



HAL
open science

Étude de l'impact de trois conditions d'élevage du poisson zèbre et mise au point d'une méthode de congélation de sa semence dans l'optique de réaliser une analyse comparative entre le niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de poisson zèbre et d'étalon après congélation/décongélation

Pierre Milon

► **To cite this version:**

Pierre Milon. Étude de l'impact de trois conditions d'élevage du poisson zèbre et mise au point d'une méthode de congélation de sa semence dans l'optique de réaliser une analyse comparative entre le niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de poisson zèbre et d'étalon après congélation/décongélation. Sciences agricoles. 2013. dumas-00941937

HAL Id: dumas-00941937

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00941937>

Submitted on 4 Feb 2014

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

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



AGROCAMPUS OUEST
CFR Rennes
65, Rue de Saint Briec
35042, Rennes cedex



LPGP (Laboratoire de
Physiologie et Génomique des
poissons)
Campus de Beaulieu
Avenue du Général Leclerc
35042, Rennes Cedex

Mémoire de Fin d'Etudes

**Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques,
Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage**

Année universitaire : 2012-2013

Spécialité : Productions Animales

Spécialisation ou option : Ingénierie Zootechnique

**Étude de l'impact de trois conditions d'élevage du poisson zèbre et mise au point d'une
méthode de congélation de sa semence, dans l'optique de réaliser une analyse
comparative entre le niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de poisson
zèbre et d'étalon après congélation/décongélation.**

Par : Pierre MILON



Volet à renseigner par l'enseignant responsable de la spécialisation/option
ou son représentant

Date : .../.../... Signature

Bon pour dépôt (version définitive)

Autorisation de diffusion : Oui Non

Devant le jury :

Soutenu à Rennes le : 16/09/2013

Sous la présidence de : Catherine DISENHAUS

Maître de stage : Catherine LABBE

Co-encadrement : Michèle MAGISTRINI

Enseignant référent : Frédéric LECERF

Autres membres du jury (Nom, Qualité) : Vanessa LOLLIVIER, rapporteur.

*"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle
d'AGROCAMPUS OUEST".*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Mme Catherine LABBE pour son accueil au sein du centre INRA LPGP de Rennes ainsi que pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ce stage. Je la remercie particulièrement pour le temps qu'elle m'a consacré afin de répondre à l'ensemble de mes interrogations.

Je remercie également Mme Michèle MAGISTRINI, qui a co-encadré ce stage, pour son accueil au sein du centre INRA PRC de Nouzilly. Elle m'a permis d'obtenir des échantillons de sperme d'étalon et a apporté un avis éclairé sur le sujet. Je remercie également son assistante Isabelle COUTY pour son aide lors de la congélation de la semence équine.

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe Cryoconservation et Régénération : Pierre-Yves LE BAIL, Nathalie CHENAIS, Alexandra DEPINCE, Léa JORRET, Jonathan BECCIU et Charlène LABESSE, de m'avoir accueilli parmi eux.

Un grand merci aux animaliers du centre INRA LPGP de Rennes : Fred BOREL, Jean Luc THOMAS, Cécile DURET et plus particulièrement Amélie PATINOTE, responsable des poissons zèbres.

Merci également à l'ensemble de l'équipe de l'unité expérimentale équine de l'INRA de Nouzilly: Messieurs Jean-Marie YVON, Yvan GAUDE, Fabrice REIGNET, Philippe BARRIERE, Thierry BLARD, Thierry GASCONNE et François STIEAU qui assurent la gestion des étalons et de la jumenterie.

Je remercie également, l'ensemble des autres stagiaires et doctorants pour leur bonne humeur : Fernanda, Zuzka, Aurélien, Aurélie, Nina, Anne Sophie, Yoann, Bastien, Faysale, Anaïs, Maud, Jérémy, Claire, Martin...

Enfin je remercie le directeur de l'unité INRA LPGP, Patrick PRUNET, de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	1
II. STRATEGIE EXPERIMENTALE	5
III. MATERIELS ET METHODES	6
III.1. Alimentation des poissons et évaluation de son impact sur leur développement et leurs capacités reproductrices	6
III.2. Obtention des gamètes.....	7
III.2.1. Chez le poisson zèbre	7
III.2.2. Chez l'étalon.....	7
III.3. Comptage et évaluation de la qualité de la semence	8
III.3.1. Comptage des spermatozoïdes	8
III.3.2. Évaluation de la qualité de la semence.....	8
III.4. Congélation du sperme	9
III.4.1. Congélation du sperme de poisson zèbre	9
III.4.2. Congélation du sperme de cheval.....	10
III.5. Extraction et quantification de l'ADN des spermatozoïdes	11
III.5.1. Méthode d'extraction de l'ADN des spermatozoïdes.....	11
III.5.2. Quantification de l'ADN extrait : deux méthodes complémentaires.....	11
III.6. Analyse du niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes par la méthode des enzymes de restriction.....	12
III.6.1. Principe de la méthode des enzymes de restriction	12
III.6.2. Évaluation du niveau de méthylation de l'ADN sur gel d'agarose	12
III.7. Analyses statistiques.....	13
IV. RESULTATS.....	13
IV.1. Mise au point d'une méthode de congélation chez le poisson zèbre.....	13
IV.1.1. Impact de l'alimentation sur le poids, la taille et les capacités reproductrices des poissons	13
IV.1.2. Congélation de la semence de poisson zèbre	14
IV.2. Analyse du niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes après congélation/décongélation.....	15
IV.2.1. Validation de la méthode des enzymes de restriction	15
IV.2.2. Impact de la cryoconservation sur le niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de poisson zèbre	16

IV.2.3. Échec de la méthode des enzymes de restriction pour l'ADN des spermatozoïdes d'étalon	16
V. DISCUSSION	17
VI. CONCLUSION GENERALE.....	19
VII. BIBLIOGRAPHIE	21

LISTE DES ANNEXES

Annexe I: Protocole de collecte des gamètes des poissons zèbres par stripping	I
Annexe II: Protocole de récupération du sperme testiculaire chez le poisson zèbre par dissection.....	V
Annexe III: Protocole de congélation du sperme de poisson zèbre	IX
Annexe IV: Protocole de congélation de la semence équine	XIV
Annexe V: Protocole de la méthode des enzymes de restriction pour l'analyse du niveau de méthylation d'ADN de spermatozoïde	XVI

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ARN: Acide Ribonucléique.

BSA: (Bovine Serum Albumin) Albumine Sérique Bovine.

DMSO : Diméthylsulfoxyde, cryoprotecteur.

DMA : Diméthylacétamide, cryoprotecteur.

HBSS : Hank's balanced salt solution, solution à 300mOsmol/kg pour conserver le sperme de poisson zèbre.

IA : Insémination Artificielle.

HpaII : enzyme de restriction ayant pour substrat les sites 5'-CCGG-3' non méthylés.

INRA96®: milieu de conservation de la semence équine fraîche produit et commercialisé par la société IMV Technologie.

INRA-Freeze® : milieu de congélation de la semence équine produit et commercialisé par la société IMV Technologie.

LDL: Low Density Lipoprotein, molécule membranaire amphiphile.

MeOH : Méthanol.

MspI : enzyme de restriction ayant pour substrat tous les sites 5'-CCGG-3'.

RNase : Ribonucléase, nucléase catalysant la dégradation des ARN.

SYSAAF : Syndicat des Sélectionneurs Avicoles Aquacoles Français.

I. INTRODUCTION

Intérêts de la cryoconservation de la semence pour les animaux de rente.

La cryoconservation de la semence est une biotechnologie très utilisée dans la gestion de la reproduction des espèces de rente et est en plein développement pour les espèces utilisées à des fins de recherche agronomique ou médicale. La congélation de la semence a deux objectifs principaux. D'une part, elle permet la conservation des génotypes des espèces d'intérêt au sein de cryoconservatoire. D'autre part, la manipulation de semence congelée facilite la gestion de la reproduction en élevage et permet d'augmenter le coefficient de diffusion des mâles. La conservation *in situ* des géniteurs est souvent abandonnée en raison de son coût trop élevé. L'élimination des animaux entraîne une perte de patrimoine génétique et une diminution de la diversité au sein des espèces. La cryoconservation de la semence y pallie et constitue en outre une sécurité contre les risques de dérive génétique lors des reproductions successives, et contre les risques de pertes accidentelles de cheptels complets (épizootie, accidents structurels). Elle est un outil majeur pour les schémas de sélection en permettant de conserver un nombre important de patrimoines génétiques à faible coût tout en préservant une diversité génétique intra-espèce. La conservation *ex-situ* des géniteurs autorise un retour en arrière pour aller chercher un caractère d'intérêt agronomique ou éliminer un caractère indésirable. La congélation du sperme présente également un intérêt sanitaire non négligeable en éliminant tout contact entre les reproducteurs. Elle permet l'éradication progressive de la plupart des maladies vénériennes en effectuant des contrôles sanitaires stricts sur les mâles.

Intérêts agro économique de la cryoconservation de la semence chez le cheval et le poisson.

Notre réflexion s'est intéressée à deux grands groupes d'animaux d'élevages pour lesquels le recours à la cryoconservation du sperme est en plein essor, malgré des contextes agronomiques et des contraintes biologiques très différentes ; les poissons et les équidés. Les besoins en semence congelée chez les espèces aquacoles sont récents et correspondent à la mise en place des programmes de sélection génétique dont les premiers datent seulement d'une vingtaine d'années. Pour autant, la production mondiale aquacole a augmenté de 25% en 5 ans pour atteindre 63.6 millions de tonne en 2011 (Chiffres FAO, 2012) et l'aquaculture est en passe de devenir une production de protéines majeure pour l'alimentation humaine à l'échelle mondiale. Aujourd'hui, 80% des entreprises de sélection aquacoles françaises (17 sur 22 adhérents au SYSAAF) utilisent la cryoconservation du sperme pour sécuriser leurs schémas de sélection, même si encore très peu d'écloseries utilisent le sperme cryoconservé en routine pour diminuer les effectifs des cheptels mâles. En élevage de production, la reproduction se fait à partir de « néo-mâles », ce sont des femelles qui ont reçu un traitement à base d'androgène afin de développer des testicules et une spermatogenèse. Les spermatozoïdes issus de ces « néo-mâles » portent tous le chromosome X comme chromosome sexuel. Ils seront à l'origine d'alevins femelles. L'intérêt de produire exclusivement des femelles en élevage de production est économique. Chez de nombreuses espèces, les femelles ont des meilleures performances de production puisqu'elles atteignent leur maturité sexuelle plus tardivement que les mâles. Ces « néo-mâles » ne développent pas de canal déférent, ce qui nécessite l'abattage de l'animal pour récupérer les gamètes. Par la

Type de monte	Nombre de saillies	Pourcentage de chaque type de monte
IA congelée	7 705	9.2%
IA fraîche	24923	30%
IA réfrigérée immédiate	18 603	22.2%
IA réfrigérée sur place	1 911	2.3%
IA réfrigérée transportée	4 409	5.3%
Monte naturelle	51 156	61%

Tableau 1 : Répartition des types de montes en France pour l'ensemble des races équinnes (les Haras Nationaux, 2012).

