73	82	155	47.1
35	11	40	77	117	34.2
36	12	94	82	176	53.4
37	13	17	120	137	12.4
38	14	45	124	169	26.6
39	15	14	131	145	9.7
40	FRAIS	123	29	152	80.9
41	2H FM R	135	58	193	69.9
42	2H FD R	123	47	170	72.4
43	4H HD DC	50	158	208	24.0
44	4H FM DC	120	44	164	73.2
45	3H FD DC	110	39	149	73.8
46	5H FD R	131	47	178	73.6
47	3H HD DC	9	185	194	4.6
48	FRAIS	140	35	175	80.0
49	25	88	85	173	50.9
50	26	12	109	121	9.9
51	27	92	103	195	47.2
52	28	11	140	151	7.3
53	29	33	125	158	20.9
54	30	12	128	140	8.6
55	31	25	130	155	16.1
56	FRAIS	125	27	152	82.2
57	41	76	82	158	48.1
58	42	60	85	145	41.4
59	43	16	143	159	10.1
60	44	98	47	145	67.6

		n oeillés	n morts	total	% oeillés
62	46	68	85	153	44.4
63	47	13	50	63	20.6
64	FRAIS	135	31	146	72.8
65	4H FM R	61	141	202	30.2
66	5H HD R	44	157	201	21.9
67	2H HD R	15	159	174	8.6
68	5H FM R	60	105	165	36.4
69	6H FD R	134	65	199	67.3
70	6H FM R	22	155	177	12.4
71	6H HD R	15	136	151	9.9
72	FRAIS	122	31	153	79.7
73	3H FM DC	127	50	177	71.8
74	5H FD R	127	63	190	66.8
75	5H HD DC	27	102	129	20.9
76	5H FD DC	124	46	170	72.9
77	5H FM DC	103	42	145	71.0
78	1H HD R	4	98	102	3.9
79	1H FM R	137	85	222	61.7
80	FRAIS	170	41	211	80.6
81	5H FM R	144	184	328	43.9
82	5H HD R	45	159	204	22.1
83	6H FD R	98	90	188	52.1
84	1H FM DC	121	63	184	65.8
85	6H HD R	5	170	175	2.9
86	6H FM R	21	113	134	15.7
87	1H FM R	149	67	216	69.0
88	FRAIS	132	32	164	80.5
89	65	45	104	149	30.2
90	66	4	115	119	3.4

