

## Travail de fin d'études

**Auteur** : Gambakpo, Pétra Togbé Scolastique

**Promoteur(s)** : 8795

**Faculté** : Faculté des Sciences

**Diplôme** : Master de spécialisation en gestion des ressources aquatiques et aquaculture

**Année académique** : 2020-2021

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/13289>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---



**UNIVERSITE DE LIEGE**



**FACULTE DES SCIENCES**

---

**Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquacultures**

**Travail de Fin d'Étude**

**Développement d'un marqueur de qualité spermatique chez le saumon Atlantique *Salmo salar* et optimisation de la cryoconservation**

**Réalisé par**

Pétra GAMBAKPO

**Promoteur**

Patrick KESTEMONT

**Encadrant**

Alexandre ERRAUD

Année-académique : 2020-2021

## Dédicace

A

mon père Albert GAMBAKPO , ma mère Aurelie HOUNSA,  
ma fille, mes frères et sœurs Ariane, Fred, Cybèle, Grâce et Melvor

Merci pour tout

## Remerciements

Nos remerciements vont à l'endroit :

- ✓ de Dieu le père, le créateur de toute chose, celui par qui je puis et qui a rendu toute chose possible ;
- ✓ de l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES) et à tout son personnel pour la bourse a nous octroyée
- ✓ des coordonnateurs et enseignants du Master GeRAA, pour leur diligence malgré les perturbations rencontrées durant l'année civile ;
- ✓ du Professeur Patrick KESTEMONT, Directeur du Laboratoire de Physiologie et Toxicologie Environnementale de l'Université de Namur de nous avoir reçu dans son laboratoire ;
- ✓ du Dr Alexandre ERRAUD mon encadrant, pour son assistance quotidienne, sa qualité d'écoute, ses encouragements et ses conseils forts utiles pour la réussite de ce travail. Ce fut un très grand plaisir d'avoir travaillé sous votre responsabilité. Merci du fond du cœur Dr;
- ✓ de Jérôme LAMBERT pour sa disponibilité;
- ✓ de Valérie CORNET pour son assistance technique
- ✓ de tout le personnel de l'URBE/UNamur pour la bonne ambiance de travail ;
- ✓ de tous le personnel du CEFRA particulièrement au Dr Carole ROUGEOT pour son assistance permanente durant cette formation et sa promptitude à apporter les solutions
- ✓ de tous nos promotionnaires du Master GeRAA 2020-2021 ; spécialement de Edith YACOUTO, Maliki IMOROU, Clovis HOUNTCHEMIN et de Serge mbondo
- ✓ du Dr. Ir. Romaric VIHOTOGBE, Assistant chercheur au laboratoire de Biomathématiques et d'Estimations forestières FSA/UAC, du Dr. Ir. Carole Nadia A. SOSSA-VIHOTOGBE, Enseignante-Chercheur Nutrition et Sciences Agro-Alimentaires de l'Université de Parakou et de Simon AHOAUNSOU MONTCHO, Docteur en Sciences Agronomiques, Maître de Conférences des Universités du CAMES, Enseignant-Chercheur et Directeur à l'Ecole d'Aquaculture de l'Université Nationale d'Agriculture, Bénin pour vos diverses assistances;
- ✓ de Scholastique E. D. GBEBO , de Bonard. VODOUGNON merci d'avoir toujours été présent à nos côtés de par vos conseils, soutiens et encouragements ;
- ✓ de ma famille paternelle, maternelle et alliée spécialement KPEDE Johanès, DOSSOU Bijou, HINNNAKOU Cyrus, GUEDOU Parfaite. Puisse Dieu vous bénir davantage ;
- ✓ des Ir. Anouchka KPONOU, Nadiatou DONOU, Nassifath ASSANI, Illuminata N'VEKOUNOU, Kafui GALLEY et de Sandrine HOUANVOEGBE, merci les filles pour votre amour
- ✓ de tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de cette formation et principalement de ce travail.

## Résumé

La mise en place de cryobanque spermatique est une alternative prometteuse dans un contexte de production de matériel biologique de repeuplement à des fins de restauration d'espèces menacées et / ou en voie d'extinction. Toutefois, la cryoconservation du sperme nécessite l'utilisation d'un cryoprotecteur et d'un diluant. Ces derniers doivent être appliqués dans un rapport de dilution optimal dans les paillettes et adaptés aux caractéristiques physiologiques du poisson afin de préserver la qualité spermatique (Maise et *al.*, 1998). Malgré ces prérogatives strictes, le processus de congélation-décongélation du sperme génère un stress oxydatif occasionnant des dommages à la membrane en modifiant la qualité du sperme (Lee et *al.*, 2021). A cet effet, notre étude s'est déroulée en deux étapes. En un premier temps il a été proposé de mettre en place un marqueur d'évaluation du stress oxydatif, notamment la peroxydation lipidique (*i.e.* TBARS) sur les spermatozoïdes de jeunes saumons matures précocement (*i.e.* tacon 1+). Afin d'induire la réaction adductive MDA-TBARS, l'effet de deux différents tampons (*i.e.* basé sur l'étude de Figueroa et *al.*, 2018) et présent dans le kit MDA) et de deux méthodes de détection (*i.e.* fluorimétrie et colorimétrie à longueur d'onde de 532nm) ont été évalués sur le sperme frais et cryoconservé. De cette évaluation, il a été constaté que la cryoconservation pouvait augmenter la peroxydation lipidique signifiant ainsi la sensibilité de la méthodologie. Aucun effet des deux tampons n'a été observé sur le sperme frais et cryoconservé soulignant le potentiel du tampon de lyse de Figueroa. En revanche, une différence significative entre les méthodes de détection a été observée uniquement sur le sperme cryoconservé avec des niveaux plus élevés en colorimétrie qu'en fluorimétrie. Une telle différence est probablement due à la sensibilité différente de ces deux méthodes de détections. En effet, les valeurs obtenues après cryoconservation par fluorimétrie se trouvaient au milieu de la droite de calibration alors qu'en colorimétrie, celles-ci étaient en dessous de la droite. La peroxydation lipidique évaluée dans la première phase a été validée avec le tampon de Figueroa et en fluorimétrie. Puis, en un second temps il a été évalué l'effet post-cryoconservation de quatre concentrations spermatiques de stockage en paillettes, et ce, dans le but de limiter la variabilité interindividuelle induite par les variations de concentration spermatique au sein des populations. Différents marqueurs de qualité spermatique ont été évalués tels que : la viabilité spermatiques avec la sonde SYBR14 / IP en cytométrie de flux ; la motilité ainsi que les paramètres de vitesse et de trajectoire associés à l'aide du système CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) et ; la peroxydation lipidique (TBARS). De façon générale, l'augmentation de la peroxydation lipidique sur les spermatozoïdes cryoconservés a permis de valider la LPO comme marqueur d'évaluation de la cryoconservation de par sa reproductibilité et sa sensibilité. A la suite des analyses menés à l'aide des différents marqueurs de qualité spermatique, des quatre concentrations testées dans les paillettes, les concentrations de  $5 \cdot 10^9$  et de  $1,25 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ mL de sperme ont présenté les meilleurs résultats signifiant l'intérêt de ces deux concentrations afin de minimiser l'effet néfaste de la cryoconservation.

Mots clés : Saumon atlantique, qualité spermatique, peroxydation lipidique TBARS, motilité CASA, cryoconservation

## Table des matières

<b>1</b>	<b><i>Introduction bibliographique</i></b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Contexte général</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Description du Saumon atlantique</b> .....	<b>2</b>
1.2.1	Répartition géographique .....	3
1.2.2	Cycle de vie.....	4
1.2.3	Stratégies de reproduction du Saumon atlantique .....	5
1.2.4	État des stocks du saumon atlantique et cause du déclin .....	7
<b>1.3</b>	<b>Projet Saumon Meuse</b> .....	<b>8</b>
1.3.1	Présentation du projet.....	8
1.3.2	Production de matériel biologique de repoissonnement (UNamur).....	8
<b>1.4</b>	<b>Méthodes de conservation des gamètes</b> .....	<b>9</b>
1.4.1	Cryoconservation spermatique .....	9
<b>1.5</b>	<b>Le sperme chez les salmonidés</b> .....	<b>11</b>
1.5.1	Physiologie du sperme chez les Salmonidés .....	11
1.5.2	Caractéristiques des spermatozoïdes chez les salmonidés .....	12
<b>1.6</b>	<b>Outils d'évaluation de la qualité spermatique</b> .....	<b>12</b>
1.6.1	Viabilité spermatique .....	12
1.6.2	Motilité des spermatozoïdes.....	12
1.6.3	Stress oxydant .....	13
<b>1.7</b>	<b>Objectifs de l'étude</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b><i>Matériels et méthodes</i></b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Première phase : Mise au point du TBARS chez les spermatozoïdes de saumon</b>	<b>15</b>
2.1.1	Acquisition des organismes.....	15
2.1.2	Sexage et obtention des gamètes .....	15
2.1.3	Le dénombrement.....	16
2.1.4	Cryoconservation .....	17
2.1.5	Mise au point des tampons de lyse.....	17
2.1.6	Peroxydation lipidique .....	18

<b>2.2</b>	<b>Deuxième phase : Optimisation de la concentration de spermatozoïdes dans les paillettes.....</b>	<b>19</b>
2.2.1	Sexage et obtention des gamètes .....	20
2.2.2	Le dénombrement.....	21
2.2.3	Cryoconservation .....	21
2.2.4	Viabilité spermatique .....	21
2.2.5	Motilité des spermatozoïdes.....	22
2.2.6	Peroxydation lipidique .....	23
<b>2.3</b>	<b>Analyses statistiques des données .....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Phase 1 : Mise au point du marqueur de la LPO .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Phase 2 : Optimisation de la concentration spermatique dans les paillettes de cryoconservation.....</b>	<b>25</b>
3.2.1	Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).....	25
3.2.2	Viabilité spermatique .....	26
3.2.3	Différents paramètres de la motilité spermatique .....	27
<b>4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>A</b>

### Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Adulte du saumon atlantique ( <i>Salmo salar</i> ) capturé en juin 2019 au barrage de Lixhe. (Page saumon-Meuse).....	3
<b>Figure 2:</b> Différences morphologiques entre tacon et smolt ( <i>Salmo salar</i> , L). (McCormick, et al., 2013).....	3
<b>Figure 3:</b> Routes de migration et zones d’engraissement des populations de saumon atlantique à l’échelle de son aire de répartition (excepté Baltique). (Source : Atlantic Salmon Federation <a href="http://www.asf.ca/">http://www.asf.ca/</a> ) .....	4
<b>Figure 4:</b> Cycle de vie du saumon atlantique ( <i>S. salar</i> ).....	5
<b>Figure 5:</b> Illustration de la variabilité des tactiques de reproduction des mâles adultes anadromes et jeune précoce (Lepais et al., 2017) .....	7

<b>Figure 6:</b> Diagramme de flux de travail de la sélection des mâles, le sexage et la collecte du sperme avec les différents tests de qualité du sperme .....	16
<b>Figure 7:</b> Lame Kova montée sur microscope pour évaluation de la concentration spermatique .....	16
<b>Figure 8:</b> Plaques à fond blanc et noir de 96 puits respectivement pour la lecture en colorimétrie et en fluorimétrie .....	19
<b>Figure 9:</b> Diagramme de flux de travail de la sélection des mâles, le sexage et la collecte du sperme avec les différents tests de qualité spermatique .....	20
<b>Figure 10:</b> Évaluation de la motilité avec le logiciel image J .....	22
<b>Figure 11:</b> Box plot de la LPO sur le sperme avant et post cryoconservé en fonction des tampons de lyse et de la méthode de détection (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes) .....	24
<b>Figure 12:</b> Droite de calibration de la LPO sur le sperme post cryoconservé en fonction des tampons de lyse et de la méthode de détection .....	25
<b>Figure 13:</b> Box plot de la LPO sur le sperme frais et post cryoconservé à différentes concentrations dans les paillettes en fonction de la lyse Figueroa par détection en fluorimétrie (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes). .....	26
<b>Figure 14:</b> Box plot de la viabilité spermatique du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes). .....	27
<b>Figure 15:</b> Box plot de la motilité spermatique du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes). .....	28
<b>Figure 16:</b> Box plot de la vitesse curviligne du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes). .....	29
<b>Figure 17:</b> Box plot de la vitesse moyenne du trajet du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes)30	
<b>Figure 18:</b> Box plot de la vitesse en ligne droite du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes). .....	31
<b>Figure 19:</b> Box plot de la linéarité du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes). .....	32



**Liste des sigles et abréviations**

**%** : Pourcentage

**Cm** : Centimètre

**ml** : Millilitre

**nmol** : Nanomole

**TBARS** : Thiobarbituric Acid Reactive Substances

**MDA** : Malondialdéhyde

**ROS** : Reactives Oxygen Substances

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**pH** : Potentiel Hydrogène

**LPO** : Lipid Peroxydation Oxygen

**CASA** : Computer Assisted Sperm Analysis

**mM** : MilliMolaire

**KCL** : Chlorure de potassium

**µl** : Microlitre

## **1 Introduction bibliographique**

### **1.1 Contexte général**

Le saumon atlantique est considéré comme une espèce vulnérable en raison de la diminution importante de son aire de répartition, et des menaces qui pèsent sur son habitat, aussi bien en eaux douces qu'en eaux marines ( Caron et Fontaine, 2003). Il se retrouve dès lors depuis les années 90 sur la liste rouge des espèces menacées en Europe (Porcher et Baglinière, 2001). Son déclin a vu naître le projet Saumon Meuse. Ce projet initié par le gouvernement Wallon est une coopération entre les chercheurs des Universités de Namur et de Liège avec la salmoniculture d'Erezée. Il vise à la réhabilitation du Saumon atlantique, une source non locale dans le bassin mosan à travers des exercices de repoissonnements à différents stades de vie (*i.e.* alevins, tacons, smolts). De part cette action, on assiste à un retour des adultes sauvages de saumons de la mer vers le bassin mosan. Néanmoins, comptes tenus des changements climatiques et des activités humaines notamment l'aménagement des rivières et les perturbations de l'écosystème aquatique, les remontées enregistrées ne permettraient pas de déclasser cette espèce de la liste rouge. De même, d'après Benitez et *al.*, (2020), le sex-ratio des retours de ces saumons est en faveur des femelles. Dès lors, le nombre insuffisant de retour de mâles anadromes constitue un facteur limitant la diversité génétique pour la réhabilitation de l'espèce. Afin de palier à ce problème, deux stratégies peuvent donc être envisagées. La reproduction alternative par les mâles précoces et ou la mise en place d'une cryobanque spermatique de ces saumons mâles anadromes. La cryoconservation spermatique présente aussi bien des avantages que des inconvénients. Le processus de cryoconservation modifie le profil lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes en conduisant à la diminution voire la perte de fonction de ces spermatozoïdes (Cerolini et *al.*, 2001). Or, la mise en place de la cryoconservation nécessite l'utilisation de sperme mâle de bonne qualité mais aussi en grande quantité, il est donc important d'évaluer les marqueurs relatifs à cette qualité spermatique. Dans son expérimentation à l'UNamur, Erraud et *al.*, (2021) s'appuie sur une batterie de biomarqueurs de qualité spermatique afin d'évaluer l'effet de la cryoconservation. Néanmoins aucun marqueur relatif au stress oxydant n'est disponible à l'UNamur ce qui peut représenter un inconvénient majeur. Il est de même important de définir un protocole de cryoconservation qui puisse être le plus fiable et répétable possible. En effet, la plupart des protocoles de congélation des spermatozoïdes sont basés sur un ratio de dilution du sperme par l'étendre, ce qui génère une grande variabilité de concentration inter-individuelle et ne garantit aucune gestion réelle de la concentration dans les paillettes la concentration dans les paillettes (Maise, 1996). Toutefois,

la concentration spermatique varie énormément entre individus et même au sein d'échantillons d'un même individu en fonction de la période de collecte (Judycka, 2018). Par conséquent, la concentration spermatique dans les paillettes après dilution avec un extender diffère largement entre les individus ce qui entraîne des différences dans la qualité post-décongélation.