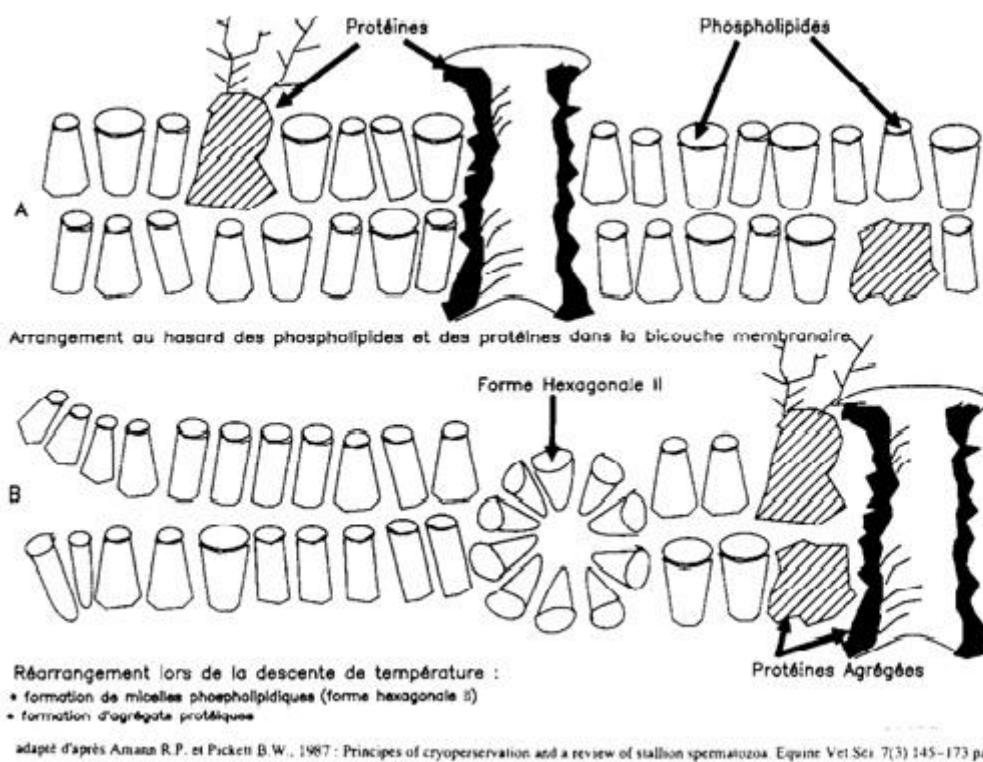


Figure 1 : Réarrangement des composants membranaires lors de la descente de température (Amann R.P. *et al.*, 1987).

congélation de la semence, chaque lignée de « néo-mâle » peut être conservée. Au sein de l'espèce équine, la cryoconservation de la semence est entrée dans les pratiques d'élevage depuis plus de 30 ans. Les Haras Nationaux ont commencé à utiliser l'insémination artificielle de semence congelée en 1985, même si la première gestation issue d'insémination artificielle de semence congelée a été rapportée par Baker et Grandier en 1957 (Pillet, 2009). Aujourd'hui, l'utilisation de la semence congelée en insémination artificielle représente 9% (Tableau 1) des techniques de reproduction chez les équidés.

Domages infligés par la cryoconservation de la semence.

La cryoconservation du sperme n'est pas sans impact sur la qualité de la semence. Au cours du processus de congélation/décongélation, des traumatismes vont être infligés aux spermatozoïdes. Lors du refroidissement en dessous des températures physiologiques, les spermatozoïdes subissent le « cold shock » ou « choc froid » se traduisant par des fuites de matériel intracellulaires et des pertes de fonctionnalité telle que la mobilité. Le mécanisme en cause est lié au fait que la diminution de température induit un changement de phase des phospholipides membranaires (John *et al.*, 1992) (Figure 1), responsable de remaniement membranaires délétères. Ces remaniements miment les réorganisations membranaires liées au phénomène de capacitation chez les mammifères et peuvent donc provoquer une mort cellulaire prématurée (Cormier *et al.*, 1997). Nous observons également lors de la descente de température la formation de cristaux de glace en premier lieu dans le milieu extracellulaire très riche en agents nucléants. L'augmentation de la concentration en ions dans l'eau extracellulaire non cristallisée crée un gradient osmotique au niveau de la membrane plasmique contribuant à une fuite d'eau de la cellule vers le milieu extracellulaire. Ce phénomène est appelé « freeze-deshydratation » (Mazur, 1984). Le volume cellulaire est ainsi modifié, entraînant un stress mécanique sur la membrane plasmique qui s'ajoute au stress osmotique lié à l'augmentation locale des concentrations en ions. L'apparition de glace intracellulaire est susceptible de créer un stress mécanique supplémentaire, souvent lié à la taille et la forme des cristaux. Les cristaux en aiguille sont les plus dommageables. Les mitochondries, à l'origine de la production d'ATP, qui assurent un apport d'énergie aux spermatozoïdes sont également affectées par la congélation/décongélation du fait de ces stress mécaniques et osmotiques.

Utilisation de dilueurs pour congeler la semence : un moyen de protéger la cellule.

Le milieu de congélation joue un rôle majeur dans la protection des fonctions cellulaires des spermatozoïdes. Un milieu de dilution dans lequel la semence est conservée à basse température doit répondre à un certain nombre de critères. Le pH et la pression osmotique du milieu doivent être proches de ceux du plasma séminal. Le milieu de dilution doit contenir des éléments nutritifs, et des éléments cryoprotecteurs pour limiter les dommages cellulaires lors de la congélation. Il faut considérer deux types de cryoprotecteurs, les perméants et les non perméants (Pillet, 2009). Les cryoprotecteurs perméants ou cryoprotecteurs internes sont ceux

Espèces	Cryoprotecteurs	Technique de congélation	Sperme : dilution moyenne	Références
Poisson chat nord africain	10% DMSO/ 10% jaune d'œufs	Chute de température par étape	1 : 1	Rurangwa et <i>al.</i> , 2001
Poisson chat européen	10% Méthanol	Chute de température par étape	1 : 200	Vivieros et <i>al.</i> , 2000
Striped trumpeter	2.84 M DMSO/ 10% jaune d'œufs	Au dessus des vapeurs d'azote liquide	1 : 5	Ritar et <i>al.</i> , 2000
Saumon	12.5% DMSO	Sur neige carbonique	1 : 3	Mounib, 1978
Saumon	10% DMSO	Sur neige carbonique	1 : 5	Gwo et <i>al.</i> , 1999
Brochet	15% DMSO	Sur neige carbonique	1 : 3	Babiak et <i>al.</i> , 2003
Chevesne	10% DMSO/ 0.5% glycine	Au dessus des vapeurs d'azote liquide	1 : 7	Lahnsteiner et <i>al.</i> , 2000
Truite arc-en-ciel	10% DMSO/ 10% jaune d'œufs	Sur neige carbonique	1 : 3	Billard, 1983
Poisson zèbre	10% Méthanol/ 15% de lait en poudre	Sur neige carbonique	1 : 5	Harvey et <i>al.</i> , 1982
Poisson zèbre	8% Méthanol	Chute de température par étape (-10°C/min)	1 : 5	Yang H. et <i>al.</i> , 2007

Tableau 2 : Méthodes de congélation chez plusieurs espèces de poisson (Berghmans et *al.*, 2004).

qui peuvent traverser la membrane plasmique. Ainsi, ils peuvent assurer une protection au niveau intra et extra cellulaire. Le glycérol est le cryoprotecteur perméant le plus utilisé en congélation de semence équine et le méthanol ou le DMSO sont ceux majoritairement utilisés pour la congélation de la semence de poisson. Les cryoprotecteurs non perméants, les sucres (lactose, saccharose) ou les additifs protéiques et lipidiques (lait écrémé, liposomes, jaune d'œuf) sont ceux qui ne peuvent entrer dans la cellule. Ils agissent seulement au niveau extracellulaire selon des mécanismes souvent difficiles à caractériser. En espèce équine, différentes méthodes de congélation existent. En France, les Haras Nationaux et certains haras privés utilisent principalement la méthode mise au point à l'INRA en collaboration avec les Haras Nationaux (Palmer, 1984 ; modifiée par Vidament *et al.*, 2000). Cette méthode définit le rapport sperme/dilueur, la méthode de refroidissement, la méthode de congélation et la nature du milieu de congélation. Récemment, Elodie PILLET a mis au point deux nouveaux milieux de congélation au cours de sa thèse de 2007 à 2009. Il a été démontré que le milieu INRA96 supplémenté de jaune d'œuf et de glycérol peut être utilisé pour congeler la semence et qu'il permet d'améliorer la fertilité par cycle (PILLET *et al.*, 2008) ; de plus, il a été également montré que le plasma de jaune d'œuf, contenant en particulier les LDL, peut remplacer le jaune d'œuf entier dans le milieu de congélation (milieu INRA-Freeze : 69% de fertilité par cycle). Il existe un nombre important de méthodes de congélation chez les poissons qui divergent selon les espèces et selon les auteurs (Tableau 2). Chez le poisson zèbre par exemple, l'utilisation de méthanol dans les milieux de congélation permet une protection des spermatozoïdes satisfaisante. Harvey *et al.*, obtiennent 43±12.3% (méthanol 10%) de spermatozoïdes mobiles après décongélation et Yang *et al.*, en obtiennent 35±15% (méthanol 8%). L'ajout de saccharose dans le milieu de congélation apporte souvent une protection supplémentaire. Cela permet de stabiliser la membrane plasmique des spermatozoïdes lors de la diminution de température (Sun *et al.*, 1996). La qualité du sperme de certaines espèces de poisson à la décongélation est faible, notamment chez les salmonidés et les cyprinidés. Elle est compensée par un ratio spermatozoïdes/ovocytes élevé au moment de la fécondation.

Altérations épigénétiques éventuelles dues à la cryoconservation de la semence.

L'ensemble de ces manipulations non naturelles de la semence posent une question majeure sur l'impact de la cryoconservation de la semence sur l'ADN des spermatozoïdes et par conséquent sur la descendance. Même si un spermatozoïde est fécondant après congélation/décongélation, son ADN a pu être altéré ce qui peut affecter le développement embryonnaire. L'ADN peut subir deux principaux types de traumatismes à l'origine de soucis de développement embryonnaire : soit une cassure de la molécule d'ADN, soit des altérations épigénétiques. Les cassures de l'ADN sont plus ou moins importantes sur le sperme chez les poissons (Labbé *et al.*, 2001 ; Pérez-Cerezales *et al.*, 2010) et leurs conséquences sur l'embryon difficiles à caractériser à cause des systèmes de réparation de l'ADN par l'ovocyte (Pérez-Cerezales *et al.*, 2010). Ainsi, aucun effet de la congélation sur le développement n'a été observé chez la truite arc-en-ciel (Labbé *et al.*, 2001 ; Pérez-Cerezales *et al.*, 2010). En revanche, Hayes *et al.* (2005) remarquent une réponse au stress différente (mesurée par le

niveau de cortisol dans l'eau) entre des alevins de truite arc-en-ciel issus de semence fraîche et des alevins issus de semence congelée. Des altérations sont également observées sur des larves de loche (Kopeika *et al.*, 2003) et de carpe (Horvath *et al.*, 2007) issues de sperme congelé. Chez les mammifères aucun travail ne rapporte un effet direct de la cryoconservation de la semence sur le développement embryonnaire. Pourtant, il est parfaitement connu qu'un ADN fragmenté altèrera le développement embryonnaire précoce (Speyer *et al.*, 2010) et que la congélation induit une fragilisation de l'ADN. Si les cassures de la molécule d'ADN sont beaucoup étudiées nous ne sommes qu'au début des travaux concernant les altérations épigénétiques. L'épigénétique a été définie dans les années 1950 par Waddington comme étant un phénotype héréditaire stable résultant de changements au niveau d'un chromosome sans altération de la séquence d'ADN. Aujourd'hui l'épigénétique est définie comme étant l'ensemble des mécanismes qui assurent l'expression du génome (Holliday, 2006), même si la définition de l'épigénétique reste le sujet de débats fiévreux entre spécialistes. En pratique, la régulation épigénétique du génome est une modification de la chromatine, héritable au cours des divisions cellulaires, et parfois même maintenue lors de la méiose, ce qui confère un caractère trans-générationnel à certaines modifications. Les principales modifications de la chromatine concernent la méthylation (et l'hydroxyméthylation) de l'ADN et la modification post-traductionnelle des histones. Par l'épigénétique, un génome peut donner plusieurs phénotypes, car les gènes concernés par les modifications épigénétiques afficheront un état répressifs ou au contraire permissifs vis-à-vis de leur expression. Dans le contexte de la congélation du sperme, nous nous sommes intéressés ici au niveau de méthylation de l'ADN plutôt qu'aux modifications post-traductionnelles des histones car, après la fécondation, la majeure partie des histones et des protamines du sperme sont remplacés par des protéines embryonnaires. On peut donc penser que des altérations des histones auront moins d'impact sur l'embryon que des modifications de la méthylation de l'ADN. En outre, les cryoprotecteurs utilisés ont des potentiels chimiques forts, et le DMSO par exemple a été décrit comme ayant un réel pouvoir hyperméthylant (Kawai *et al.*, 2010). Certaines études laissent penser que les marques épigénétiques portées par la chromatine du sperme sont importantes ultérieurement lors du développement embryonnaire. Ainsi, chez le poisson zèbre, Wu *et al.* (2011) ont décrit que plusieurs gènes impliqués dans le développement précoce de l'embryon sont hypométhylés au stade spermatozoïde. L'hypométhylation étant un état permissif de la chromatine, on peut faire l'hypothèse que les gènes activés précocement sont déjà prêts à recevoir les signaux d'activation dès le stade spermatozoïde. Ces observations nous questionnent sur l'impact de biotechnologies telles que la cryoconservation sur ces marques épigénétiques, et sur les conséquences pour le développement embryonnaire.