Mode de congélation

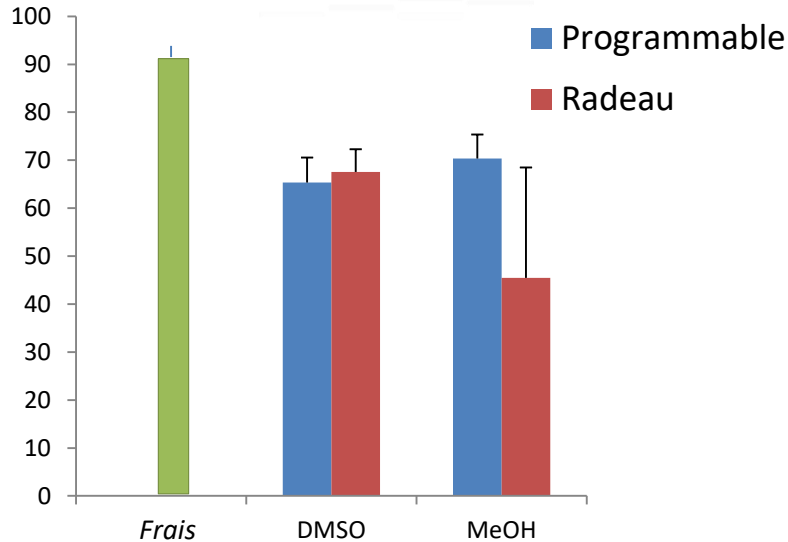
sperme à $1,5 \cdot 10^9$ spz/mL



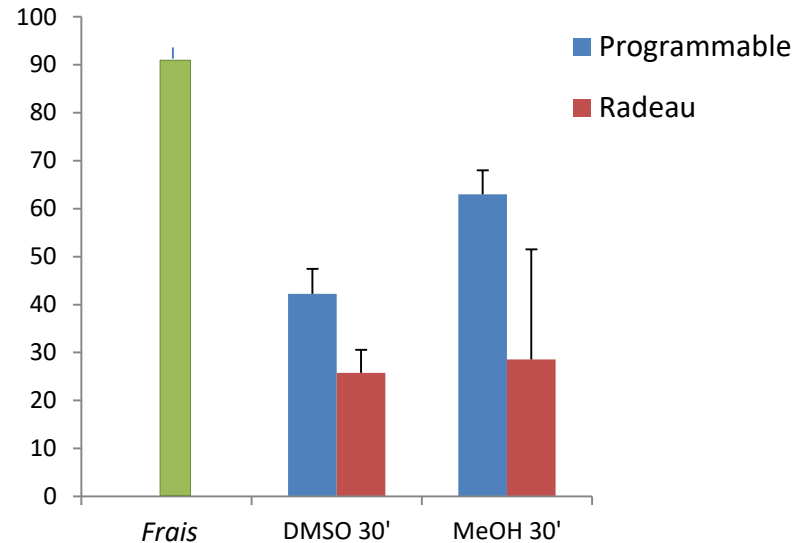
- **Programmable > radeau**
- **DMSO plus robuste que MeOH**

Mode de congélation

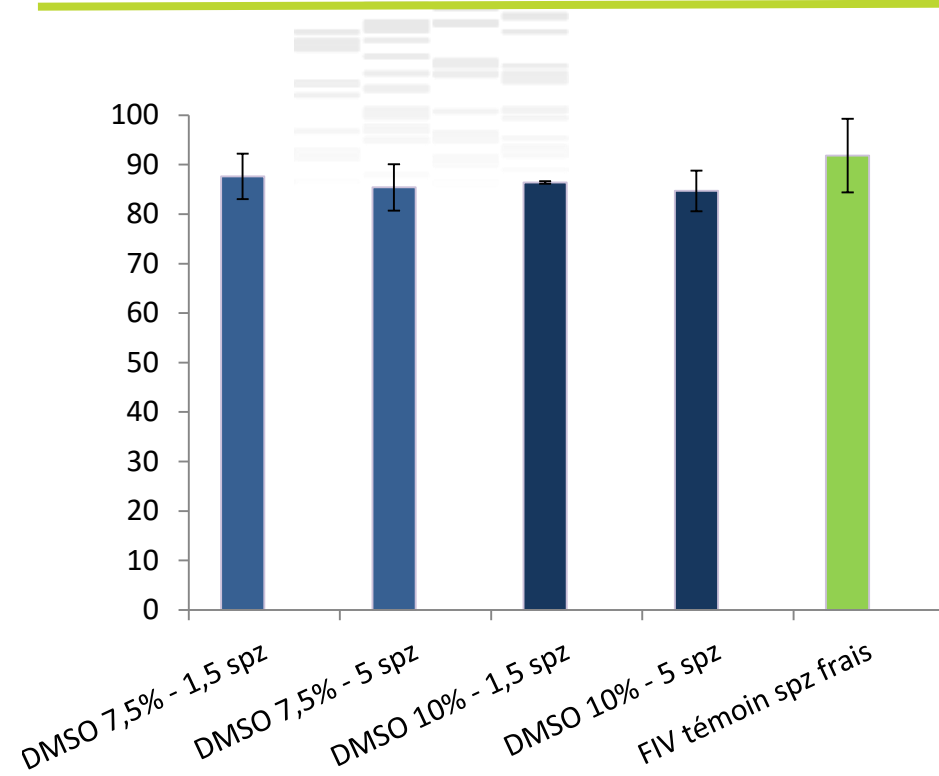
sperme à $1,5 \cdot 10^9$ spz/mL



- Programmable = ... > radeau
- DMSO plus «robuste» que MeOH
- ... mais MeOH plus tolérant à l'attente



Concentration dans les paillettes



- En MeOH, taux à 20 %
- En DMSO, $5 \cdot 10^9$ spz / mL équivalent à frais
- DMSO 7,5 % = 10 %

Conclusion

- Congélateur programmable = radeau
 - Choix du cryoprotecteur : robustesse (DMSO) versus tolérance à l'attente (MeOH)
 - Augmentation du nombre de spermatozoïdes dans les paillettes : DMSO
- Validation d'un changement de pratique