## **1.2 Description du Saumon atlantique**

*Salmo salar* appartient à la famille des salmonidés et à la sous-famille des salmoninés, dont font également partie les truites et les saumons du pacifique (Fontaine, 1950). La figure 1 représente le saumon atlantique adulte. Il se distingue de ses congénères car il présente le moins de polymorphismes avec des caractères physiologiques et morphologiques qui lui sont propres (Baglinière et *al.*, 1990). Il possède deux nageoires pectorales et pelviennes ainsi qu'une nageoire dorsale, adipeuse et caudale. De couleur argentée, il a un corps fusiforme recouvert de petites écailles lisses, alignées sur la ligne latérale, reliant l'opercule à la nageoire caudale. Il dispose d'une bouche fendue jusqu'à l'aplomb de l'œil, avec une tête assez petite. Son pédoncule caudal est étroit (Descroix, 2009). Les juvéniles possèdent sur les flancs des taches de couleur bleu-violacées allant de 8 à 12. De petites taches rouges peuvent également être présentes sur ses flancs (Rochard et Elie, 1994). En mer, les adultes présentent une coloration vert-bleutée sur le dos. Avec le temps, celle-ci devient argentée le long des côtés et blanc sur le ventre ; avec la présence de quelques taches noires mais aucune sous la ligne latérale (Bigelow et *al.*, 1963). De façon générale, leurs nageoires caudale et adipeuse ne sont pas tachetées, encore moins bordées de noir (Rochard et Elie, 1994). Pendant la reproduction, ils perdent leur couleur argentée et deviennent brun terne ou jaunâtre avec une peau épaisse et coriace (Bigelow et *al.*, 1963 ; Rochard et Elie, 1994). Pendant la saison du frai, les mâles ou bécards présentent des mâchoires allongées et crochues qui se rejoignent aux extrémités, des nageoires plus épaisses (Schultz, 2000).



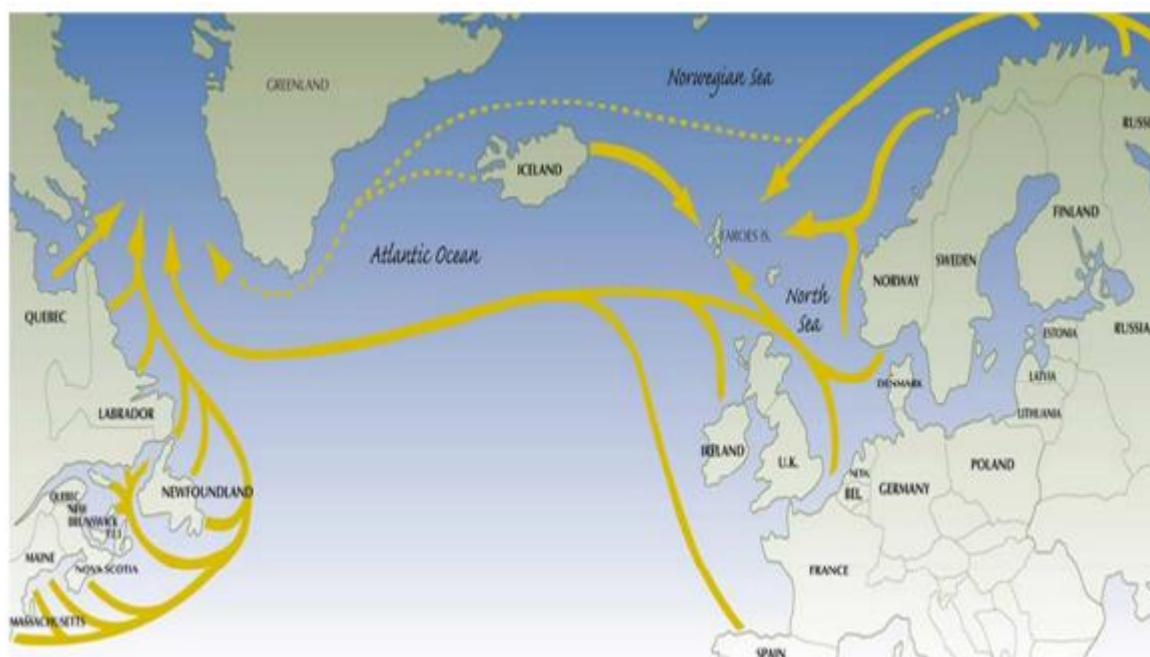
**Figure 1:** *Adulte du saumon atlantique (Salmo salar) capturé en juin 2019 au barrage de Lixhe. (Page saumon-Meuse)*



**Figure 2:** *Différences morphologiques entre tacon et smolt (Salmo salar, L). (McCormick, et al., 2013)*

### **1.2.1 Répartition géographique**

*S. salar* est un excellent nageur. Comme illustré dans la figure 2, il est très largement répandu dans tous les pays baignés par l'océan Atlantique situés au nord du fleuve Hudson (États-Unis) et du fleuve Mifio au Portugal (Bensettiti et Gaudillat, 2004). *S. salar* est présent dans les régions tempérées et froides appartenant au bassin du nord de l'Atlantique au sens large incluant la mer Baltique et se prolongeant jusqu'à la péninsule de Kola (Russie) (Mocq, 2013). Il vit aussi bien dans les rivières, les lacs et les mers de la zone tempérée et froide de l'hémisphère nord (Guéguen et al., 1994). Le saumon se trouve dans les systèmes fluviaux des deux côtés de l'Atlantique et migre sur la majeure partie de la zone nord de l'océan au cours de l'anadromie (Hansen, 1994).

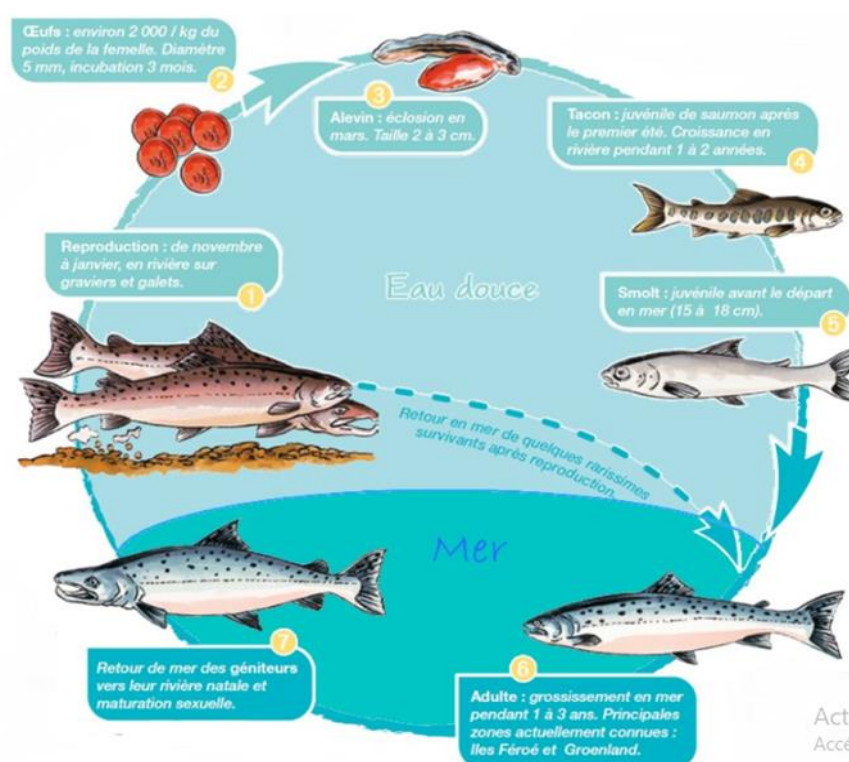


**Figure 3:** Routes de migration et zones d'engraisement des populations de saumon atlantique à l'échelle de son aire de répartition (excepté Baltique). (Source : Atlantic Salmon Federation <http://www.asf.ca/>)

### **1.2.2 Cycle de vie**

*S. salar* est une espèce anadrome, qui remonte les cours d'eau douce pour se reproduire. Au début de la maturité sexuelle, le saumon atlantique dévale la mer pour retourner à sa rivière natale. Il est marqué par une alternance de vie en eau douce pour les juvéniles et en eau de mer pour les post-smolts et adultes avant la reproduction (Descroix, 2009). La figure 3 illustre le cycle de vie de cette espèce. *S. salar* est un grand migrateur amphibiotique de par ses possibilités de vie en eau douce et en eau de mer, potamotocue parce qu'il accomplit sa ponte en eau douce (Hansen, 1994). Espèce migratrice, elle existe sous des formes anadromes et non anadromes résidant en eau douce (Lebrech, 2009). La diadromie, c'est-à-dire la migration entre eau douce et eau marine est un avantage évolutif pour cette espèce, qui dévale vers la mer pour pouvoir croître lorsque le cours d'eau d'origine, exigu est relativement peu productif et ne suffit plus à soutenir la population de saumons. Le tacon va subir de profonds changements physiques, biologiques et comportementaux destinés à le rendre apte à survivre en milieu salé avant de dévaler vers la mer, devenant un smolt (Boeuf, 1994). Au cours de cette métamorphose appelée smoltification ; c'est-à-dire la transformation du tacon (poisson dulcicole) en smolt ou

saumoneau (poisson marin), le jeune saumon mémorise l'odeur de sa rivière natale, ce qui lui permet de l'identifier lors de retour pour la reproduction au stade adulte. Il s'agit du phénomène de « homing » (Philippart et *al.*, 2016). La majeure partie de sa croissance s'effectuera en mer (Descroix, 2009). La phase marine peut généralement varier de 1 à 4 ans, durant laquelle ces espèces deviennent rapidement mature sexuellement. Puis, ils reviennent en rivière au printemps ou au début de l'été. Une fois dans leur rivière natale, ils se reproduisent en automne et au début de l'hiver. La plupart des saumons meurent après le frai (Valiente et *al.*, 2005). La durée totale du cycle biologique de ce poisson est de 3 à 7 ans.



**Figure 4:** Cycle de vie du saumon atlantique (*S. salar*) (Source : [www.saumon-rhin.com](http://www.saumon-rhin.com) <https://www.bing.com/images/search>)

### 1.2.3 Stratégies de reproduction du Saumon atlantique

Les géniteurs anadromes qui au contraire des charognards, présentent dans la majorité des cas un cycle de reproduction au cours de leur vie (Philippart, 2005). Le saumon atlantique est présent sous des formes anadromes et non anadromes résidant en eau douce, ce qui le diversifie dans l'utilisation de cet habitat en eau douce (Heggenes et *al.*, 1999). Selon Klemetsen et *al.*, (2003), *S. salar* présente différentes stratégies de reproduction. L'une d'entre elles est basée sur des tactiques de reproduction alternatives chez le mâle. En effet, certains jeunes mâles atteignent leur maturation sexuelle de façon précoce sans pour autant dévaler en mer. Ce sont

des tacons précoces sans la période de smoltification. Cette maturation précoce augmente non seulement la survie et la stabilité de la population (Ellner et Hairston, 1994), mais permet aussi de maintenir la diversité génétique de l'espèce (Almodovar et *al.*, 2020).

#### *1.2.3.1 Les mâles adultes anadromes et satellites*

La grande majorité des mâles (Figure 4), et toutes les femelles, sont anadromes, migrant vers la mer après la mise bas, revenant après 1 an, ou plus en rivière natale pour la reproduction. Les mâles anadromes de par leur taille et l'apparition de leurs caractères sexuels secondaires, usent de leur charme et énergie pour féconder les femelles. Ce qui déclenche entre ces mâles une compétition féroce afin d'attirer les femelles (Fleming 1996). Les espèces se reproduisent à une température de 6-10°C (Schmidt, 1996) dans des zones de rivières de gravier très en amont, avec des eaux modérées à rapides, bien oxygénées et une succession de radiers et de fosses (Kailola et *al.*, 1993). Les femelles déposent leurs œufs dans des eaux courantes au sein de nids ou le gravier est de la bonne taille et d'une profondeur suffisante de 0,1 à 0,3 m avec une profondeur d'eau d'environ 0,5 - 3 m (Muus, 1999). La période de ponte dure de 1 à 2 semaines. La plupart des mâles meurent après le frai, tandis que 10-40% des femelles peuvent survivre et retourner à la mer en automne ou passer l'hiver dans les rivières, se nourrir un été et migrer à nouveau (Luna, 1988). Les œufs émis passent sous différents stades puis éclosent en alevins vésiculés. Ces derniers vont ensuite grandir sous le gravier jusqu'à ce que leur vésicule vitelline se résorbe. Ils vont ensuite émerger à travers le gravier, avaler une bulle d'air pour atteindre une flottabilité neutre et commencer à se nourrir de macro invertébrés en rivière pour une période variant de 1 à 7 ans selon la latitude, mais la plupart y restent pendant 2 à 3 ans (Lebrech, 2009).

#### *1.2.3.2 Les jeunes mâles précoces*

Les jeunes mâles précoces (Figure 5) sont des tacons vivants en eau douce. Ces derniers mûrissent sexuellement dès leur première année (Bailey et *al.*, 1980). Selon Duston et *al.*, (2005), cette maturation précoce des mâles est plutôt induite par une interaction entre génétique et les stimuli environnementaux qui influencent le taux de croissance au cours du printemps. Donc, au moment de la ponte, les œufs de chaque femelle de manière générale sont fécondés par des géniteurs mâles adultes et précoces. Toutefois, les adultes défendent la femelle contre les autres mâles afin d'empêcher les jeunes tacons de venir féconder les œufs, ce qui oblige alors ces individus à être plus rapides et plus performant dans la qualité de leur semence pour

réussir une fécondation. (Kottelat et Freyhof, 2007). Compte tenu de l'avantage de la petite taille que présentent ces tacons face aux mâles anadromes, ils réussissent à passer à travers le nid des femelles afin d'aller féconder discrètement les œufs. D'après Martinez, et *al.*, (2000), les tacons mâles précoces peuvent contribuer à plus de 50% dans le succès reproductif et par conséquent augmentent la taille effective de la population.



**Figure 5:** Illustration de la variabilité des tactiques de reproduction des mâles adultes anadromes et jeune précoce (Lepais et *al.*, 2017)

#### **1.2.4 État des stocks du saumon atlantique et cause du déclin**

Le saumon atlantique *Salmo salar* L. 1758 est l'une des trois espèces de salmonidés les plus importantes pour l'aquaculture mondiale (Figuerola et *al.*, 2016). D'après Gueguen et Prouzet, (1994), il était très abondant dans les rivières en Europe mais aujourd'hui, est devenu beaucoup plus rare. *S.salar* était présent en nombre et parcourait le bassin de la Meuse jusqu'à Monthermé en France en 1840. A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, la capture de cette espèce aussi bien dans l'estuaire commun du Rhin et de la Meuse a connu une augmentation exponentielle en passant de 21.600 à 104.000 individus par an. Mais, à dater de 1885, une diminution totale en capture de cette espèce en Meuse belge a été constatée (Malbrouck et *al.*, 2007). De par son comportement anadrome, *S.salar* est particulièrement vulnérable face à sa surpêche et aux perturbations de ses habitats due à la construction de barrages, aux pollutions et à la disparition de frayères (Kestemont et *al.*, 2021). *S.salar* qui autrefois était présent dans 2605 rivières et dans 19 pays, a connu une raréfaction voire une extinction presque totale dans 294 rivières et dans 6 pays dont l'Allemagne, la Hollande et la Belgique (Atlantic Salmon Federation, 2009). Les causes d'un tel déclin sont multiples et variées et sont principalement liés à l'activité



humaine et aux répercussions qu'elle induit sur le milieu aquatique (Bardonnet et Baglinière, 2000 ; Malbrouck *et al.*, 2007). Cette disparition fait de *S. salar* une espèce en danger partout dans le monde (Gueguen et Prouzet, 1994; Bardonnet et Baglinière, 2000). Face à ce déclin, les pouvoirs publics belges et hollandais ont entrepris des solutions pour y palier. Ces solutions portent principalement sur la préservation et la restauration des populations de saumon Atlantique à travers des rempoissonnements de la Meuse.

### **1.3 Projet Saumon Meuse**

#### **1.3.1 Présentation du projet**

*S. salar*, est parfois qualifié de ‘ ‘ roi des poissons d’eau douce’ ’ de par ses exigences pour la qualité du milieu aquatique (Malbrouck *et al.*, 2007). Sa disparition en Meuse, a conduit à l’amélioration de la qualité des eaux de la Meuse en 1980 et à un programme de restauration. Ce programme est basé sur un repeuplement approprié de saumons provenant d'une source non locale. De par cette amélioration, la truite de mer, autre espèce migratrice que *S. salar* a fait son apparition de nouveau dans la Berwinne, dernier affluent mosan à la frontière belgo-hollandaise. Toutefois, ce programme se heurte encore à plusieurs goulots d'étranglement (Renardy *et al.*, 2020). Alors dans le but de mieux intégrer cette avancée et de pallier cette extinction, le projet " Meuse Saumon 2000" est né par la collaboration des scientifiques des universités de Notre-Dame de la Paix de Namur et de Liège, d’avec le Service de la Pêche de la Région Wallonne. Le projet vise le retour du saumon en Meuse belge à travers des programmes de repeuplements annuels des principaux affluents de la Meuse (Malbrouck *et al.*, 2007).