Objectifs de l'étude

Notre réflexion s'est intéressée à l'étude de deux espèces chez lesquelles la cryoconservation du sperme est globalement maîtrisée mais les stratégies de reproduction et la biologie de leurs spermatozoïdes sont très différentes ; un mammifère, le cheval ayant une fécondation interne et un cyprinidé, le poisson zèbre produisant des spermatozoïdes dépourvus d'acrosome avec une fécondation externe. Le poisson zèbre est un organisme modèle très utilisé en laboratoire,

notamment parce qu'il atteint sa maturité sexuelle rapidement, à 3 mois, que ses embryons transparents facilitent les études de développement précoce, et qu'il est capable de régénérer des parties du corps blessées. L'ADN des spermatozoïdes d'étalon est très condensé du fait de la présence de nombreuses protamines. Inversement, celui des spermatozoïdes de poisson zèbre est peu condensé. La transmission fidèle du patrimoine épigénétique est d'importance capitale pour ces deux espèces même si les objectifs d'élevage sont différents. La semence d'un étalon de haute valeur génétique coûte chère. Elle doit permettre de produire des poulains ayant le potentiel de performance voulu par l'éleveur. Le poisson zèbre est très utilisé en transgénèse, les manipulateurs doivent connaître précisément leurs transgènes et les niveaux d'expressions des gènes doivent être fidèlement transmis à la descendance. La finalité du présent travail est d'explorer l'impact de la cryoconservation sur les altérations épigénétiques chez ces deux espèces. Nous nous sommes focalisés essentiellement sur l'évaluation du niveau de méthylation de l'ADN de spermatozoïde après congélation/décongélation.

II. STRATEGIE EXPERIMENTALE

Afin d'étudier l'impact de la cryoconservation du sperme chez le cheval et le poisson zèbre sur la méthylation de l'ADN, il était important de disposer de méthodes de congélation optimisées sur lesquelles les analyses pouvaient porter. Le protocole de congélation de la semence équine mis au point à l'INRA de Nouzilly (Pillet, 2009) a permis de standardiser la méthode. Il utilise un dilueur de composition connu et défini, le milieu INRA-Freeze® (IMV-Technologies, France). L'INRA-Freeze® est à base de plasma de jaune d'œuf (Pillet *et al.*, 2011). Il permet d'obtenir une fertilité par cycle de 69% alors qu'elle n'est que de 60% avec du jaune d'œuf ($p > 0.05$). En revanche, même si la congélation du sperme de poisson zèbre a fait l'objet de plusieurs publications (Harvey *et al.*, 1982 ; Ransom *et al.*, 1999 ; Morris *et al.*, 2003 ; Berghmans *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2009 ; Hagedorn *et al.*, 2009), les méthodes et dilueurs sont difficiles à comparer. Le préalable à l'étude des dommages épigénétiques était donc de s'approprier une méthode de congélation de sperme de poisson zèbre et de l'optimiser. Ce besoin fait aussi écho à la nécessité de mettre en place une procédure en routine au laboratoire à des fins de conservation des lignées transgéniques produites.

Le poisson zèbre est un modèle d'étude difficile car la production spermatique est très faible (1-2 μ l) et aléatoire. De même l'obtention d'œufs en qualité et en quantité suffisantes est difficile. Il a été montré (Yang *et al.*, 2007) chez le poisson zèbre que des mâles ayant un index gonadosomatique ($IGS = (\text{Poids testiculaire}/\text{Poids vif}) \times 100$) élevé ($IGS = 2.32 \pm 0.6\%$) présentent une fertilité supérieure ($p < 0.05$) après décongélation de la semence que des mâles ayant un index gonadosomatique faible ($0.93 \pm 0.09\%$). Donc dans un premier temps, nous avons cherché à optimiser les conditions d'élevage des géniteurs, afin d'obtenir les animaux les plus aptes à produire des gamètes de qualité. Le paramètre sur lequel il nous a paru le plus important de jouer a été l'alimentation. Un premier volet du présent travail a donc été

d'étudier l'impact de l'alimentation des géniteurs sur leurs capacités reproductrices, pour optimiser l'obtention de sperme et d'œufs de qualité. L'objectif était de déterminer le régime alimentaire pour lequel les performances de développement et de reproduction étaient les meilleures. Cette étude n'est en aucun cas une analyse nutritionnelle. C'est une évaluation de trois conditions d'élevage différentes. Une étude nutritionnelle aurait imposé que nous puissions mesurer de façon précise la quantité d'aliment ingérée par le poisson et les répercussions sur ses performances de développement et de reproduction. La mesure du poids vif, du poids testiculaire et de la taille nous ont permis d'apprécier l'impact de l'alimentation sur le développement des poissons.

Le succès de cette expérimentation de l'impact de l'aliment sur les capacités reproductrices des poissons zèbres a permis de travailler avec du sperme éjaculé, et non pas seulement du sperme testiculaire, car la production spermatique est plus fiable et de meilleure qualité. Nous avons mis au point une méthode de congélation en partant du protocole de Yang *et al.* (2007) qui était le plus prometteur en terme de qualité des résultats. Nous avons adapté ce protocole à nos conditions en re-testant certains composants des dilueurs de congélation. Ainsi, nous avons testé deux cryoprotecteurs, le méthanol et le DMA, et évalué l'impact d'un ajout de saccharose dans le milieu. Nous avons en outre exploré différentes vitesses de descente en température.

La mise au point d'un protocole de congélation adapté à nos conditions de laboratoire nous a permis de développer les analyses du niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes à la décongélation. Travail initié par Marie Conradt (Mémoire de fin d'études de Master 2 BAPSA, 2012) qui a montré que la congélation du sperme de poisson zèbre a pour effet une augmentation significative de la méthylation ($p < 0.05$). Seulement son étude portait sur des effectifs trop faibles ($n=6$) qui ne permettaient pas de conclure de façon fiable sur la réalité biologique des observations, et la procédure de cryoconservation de la semence n'avait pas été complètement optimisée.

La finalité de ce travail étant de réaliser une étude comparative du niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes à la décongélation entre deux espèces : le poisson et le cheval. L'analyse du niveau de méthylation a été développée en parallèle sur le sperme équin. Les protocoles d'extraction de l'ADN et de digestion par enzyme de restriction ont été difficiles à adapter au sperme d'étalon. Plusieurs expériences ont été réalisées dans le but de circonvier aux problèmes de l'ADN très dégradé après l'extraction, et des enzymes de restrictions qui ne le digéraient pas.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Alimentation des poissons et évaluation de son impact sur leur développement et leurs capacités reproductrices

Les poissons zèbres (*Danio rerio*) sont issus de l'élevage expérimental de l'unité LPGP sur le centre INRA de Rennes. Ils sont maintenus en circuits fermés à 28°C sous photopériode

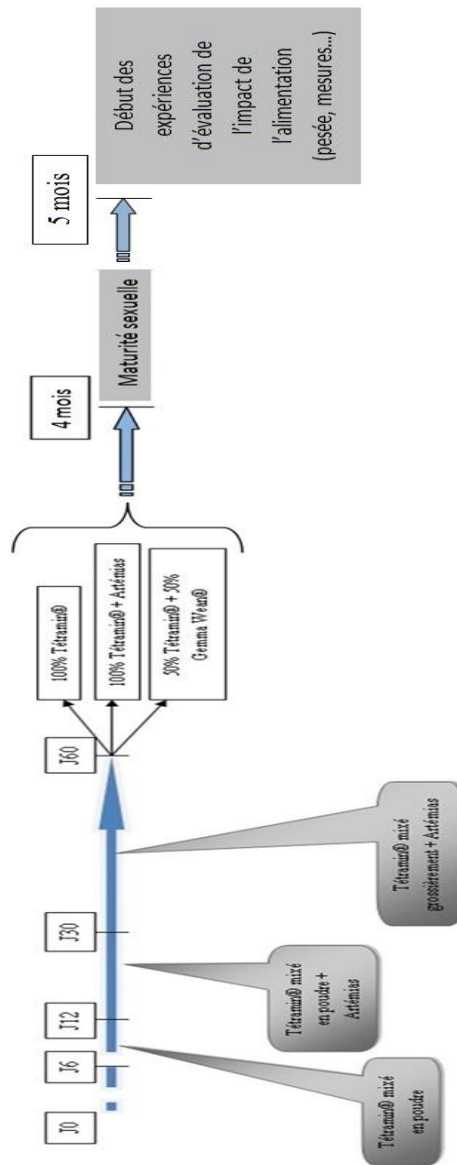


Figure 2 : Représentation graphique de la conduite de l'étude de l'impact de l'alimentation des poissons zèbres.



Figure 3a: Stripping de mâle et femelle poisson zèbre.

estivale : 14h30 de jour (de 7h45 à 22h15) et 9h30 de nuit. Ils sont nourris trois fois par jour *ad libitum*. Depuis la naissance jusqu'à l'âge de 2 mois, l'ensemble des poissons reçoit le même aliment. Puis ils sont répartis selon trois régimes alimentaires différents (Figure 2), dispensés *ad libitum* 3 fois par jour. Un lot témoin est nourri exclusivement avec de l'aliment Tétramin® (protéines brutes 47%), aliment de composition définie utilisé pour l'alimentation des poissons d'ornement. Un second lot reçoit la même ration de Tétramin® supplémentée d'artémias vivants (8 à 10 mm). Il est impossible de connaître la composition précise de la ration. Le dernier lot reçoit du Tétramin® (50% de la ration) et de l'aliment Gemma Wean® (50% de la ration). L'aliment Gemma Wean® est riche en protéine (protéines brutes 62%), c'est un aliment commercial utilisé pour le sevrage en proies vivantes des poissons marins. La composition finale en protéines brutes de cet aliment mixte est de 54.5%. Après 5 mois d'élevage, soit environ 1 mois après le début de la maturité sexuelle, différents paramètres sont relevés sur ces animaux. Pour cela, ils sont anesthésiés dans du phénoxy-2-éthanol à 0.1% (250µl de phénoxy-2-éthanol dans 250 ml d'eau osmosée), égouttés et pesés (au mg près). Leur taille est mesurée entre le bout du nez et le bout de la nageoire caudale (au mm près). Chez les mâles, les testicules sont récupérés par dissection et pesés (à 0.01 mg près). La motilité du sperme testiculaire est analysée après dilacération des testicules. Pour ce faire, les deux lobes testiculaires sont déposés dans 100 µl de HBSS300 (300 mOsmol/kg, 137mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 0.25 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 5.55 mM glucose, pH=7.2) au sein d'un Eppendorf conique de 1.5ml. La dilacération est réalisée à l'aide d'un piston. La solution est filtrée sur nylon (100 µm) puis conservée à 4°C. Chez les femelles, les ovules sont collectés par stripping. La couleur des œufs et la présence de liquide cœlomique permettent d'évaluer la qualité de la ponte. Une note allant de 0 (mauvaise qualité : œufs blancs et peu de liquide cœlomique) à 3 (bonne qualité : œufs jaunâtres baignant dans quelques µl de liquide cœlomique) est attribuée à chaque ponte.

III.2. Obtention des gamètes

III.2.1. Chez le poisson zèbre

La collecte des gamètes chez le poisson zèbre est réalisée par « stripping » (pression abdominale destinée à extraire les gamètes libérés dans les voies génitales) (Figure 3a). Le sperme est aspiré au niveau de la papille anale à l'aide d'une pipette plastique. Les 1 à 3 µl ainsi collectés sont aussitôt dilués dans 200 µl de HBSS300 et placés à 4°C. Les ovules sont récupérés à l'aide d'une cuillère, déposés dans une boîte de pétri et placés à 10°C. Deux cents µl de liquide cœlomique de truite sont ajoutés pour éviter que les œufs ne sèchent à l'air libre. Il a été montré (Depince *et al.*, 2011) que l'ajout de liquide cœlomique de truite maintient la qualité des œufs de cyprinidés en vue d'une manipulation *in vitro*.

III.2.2. Chez l'étalon

Trois étalons poneys Welsh adultes, de fertilité connue, ont été utilisés (MW329, MW438 et MW483). Pour chaque étalon, 3 éjaculats ont été récoltés et traités. Les récoltes ont été réalisées, l'après-midi, dans le même ordre et selon un rythme régulier de 3 fois par semaines



Figure 3b: Collecte d'un étalon.

(Lundi/Mercredi/Vendredi). Elles ont été réalisées à l'aide d'un mannequin et d'un vagin artificiel de type INRA (Figure 3b). Une fois la récolte réalisée, le technicien rejoint le laboratoire avec le vagin artificiel. Il le démonte pour récupérer uniquement le flacon de récolte. Après la collecte, le sperme est filtré sur gaze stérile afin d'éliminer le gel et les impuretés.

III.3. Comptage et évaluation de la qualité de la semence

III.3.1. Comptage des spermatozoïdes

Le comptage des spermatozoïdes de poisson zèbre est réalisé sur cellule de Thoma avec une dilution du sperme au préalable au 1/50 dans du HBSS300. En espèce équine, dès la collecte réalisée, deux caractéristiques séminales quantitatives sont mesurées : la concentration, **C** (en million de spermatozoïdes par ml) est évaluée au photomètre et **V** (le volume en ml) est mesuré dans un tube gradué. Ce qui donne accès à **N**, le nombre total de spermatozoïdes en millions, selon l'opération suivante : $N = C \times V$.

III.3.2. Évaluation de la qualité de la semence

➤ Appréciation de la mobilité des spermatozoïdes

L'évaluation de la mobilité du sperme de poisson zèbre (testiculaire ou obtenu par stripping) se fait en diluant entre lame et lamelle 1µl de la solution de sperme dans 10 µl de BSA (Bovin Serum Albumin : 5mg/ml d'eau distillée). L'utilisation de BSA pour activer les spermatozoïdes plutôt que de l'eau distillée empêche les spermatozoïdes de coller au verre. L'appréciation de la mobilité est faite au microscope, grossissement 250. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles correspond au nombre de spermatozoïdes ayant un mouvement traçant par rapport au nombre total de spermatozoïdes.

Pour le sperme d'étalon, l'analyse de la mobilité est réalisée par un analyseur de mobilité automatisé et assisté par ordinateur (IVOS, version 10, Hamilton Thorne, USA). Au sein des Haras Nationaux, un étalon est considéré comme apte à la production de semence congelée, si sur 9 éjaculats analysés au moins 3 présentent un pourcentage de spermatozoïdes rapides supérieur à 35% après congélation/décongélation. Cette analyse de mobilité est réalisée sur 3 paillettes par éjaculat. Un spermatozoïde est considéré comme rapide si son mouvement est traçant et sa vitesse de déplacement supérieure à 40µm/sec. Nous avons utilisé cette norme des Haras Nationaux pour apprécier la qualité de la semence des étalons. Les analyses sont réalisées sur deux gouttes de sperme ajusté à la concentration de 25×10^6 spermatozoïdes par ml et sur 3 champs optiques par goutte (soit 6 observations par échantillon). Si au regard des résultats de mobilité, nous observons une différence du pourcentage de spermatozoïdes rapides entre les 2 gouttes supérieure à 10% alors il est nécessaire d'analyser une 3ème goutte. Dans ce cas, seules les deux valeurs les plus proches sont conservées pour le calcul.

➤ Appréciation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes

Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes a été évalué seulement pour les spermatozoïdes de poisson zèbre. Ce test contribue à la mise au point de la collecte des gamètes, du protocole de congélation et à l'évaluation de l'impact du régime alimentaire. Des fécondations *in vitro* sont réalisées. Dans une boîte de pétri de 5cm de diamètre une centaine d'œufs est déposée. La goutte de sperme est placée à côté des ovocytes, sans qu'il y ait contact entre les gamètes. L'activation et la mise en contact des gamètes sont réalisées par l'ajout de 1ml d'eau osmosée (correspondant à l'eau du circuit poisson zèbre). On l'appelle « eau de fécondation ». Trois minutes plus tard, 4ml d'eau osmosée supplémentaires sont ajoutés. Les boîtes sont placées dans une étuve à 28°C pour le développement embryonnaire. Six heures après la fécondation, un rinçage des boîtes est effectué avec une solution de bleu de méthylène à 0.5%. L'eau de fécondation est aspirée à l'aide d'une pipette pasteur et remplacée par 5ml de solution de bleu de méthylène. Ce lavage facilite le comptage des embryons en développement (les embryons morts se colorent en bleu) et permet d'éviter toute contamination bactérienne. Le comptage des embryons en développement est réalisé 24 heures après la fécondation. À ce stade l'embryon présente une pigmentation des yeux, de la colonne vertébrale et ressemble à un alevin. Ce qui rend le comptage plus facile qu'au cours des stades de division cellulaire. Le pourcentage de fécondation est alors estimé à partir de ce taux de développement à 24h (pourcentage de fécondation = nombre d'embryons en développement à 24h / nombre total d'œufs à la fécondation). Le calcul du pourcentage d'embryons vivants à 24 heures donne une estimation du pouvoir fécondant de la semence. Pour l'étalon, aucun test de fertilité de la semence n'a été effectué puisqu'au regard des résultats de mobilité, l'ensemble des paillettes produites sont commercialisables.

III.4. Congélation du sperme

III.4.1. Congélation du sperme de poisson zèbre

Avant de sélectionner le milieu de congélation dans lequel toutes les capacités reproductrices de la semence sont conservées, plusieurs méthodes ont été expérimentées. Les paramètres testés sont le dilueur de congélation et la descente de température.

➤ Dilueurs utilisés

La semence et le dilueur de congélation sont mélangés volume à volume. Il faut donc fabriquer des dilueurs deux fois plus concentrés pour avoir la concentration finale souhaitée. Les dilueurs expérimentés dans cette étude pour congeler la semence de poisson zèbre sont:

- Méthanol 16% (concentration finale 8%) : 420µl de HBSS600*, 160µl de méthanol 100% et 420 µl d'eau distillée (pour 1ml de dilueur).

*HBSS600 : 600 mOsmol/kg, 274mM NaCl, 10.8 mM KCl, 2.6 mM CaCl₂, 2.0 mM MgSO₄, 0.50 mM Na₂HPO₄, 0.88 mM KH₂PO₄, 8.4 mM NaHCO₃, 11.10 mM glucose, pH=7.2)

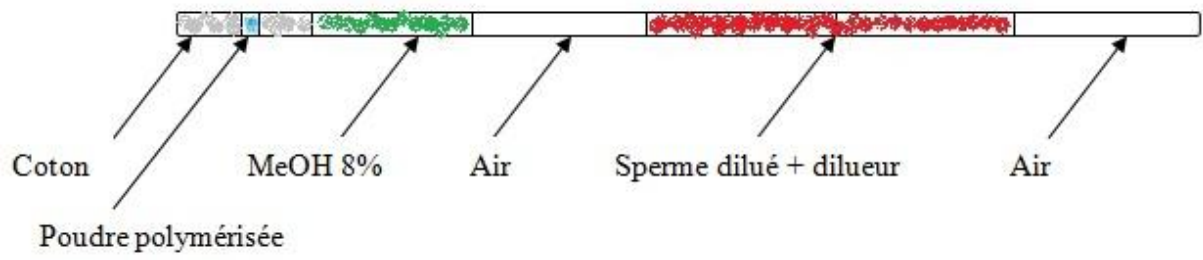


Figure 4 : Schéma d'une paillette de sperme de poisson zèbre.

- Méthanol 16% + saccharose 126mM (concentration finale en méthanol 8%, en saccharose 63mM): 420µl de HBSS600, 160µl de méthanol 100%, 100µl de saccharose 1,26M, 320µl d'eau distillée (pour 1ml de dilueur).
- DMA 16% (concentration finale 8%) : 420µl de HBSS600, 160µl de DMA et 420 µl d'eau distillée (pour 1ml de dilueur).
- DMA 16% + saccharose 126mM (concentration finale en DMA 8%, en saccharose 63mM) : 420µl de HBSS600, 160 µl de DMA 100%, 100µl de saccharose 1,26M et 320µl d'eau distillée (pour 1ml de dilueur).

Juste avant le début de la congélation, un volume de sperme est ajouté à un volume de dilueur. La suspension sperme-dilueur est aspirée dans des paillettes bovines IMV Technologies de 250µl selon la séquence suivante : aspiration de 1 cm de dilueur 1X dans la paillette (volume servant à mouiller le coton en haut de paillette sans sacrifier du sperme pour cela), puis aspiration de 1 cm d'air, puis aspiration de 2 cm du mélange sperme/dilueur et enfin aspiration de 1 cm d'air (figure 4).

➤ Congélation :

La congélation se fait à l'aide d'un congélateur programmable (Planer Kryo 360-3.3). Quatre vitesses de congélation ont été testées au cours de ces manipulations : -1°C/min, -5°C/min, -10°C/min (Yang *et al.*, 2007) et -60°C/min. Une fois la température de -80°C atteinte, les paillettes sont plongées dans l'azote liquide à -196°C.

➤ Décongélation des paillettes

Les paillettes contenant du sperme de poisson zèbre sont décongelées dans un bain marie à 37°C pendant 7 secondes, et immédiatement vidées dans un tube maintenu dans la glace en attendant les analyses ultérieures (motilité, fécondance). Le sperme est utilisé dans les 5 minutes suivant la décongélation.

III.4.2. Congélation du sperme de cheval

Le protocole de congélation de la semence équine est le suivant :

➤ Collecte de la semence et première dilution

Une fois collectée et filtrée sur gaze la concentration en spermatozoïdes de la semence est évaluée au photomètre. Une première dilution de la semence est réalisée dans le milieu INRA96® dans un bain-marie à +37°C de façon à avoir une concentration par pot de 50.10⁶ spermatozoïdes/ml. La semence est ensuite refroidie dans un bain-marie à +22°C, pendant 10 minutes. Une première centrifugation est effectuée à 600g, pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant contenant le milieu et le plasma séminal est éliminé.

➤ Deuxième dilution et congélation de la semence

Le culot de spermatozoïdes est resuspendu dans le milieu INRA-Freeze® afin d'obtenir une concentration finale de 100.10⁶ spermatozoïdes/ml. Avant de mettre la semence en paillette de

0.5 ml (paillettes bovines IMV Technologies), elle est refroidie pendant 1 heure et 15 minutes à 4°C. La congélation des paillettes est réalisée à l'aide d'un congélateur programmable (Minidigitcool, IMV), selon une descente de température de -60°C par minute, de +4°C à -140°C. Une fois la température de -140°C atteinte, les paillettes sont plongées dans l'azote liquide à -196°C, où elles sont stockées.

➤ Décongélation des paillettes

Le sperme est décongelé 30 secondes dans un bain marie à 37 °C. Pour les analyses de motilité, 3 paillettes sont prélevées de manière aléatoire dans la cuve et décongelées (une par une à 3 minutes d'intervalle), pour chaque éjaculat et chaque étalon. Une fois décongelé, le contenu de chaque paillette est dilué dans 2mL d'INRA96® à la concentration de 25x10⁶ spermatozoïdes par ml et incubé à 37°C pendant 10 minutes avant analyse.