#### **1.3.2 Production de matériel biologique de rempoissonnement (UNamur)**

La faible remontée des mâles adultes sauvages constitue le point limitant pour la restauration de la population éteinte (Erraud *et al.*, 2019). Or, il est important de maintenir la diversité intraspécifique de l'espèce. Pour contrebalancer cette situation, plusieurs études ont été menées dans le rang des scientifiques pour mettre en place deux stratégies envisageables dont la reproduction alternative du saumon atlantique mâle (Martinez *et al.*, 2000 ; Valiente *et al.*, 2005) et ou une méthode basée sur le maintien de la diversité génétique afin de restaurer les populations. Elle consiste à optimiser l'efficacité de la reproduction en utilisant des techniques de conservation des gamètes males pour une utilisation future. Dans ce cadre, l’université de

Namur mets en place une cryobanque spermatique de ces saumons pour assurer une reproduction ultérieure et reempoissonner les rivières.

#### **1.4 Méthodes de conservation des gamètes**

Les biotechnologies de la reproduction constituent un ensemble de technologies qui permettent d'assurer aussi bien la prolifération de la descendance issue des géniteurs présentant une meilleure fitness, que de garantir la conservation de la biodiversité des espèces domestiques et sauvages (Decuadro-Hansen, 2004). Elles se basent sur l'application de diverses techniques comme le sexage, la cryopréservation des gamètes et des embryons, le clonage et la transgénèse. Ainsi, plusieurs techniques sont d'usage courant permettant donc cette conservation des gamètes (Thibier et Guérin, 1991). Les possibilités de conservation du sperme se font à l'état frais et à l'état congelé et sont d'application depuis des années à travers plusieurs pays d'Europe (Bratanov et Dikov, 1961). La conservation du sperme par le froid est la méthode de conservation à court terme à des températures voisines de 0°C. Elle permet de pallier un manque temporaire de sperme ou une désynchronisation de la maturation sexuelle des mâles et des femelles. La conservation du sperme par la congélation quant à elle permet une conservation à long terme du sperme (Billard et Dupont, 1975). Leur mise en application passe par l'utilisation de solution de dilution qui assure la protection du liquide séminal (Truscott et *al.*, 1968). Les méthodes de conservation des gamètes de ces poissons présentent de nombreux avantages notamment leur transport lorsque les lieux de prélèvements et d'insémination sont différents, la facilité du travail en pisciculture ou des améliorations génétiques afin de constituer des stocks de gamètes non porteurs de maladies et de qualité génétique déterminée (Carpentier et Billard, 1978). De ces deux méthodes, la cryoconservation semble être la méthode qui garantisse plus la disponibilité de la semence pour une longue période.

##### **1.4.1 Cryoconservation spermatique**

###### **1.4.1.1 Description globale**

La cryoconservation est une méthode de conservation du sperme dans de l'azote liquide en présence de cryoprotecteurs. C'est un processus par lequel des matériaux biologiques tels que des cellules et des tissus sont préservés par refroidissement à de très basses températures, généralement à -196°C (température de l'azote liquide). Ces cellules restent viables tout le long du processus après un réchauffement ultérieur à des températures supérieures à 0°C (Agarwal, 2011). De façon générale, la cryoconservation arrête de manière réversible le métabolisme des

cellules tout en maintenant leur intégrité et leur fonctionnalité. La première cryoconservation spermatique a été réalisée avec succès sur des taureaux d'élevage depuis plus de 60 ans (Polge et *al.*, 1949), ce qui a donné lieu à une multitude d'essai sur d'autres espèces notamment le poisson dont le premier rapport issu de la cryoconservation de sperme de poisson a été publié par Blaxter en 1953 (Maisse et *al.*, 1998). Suite à la percée de cette nouvelle technique, de nombreuses publications ont démontré la faisabilité de cette cryoconservation du sperme chez plusieurs espèces de poissons d'eau douce, principalement les salmonidés, les esturgeons et les carpes. Toutefois, l'application de cette technique sur les espèces de poissons marins n'a été effective qu'au cours de la dernière décennie (Cabrita et *al.*, 2010).

#### *1.4.1.2 Différentes étapes de la cryoconservation*

La cryoconservation repose sur différents types de protocole dans le but de toujours améliorer la qualité spermatique post cryoconservation de l'espèce. Afin de réussir cette cryoconservation, il est indispensable de respecter plusieurs conditions nécessitant l'utilisation d'un protocole adapté. Ainsi, une cryoconservation réussie du sperme de poisson nécessite l'utilisation d'un cryoprotecteur et d'un diluant adapté aux caractéristiques physiologiques du sperme de poisson ciblé capable de préserver les fonctions du spermatozoïde. (Lee et *al.*, 2021). Selon Dziejulska et *al.*, (2011), l'un des meilleurs cryoprotecteurs et capable garantir une bonne qualité spermatique post cryoconservation est le DMSO complété par des antioxydants et des stabilisateurs de la membrane plasmique. Cabrita et *al.*, (2001), ont également rapporté que cela maintient la composition lipidique de la membrane plasmique et augmente la stabilité des spermatozoïdes chez les salmonidés. Toutefois, il est tout aussi important de maîtriser les techniques de décongélation et de fécondation, car c'est la décongélation est l'une des étapes durant laquelle les altérations peuvent survenir (Maisse et *al.*, 1998).

#### *1.4.1.3 Les avantages de la cryoconservation*

La cryoconservation permet de conserver presque indéfiniment les pools génétiques souhaités et garantir la disponibilité de sperme cryopréservé pour l'insémination artificielle et la reproduction. En aquaculture, la cryopréservation de sperme a permis d'amplifier des programmes de reproduction de grande envergure, de livrer des gamètes pour la fécondation en dehors des saisons de reproduction normales et d'introduire des techniques alternatives pour la gestion du bétail, comme la triploïdisation et l'hybridation (Martínez-Páramo et *al.*, 2009 ; Cabrita et *al.*, 2010 ; Martínez-Páramo et *al.*, 2016). La cryoconservation du sperme de poisson

est un outil important pour la banque de matériel génétique d'espèces menacées ou la préservation à long terme des gamètes chez des espèces d'importance commerciale, l'amélioration des programmes de reproduction et la protection des souches de valeur biologique et commerciale (Bogevik et al., 2020). Elle assure la disponibilité des gamètes toute l'année de même que la préservation de la diversité génétique.

#### *1.4.1.4 Les inconvénients de la cryoconservation*

La recherche continue à optimiser les méthodes de cryoconservation du sperme dans le but de garantir des spermatozoïdes motiles, viables et fertiles (Nynca et al., 2021). Mais, la qualité du sperme cryoconservé dépend des caractéristiques du sperme frais. Il est nécessaire de s'assurer de la bonne composition du liquide spermatique car, le processus de cryoconservation modifie le profil lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes et provoquent des changements dans l'organisation des phospholipides et du cholestérol, qui bouleversent l'homéostasie cellulaire, conduisant ainsi à la diminution voire la perte de fonction de ces spermatozoïdes (Cerolini et al., 2001). Cette méthode n'est pas sans risque pour la qualité du sperme. Selon Cerezales et al., (2010), elle influe les résultats des fertilisations et le bon développement de l'organisme futur en compromettant l'intégrité et la fonctionnalité des spermatozoïdes. De même, lors des manipulations et durant le stockage en cryoconservation des spermatozoïdes, les cryodommages surviennent. Au nombre desquels la formation de cristaux de glace et de toxicité liée au cryoprotecteurs tels que le DMSO, le MtOH qui altèrent la structure et la physiologie des spermatozoïdes en agissant sur le potentiel mitochondrial, sur la viabilité spermatique et sur la motilité, avec génération de ROS (Pérez, 2016).

## **1.5 Le sperme chez les salmonidés**

D'après Coste (1856), le sperme des salmonidés est un liquide blanc laiteux. En fonction de la période de spermiation et de la taille de l'espèce, le volume de l'éjaculat des mâles matures peut avoisiner jusqu'à 50 ml avec un nombre de spermatozoïdes par millimètre d'éjaculat variant de  $10^9$  à  $30.10^9$ , avec une moyenne de  $10.10^9$  (Maisse et al., 1988).

### *1.5.1 Physiologie du sperme chez les Salmonidés*

Selon Robitaille et al., (1986), il existe une relation de causalité entre la consommation d'oxygène des spermatozoïdes immobiles et la température. Le sperme soumis à une température de  $10^{\circ}\text{C}$  avec une concentration moyenne de spermatozoïdes de  $10.10^9$ , exige une demande en oxygène de  $10\mu\text{l}/\text{heure}$ . En milieu hypotonique, l'entrée d'eau dans le

spermatozoïde provoque le gonflement, voire l'éclatement, de la membrane (Maléjac *et al.*, 1990).

### **1.5.2 Caractéristiques des spermatozoïdes chez les salmonidés**

Chez les salmonidés, le spermatozoïde présente une tête qui est sans acrosome et ovoïde. La pièce intermédiaire est de forme cylindrique, imprégnée par la voie cytoplasmique (Maisse *et al.*, 1998). Cette voie représente l'invagination de plasmalemme, car les mitochondries y sont contenues. Il est uni-flagellé et asymétrique et composé de neuf périphériques et une paire centrale de microtubules, latéralement inséré au noyau qui présente une forme ovoïde. La mitochondrie n'est pas en mesure de compenser rapidement les pertes en ATP, ce qui limite la durée de la motilité. La durée de motilité des spermatozoïdes de salmonidés se voit réduire à 30s après activation dans l'eau. L'ATP chute de façon rapide or il faut près d'une quinzaine de minutes après avant que la mitochondrie puisse être en mesure de s'activer. Les spermatozoïdes demeurent immobiles à pH acide (Maisse *et al.*, 1998).

## **1.6 Outils d'évaluation de la qualité spermatique**

La mise au point d'outils d'évaluation de la qualité spermatique spécifique au saumon semble nécessaire pour s'assurer de l'excellente qualité du sperme cryoconservé. Ainsi, plusieurs biomarqueurs doivent être contrôlés dont un bon nombre que dispose l'UNamur. Toutefois, il est primordial d'évaluer également le stress oxydant lié au sperme de cette espèce puisqu'il constitue un inconvénient majeur de la cryoconservation.

### **1.6.1 Viabilité spermatique**

La mise en évidence de l'état de la membrane plasmique relatif au nombre de spermatozoïdes vivants et morts est largement documentée pour l'humain et les animaux d'élevage, dont le saumon. Son utilité dans l'évaluation de la viabilité spermatique chez les poissons n'est plus à démontrer. Les techniques utilisées nécessitent l'utilisation de fluorochromes (i.e. SYBR®14, iodure de propidium) et d'un cytomètre de flux (Cabrita *et al.*, 2005; Erraud *et al.*, 2019).

### **1.6.2 Motilité des spermatozoïdes**

La motilité, est un critère essentiel de la qualité spermatique. C'est un facteur crucial pour la fertilisation et particulièrement lorsqu'une certaine distance doit être franchie pour rejoindre les œufs (Côté, 2004). Le flagelle du spermatozoïde est la pièce mécanique qui permet au

spermatozoïde de se propulser. Il est formé d'un complexe de microtubules qui sont articulés autour du centriole, la pièce qui permet la jonction entre la tête et la queue. Ainsi, l'énergie qui est transmise à ce complexe peut générer le mouvement propulseur du spermatozoïde. Cette énergie est principalement issue des mitochondries qui sont situées au niveau de la pièce intermédiaire du spermatozoïde (Gilbert, 1996). La mise en branle du flagelle d'un spermatozoïde est la réponse à une diminution de la concentration en cations potassium due à un changement de milieu. Chez les poissons les spermatozoïdes sont immobiles dans le plasma séminal. Ils n'acquièrent leur motilité qu'au contact de l'eau (Harvey et Hoar, 1980). On appelle activation le processus d'acquisition de cette motilité. Après son activation, un spermatozoïde de saumon pourra se mouvoir pendant environ 30 secondes. Il existe de nos jours des analyseurs d'image de type CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) qui permettent de quantifier de manière plus précise la nature et la vitesse de déplacement des spermatozoïdes (Rurangwa et al., 2004 ; Gennotte et al., 2012). Comme la motilité intègre différentes caractéristiques cellulaires et séminales, elle apparaît comme l'estimateur le plus objectif et le plus fiable pour évaluer la qualité des semences (Gennotte et al., 2012, Shaliutina, 2013). Bien qu'elle ne soit pas une garantie absolue de fécondité, les spermatozoïdes qui ont perdu leur motilité sont incapables de fécondation (Billard et al., 1971).

### ***1.6.3 Stress oxydant***

Le stress oxydant met en évidence la production d'espèces réactives de l'oxygène. Il est l'un des plus grands dommages de l'être vivant. Lorsque les réactions liées à l'oxygène sont en excès par rapport aux capacités des systèmes de protection et de réparation, elles créent des dommages notamment sur l'ensemble des constituants cellulaires lipidiques, protéiques, acides nucléiques et polysaccharides (Jean-Claude et Claude, 2008).

#### ***1.6.3.1 La peroxydation lipidique (thiobarbituric acid reactive substances TBARS)***

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés qu'ils soient d'origines animale, végétale ou provenant des membranes cellulaires ou des lipoprotéines sont susceptibles de se peroxyder. L'étude des mécanismes de la peroxydation lipidique et des moyens de la prévenir par les antioxydants connaît depuis les dernières décennies un regain d'intérêt dû aux implications de ces phénomènes dans les domaines de la nutrition et de la santé (Cillard, 2006). *In vivo*, la peroxydation lipidique est un phénomène également très important. Les membranes

des cellules sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50 %) présents dans les phospholipides, les sphingolipides, les cardiolipines. La lipoperoxydation des membranes va altérer leur fonctionnalité, ce qui induirait une modification de leur perméabilité, de leur fluidité, avec la perte d'activité d'enzymatique. Martínez-Páramo *et al.*, (2012) ont démontré que la peroxydation lipidique des spermatozoïdes est corrélée aux différences de qualité des spermatozoïdes pendant la saison de reproduction chez les mâles du bar européen précoce. L'oxydation des cardiolipines de la mitochondrie est un facteur déterminant dans le déclenchement de l'apoptose des cellules (Nakagawa, 2004). L'appréciation de l'importance du stress oxydant dans de nombreuses pathologies rend nécessaire l'utilisation de différents dosages dont le plus utilisé est celui du malondialdéhyde, un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiée par les radicaux libres. Son dosage est le plus souvent réalisé par condensation en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique. Un stress oxydant se traduit par la diminution des anti-oxydants (beta-carotène, vitamine E), la dégradation des acides gras polyinsaturés, suivi d'une augmentation des produits de dégradation (Lefèvre *et al.*, 1998).

### **1.7 Objectifs de l'étude**

Aux vues de ces données bibliographiques, il revient donc en un premier temps de mettre au point une méthode fiable et reproductible de dosage d'un marqueur notamment le TBARS. Puis, en une seconde partie de normaliser le protocole de cryoconservation en établissant une concentration optimale et constante de sperme dans les paillettes. Enfin, le marqueur développé pourra être évalué sur les semences fraîches et cryoconservées.

## **2 Matériels et méthodes**

### **2.1 Première phase : Mise au point du TBARS chez les spermatozoïdes de saumon**

L'expérimentation s'est déroulée en deux étapes. En un premier temps il a été question de développer un marqueur de la qualité spermatique lié au stress oxydatif notamment le LPO. Pour ce fait, il était important de bien lyser la matrice extracellulaire et les organites constituant les spermatozoïdes afin de ne garder que les lipides. Cette étape est le point crucial de la technique. La peroxydation lipidique (LPO) est déterminée par la réaction de la malondialdéhyde (MDA) avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former une réaction en colorimétrie de longueur d'onde (532 nm) ou en fluorimétrie présentée sur plaque de 96 puits.