III.5. Extraction et quantification de l'ADN des spermatozoïdes

III.5.1. Méthode d'extraction de l'ADN des spermatozoïdes

Après décongélation de la paillette, le cryoprotecteur est éliminé par deux centrifugations successives de 10 minutes à 4°C, 200g, dans 500µl de HBSS300 pour le sperme de poisson ou d'Hank's Hépès (CaCl₂ 1.26mM, KCl 5.36 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, MgSO₄(7H₂O) 0.80 mM, NaCl 136.89 mM, Na₂HPO₄ (12H₂O) 0.33mM, NaHCO₃ 4.16 mM, Glucose (anhydre) 5.50 mM, Hépès 20 mM, le pH est ajusté à 7.1 et la pression osmotique à 290 mOsm/kg) pour le sperme d'étalon. Chaque échantillon est digéré à 42°C sous agitation (Thermomixer Eppendorf – 1400 rpm) pendant 16 heures, par de la protéinase K (SIGMA) à 20 mg/ml dans un 1ml de TNES (Tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.125M, EDTA 0.01M, SDS 0.017M, Urée 4M). Le SDS (détergent) sert à casser les cellules et la protéinase K à digérer les protéines, dont les protéines nucléaires. L'ajout d'1ml de phénol-chloroforme-isoamyl (25 :24 :1) est suivi d'une agitation soigneuse permettant la création d'une émulsion. Une centrifugation de 15 minutes à 4°C, 8000g permet de faire apparaître deux phases. La phase organique au dessous contient les lipides, l'interphase est constituée de protéines dénaturées et la phase aqueuse comporte l'ADN. La phase aqueuse (800µl) est récupérée. On y ajoute 100 µl de NaCl 5M pour faire précipiter l'ADN et 1ml d'éthanol absolu pour optimiser l'effet du NaCl. Après une centrifugation (8000g) de 15 minutes à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot formé d'ADN est lavé par ajout de 100 µl d'éthanol 75%. Après 3 minutes d'incubation, l'éthanol est éliminé par retournement du tube et le culot est mis à sécher sous hote ou au speed vac (centrifugation sous vide) pendant une heure pour supprimer toute trace d'éthanol. Le culot est repris dans 100 µl de RNase à 100 mg/ml d'eau sans nucléase (Nuclease free water, Promega) et incubé 1 heure à 37°C pour supprimer les ARN de l'échantillon.

III.5.2. Quantification de l'ADN extrait : deux méthodes complémentaires

La concentration de chaque échantillon est estimée par le NanoDrop ND-1000. Il mesure l'absorbance de la molécule d'ADN (260 nm). Ce dernier donne également des informations sur la présence de protéines (elles absorbent jusqu'à 280 nm) dans l'échantillon par le rapport 260/280 qui doit être proche de 1.80. Et nous renseigne sur la contamination ou non par des

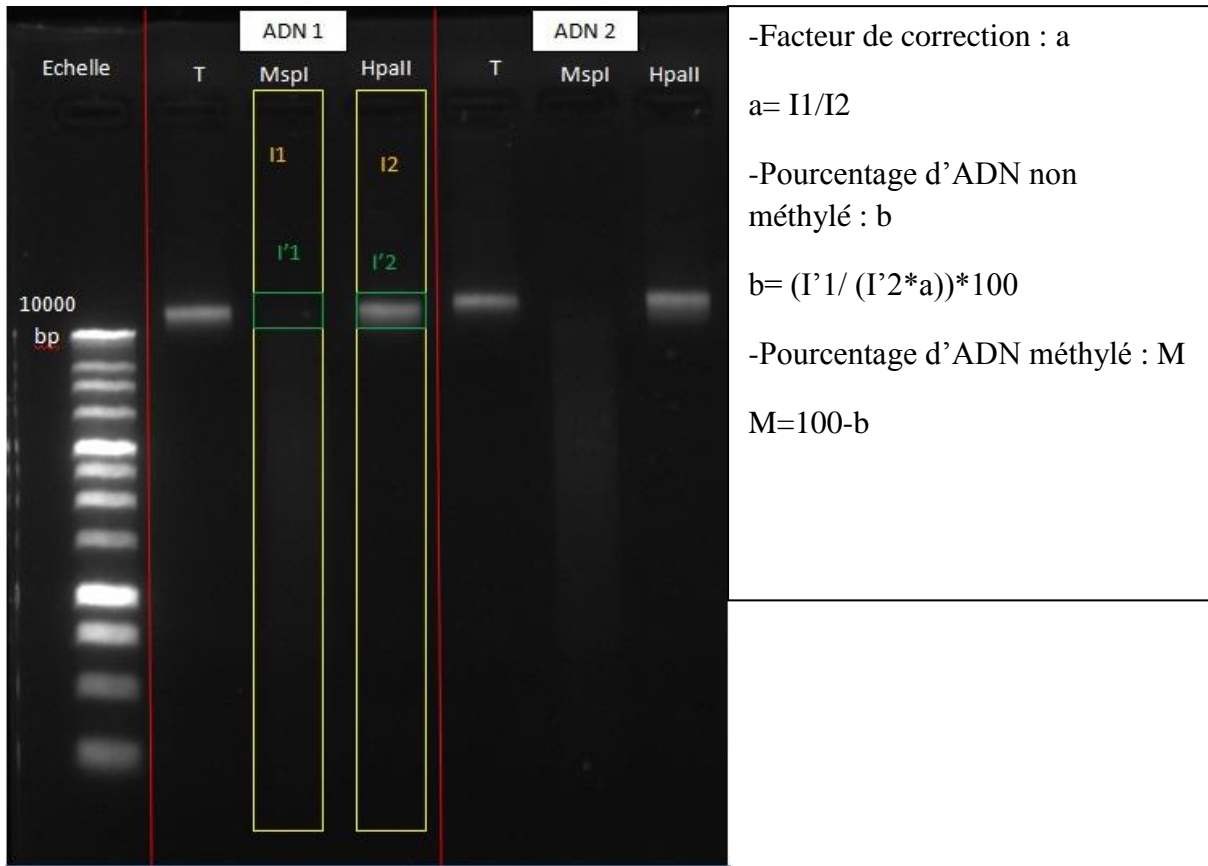


Figure 5 : Explication du calcul de pourcentage de méthylation par la méthode des enzymes de restriction.

solvants à travers le rapport 260/230 qui doit être proche de 2. La mesure de la concentration au NanoDrop donne un ordre d'idée sur la quantité d'ADN présente dans l'échantillon. Cette estimation nous permet de faire migrer chaque échantillon sur gel d'agarose après avoir déposé 1 µg d'ADN théorique par puits. Au volume théorique d'échantillon est ajouté 3 µl de tampon de charge (blue/orange 6X loading Dye buffer, Promega) et 0.2 µl de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water pour permettre une révélation par fluorescence (UV). Après révélation du gel, en fonction de l'intensité de la bande de haut poids moléculaire (10 000 paires de base), on ajuste le volume d'échantillon à déposer par puits pour avoir 1 µg d'ADN. Le gel nous donne également accès au niveau de dégradation de l'échantillon. Si un « smear » (trainée sur le gel) est observé, cela indique que l'échantillon est dégradé.

III.6. Analyse du niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes par la méthode des enzymes de restriction

III.6.1. Principe de la méthode des enzymes de restriction

La méthode des enzymes de restriction consiste à faire digérer chaque échantillon par deux iso enzymes, MspI et HpaII. MspI coupe l'ensemble des sites CCGG de l'ADN. HpaII coupe seulement ceux qui sont déméthylés. Les sites CCGG sont répartis de façon aléatoire sur l'ensemble de la séquence d'ADN et sont donc considérés comme représentatifs de l'ensemble des sites CpG du génome. Nous pouvons ainsi avoir accès à une estimation du niveau de méthylation global de l'échantillon. Chaque échantillon d'ADN de spermatozoïde est déposé dans trois tubes différents, à raison de 1 µg d'ADN par tube. Dans le tube témoin aucune enzyme n'est ajoutée (témoin, ADN non digéré). Un tube contient l'ADN qui sera digéré par MspI et un autre tube contient l'ADN qui sera digéré par HpaII. Chaque enzyme doit être diluée dans son tampon respectif et de la BSA (Bovin Serum Albumin) pour être active. Dans le tube témoin, le mélange enzyme, tampon et BSA est remplacé par un ajout d'eau sans nucléase (Nuclease-Free water, Promega). Après une incubation d'une heure à 37°C, les échantillons digérés sont additionnés de tampon de charge ((blue/orange 6X loading Dye buffer, Promega) contenant un marqueur de l'ADN (0.2 µl de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water). Le mélange est déposé sur gel d'agarose (0.8%, poids/volume) et mis à migrer à 100V pendant 30 minutes. Pour valider la répétabilité inter expérience de cette méthode, à chaque gel on ajoute une digestion d'un échantillon d'ADN de nageoire de digestibilité et de répétabilité connues. Cet échantillon est un contrôle de la digestion.

III.6.2. Évaluation du niveau de méthylation de l'ADN sur gel d'agarose

La lecture du gel est réalisée par une caméra pilotée par le logiciel Fusion après exposition aux UV. Le niveau de méthylation de l'échantillon est obtenu par une analyse de l'intensité de fluorescence de chaque piste par un logiciel d'analyse d'image, Image J (Figure 5). Pour chaque échantillon, une mesure de l'intensité totale de chaque piste est réalisée. À partir de ces mesures, on calcule le rapport de l'intensité totale de la piste où l'ADN a été digéré par MspI (I1) et celle de la piste où l'ADN a été digéré par HpaII (I2). Ce rapport constitue un facteur de correction (a) qui permet de normaliser les quantités d'ADN totales déposées dans chaque puits. Une mesure de l'intensité de fluorescence est effectuée au niveau de la bande

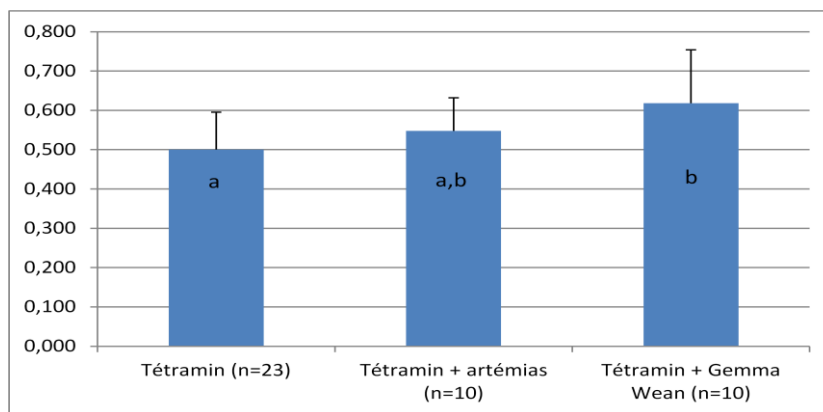


Figure 6 : Poids vif moyen (en gramme) des mâles en fonction du régime alimentaire (*n* : nombre de mâles analysés ; différences significatives ($p < 0.05$) entre lettres différentes (a, b)).

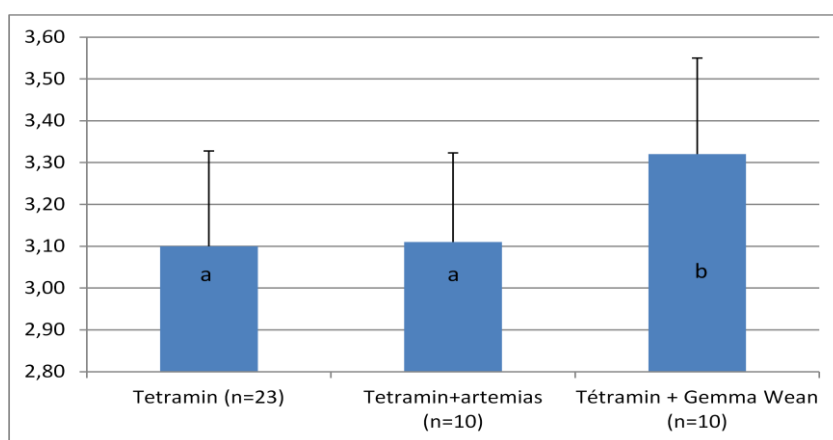


Figure 7 : Taille moyenne des mâles en fonction du régime alimentaire (*n* : nombre de mâles analysés ; différences significatives ($p < 0.05$) entre lettres différentes (a, b)).

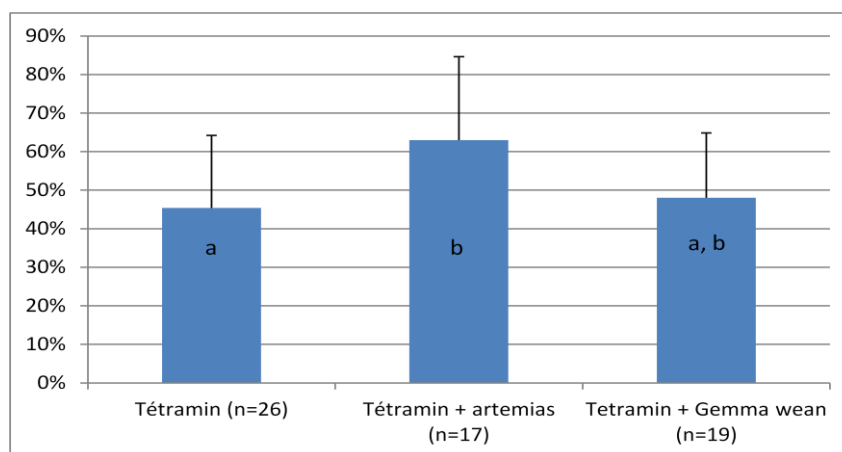


Figure 8 : Pourcentage moyen des spermatozoïdes mobiles en fonction du régime alimentaire (*n* : nombre de mâles analysés ; différences significatives ($p < 0.05$) entre lettres différentes (a, b)).

d'ADN de haut poids moléculaire (10 000 paires de bases) pour les deux enzymes (I'1 et I'2). Cette bande représente l'ADN non digéré par les enzymes. La valeur du rapport de ces deux intensités est normalisée avec le facteur de correction pour donner le niveau de méthylation de l'échantillon (M).

III.7. Analyses statistiques

L'ensemble des données ont été analysées statistiquement à l'aide du logiciel R. Le seuil de significativité utilisé est de 5%. On considère qu'il y a une tendance lorsque p-value est comprise entre 5 et 10%. L'ensemble des données ont été soumises à une analyse de variance suivant la procédure ANOVA, hormis le jeu de données concernant la capacité des poissons à émettre des gamètes à la suite d'un stripping qui a été soumis à un test du khi 2.

IV. RESULTATS

IV.1. Mise au point d'une méthode de congélation chez le poisson zèbre

IV.1.1. Impact de l'alimentation sur le poids, la taille et les capacités reproductrices des poissons

➤ Impact de l'alimentation sur le poids et la taille des poissons zèbres

Une ANOVA à un facteur montre que le poids vif des poissons est lié de façon significative au type d'alimentation ($p=0.016$). En comparant deux à deux les régimes on a mis en évidence que le poids est significativement plus élevé chez les poissons nourris avec le régime Tétramin® + Gemma Wean® que celui des poissons nourris avec le régime Tétramin® ($p=0.005$) (Figure 6). Les poids des poissons nourris avec le régime Tétramin® + artémias sont intermédiaires et ne diffèrent pas significativement des deux autres lots. En ce qui concerne la taille des poissons (longueurs en cm) (Figure 7), les poissons sont significativement plus grands lorsqu'ils ont été élevés avec de l'aliment Tétramin® + Gemma Wean® qu'avec du Tétramin® seul ($p=0.01$) ou du Tétramin® + artémias ($p=0.04$). En revanche, on n'observe aucun effet de l'alimentation sur le poids testiculaire des mâles (Tétramin® $7.3\text{mg}\pm 2.9$, Tétramin® + artémias $8.4\text{mg}\pm 3.8$, Tétramin® + Gemma Wean® $9.6\text{mg}\pm 4$, $p=0.19$).

➤ Impact de l'alimentation sur les capacités reproductrices des poissons zèbres

Aucunes différences significatives n'ont été mises en évidence entre les trois régimes pour la quantité de spermatozoïdes (Tétramin® $40.7\times 10^6\pm 26.6\times 10^6$, Tétramin® + artémias $43.4\times 10^6\pm 24.5\times 10^6$, Tétramin® + Gemma Wean® $23.2\times 10^6\pm 18.6\times 10^6$, $p=0.27$), la qualité des ovules (Tétramin® 1.4 ± 1.2 , Tétramin® + artémias 1.6 ± 1.3 , Tétramin® + Gemma Wean® 1.9 ± 1.3 , $p=0.74$) et la quantité d'ovocytes (Tétramin® 35 ± 15 , Tétramin® + artémias 55 ± 19 , Tétramin® + Gemma Wean® 41 ± 15 , $p=0.85$). En revanche, un impact de l'alimentation sur la mobilité des spermatozoïdes a été mis en évidence ($p=0.019$) (Figure 8). La différence est

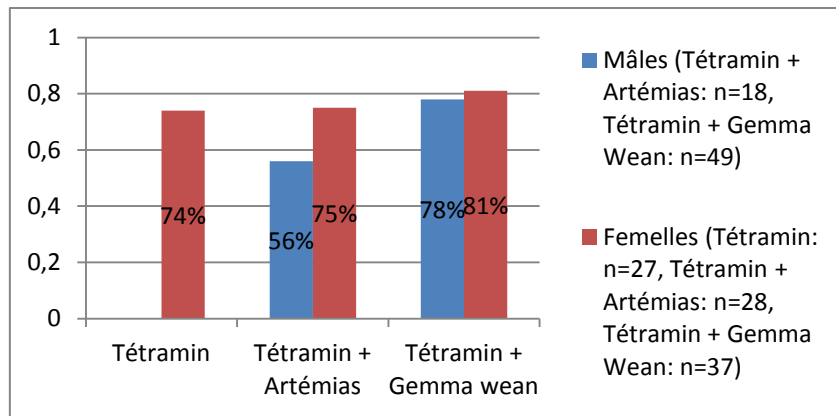


Figure 9 : Pourcentage des poissons répondant au stripping par une émission de gamètes en fonction du régime alimentaire (*n* : nombre d'animaux analysés ; aucune différences significatives ($p < 0.05$) entre alimentations).

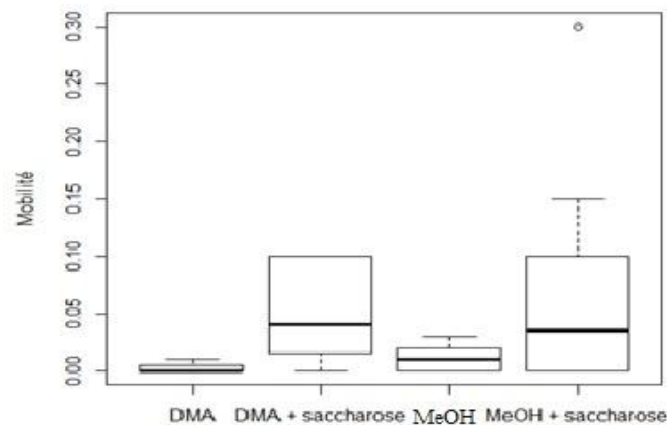


Figure 10 : Boîtes de dispersion représentant la proportion de spermatozoïdes mobiles en fonction du dilueur utilisé (DMA, $n=8$; DMA + saccharose, $n=16$; MeOH, $n=8$; MeOH + saccharose, $n=28$; n : nombre de mâles analysés).

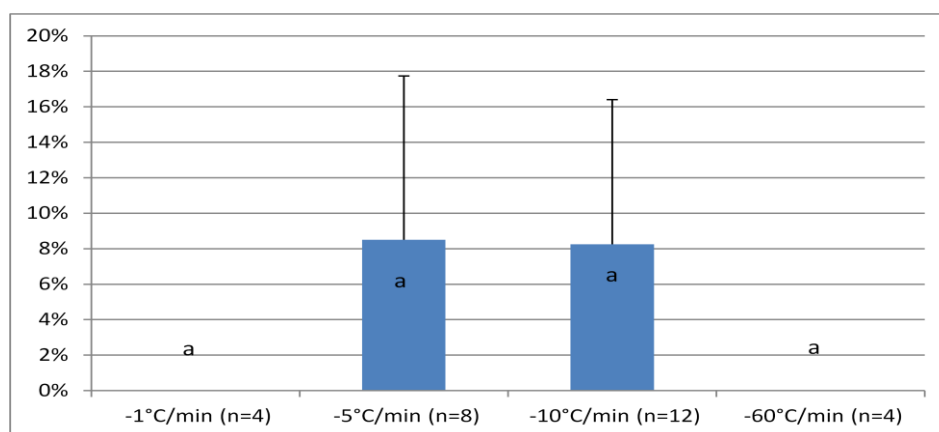


Figure 11 : Pourcentage de spermatozoïdes mobiles à la décongélation en fonction de la vitesse de descente en température dans le cryoprotecteur MeOH 8% + saccharose 63mM (*n* nombre de mâles analysés, différences significatives ($p < 0.05$) entre lettres différentes).

significative seulement entre le régime Tétramin® + artémias et le régime Tétramin® ($p=0.005$). Par un test du khi 2 nous avons montré que l'aliment n'améliore pas la capacité de collecte des gamètes sur les femelles ($p=0.76$). En effet, le pourcentage de femelles répondant au stripping par l'émission d'œufs est le même dans les trois lots (figure 9). En revanche, les mâles nourris avec le mélange Tétramin® + Gemma wean® présentent une tendance à émettre plus facilement du sperme que ceux nourris avec du Tétramin® + artémias (78% de réponse positive à la collecte *vs* 56%, $p=0.07$) (Figure 9).

Ainsi, l'utilisation du mélange Tétramin® et Gemma Wean® permet d'avoir des poissons plus lourds, plus grands et il est plus facile de récupérer du sperme par stripping chez les mâles nourris avec cet aliment.

IV.1.2. Congélation de la semence de poisson zèbre

- Première étape : Choix du cryoprotecteur et de la vitesse de descente en température.

Dans une première expérience, deux vitesses de congélation (-5°C et $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$), et quatre dilueurs (méthanol 8%, méthanol 8% + saccharose 63mM, DMA 8% et DMA 8% + saccharose 63mM) ont été comparés. Aucune différence significative de mobilité des spermatozoïdes décongelés n'a été mise en évidence entre ces deux vitesses de descente en température, quel que soit le dilueur de congélation (méthanol 8% : $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $1\% \pm 0.5\%$ *vs* $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $1.75\% \pm 1.26\%$, méthanol 8% + saccharose 63mM : $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $8.5\% \pm 9.2\%$ *vs* $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $8.2\% \pm 8.15\%$, DMA 8% : $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $0.25\% \pm 0.5\%$ *vs* $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $0.25\% \pm 0.5\%$ et DMA 8% + saccharose 63mM : $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $4.5\% \pm 3.7\%$ *vs* $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $5\% \pm 4.4\%$, $p>0.05$). En revanche, nous avons observé que l'ajout de saccharose dans les milieux de congélation améliore significativement le pourcentage de spermatozoïdes mobiles à la décongélation ($p=0.0011$, $n=52$) (Figure 10). Quant à l'utilisation de DMA 8% ou de MeOH 8%, il n'y a aucunes différences entre ces deux cryoprotecteurs en termes de pourcentage de spermatozoïdes mobiles à la décongélation. Nous avons choisi d'utiliser comme milieu de congélation une solution de MeOH 8% avec du saccharose 63mM pour tester une gamme étendue de vitesse de congélation : les deux vitesses intermédiaires déjà testées, $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (pour confirmation) et deux vitesses extrêmes, $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (vitesse utilisée pour les cellules type embryonnaires) et $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (vitesse utilisée pour congeler la semence équine) (Figure 11). L'absence de différence entre les vitesses intermédiaires $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a été confirmée. Les deux descentes de température extrêmes testées, $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ semblent être à l'origine d'une diminution de la mobilité des spermatozoïdes, même si les effets ne sont pas statistiquement significatifs ($-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ *vs* $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$: $p=0.068$, $n=16$; $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ *vs* $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$: $p=0.068$, $n=16$). Par soucis pratique lors des manipulations de congélation nous avons décidé d'utiliser la vitesse de descente en température de $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

- Deuxième étape : Évaluation de la toxicité du cryoprotecteur pour les œufs de poisson zèbre.