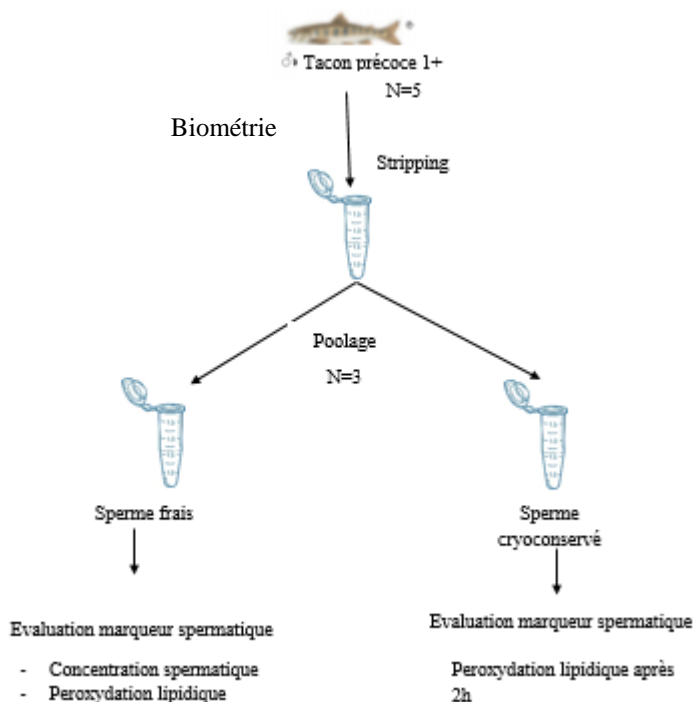
#### **2.1.1 Acquisition des organismes**

Les tacons utilisés lors de cette expérimentation provenaient d'un stock de saumons produits et élevés au sein des installations de l'UNamur. Ces derniers ont été maintenus dans des bassins de 3 × 3 m alimentés en système recirculé sous un régime de photopériode naturelle simulée pour induire la spermatogenèse. Les paramètres physico-chimiques ont été relevés quotidiennement. La température de l'eau dans les bassins d'élevage a varié entre 12,8°C et 17,2°C avec une moyenne de 14,1 ± 1,5 °C. Un renouvellement d'eau d'environ 25% a été effectué tous les jours.

#### **2.1.2 Sexage et obtention des gamètes**

La première phase de l'expérience a été réalisée sur des tacons précoces (1+) sexuellement matures de saumon Atlantique. Les tacons 1+ (N=5) avaient un poids et une longueur moyenne respectivement de 54,92 ± 5,68 g et de 17,64 ± 0,96 cm. Ils ont été anesthésiés dans un bac de 50L avec 125 mg.L<sup>-1</sup> de MS-222 pendant 10 minutes. Les organismes ont été ensuite mesurés et pesés. L'orifice urogénital a été préalablement séché afin d'éviter toutes contaminations avec des fèces, du mucus ou de l'urine. La semence (i.e. 1mL maximum / inds) a ensuite été collectée par stripping (i.e. massage abdominal) dans un tube Eppendorf (2 ml gradué ; stérile et sec), et maintenue à 4°C sur bain de glace. La quantité de sperme n'étant pas suffisante pour obtenir 5 échantillons d'1 ml nécessaire à la réalisation de l'expérimentation, le sperme de trois mâles a été poolé pour reconstituer un échantillon. Cela a amené le nombre d'échantillons à n = 3. Ensuite, chaque échantillon a été aliquoté en 2 tubes analysés en laboratoire, dont l'un pour la semence fraîche et l'autre pour l'analyse post cryoconservation du TBARS.





**Figure 6:** Diagramme de flux de travail de la sélection des mâles, le sexage et la collecte du sperme avec les différents tests de qualité du sperme

### **2.1.3 Le dénombrement**

Dans notre étude la concentration spermatique a été évaluée par un comptage visuel à l'aide de lames KOVA. Pour cela, chaque échantillon d'éjaculat frais a été dilué au 1/10000 avec une solution inactivatrice (*i.e.* extender à pH 8). Le sperme a été maintenu ainsi immotile pour faciliter la lecture au microscope. La concentration spermatique a ensuite été évaluée à l'aide du microscope Zeiss dans 10 petits carrés. Un petit carré correspondant à 0,01  $\mu\text{L}$  et connaissant le facteur de dilution (FD), la concentration des 3 échantillons a ainsi pu être déterminée.



$$[C] = \text{nbre de spz pour 10 petits carrés} \times 0,01 \mu\text{L} \times \text{FD}$$

**Figure 7:** Lame Kova montée sur microscope pour évaluation de la concentration spermatique

#### **2.1.4 Cryoconservation**

Le protocole utilisé est celui de Landsteiner et *al.*, (2000) qui a été modifié par Horvath et *al.*, (2012) en rapport au taux de dilution de la semence fraîche et de la méthode de refroidissement. Avant la congélation, le sperme de chaque échantillon est mélangé dans un rapport de 1:6 avec une solution de dilution extender, composée de 200 mM de glucose, 40 mM de KCl, 30 mM de Tris (pH 8,0) et 10% de méthanol pour un volume final de 1ml. L'ajout du méthanol qui est un cryoprotectant permet de conserver les cellules en réduisant l'excédent d'eau et d'éviter la formation de cristaux de glace. Le sperme dilué a été ensuite chargé dans des paillettes de 0,5 ml (IMV technologies, France) à l'aide d'une seringue. Les paillettes doivent être bien remplies pour éviter qu'elles ne s'éclatent une fois plongées dans l'azote liquide. Après remplissage des paillettes, l'extrémité non utilisée a été plongée dans du polyvinyle pour être refermé. Les paillettes ont été ensuite placées sur un cadre en polystyrène de 3 cm de haut flottant à la surface de l'azote liquide et laissées à refroidir pendant 3 minutes. Après refroidissement, les paillettes ont été immergées directement dans l'azote liquide contenu dans le polystyrène pendant 10 minutes pour permettre une homogénéisation de la température avant le stockage final dans les canisters. Les échantillons de sperme congelés ont été stockés dans une cuve Arpège GT35 (Air Liquide). Ensuite, les échantillons ont été utilisés pour l'analyse des spermatozoïdes après 2h post-cryopréservation. Les échantillons de sperme cryoconservés ont été décongelés dans un bain-marie à 40°C pendant 17s. Une fois décongelée, la peroxydation lipidique avec le TBARS et le MDAkit en fluorimétrie et en colorimétrie ont été évalués en réplicat technique.

#### **2.1.5 Mise au point des tampons de lyse**

##### **2.1.5.1 Kit MDA**

La préparation du MDA a été faite suivant les recommandations de la société SIGMA-ALDRICH. Pour la préparation des standards en détection par colorimétrie, 2µl de la solution standard de MDA a été diluée dans 81,4µl d'eau distillée pour l'obtention d'une solution à 0,1M. Ensuite, 20µl de cette solution préparée ont été dilués dans 980µl d'eau distillée pour avoir une solution à 2mM de MDA. Pour la détection en colorimétrie, le kit propose une gamme de détection de 0 ; 2 ; 4 ; 8 ; 12 ; 16 et 20 nmoles. Pour obtenir cette gamme étalon il a été nécessaire d'ajouter respectivement 0 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10µl de la solution de MDA et ensuite le volume a été ajusté à 200µl respectivement pour chaque solution avec complément d'eau distillée.

La fluorimétrie permet une détection plus faible de l'ordre de 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,2 ; 1,6 ; et 2nmoles. Pour réaliser cette gamme étalon, Il a été nécessaire de prélever 50µl de la solution de 2mM de MDA préparée précédemment et d'ajouter 450µl d'eau distillée pour obtenir une solution à 0,2mM de MDA. Ensuite, 0 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10µL de la solution à 0,2mM de MDA ont été prélevés et le volume final a été ajusté à 200µL. Tous les tubes sont ensuite passés au vortex pour une meilleure homogénéisation et ont été conservés au frais à 4°C

#### *2.1.5.1 Composition du tampon de lyse Figueroa*

Le tampon de lyse de Figueroa et *al.*, (2018) est composé de Tris à 50 mM, de NaCl à 100 mM, de EDTA à 1 mM, maintenu à un de pH 8,0)

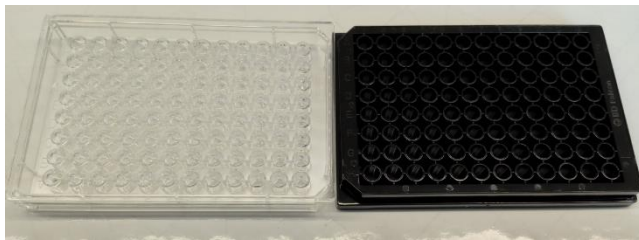
#### *2.1.5.2 Préparation du TBARS*

L'acide thiobarbiturique permettant de déclencher la réaction d'avec les lipides, a été recomposé en suivant les recommandations de la société SIGMA-ALDRICH). 7,5 ml d'acide acétique ont été dilués avec de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 25ml.

#### *2.1.6 Peroxydation lipidique*

Les trois échantillons, après dénombrement, présentaient respectivement des concentrations impressionnantes de l'ordre de 98.109 ; 47.109 et 63.109 de spermatozoïdes/ml de sperme. Quatre conditions ont été mises en application à raison de l'utilisation des deux tampons de lyse préparés et de deux méthodes de détection (i.e. fluorimétrie et colorimétrie). Toutes ces conditions ont été appliquées sur les trois concentrations de sperme en frais et cryoconservés. Les analyses ont été réalisées en réplicat technique. Pour obtenir le volume de sperme à prélevé pour chaque échantillon aussi bien frais que cryoconservé, il était important de connaître le volume final de l'échantillon de même que la concentration finale des échantillons. Une fois ces volumes déterminés, s'en est suivit une série successive d'étapes. La première étape a consisté à décongeler le sperme cryoconservé au bain-marie à 40°C pendant 17secondes. Après cette décongélation, 122µl, 210µl et 190µl de sperme cryoconservé ont été respectivement prélevés des échantillons de base. Pour le sperme, frais, il a été prélevé respectivement 20,4µl, 35µl et 32µl des trois échantillons de sperme frais dans l'ordre de concentration cité plus haut. Ensuite, sur chacun des échantillons du sperme frais, 950µl d'extender ont été ajoutés, contre 750 µl d'extender pour chaque échantillon de sperme cryoconservé. L'ajout de cette solution

permet de nettoyer le sperme. Ensuite, le mélange a été centrifugé à 5000G pendant 10mn à 4°C. La troisième étape qui est l'étape de lyse a consisté à retirer le surnageant de chaque tube et à y ajouter 1mL du tampon de lyse de Figueroa, ou celui du MDAkit. Après cela, des billes de 0,5 mm ont été incorporées dans les tubes. Le mélange a été soumis pendant 1mn au Bullet blender storm 24 à puissance 12 pour être broyé. Quand la minute ne suffisait pas, l'opération a été répétée de nouveau pendant 1mn. Une fois que les cellules étaient bien lysées, chaque tube a été de nouveau centrifugé pendant 30 minutes à 4°C à 12000G. La quatrième étape est celle de l'adduction des tampons. A ce niveau, 200µl de chaque surnageant ont été récupérés dans des tubes Eppendof de 1,5ml. A chacun des surnageant, 600µl de la solution de TBARS ont été ajoutés. Cette même solution de TBARS a été ajoutée dans tous les tubes contenant les standards. Tous les échantillons ont été passés au bain-marie à 95°C pendant 1heure. Un temps de repos sur glace a été appliqué pendant 10minutes. Enfin, la dernière étape est celle de la mise sur plaque. 200µl de chaque échantillon ont été prélevés et disposés sur plaque blanche à fond plat de 96 puits pour la lecture en colorimétrie et sur plaque noire pour la lecture en fluorimétrie à longueur d'onde 532nm.



*Figure 8: Plaques à fond blanc et noir de 96 puits respectivement pour la lecture en colorimétrie et en fluorimétrie*

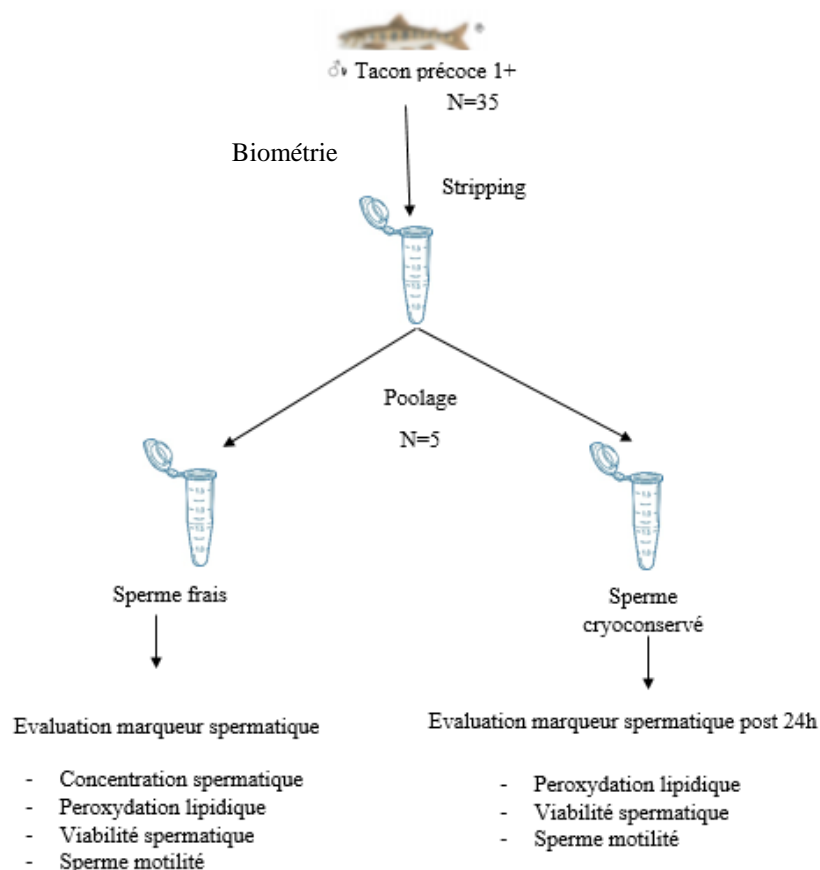
## **2.2 Deuxième phase : Optimisation de la concentration de spermatozoïdes dans les paillettes**

Au cours de la deuxième étape, il a été question de doser les marqueurs de qualité spermatique y compris celui développé plus haut. Ces dosages se sont faits sur du sperme frais et du sperme congelé. La variation des concentrations dans les paillettes lors de la cryoconservation permet de définir celui présentant le meilleur résultat. L'effet de 4 concentrations spermatiques soient 5.10<sup>9</sup>, 2,5.10<sup>9</sup>, 1,25.10<sup>9</sup>, 0,625.10<sup>9</sup> spermatozoïdes/ml de sperme dans les paillettes de cryoconservation ont été évalué sur différents marqueurs de qualité spermatique notamment, la

viabilité spermatique avec les sondes SYBR14 / IP en Cytométrie de flux, la motilité avec le système CASA et enfin la peroxydation lipidique avec le TBARS en fluorimétrie.

### **2.2.1 Sexage et obtention des gamètes**

Cette deuxième partie de l'expérimentation a été faite également sur des tacons précoces (1+) sexuellement matures de saumon Atlantique. Les tacons 1+ (N=35) présentaient un poids et une longueur moyenne respectivement de  $42,30 \pm 10,91$  g et de  $16,20 \pm 1,45$  cm. Trente-cinq mâles ont été anesthésiés dans un bac de 50L avec 125 mg. L-1 de MS-222 pendant 10 minutes. Le sperme des individus a été poolé pour avoir cinq échantillons présentant un volume minimum de 1,6 mL, volume nécessaire à la bonne réalisation de l'expérimentation. Enfin, chaque échantillon a été aliquoté en 2 tubes analysés en laboratoire, dont l'un pour la semence fraîche et l'autre pour l'analyse post cryoconservation des différents marqueurs. Le second aliquot du sperme cryoconservé a été évalué 24h après cryoconservation.



**Figure 9:** Diagramme de flux de travail de la sélection des mâles, le sexage et la collecte du sperme avec les différents tests de qualité spermatique

### **2.2.2 Le dénombrement**

Les échantillons frais ont été dilués dans 1/10000 d'extender. La concentration spermatique a été ensuite évaluée à l'aide du microscope Zeiss montée sur une lame de comptage KOVA dans 10 petits carrés. Les concentrations obtenues étaient respectivement de  $21,5 \cdot 10^9$  ;  $20,9 \cdot 10^9$  ;  $39,8 \cdot 10^9$  ;  $49,4 \cdot 10^9$  et  $27,6 \cdot 10^9$  de spermatozoïdes/ ml de sperme respectif pour les cinq échantillons

### **2.2.3 Cryoconservation**

Afin d'obtenir la même concentration dans les paillettes pour les cinq échantillons et d'évaluer celle présentant les meilleurs paramètres de qualité après analyse, différents types de dilution ont été testées. Sur le sperme frais, des dilutions avec de l'extender dans un rapport de 1 :6 à 1 :50 en moyenne ont été testées sur chacun des échantillons afin d'obtenir dans les paillettes quatre concentrations de  $5 \cdot 10^9$ ,  $2,5 \cdot 10^9$ ,  $1,25 \cdot 10^9$ ,  $0,625 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ ml de sperme. La solution de dilution était composée de 200 mM de glucose, 40 mM de KCl, 30 mM de Tris (pH 8,0) et 10% de méthanol. Le sperme dilué a été ensuite chargé dans des paillettes de 0,5 ml (IMV technologies, France) à l'aide d'une seringue. L'extrémité non utilisée de chaque paillette a été plongée dans du polyvinyle pour être refermée. Les paillettes ont été ensuite placées sur un cadre en polystyrène de 3 cm de haut flottant à la surface de l'azote liquide et laissées à refroidir pendant 3 minutes. Après refroidissement, les paillettes ont été immergées directement dans l'azote liquide contenu dans le polystyrène pendant 10 minutes pour permettre une homogénéisation de la température avant le stockage final dans les canisters. Les échantillons de sperme congelés ont été stockés dans une cuve Arpège GT35 (Air Liquide). Une fois décongelée, la viabilité spermatique, en Cytométrie de flux, la motilité avec le système CASA et enfin la peroxydation lipidique avec le TBARS en fluorimétrie ont été évalués en réplicat sur chacune des 4 concentrations à savoir  $5 \cdot 10^9$ ,  $2,5 \cdot 10^9$ ,  $1,25 \cdot 10^9$ ,  $0,625 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ ml de sperme.

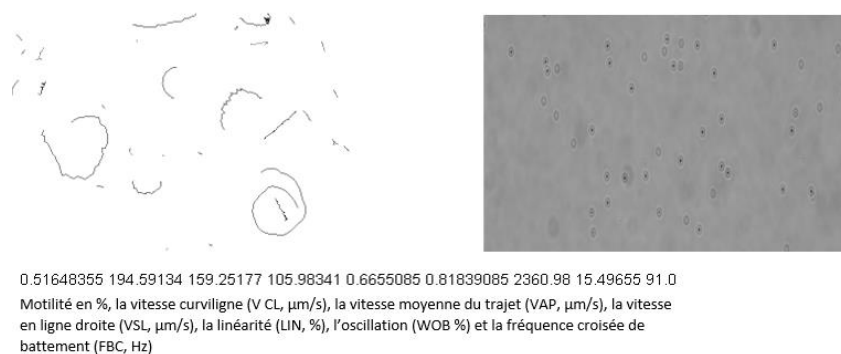
### **2.2.4 Viabilité spermatique**

Ce marqueur a été dosé suivant les recommandations du kit Invitrogen® Sperm Viability fournit par la société Thermo fisher scientific. Il contient une combinaison de deux fluorochromes : le SYBR 14 et l'iodure de propidium (*i.e.* IP). Les membranes plasmiques intactes sont perméables au SYBR® 14. Ce fluorochrome va s'insérer dans l'ADN des cellules saines et fonctionnelles (Cabrita et *al.*, 2008). Une fois excité à une longueur d'onde proche de 488 nm, il va fluorescer dans le vert à 516 nm. L'IP quant à lui s'intercale dans l'ADN

des cellules des membranes plasmiques altérées. Il possède la même longueur d'excitation que le SYBR 14, mais fluorera dans le rouge à 617 nm. Pour la préparation du SYBR 14 à 20 $\mu$ M, la solution mère a été diluée 50 fois. 2 $\mu$ l de cette dilution, ont été ajoutés dans 98 $\mu$ L d'Extender. Les concentrations de sperme diluées lors du dénombrement ont été directement utilisées. 250  $\mu$ L de chaque échantillon ont été prélevés. A cela, ont été ajoutés 1,25 $\mu$ l de SYBR 14 à 200 nM. Les échantillons ont été incubés pendant 6 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Une fois l'exposition achevée, 1,25 $\mu$ L d'IP à 12 $\mu$ M ont été ajoutés suivit directement de 250 $\mu$ L d'Extender afin de stopper l'exposition et de procéder au rinçage. Enfin, les tubes ont été passés au cytomètre en flux (BD FACSVerser) pour lecture, en respectant un délai de 2 minutes entre chaque tube. Chaque échantillon a été testé en duplicat.

### **2.2.5 Motilité des spermatozoïdes**

L'analyse assistée des spermatozoïdes par ordinateur (CASA) a été réalisée avec le système CASA SpermVision 3.5 (Mini-tube, Allemagne) du logiciel image J couplé à un microscope Olympus BX41 équipé d'un objectif de contraste de phase négatif avec une caméra JAI CV-A10CL (i.e. débit 60 images s<sup>-1</sup>). 2,7 $\mu$ l de sperme de chaque échantillon ont été dilués dans 1ml d'Actifish de IMV technologies. Ensuite, 2,7 $\mu$ l de la suspension spermatique ont été transférés dans une chambre de comptage cellulaire Leija de type Makler 8 puits de 20 $\mu$ m. Cette méthode de détection permet d'éviter que les spermatozoïdes ne se présentent les uns sous les autres. Les mesures de motilité sont effectuées dans les 10 s après l'activation. Le logiciel image J via le plugin CASA a permis d'analyser des séquences vidéo capturées de 2 s (120 images). La motilité des spermatozoïdes ainsi que différents paramètres de vitesse et de trajectoire ont ensuite été analysés : la vitesse curviligne (VCL,  $\mu$ m/s), la vitesse moyenne du trajet (VAP,  $\mu$ m/s), la vitesse en ligne droite (VSL,  $\mu$ m/s), la linéarité (LIN, %). L'analyse a été réalisée en triplicat dans chaque essai.



**Figure 10:**Évaluation de la motilité avec le logiciel image J

### **2.2.6 Peroxydation lipidique**

Le dosage du TBARS a été fait sur les cinq concentrations issues de la cryoconservation et en répliquat technique. L'analyse a mis en jeu l'utilisation du tampon de lyse de Figueroa et *al.*, (2018) avec détection en fluorimétrie. Après avoir décongelé le sperme cryoconservé au bain-marie à 40°C pendant 17secondes, la quantité de sperme correspondant à chaque échantillon a ensuite été prélevée soient 400µl, 800µl, 1600µl et 3200µl pour les concentrations respectives de 5.109 ; 2,5.109 ; 1,25.109 ; 0,625.109 spermatozoïdes/ml de sperme. Il a été ajouté 750 µl d'extender dans chaque tube pour un nettoyage. S'en est suivi une centrifugation à 5000G pendant 10mn à 4°C. Le surnageant a été retiré de chaque tube et le tampon de lyse de Figueroa a été ajouté dans une proportion de 200µl. Ensuite, des billes de 0,5 mm ont été incorporées dans les tubes et les tubes ont été soumis au Bullet blender storm 24 à puissance 12 pendant 1mn afin de broyer les cellules. Une fois la semence lysée, les tubes ont été centrifugés de nouveau pendant 30mn à 4°C à 12000G. 200µl de surnageant ont été récupérés dans un tube eppendof de 1,5ml. Puis, 600ml de la solution de TBARS ont été ajoutées dans les tubes contenant la semence et également dans les standards. Tous les échantillons sont passés au bain-marie à 95°C pendant 1heure. A la fin du traitement thermique, tous les échantillons ont été posés sur glace pendant 10 minutes. Après refroidissement, 200µl ont été prélevés et disposés sur une plaque noire pour la lecture en fluorimétrie à longueur d'onde 532nm.

### **2.3 Analyses statistiques des données**

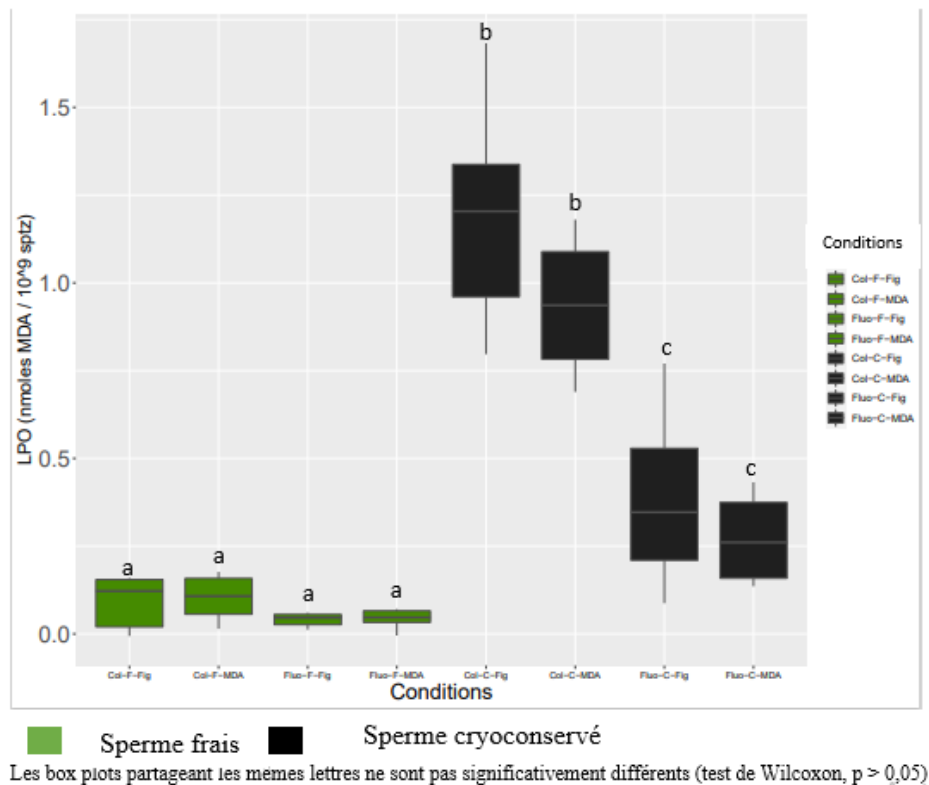
Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R Studio v1.4.1717 (RStudio). Les tests respectifs de Shapiro-Wilk et de Bartlett ont permis de vérifier la normalité et l'homogénéité des variances. En fonction de la normalité des données, différents tests statistiques ont été évalués. Lorsque les deux tests de base sont vérifiés, la comparaison des moyennes a été effectuée avec le test ANOVA suivie d'une comparaison post-hoc avec le test de Tukey en cas de différences significatives (valeur  $p < 0,05$ ). En cas de non normalité des données, les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis ont été réalisés avant le test post hoc de Wilcoxon-Whitney en cas de différences significatives (valeur  $p < 0,05$ ).



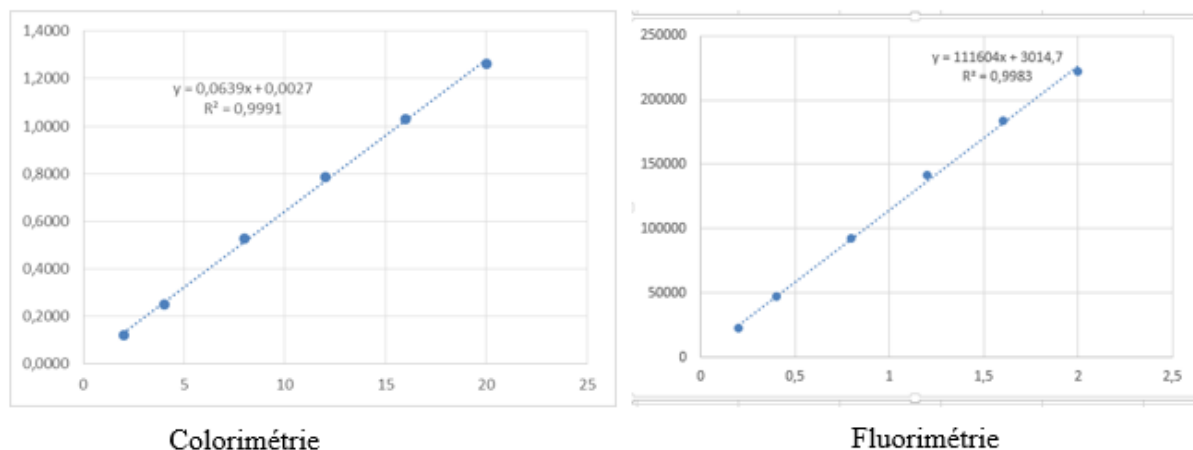
### 3 RESULTATS

#### 3.1 Phase 1 : Mise au point du marqueur de la LPO

La figure 11 présente les résultats de la peroxydation lipidique avant et après cryoconservation du sperme en fonction des différents tampons de lyse testés dans cette étude (i.e. Figueroa et MDA) en détection par fluorimétrie et par colorimétrie. On remarque que la cryoconservation entraîne une augmentation significative de la peroxydation lipidique dans toutes les conditions testées que ce soit par la méthode de détection ou par les tampons de lyse (test de Wilcoxon, p-value < 0,05). Le sperme frais utilisé aussi bien sur le tampon de lyse MDA par détection en fluorimétrie, ne présente aucune différence significative avec le tampon de lyse Figueroa (test de Wilcoxon, p-value = 0,8). De même, on n'observe aucune différence significative de la méthode de détection en colorimétrie avec les deux tampons de lyse sur le sperme frais (test de wilcoxon, p-value = 0,7). Il n'y a donc aucune différence significative du sperme frais sur toutes les conditions. Des droites de calibration relatives à la fluorimétrie et à la colorimétrie (Fig 12), le sperme cryoconservé présente un niveau de détection plus haut avec la colorimétrie qu'avec la fluorimétrie en fonction de la gamme de calibration. Toutefois, il n'y a aucun effet de la cryoconservation entre le tampon de lyse de Figueroa et MDA.



**Figure 11:** Box plot de la LPO sur le sperme avant et post cryoconservé en fonction des tampons de lyse et de la méthode de détection (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes)

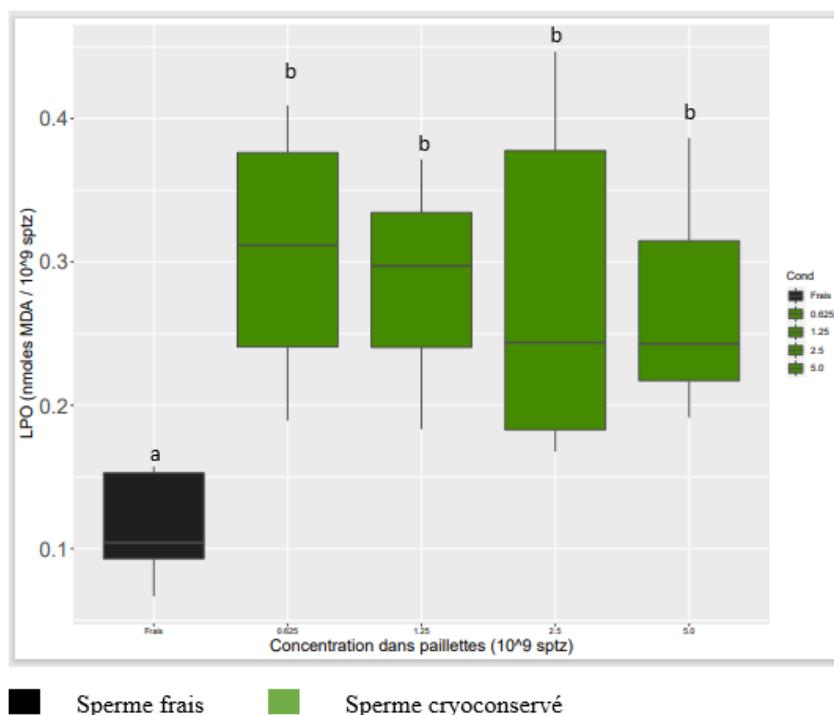


**Figure 12:** Droite de calibration de la LPO sur le sperme post cryoconservé en fonction des tampons de lyse et de la méthode de détection

### 3.2 Phase 2 : Optimisation de la concentration spermatique dans les paillettes de cryoconservation

#### 3.2.1 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

La figure 13 présente la peroxydation lipidique du sperme frais et du sperme cryoconservé à différentes concentrations. L'échantillon frais présente la plus faible concentration en LPO ( $0,11 \pm 0,07 \cdot 10^9$  nmoles de MDA /  $10^9$  spermatozoïdes) comparativement à toutes les autres conditions de sperme cryoconservé. La concentration de  $0,625 \cdot 10^9$  quant à elle, présente la plus grande valeur de concentration ( $0,30 \pm 0,1 \cdot 10^9$  nmoles de MDA /  $10^9$  spermatozoïdes) sans toutefois qu'il n'y ait de différence significative entre les quatre concentrations. Le sperme frais présente une plus grande variabilité avec le sperme cryoconservé de concentration  **$0,625 \cdot 10^9$**  (Anova, p-value=0,00554).