Avant de valider la méthode de congélation retenue ci-dessus, il est nécessaire de vérifier que le cryoprotecteur dans lequel baigne le sperme décongelé n'est pas toxique pour les œufs lors

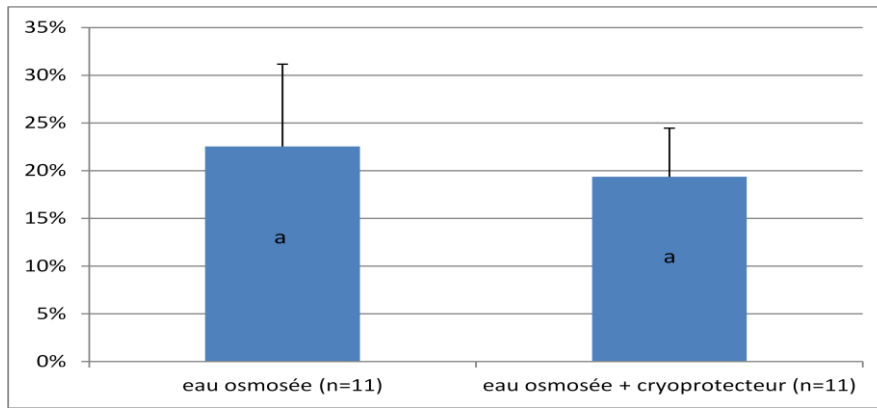


Figure 12 : Impact du cryoprotecteur (MeOH 8% + saccharose 126 mM) sur le taux de fécondation des œufs (*n* nombre fécondations réalisées, pas de différence significative entre les deux lots).

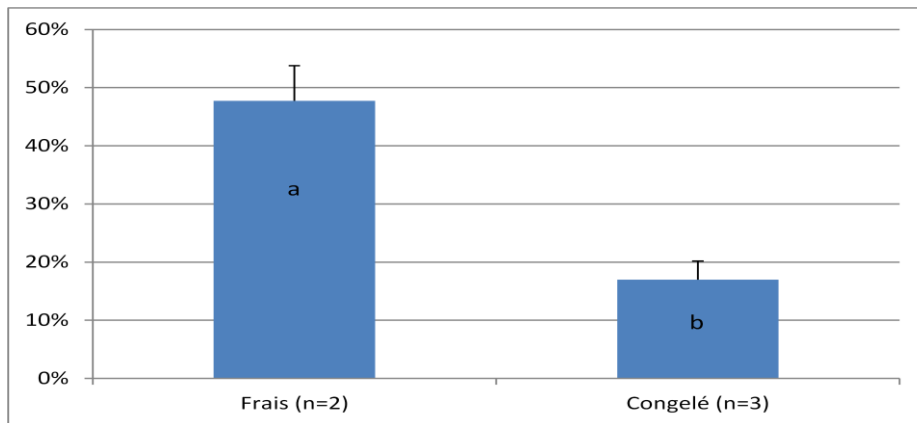


Figure 13 : Taux de fécondation des œufs en fonction du type de sperme utilisé (frais ou congelé) (*n* nombre de fécondations réalisées, différences significatives ($p < 0.05$) entre lettres différentes (a, b)).

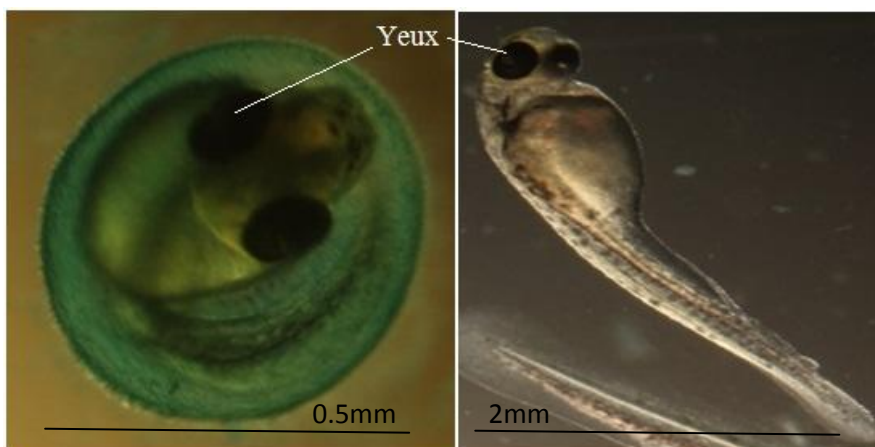


Figure 14 : Photo d'un embryon de poisson zèbre à 24 heures (à droite) et d'un alevin après éclosion (à gauche).

de la fécondation et qu'il est possible de produire des alevins avec de la semence congelée dans ces conditions. Cette vérification a été effectuée en réalisant des fécondations avec un pool de sperme frais. Le cryoprotecteur a été introduit dans l'eau de fécondation selon un ratio sperme/dilueur qui mime le ratio avec du sperme congelé. Une paillette de sperme de poisson zèbre congelée selon notre protocole contient 75µl de solution de sperme et 75µl de cryoprotecteur. Pour réaliser les fécondations, un pool d'œufs issu d'une dizaine de femelles poisson zèbre a été utilisé. Dans une boîte de pétri de 5cm de diamètre, une centaine d'œufs et 75µl de solution de sperme sont déposés en deux endroits distincts. Le cryoprotecteur (75 µl de méthanol 16% et saccharose 126 mM) est ajouté à l'eau de fécondation (1ml) qui sert à mettre en contact et activer les gamètes. Pour le lot témoin, l'eau de fécondation seule est utilisée. Une ANOVA a un facteur n'a pas mis en évidence de différence entre l'absence et la présence de cryoprotecteur dans l'eau de fécondation sur les taux de fécondance des œufs ($p=0.34$) (Figure 12). Nous pouvons en déduire que le cryoprotecteur n'est pas toxique pour les œufs de poisson zèbre.

- Troisième étape : Évaluation de la fécondance du sperme congelé dans un milieu MeOH8% + saccharose 63mM avec une vitesse de descente en température de -10°C/min.

Nous avons utilisé 3 pools composés chacun du sperme de 4 mâles poissons zèbres différents pour évaluer la fécondance de la semence congelée. Trois paillettes par pool ont été décongelées et poolées, afin de s'affranchir d'une éventuelle variabilité inter-paillettes. Pour réaliser les fécondations, 150µl de semence ont été déposés par boîte de fécondation. Deux fécondations témoins à partir de sperme frais ont été réalisées, ce qui constitue un contrôle qualité des œufs. Chacune des deux fécondations témoins a été effectuée avec un pool de sperme frais issu de 4 mâles différents. On remarque une diminution significative du taux de fécondation par rapport au sperme frais ($48\% \pm 6\%$ vs $17\% \pm 3\%$, $p=1.1.10^{-5}$) (Figure 13). Les embryons ont été élevés jusqu'à l'éclosion pour s'assurer que la méthode de congélation ne soit pas à l'origine d'un souci de développement (Figure 14).

En conclusion, à l'issue de ces trois étapes expérimentales nous avons montré que l'utilisation de méthanol 8% supplémenté par du saccharose 63mM comme cryoprotecteur associé à une vitesse de descente en température de -10°C/min, est une méthode de cryoconservation optimisée de la semence de poisson zèbre.

IV.2. Analyse du niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes après congélation/décongélation

IV.2.1. Validation de la méthode des enzymes de restriction

À chaque digestion enzymatique un témoin interne est habituellement réalisé pour s'assurer de la répétabilité de cette méthode. Le témoin est un échantillon d'ADN de nageoire de poisson rouge. Le pourcentage de méthylation de ce témoin interne a été apprécié pour 16 expériences indépendantes (digestions, gels et analyses indépendantes), puis la moyenne et l'écart type ont été calculés. Le faible écart type de 6.2%, pour une moyenne de 68.7%, valide

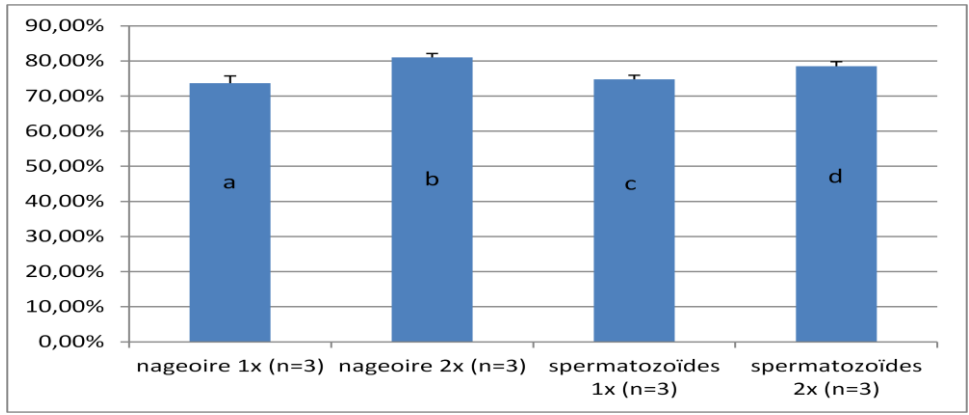


Figure 15 : Niveaux de méthylation de l'ADN de 4 échantillons pour évaluer la répétabilité intra expérience de la méthode des enzymes de restriction (*n* nombre d'échantillons d'ADN analysés, 1X 1 μ g d'ADN par puits, 2X 2 μ g d'ADN par puits, différence significative entre les lettres différentes ($p < 0.05$) a, b, c et d).

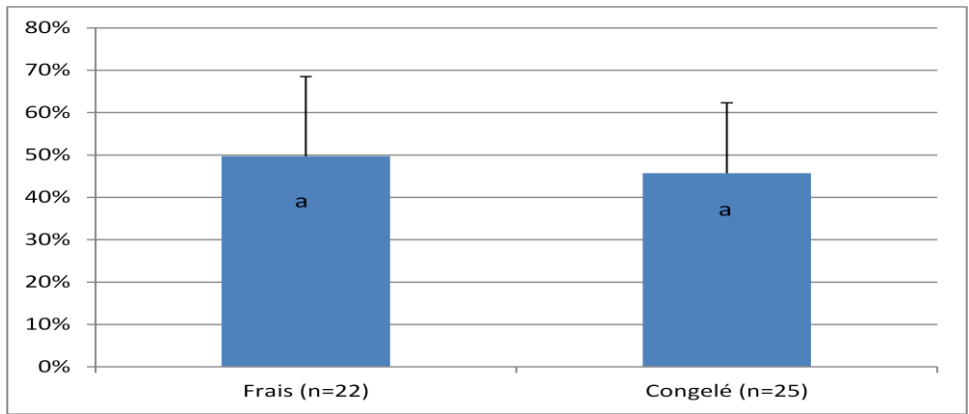


Figure 16 : Niveau de méthylation de l'ADN issu de spermatozoïdes frais ou congelés de poisson zèbre (*n* nombre d'échantillons d'ADN analysés, pas de différence significative ($p < 0.05$) entre les traitements).

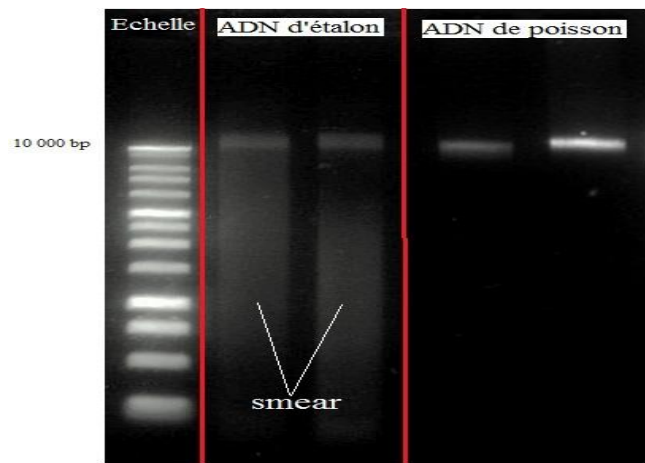


Figure 17 : Différence de dégradation de l'ADN après extraction entre l'ADN de sperme d'étalon et celui de poisson zèbre.

la répétabilité inter expérience pour la digestion enzymatique. Ces valeurs permettent également d'estimer au-delà de quelle différence de méthylation on pourra attribuer un effet biologique aux observations.