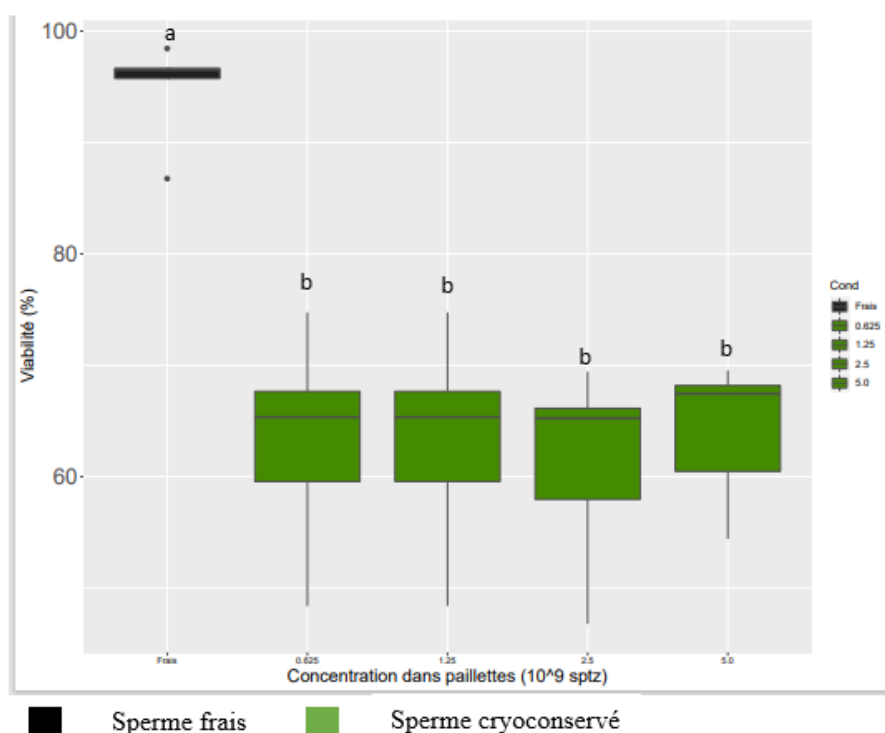


Les box plots ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différents (ANOVA,  $p < 0,05$ )

**Figure 13:** Box plot de la LPO sur le sperme frais et post cryoconservé à différentes concentrations dans les paillettes en fonction de la lyse Figuroa par détection en fluorimétrie (*i.e.* la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes).

### 3.2.2 Viabilité spermatique

La figure 14 illustre l'intégrité de la membrane plasmique (*i.e.* viabilité) du sperme frais et du sperme cryoconservé à différentes concentrations. On remarque une viabilité significativement plus élevée pour le sperme frais ( $94,82 \pm 4,61$  %) que dans toutes les différentes concentrations de sperme cryoconservé. La cryoconservation a eu un effet négatif sur toutes les conditions (test de rang de Wilcoxon,  $p$ -value  $< 0,05$ ). Il n'y a en revanche aucun effet de la concentration spermatique dans les paillettes sur la viabilité spermatique au seuil de 5%.



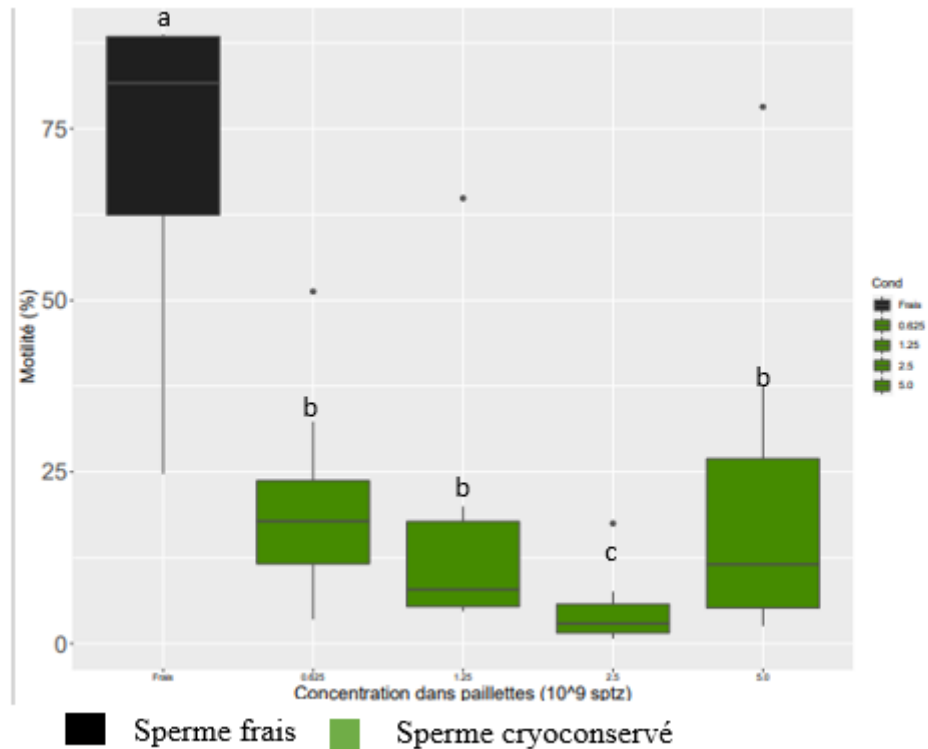
*Les box plots ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différents (test de rang de Wilcoxon,  $p < 0,05$ )*

**Figure 14:** Box plot de la viabilité spermatique du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes).

### **3.2.3 Différents paramètres de la motilité spermatique**

#### **3.2.3.1 Pourcentage de motilité**

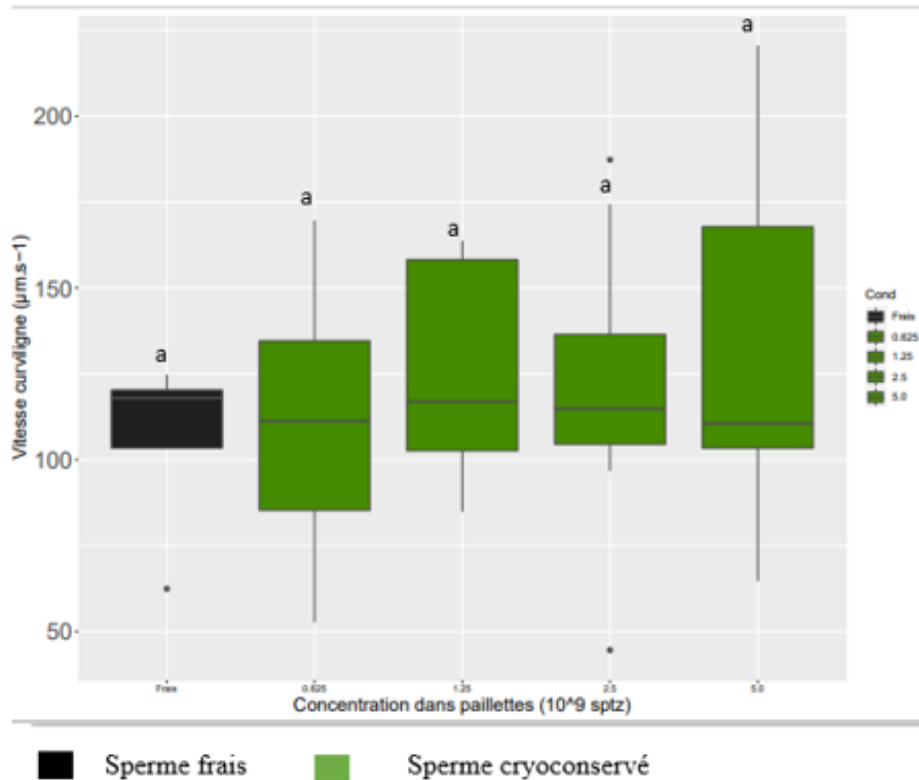
La figure 15 présente la motilité spermatique du sperme frais et du sperme cryoconservé à différentes concentrations dans les paillettes. La motilité des spermatozoïdes frais est significativement plus élevée ( $69,19 \pm 30,33$  %) que celles de toutes les concentrations dans les paillettes. (Test de rang de Wilcoxon,  $p$ -value  $< 0,05$ ). La concentration de  $2,5 \cdot 10^9$  présente une différence significative avec toutes les concentrations dans les paillettes  $0,625 \cdot 10^9$  ;  $1,25 \cdot 10^9$  et  $5 \cdot 10^9$  (Test de rang de Wilcoxon,  $p$ -value= $0,003$  et  $p=0,011$  et  $p=0,016$  respectivement).



Les box plots ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différents (Test de rang de Wilcoxon,  $p < 0,05$ )  
**Figure 15:** Box plot de la motilité spermatique du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes).

### 3.2.3.2 Vitesse curviligne (VCL)

La figure 16 illustre la vitesse curviligne du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations. La cryoconservation n'a eu aucun effet sur la VCL, quel que soit les concentrations testées (ANOVA,  $p$ -value = 0,75). On ne note aucune différence significative entre le sperme frais et le sperme post cryoconservé de toutes les conditions au seuil de 5%.

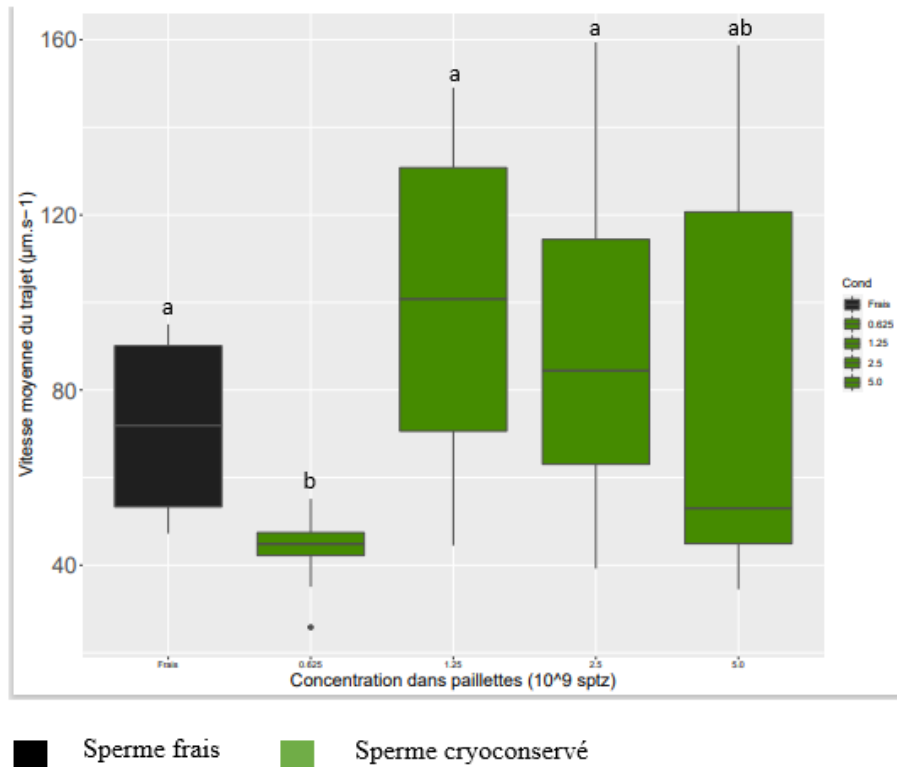


Les box plots ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différents (ANOVA,  $p < 0,05$ )

**Figure 16:** Box plot de la vitesse curviligne du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes).

### 3.2.3.3 Vitesse moyenne du trajet (VAP)

La figure 17 présente la vitesse moyenne du trajet du sperme frais et du sperme cryoconservé à différentes concentrations dans les paillettes. Le sperme frais présente une différence significative avec le sperme cryoconservé de concentration  $0,625 \cdot 10^9$  (Test de rang de Wilcoxon,  $p$ -value = 0,02), mais ne présente aucune différence significative avec les autres concentrations cryoconservées. La concentration de  $0,625 \cdot 10^9$  présente une différence significative avec les concentrations  $1,25 \cdot 10^9$  et  $2,5 \cdot 10^9$  (Test de rang de Wilcoxon,  $p$ -value=0,0014 et  $p= 0,0035$  respectivement). La concentration de  $5 \cdot 10^9$  n'a quant à elle aucune différence significative ni avec le sperme frais ni avec toutes les autres conditions au seuil de 5%.

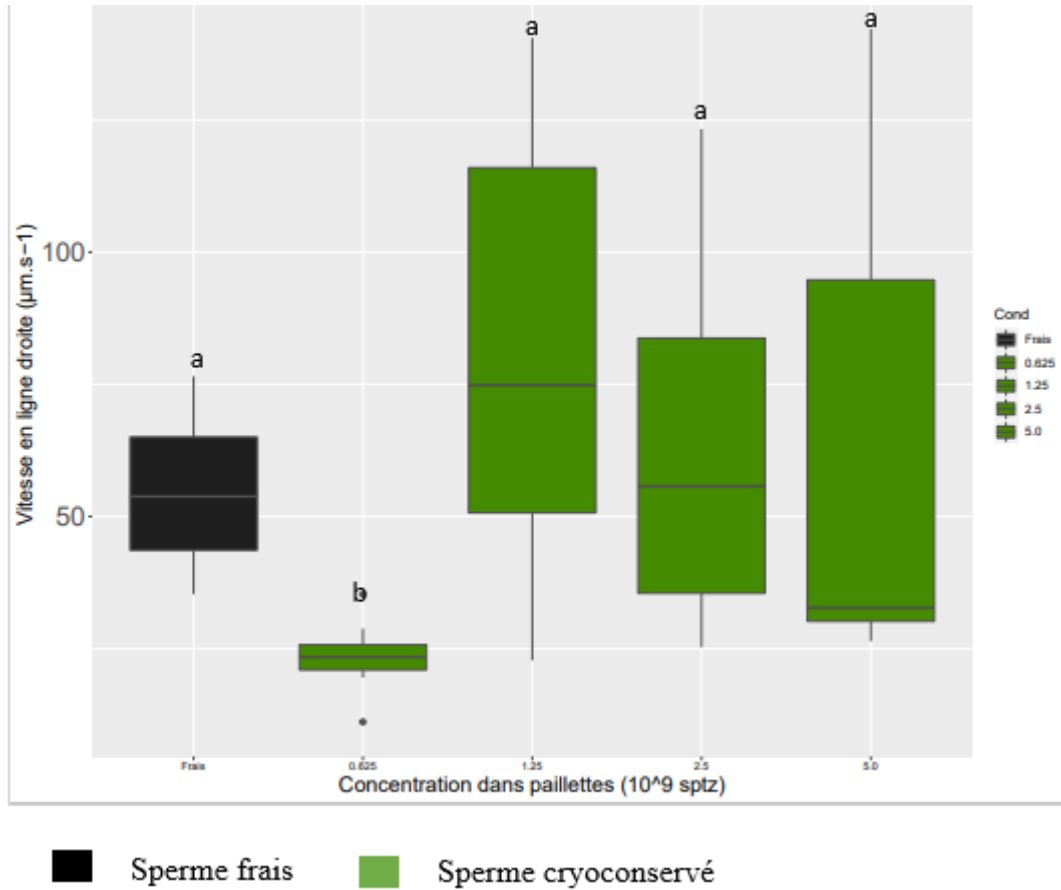


Les box plots ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différents (Test de rang de Wilcoxon,  $p < 0,05$ )

**Figure 17:** Box plot de la vitesse moyenne du trajet du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes)

#### 3.2.3.4 Vitesse en ligne droite (VSL)

La figure 18 présente la vitesse en ligne droite du sperme frais et du sperme cryoconservé à différentes concentrations dans les paillettes. Le sperme frais ne présente aucune différence significative avec les concentrations  $1,25 \cdot 10^9$  ;  $2,5 \cdot 10^9$  et  $5 \cdot 10^9$  mais par contre est significativement différent de la concentration  $0,625 \cdot 10^9$  (Test de rang de Wilcoxon,  $p$ -value = 0,002). La concentration  $0,625 \cdot 10^9$  présente une différence significative avec toutes les autres conditions testées en cryoconservation (Test de rang de Wilcoxon,  $p$ -value < 0,01). Les concentrations  $1,25 \cdot 10^9$  ;  $2,5 \cdot 10^9$  et  $5 \cdot 10^9$  ne présentent aucune différence significative entre elles au seuil de 5%.



Les box plots ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différents (Test de rang de Wilcoxon,  $p < 0,01$ )

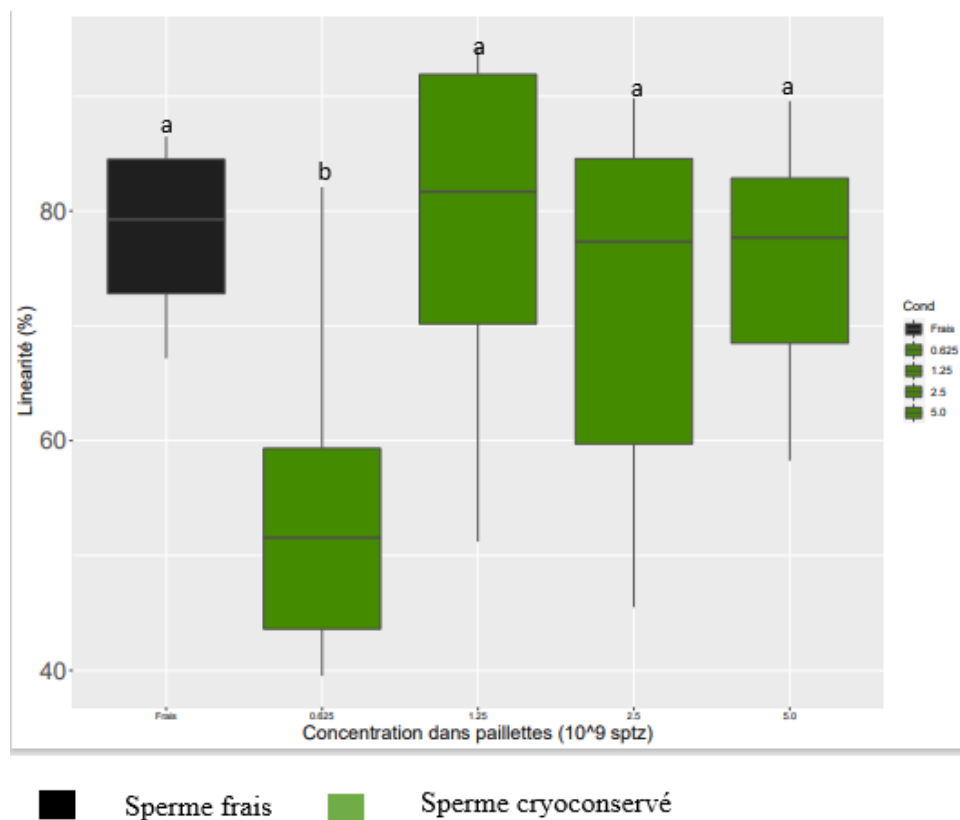
**Figure 18:** Box plot de la vitesse en ligne droite du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes).

### 3.2.3.5 Linéarité (LIN)

La figure 19 présente la linéarité du sperme frais et du sperme cryoconservé à différentes concentrations dans les paillettes. Le sperme frais ne présente aucune différence significative avec les concentrations  $1,25 \cdot 10^9$  ;  $2,5 \cdot 10^9$  et  $5 \cdot 10^9$  mais par contre est significativement différent de la concentration  $0,625 \cdot 10^9$  (Test de rang de Wilcoxon,  $p$ -value = 0,019). La concentration  $0,625 \cdot 10^9$  présente une différence significative avec toutes les autres conditions testées en



cryoconservation (Test de la somme des rangs de Wilcoxon,  $p$ -value  $< 0,05$ ). Les concentrations  $1,25 \cdot 10^9$  ;  $2,5 \cdot 10^9$  et  $5 \cdot 10^9$  ne sont pas significativement différentes entre elles au seuil de 5%.



*Les box plots ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différents (Test de la somme des rangs de Wilcoxon,  $p < 0,05$ )*

**Figure 19:** *Box plot de la linéarité du sperme frais et cryoconservé à différentes concentrations (i.e. la médiane, les premiers et troisièmes quartiles, et des valeurs extrêmes).*

## **4 Discussion**

Afin de permettre la restauration d'une population éteinte telle que celle du saumon Atlantique dans le bassin mosan, il est avant tout nécessaire de pouvoir s'appuyer sur une production d'organismes de repopulation. Pour cela, la mise en place d'une cryobanque spermatique présente de nombreux avantages. Toutefois, cette cryoconservation fragilise la qualité de ces spermatozoïdes entraînant non seulement une augmentation du stress oxydatif mais aussi une réduction des paramètres liés à la motilité et à toute la membrane plasmique (Pini *et al.*, 2018). Dans notre étude, il a été question de mettre au point un marqueur sensible et reproductible d'évaluation du stress oxydatif notamment la peroxydation lipidique. La seconde étape de ce travail a consisté à normaliser le protocole de cryoconservation en établissant une concentration optimale de sperme dans les paillettes. Afin d'évaluer ce paramètre, la qualité du sperme frais et cryoconservé a été évaluée à l'aide d'une batterie de biomarqueurs déjà utilisés à l'UNamur mais également du marqueur de qualité spermatique optimisé préalablement.

### **Effet des tampons de lyse et de la méthode de détection sur la qualité du sperme frais et cryoconservé**

Dans notre étude, l'utilisation de la peroxydation lipidique comme marqueur de qualité spermatique chez le saumon atlantique s'est révélée suffisamment sensible pour identifier un effet délétère de la cryoconservation. En effet, cette dernière a entraîné une augmentation du niveau de MDA comparativement au sperme frais. Cette observation permet de valider la peroxydation lipidique comme un marqueur d'évaluation de la cryoconservation. Ses résultats concordent avec l'étude de Figueroa *et al.*, (2018) qui ont observé chez le saumon atlantique adulte, un effet marqué de la peroxydation lipidique après cryoconservation. Ces résultats sont aussi en adéquation avec ceux de Sandoval-Vargas *et al.*, (2020) qui, dans leur étude sur l'évaluation de l'effet du stress oxydatif chez le saumon coho après cryoconservation du sperme ont observé une augmentation du niveau de MDA post cryoconservation.. Les résultats démontrent également que l'action de tampon de lyse proposé dans l'étude de Figueroa est identique à celui présent dans le kit de MDA qu'ils soient utilisés sur le sperme frais ou le sperme cryoconservé. Cette observation vient valider aussi bien l'efficacité de ces deux tampons. De même, les méthodes de détection (*i.e.* fluorimétrie vs colorimétrie) ont permis d'identifier sur le sperme frais des niveaux semblables de peroxydation lipidique. Elles ont également permis d'identifier toutes deux un effet de la cryoconservation. Avec les données

dont nous avons disposé lors de cette expérimentation, des valeurs plus importantes ont été obtenues avec la méthode de colorimétrie qu'en fluorimétrie. Toutefois, il est important de noter que les valeurs obtenues sur nos échantillons se trouvaient dans la gamme basse de la colorimétrie alors qu'en fluorimétrie, la détection au centre de notre gamme. En vue de ces résultats sur le saumon précoce, il semble donc préférable, d'effectuer la détection en fluorimétrie plutôt qu'en colorimétrie car, elle offre une détection beaucoup plus précise. Yagi, (1976) recommande également pour l'évaluation de la peroxydation lipidique par l'adduct MDA-TBARS, la méthode de détection par fluorimétrie, car elle permet non seulement d'évaluer les petits volumes d'échantillon mais aussi présente une sensibilité 10 fois inférieure à la méthode de détection en absorbance. Dans cette étude, le tampon de lyse présent dans le kit MDA constitue un point limitant majeur à cause de sa faible quantité et du prix élevé du kit en lui-même. Le tampon de lyse proposé dans l'étude de Figueroa quant à lui présente une facilité de mise en application et a révélé son efficacité dans cette étude. De ces différents résultats obtenus, le choix du tampon de lyse a été porté sur celui de Figueroa pour une détection en fluorimétrie.

### **Effet de la cryoconservation sur la qualité spermatique dans les différentes concentrations dans les paillettes**

La peroxydation lipidique nous a permis d'observer un effet de la cryoconservation entre le sperme frais et les différentes concentrations spermatiques testées dans les paillettes. Toutefois, nous n'avons pas observé d'effet de la dilution dans les paillettes sur la peroxydation lipidique. Pourtant, Cabrita et *al.*, (2011) démontre que, la dilution du sperme dans de l'extender, diminue l'effet de barrière protectrice antioxydante qu'offre le plasma séminal. Cette diminution augmente le stress oxydatif. Donc, plus on dilue le sperme plus il est exposé au stress oxydatif. Cela suppose donc que la sensibilité du test LPO n'est soit pas suffisante pour identifier un effet entre les concentrations spermatiques dans les paillettes. Le fort taux de dilution individuel au sein des échantillons que présente la concentration de  $0,625 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ ml de sperme par rapport à toutes les autres conditions, pourrait donc expliquer l'effet marqué de la peroxydation lipidique à ce niveau. Il est important de connaître le nombre de spermatozoïdes morts et vivants pour garantir la pérennisation de la descendance. Dans notre étude, la viabilité est de 94,82% pour le sperme frais contre 61,65% pour le sperme cryoconservé dans les paillettes. La cryoconservation a également impacté négativement cette intégrité plasmatique

des spermatozoïdes. Nous ne notons en revanche aucun effet de la concentration spermatique dans les paillettes sur la survie spermatique post-cryoconservation. Il est plus judicieux lorsque la quantité de sperme à cryoconservé est importante, d'opter pour l'utilisation de la concentration la plus importante afin de limiter le stockage des paillettes dans les cuves lors de la cryoconservation. Selon Pini et *al.*, (2018), la cryoconservation réduit la viabilité des spermatozoïdes et crée également des dommages sublétaux aux cellules. Cette hypothèse est soutenue par Perez-Cerezales et *al.*, (2010), qui dans leur étude sur la truite arc en ciel malgré l'ajout de cryoprotectant après cryoconservation, la viabilité s'est vu réduite de plus de 50%. Nos résultats paraissent plus élevés que ceux obtenus par Perez-Cerezales et *al.*, (2010) et moins important que ceux de Figueroa et *al.*, (2016) sur le saumon atlantique où la viabilité observé étaient de 75%. Une telle différence a été observée par Sandoval-Vargas et *al.*, (2020) dans son étude sur *Oncorhynchus kisutch* où il explique que la mort des spermatozoïdes étaient en partie due à l'augmentation de la peroxydation lipidique dans le sperme cryoconservé. Dans notre cas, la peroxydation lipidique a été augmentée dans toutes les concentrations dans les paillettes. L'évaluation de la motilité est un facteur crucial pour la reproduction artificielle, car elle est un critère essentiel de la qualité spermatique. Dans notre étude, le pourcentage de motilité le plus faible a été observé dans la concentration de  $2,5 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml de sperme qui a subi en moyenne un taux de dilution moins important que la concentration de  $0,625 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml de sperme. Malgré la variabilité de cette dilution, de toutes les conditions testées dans les paillettes aucune n'est comparable au frais. Nos résultats concordent avec ceux de (Labbe, 2013) qui stipule qu'il existe une forte variation de la motilité lors de la décongélation et qu'elle pouvait être dépendante des espèces. Il poursuit en disant que x, que le faible taux de motilité observé pouvait être causé par cette décongélation. Ainsi, la motilité est relativement faible et qu'elle varie de 10- 20 % à la décongélation. Nos résultats sont contraires avec ceux de Billard, (1984) dans son livre sur la conservation des gamètes, où il explique que la motilité du sperme diminue à mesure où le taux de dilution est élevé car la concentration à  $2,5 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml de sperme s'est révélée moins intéressante que celle de  $0,625 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml de sperme qui pourtant a été la plus diluée. Judycka et *al.*, (2018) , soutient également que le pourcentage de motilité est fonction des espèces de salmonidés. De leurs expériences effectuées sur l'amélioration du protocole de cryoconservation des spermatozoïdes de salmonidés, ils ont retenu que chez le saumon atlantique, dans les paillettes de 0,5ml, que la motilité la plus élevée est obtenue avec des concentrations de sperme variant de  $1,5 - 4 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml de sperme. Nynca et *al.*, (2017) quant à eux, ont obtenu des résultats plus bas pour la truite arc-en-ciel avec des

concentrations de  $0,5-1,0 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml de sperme. Dans notre cas la motilité la plus élevée dans les paillettes a été obtenue avec la concentration de  $5 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml de sperme. De l'étude ci, la cryoconservation a impacté les autres paramètres de motilité. La vitesse curviligne, la vitesse du trajet, la vitesse en ligne droite et la linéarité se sont vu augmenter comparativement à l'échantillon frais dans toutes les conditions sauf dans la concentration de  $0,625 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml de sperme ou la VAP, la VSL et la linéarité ont diminué comparativement au sperme frais. Cette variation de résultats obtenus pourrait s'expliquer par l'hypothèse selon laquelle les individus collectés pour constituer la concentration présentait des caractéristiques variées. Dans notre étude, afin d'obtenir la quantité de sperme nécessaire à cette expérimentation, le sperme de plusieurs individus ont été poolés pour reconstituer des échantillons. Ce poolage d'individus a probablement impacté l'échantillonnage, ce qui aurait généré une variabilité non plus individuelle mais dans la population. Rurangwa et al., (2004), dans leur étude sur la mesure de la motilité des spermatozoïdes et des facteurs pouvant affecter la qualité du sperme chez les poissons d'élevage ont suggéré qu'il était important de maîtriser la qualité spermatique d'un mâle avant de le pooler avec un autre mâle. Ce qui n'avait pas été le cas dans l'étude. Nos résultats contrastent avec ceux de Nynca et al., (2016) qui ont obtenu des valeurs plus élevées pour les spermatozoïdes cryoconservés par rapport aux spermatozoïdes frais sur la VCL ; la VAP et la linéarité. Figueroa et al., (2016) quant à eux, ont constaté une diminution significative de la VCL, de la VSL et de la VAP dans le sperme après cryoconservation du saumon de l'Atlantique. Cette observation n'a été faite que sur la concentration la plus faible dans notre cas. Selon Judycka et al., 2019, ces différences de résultats peuvent être associées à plusieurs facteurs dont l'utilisation de différents systèmes CASA et de différents protocoles. Dans notre étude, puisque la qualité des spermatozoïdes des mâles utilisés n'était pas préalablement maîtrisée et compte tenu du peu de sperme disposé, il avait été question de constituer des pools de plusieurs individus afin de reconstituer des échantillons. La raison du recours à cette technique est due à une défaillance enregistrée dans le circuit de température d'élevage. Cette défaillance a augmenté la température dans le bassin d'élevage, ce qui a inhibé la spermatogenèse chez les tacons car, n'étant pas en période de frai naturel, la spermatogenèse était induite par la modification des facteurs environnementaux dont une stimulation de photopériode naturelle et de température. Ce poolage associé à la grande variation de taux de dilution du sperme frais par rapport aux autres concentrations dans les paillettes pourraient justifier la différence significative obtenues avec les autres concentrations dans les paillettes au niveau de la VAP, la VSL et la linéarité. Selon Maise, (1998), les variations individuelles et zootechniques peuvent influencer l'effet de

la cryoconservation sur ce sperme. La cryoconservation n'a pas impacté les paramètres de motilité mise à part le pourcentage de motilité pour toutes les concentrations spermatisques dans les paillettes sauf celle de  $0,625 \cdot 10^9$  qui est la concentration la plus faible. Afin de maintenir une bonne VCL, VAP et linéarité, les concentrations de  $5 \cdot 10^9$  ;  $2,5 \cdot 10^9$  et  $1,25 \cdot 10^9$  peuvent être utilisées car la VCL est un déterminant majeur du succès de la fécondation (Butts et al., 2010). (Billard, 1997) dans son étude sur la cryoconservation de la semence du Tubot a montré que la plupart des espèces compte tenues des caractéristiques de leur sperme pouvaient ne pas supporter la cryoconservation. Ciereszko et al., (2011), est venu attester en stipulant que cette une grande variabilité des espèces à supporter la cryoconservation de leur sperme pouvait provenir de la composition des constituants du plasma du plasma séminal ce qui pourrait engendrer les différences liées de qualité post cryoconservation observées

Les cryodommages occasionnés par la cryoconservation sur la membrane peuvent affecter la qualité spermatisque. Toutefois, aucun effet sur la peroxydation lipidique et la viabilité n'a été observé, en revanche un bon pourcentage de motilité a été observé avec la concentration  $2,5 \cdot 10^9$ . Pour ce qui en est des paramètres de vitesse et de trajectoire, la concentration de  $0,625 \cdot 10^9$  a révélé de bons résultats Les concentrations  $5 \cdot 10^9$  et  $1,25 \cdot 10^9$  n'ont pas présenté d'effet négatif de cryoconservation sur la qualité du sperme. Il serait donc envisageable dans le but d'une optimisation de la cryoconservation spermatisque chez le saumon atlantique précoce dans les paillettes de préférer des concentrations finales de  $5 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ ml de sperme et de  $1,25 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ ml de sperme de concentrations finale dans les paillettes.

## **5 Conclusion et perspectives**

Cette étude a montré tout son intérêt car elle a permis de valider la peroxydation lipidique comme marqueur d'évaluation de la cryoconservation spermatique chez le saumon atlantique précoce. Afin de limiter les dommages occasionnés par cette cryoconservation, sur les spermatozoïdes, il serait intéressant d'évaluer aussi stress oxydatif que pourront engendrer les protéines car elles sont aussi présentes en quantité dans le liquide séminal. De toutes les concentrations spermatiques évaluées dans les paillettes, les concentrations de  $5.10^9$  spermatozoïdes/ ml de sperme et de  $1,25.10^9$  spermatozoïdes/ mL de sperme semblent être celles présentant la meilleure qualité spermatique. Il serait aussi intéressant d'évaluer le succès de reproduction de ces différentes concentrations pour être plus précis dans les résultats obtenus.

## **6 Références bibliographiques**

- Agarwal, N. 2011.** « Cryopreservation of Fish Semen. » In , 104-27.  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1215.7209/1>.
- Almodovar, ´ A., Leal, S., Nicola, G.G., Horreo, ´ J.L., García-Vazquez, E., Elvira, B., 2020.** Long-term stocking practices threaten the original genetic diversity of the southernmost European populations of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Endanger. Species Res.* 41, 303–317.
- Baglinière, J.L., Thibault, M., et Dumas, J. (1990).** Réintroductions et soutiens de populations du Saumon atlantique (*Salmo salar* L.) en France. *Revue d'écologie (Terre Vie), Suppl.*, 5, 299- 323.
- Bailey, J.K., Saunders, R.L., and Buzeta, M.I. 1980.** Influence of parental smolt age and sea age on growth and smolting of hatch ery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 1379–1386
- Bardonnet, A., et Baglinière, J.L. (2000).** Freshwater habitat of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(2), 497-506.
- Benitez, J.P., Erraud, A., Dierckx, A., Antipine, S., Renardy, S., Nzau Matondo, B., Kestemont, P., et Ovidio, M. (2020).** Rapport final annuel 2020 au Service Public de Wallonie (DGARNE/DNF-SP) de la Subvention 2019-2020 relative au suivi scientifique de la réhabilitation du saumon atlantique dans le bassin de la Meuse. Université de Liège et Université de Namur, 137 p.
- Bensettiti, F., et Gaudillat, V. (2004).** Espèce 1106, *Salmo salar*. 189-192. In *Cahiers d'habitats Natura 2000. Connaissance et gestion des habitats et des espèces d'intérêt communautaire. Tome 7 : Espèces animales.* La Documentation française, 353 p.
- Billard R., Breton B., Jalabert B., Escraffre A. M., Solari A. (1971).** La production spermatogénétique chez la truite. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 11 (2) : 199-212



**Billard R., Dupont J.**, 1975. Etudes sur la congélation du sperme de poissons marins (bar, daurade, turbot). C. R. Activité CNEXO, 15 pp

**Billard, Roland.** 1984. *L'Aquaculture du bar et des Sparidés*. Editions Quae.

**Bogevik, André S., Edward S. Hayman, Målfrid T. Bjerke, Jens-Erik Dessen, Kjell-Arne Rørvik, et J. Adam Luckenbach.** 2020. « Phospholipid and LC-PUFA Metabolism in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Testes during Sexual Maturation ». *PLOS ONE* 15 (5): e0233322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233322>.

**Boeuf G.** (1994) La phase de préadaptation à la vie en mer: la smoltification. Le Saumon Atlantique, Guéguen J & Prouzet P (Édit.) Ifremer. p 47-63.

**BRATANOV C., DIKOV V.**, 1961. Certaines particularités du sperme chez les poissons. 4e Congr. int. Reprod. anim., La Haye, 895-897.

Butts, I. A. E., M. K. Litvak, V. Kaspar, et E. A. Trippel. 2010. « Cryopreservation of Atlantic Cod *Gadus Morhua* L. Spermatozoa: Effects of Extender Composition and Freezing Rate on Sperm Motility, Velocity and Morphology ». *Cryobiology* 61 (2): 174-81. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.07.001>.

**Cabrita, E., Anel, L. & Herráez, M. P. (2001).** Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology* 56, 623–635.

**Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., & Herráez, M. P. (2005).** Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50(2), 144-153.

**Cabrita, E., C. Sarasquete, S. Martínez-Páramo, V. Robles, J. Beirão, S. Pérez-**

- Carpentier, P., et R. BILLARD.** 1978. « Conservation à court terme des gamètes de Salmonidés à des températures voisines de 0 °C ». *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique* 18 (4): 1083-88. <https://doi.org/10.1051/rnd:19780550>.
- Caron, F., P. M. Fontaine, and V. Cauchon.** 2003. État des stocks de saumon au Québec en 2005. Page 20 in D. d. 1. r. s. 1. faune, editor. Ressources naturelles et faune.
- Cerezales, et M. P. Herráez.** 2010. « Cryopreservation of Fish Sperm: Applications and Perspectives ». *Journal of Applied Ichthyology* 26 (5): 623-35. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>.
- Ciereszko A, Dabrowski K, Toth GP, Christ SA, Glogowski J.** Factors affecting motility characteristics and fertilizing ability of sea lamprey Spermatozoa. *Trans Am Fish Soc* 2002;131:193e202
- Cillard, Josiane, et Pierre Cillard.** 2006. « Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations ». *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 13 (1): 24-29. <https://doi.org/10.1051/ocl.2006.6666>.
- Decuadro-Hansen, G.** 2004. « La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal ». *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 32 (10): 887-93. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2004.09.003>.
- Descroix, Aurélie.** 2009. « Croissance et régime alimentaire des juvéniles de Saumon atlantique (*Salmo salar* L.) dans la rivière Allier ». Theses, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00725306>.
- Duston, J, T Astatkie, et P F MacIsaac.** 2005. « Genetic influence of parr versus anadromous sires on the life histories of Atlantic salmon (*Salmo salar*) ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62 (9): 2067-75. <https://doi.org/10.1139/f05-120>.
- Dziewulska, K., A. Rzemieniecki, R. Czerniawski, and J. Domagala.** 2011. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon *Salmo salar* L. sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. *Theriogenology* 76:300–311

**Erraud, A., Kestemont, P., Mandiki, R., Ovidio, M., Antipine, S., Neus, Y., Dierckx, A., Benitez, J.P.** (2019). Le retour du saumon atlantique dans le bassin Mosan. *Projet Saumon Meuse*. Namur & Liège, Wallonie: SPW.

**Erraud Alexandre , Bonnard Marc , Cornet Valerie , Ammar Imen Ben , Antipine Sascha , Peignot Quentin , Lambert Jérôme , Mandiki Syaghalirwa , Kestemont Patrick,** How age, captivity and cryopreservation affect sperm quality and reproductive efficiency in precocious Atlantic salmon (*Salmo salar* L. 1758), *Aquaculture* 544 (2021) 737047

**Figuroa, E., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Merino, O., Valdebenito, I. & Isachenko, V.** (2013). Sperm vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture* 372–375, 119–126.

**Figuroa, C. A., Dumorne, K., Castillo, R. L. & Farias, J. G.** (2015a). Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Reviews in Aquaculture*. doi:10.1111/raq.12105/abstract **Figuroa, E., Merino, O., Risopatrón, J., Isachenko, V., Sánchez, R., Effer, B., Isachenko, E., Farias, J. G. & Valdebenito, I.** (2015b). Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology* 83, 238–245.

**Figuroa, E., Valdebenito, I. & Farias, J. G.** (2016). Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research* 47, 1691–1705. doi: 10.1111/are.12630

**Figuroa, E., I. Valdebenito, O. Merino, A. Ubilla, J. Risopatrón, et J. G. Farias.** 2016. « Cryopreservation of Atlantic Salmon *Salmo Salar* Sperm: Effects on Sperm Physiology ». *Journal of Fish Biology* 89 (3): 1537-50. <https://doi.org/10.1111/jfb.13052>.

**Figuroa. E , Fariasc J.G , M. Lee-Estevezc , I. Valdebenitoa , J. Risopatrónf , C. Magnottig , J. Romerob , I. Watanabee , R.P.S. Oliveira** Sperm cryopreservation with supplementation of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture* 493 (2018) 1–8

**FONTAINE, MAURICE.** 1950. « BIOLOGIE du Saumon atlantique ». *Hommes et mondes* 13 (53): 547-59.

**Guéguen, J.C., et Prouzet, P.** (1994). Le saumon atlantique. Plouzané: IFREMER, 330 p  
**Jean-Claude, AMIARD, et AMIARD-TRIQUET Claude.** 2008. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques.* Lavoisier.

« **Jonathan\_Cote\_decembre2004.pdf** ». s. d. Consulté le 14 juin 2021.  
[http://semaphore.uqar.ca/id/eprint/273/1/Jonathan\\_Cote\\_decembre2004.pdf](http://semaphore.uqar.ca/id/eprint/273/1/Jonathan_Cote_decembre2004.pdf).

**Klemetsen, A., Amundsen, P. A., Dempson, J. B., Jonsson, B., Jonsson N., O'connell, M. F., et Mortensen, E.** (2003). Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), brown trout (*Salmo trutta* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of freshwater fish*, 12(1), 1-59

**Kottelat, M., et Freyhof, J.** (2007). Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin, 646 p.

**Labbe, Catherine.** 2013. « Spécificités de la cryoconservation des ressources génétiques chez les espèces aquacoles ». *STAL. Sciences et techniques de l'animal de laboratoire* 39 (janvier): 67-69.

**Lahnsteiner, F., Weismann, T., & Patzner, R. A.** (2000). A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta* f. *fario* L., *Salmo trutta* f. *lacustris* L., *Coregonus* sp. *Aquaculture Research*, 26(11), 801-807.

**McCORMICK, S. D.** (2012). Smolt physiology and endocrinology. In *Fish physiology* (Vol. 32, pp. 199-251). Academic Press

**Maise, G., Catherine Labbe, B. Baulny, S. Calvi, et Pierrick Haffray.** 1998. « Fish sperm and embryos cryopreservation ». *Productions Animales* 11 (janvier): 57-65.

**Maise, Gérard, Catherine Labbe, Bénédicte Baulny, Sylvia Calvi, et Pierrick Haffray.** 1998. « Cryoconservation du sperme et des embryons de poissons ». *INRAE*

*Productions Animales* 11 (février). <https://doi.org/10.20870/productions-animales.1998.11.1.3916>.

**Martínez-Páramo, S., P. Diogo, J. Beirão, M. T. Dinis, et E. Cabrita.** 2012. « Sperm Lipid Peroxidation Is Correlated with Differences in Sperm Quality during the Reproductive Season in Precocious European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) Males ». *Aquaculture* 358-359 (août): 246-52. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.010>.

**Martínez-Páramo, S., Diogo, P., Dinis, M.T., Herráez, M.P., Sarasquete, C., Cabrita, E.,** 2012. Incorporation of ascorbic acid and a-tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved seabass sperm. *Theriogenology* 77, 1129–1136

**Malbrouck, C., Micha J-C., et Philippart, J.-C.** (2007). La réintroduction du saumon atlantique dans le bassin de la Meuse : synthèse et résultats. Ministère de la Région wallonne, [environnement.wallon.be/publi/education/saumon](http://environnement.wallon.be/publi/education/saumon) 2000, 25 p.

**Mocq, Julien.** 2013. « Modélisation floue de l’habitat du saumon atlantique *Salmo salar*. » Phd, Québec: Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique. <http://espace.inrs.ca/id/eprint/2076/>.

**Muus, B.J., et Nielsen, J.G.** (1999). *Die Meeresfische Europas in Nordsee, Ostsee und Atlantik*. Stuttgart (Kosmos-Naturführer), 336 p.

**Nynca, J., S. Judycka, E. Liszewska, S. Dobosz, M. Krzyś, et A. Ciereszko.** 2021. « Effect of Double Freezing Fish Semen on Sperm Motility and Fertility ». *Aquaculture* 530 (janvier): 735782. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735782>.

**Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Beirão, J., Herráez, M.P.,** 2010. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology* 74, 282–289.

**Philippart, J.C.** (2005). *Le voyage périlleux des poissons grands migrateurs dans la Meuse*. APAMLg asbl, Liège, 56 p.

**Philippart, J.C., Ovidio, M., et Poncin, P.** (2016). Le suivi des populations de poissons après rempoissonnements. Cas du saumon atlantique et du barbeau fluviatile. *Forêt.Nature*, 141, 32-39.

« **plagepomi bzh 2013-2017\_extrait saumon.pdf** ». s. d. Consulté le 15 juin 2021.  
[https://www.observatoire-poissons-migrateurs-bretagne.fr/images/pdf/Actions\\_Cadre-de-gestion/plagepomi%20bzh%202013-2017\\_extrait%20saumon.pdf](https://www.observatoire-poissons-migrateurs-bretagne.fr/images/pdf/Actions_Cadre-de-gestion/plagepomi%20bzh%202013-2017_extrait%20saumon.pdf).

« **RevuedEcologie\_1990\_SUP5\_299.pdf** ». s. d. Consulté le 19 mai 2021.  
[http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/54627/RevuedEcologie\\_1990\\_SUP5\\_299.pdf;sequence=1](http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/54627/RevuedEcologie_1990_SUP5_299.pdf;sequence=1).

**Renardy, S., Benitez, J.-P., Tauzin, A., Dierckx, A., Nzau Matondo, B., Ovidio, M.** 1, 2020. How and where to pass ? Atlantic salmon smolt ' s behaviour at a hydropower station offering multiple migration routes. *Hydrobiologia* 847, 469–485

**Rochard, E., et Elie, P.** (1994). La macrofaune aquatique de l'estuaire de la Gironde. Contribution au livre blanc de l'Agence de l'Eau Adour Garonne. État des connaissances sur l'estuaire de la Gironde. Bordeaux, France: Agence de l'Eau Adour-Garonne, 115 p.

**Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., & Nash, J. P.** (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234(1-4), 1-28.

**Sandoval-Vargas, Leydy, Kelly Dumorné, Pablo Contreras, Jorge Farias, Elias Figueroa, Jennie Risopatron, et Iván Valdebenito.** 2020. « Cryopreservation of coho salmon sperm (*Oncorhynchus kisutch*): Effect on sperm function, oxidative stress and fertilizing capacity ». *Aquaculture* 533 (novembre): 736151.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736151>.

« **synthese-bibliographique\_saumon\_fdppma35-lebrech-2009.pdf** ». s. d. Consulté le 10 mai 2021.  
[https://www.observatoire-poissons-migrateurs-bretagne.fr/images/pdf/Saumon/synthese-bibliographique\\_saumon\\_fdppma35-lebrech-2009.pdf](https://www.observatoire-poissons-migrateurs-bretagne.fr/images/pdf/Saumon/synthese-bibliographique_saumon_fdppma35-lebrech-2009.pdf).

- Sánchez, R., Isachenko, E., Figueroa, E., Valdebenito, I., Isachenko, V., 2011. Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. Anim. Reprod. Sci. 124, 125–131.**
- Sánchez-Rodríguez, M., & Billard, R. (1977).** Conservation de la motilité et du pouvoir fécondant du sperme de truite arc-en-ciel maintenu à des températures voisines de 0 C. Bulletin Français de Pisciculture, (265), 143-152.
- Schmidt, G.W., 1996.** Wiedereinbürgerung des Lachses *Salmo salar* L. In Nordrhein-Westfalen: Allgemeine Biologie des Lachses sowie Konzeption und Stand des Wiedereinbürgerungsprogramms unter besonderer Berücksichtigung der Sieg. Schriftenr. der Landesanstalt für Ökologie, Bodenordnung und Forsten / Landesamt für Agrarordnung Nordrhein-Westfalen 11: 1-194.
- Shaliutina A. (2013).** Fish sperm motility parameters and total proteins profiles in seminal plasma during in vivo and in vitro storage. Thèse de Doctorat, Faculté des poisons et de la protection des eaux, Université du Sud Bohemie, République Czech. 96p.
- Thibier M, Guérin B.** Les biotechnologies de la reproduction et amélioration sanitaire du troupeau. Reproduction des ruminants Numéro spécial 1991;167(No 3/4):249–58.
- Trus-Cott, B., Idler, D., Hoyle, R., Freeman, H., 1968. Sub-zero preservation of Atlantic salmon sperm. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 25, 363–372.
- Valiente, A.G., Juanes, F., Garcia-Vazquez, E., 2005.** Reproductive strategies explain genetic diversity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Environ. Biol. Fishes 74, 323–334.

Sites web:

- 1- [https://www.researchgate.net/figure/Routes-de-migration-et-zones-dengraissement-des-populations-mondiales-de-saumon\\_fig8\\_321304227](https://www.researchgate.net/figure/Routes-de-migration-et-zones-dengraissement-des-populations-mondiales-de-saumon_fig8_321304227).
- 2- [www.saumon-rhin.com](http://www.saumon-rhin.com) <https://www.bing.com/images/search>