Pour explorer la répétabilité intra expérience, la digestion d'un même échantillon a été répétée 3 fois, à deux concentrations d'ADN différentes (1 et 2 µg) et analysée sur le même gel. Des échantillons d'ADN de nageoire et de poisson zèbre ont été analysés. La moyenne et l'écart type des pourcentages de méthylation obtenus ont été calculés. Les faibles écarts types obtenus (1.14% < écart type < 2.03%) pour des moyennes de pourcentage de méthylation comprises entre 74% et 81% certifient le fait que la méthode des enzymes de restriction est répétable (Figure 15). Une ANOVA à un facteur montre qu'il y a une différence significative du niveau de méthylation lorsque la quantité d'ADN est doublée (nageoire 1µg=73.7% vs nageoire 2µg=81%, p=0.006 ; spermatozoïde 1µg=74.7% vs spermatozoïde 2µg=78.5%, p=0.02). Nous démontrons ainsi que la quantité d'ADN est un point important à contrôler, ce qui justifie pleinement le soin apporté en fin d'extraction de l'ADN, à la détermination des quantités d'ADN à déposer sur les gels.

IV.2.2. Impact de la cryoconservation sur le niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de poisson zèbre

Le niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de poisson zèbre est faible (sperme frais : 50%, sperme congelé : 46%) (Figure 16) par rapport à celui de l'ADN de nageoire (69%). Aucune différence du niveau de méthylation de l'ADN moyen entre le sperme frais et le sperme congelé n'a été établie (sperme frais (n=22) : 50% ± 19% vs sperme congelé (n=25) : 46% ± 17%, p=0.45). Il convient de noter l'importante variabilité inter-mâle des niveaux de méthylation. De même, l'analyse individuelle par paire d'échantillons (frais-congelés d'un même mâle) a permis de mettre en évidence le fait que la congélation induit aléatoirement une hypo ou une hyperméthylation de l'ADN des spermatozoïdes. En effet, après congélation, 10 échantillons sont plus méthylés que les frais correspondants et 12 sont moins méthylés.

IV.2.3. Échec de la méthode des enzymes de restriction pour l'ADN des spermatozoïdes d'étalon

Le protocole d'extraction de l'ADN puis celui des enzymes de restriction ont été appliqués de la même façon pour les spermatozoïdes d'étalon et ceux de poisson. À l'issue de l'extraction de l'ADN des spermatozoïdes d'étalon, nous avons remarqué un niveau de dégradation de l'ADN très élevé par rapport aux échantillons de spermatozoïdes de poisson (Figure 17). Le niveau de dégradation de l'ADN est apprécié par la présence d'un « smear » suivant la bande d'ADN de haut poids moléculaire. Pour palier à ce problème, nous avons essayé plusieurs méthodes. Nous avons soupçonné l'étape de digestion des protéines nucléaire de 16 heures à 42°C d'être responsable d'une altération de l'ADN. Nous avons alors comparé deux types de digestions, la digestion habituelle de 16 heures et une digestion d'une heure. Nous avons obtenu le même résultat, l'ADN est autant dégradé suivant les deux digestions. La suppression de l'étape de « vortex doux » après l'ajout du NaCl et de l'éthanol 100% pour faire précipiter l'ADN ainsi que la diminution de l'agitation lors de la digestion n'ont rien

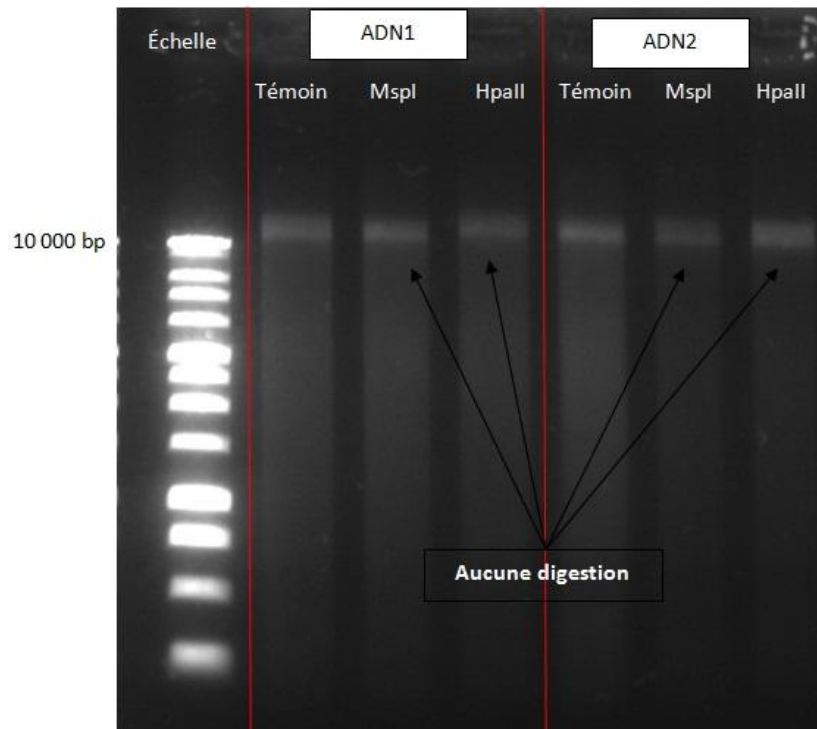


Figure 18 : Illustration de l'échec de la méthode des enzymes de restriction sur l'ADN de spermatozoïde d'étalon.

donné. Bien que l'ADN soit dégradé, la présence d'une bande à haut poids moléculaire nous a encouragés à tenter d'analyser son niveau de méthylation par la méthode des enzymes de restriction. Il s'avère que les deux enzymes, MspI et HpaII n'ont pas digéré l'ADN (Figure 18). Nous avons supposé que la présence d'un reliquat d'éthanol dans l'échantillon inhibe l'action des enzymes. Nous avons alors remplacé l'étape de séchage du culot sous hote par un chauffage doux sous vide (speed vac). Cette modification du protocole n'a pas changé le résultat de la digestion. Nous avons incriminé le fait que la quantité d'enzyme était peut être trop faible par rapport à la quantité d'ADN. Cette quantité a été doublée, aucune amélioration n'a pu être mise en évidence. La tentative de digestion avec une enzyme de restriction ayant un site de restriction différent (EcoR1) a également échoué. Cela pourrait signifier qu'il s'agit d'un problème d'accessibilité de l'ADN et/ou de la présence d'un facteur responsable d'une inhibition des enzymes, et non pas d'un dysfonctionnement lié aux sites CCGG. Il nous est très difficile de proposer une molécule responsable sachant que le sperme est lavé trois fois, une fois au moment de la congélation et deux fois avant l'extraction de l'ADN.

V. DISCUSSION

Une composante importante de ce travail a été de déterminer une condition d'élevage du poisson zèbre optimale pour la production de gamètes en quantité et en qualité suffisantes. Ceci s'inscrivait dans l'objectif de mettre au point un protocole de congélation défini en préalable à une analyse comparative du niveau de méthylation de la semence de poisson zèbre et d'étalon après congélation/décongélation.

Impact du régime alimentaire sur le poids, la taille et les capacités reproductrices des poissons zèbres.

Aux termes de notre étude, nous avons montré que l'utilisation d'un mélange d'aliments Tétramin® (50% de la ration) et Gemma Wean® (50% de la ration) assure un meilleur développement des poissons par rapport à l'utilisation de l'aliment Tétramin® seul. Ce mélange permet en outre d'obtenir une qualité de sperme équivalente aux autres régimes, tout en augmentant la fréquence d'émission de sperme par stripping, par rapport à l'aliment Tétramin® supplémenté en artémias. Nous avons pu faire un lien entre la croissance des poissons et leur capacité à émettre du sperme. Avoir des animaux qui émettent régulièrement et facilement des gamètes par stripping constitue un véritable confort pour le manipulateur. Le stripping n'est pas sans impact sur le poisson, il peut provoquer la mort du poisson. La pression réalisée sur la partie abdominale crée des traumatismes. Lorsque les mâles émettent le sperme plus facilement, le manipulateur cause moins de traumatismes à l'animal donc moins de poissons meurent au cours des prélèvements. Ces deux aspects peuvent avoir un impact non négligeable sur la durabilité économique de l'élevage. Il est possible de diminuer la taille de l'élevage tout en gardant la même quantité de matériel biologique prélevable. Une plus grande quantité de sperme émis dans le cas d'animaux précieux rares (lignée transgénique par exemple) est d'importance capitale dans l'optique de conserver ces lignées. L'arrêt de l'utilisation d'artémias comme source d'alimentation enlève par ailleurs une contrainte organisationnelle considérable pour les animaliers. En effet, les artémias sont reçus

sous forme d'œufs embryonnés quiescents qu'il faut faire éclore dans des conditions de température et de salinité précise (26°C, 35g de sel de mer synthétique Instant Océan® pour 1L d'eau, incubation pendant 48h) avant d'être distribués. De plus, il est important, pour un centre de recherche, de maîtriser avec précision l'ensemble des paramètres d'alimentation. L'aliment Gemma Wean® a une composition définie, contrairement aux artémias et présente moins de contrainte d'utilisation que l'apport de proies vivantes. La composition des artémias est variable, il a été montré que la provenance des artémias influence indiscutablement le développement de larve de crevette (Campillo, 1975). L'utilisation d'un aliment prêt à l'emploi de composition finie est plus facile d'utilisation et assure une meilleure maîtrise des paramètres d'élevage, ce qui est un argument supplémentaire à l'adoption de ce régime pour nourrir les géniteurs. Suite à nos résultats, il est prévu de tester le remplacement des artémias par de l'aliment Gemma Wean® mixé en poudre (l'aliment Gemma Wean® étant sous forme de granulés) dès la phase larvaire, c'est-à-dire de la première alimentation jusqu'à 2 mois. Si cet apport est concluant, alors l'élevage du centre INRA pourra supprimer de manière définitive la distribution d'artémias et les contraintes qui l'accompagnent.

Mise au point d'un protocole de congélation de la semence de poisson zèbre.

Pour mettre au point un protocole de congélation de la semence de poisson zèbre, nous avons eu besoin d'une quantité importante de matériel biologique. Il était donc plus fiable d'utiliser des poissons nourris avec le mélange Tétramin® + Gemma Wean® que ceux nourris avec les autres régimes alimentaires. Lors de l'exploration des conditions optimales de congélation nous avons montré que l'utilisation du méthanol 8% supplémenté en saccharose 63mM comme milieu de congélation associée à une vitesse de descente en température de -10°C/min assure une protection optimale des spermatozoïdes et n'est pas toxique pour les œufs. Un cryoprotecteur non toxique pour les œufs permet d'éviter la réalisation d'un lavage de la semence à la décongélation, étape qui est souvent délétère pour les spermatozoïdes. Avant que ce protocole de congélation soit utilisé en routine par l'élevage pour créer une cryobanque et conserver les lignées d'intérêt plusieurs paramètres restent à explorer. Le nombre de paillettes minimum par mâle à utiliser pour la fécondation, la variabilité inter mâles, la répétabilité inter paillettes et la quantité minimale de sperme par paillette sont autant de facteurs qui doivent être approfondis pour optimiser la méthode de congélation. Dans le cadre de notre étude, nous avons pu utiliser cette méthode pour produire de la semence afin d'apprécier son niveau de méthylation à la décongélation.

Analyse du niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes après congélation/décongélation de la semence.

Nous avons montré qu'il y a une immense variabilité du niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes frais. Ceci pose la question de l'importance de ce paramètre pour la semence de poisson zèbre. L'analyse globale du niveau de méthylation de l'ADN que nous avons réalisé ne nous permet pas de savoir quel type de gène est plus ou moins méthylé. Wu *et al.* (2011) ont montré, sur les spermatozoïdes de poisson zèbre, que les gènes impliqués dans le développement précoce sont hypométhylés. Le niveau de méthylation de certains gènes

semble être important pour le développement. Nous pouvons supposer que ce niveau est très protégé dans les zones importantes du génome par un mécanisme, tandis que le reste de la chromatine serait relativement labile. Ce mécanisme de protection pourrait être mis en évidence par des études de méthylation gène à gène en choisissant des candidats fortement impliqués dans le développement précoce. La réponse du niveau de méthylation de l'ADN à la congélation de la semence est variable. La cryoconservation aurait un effet aléatoire sur le niveau de méthylation d'un sperme à l'autre. Il est difficile de cerner où cette variabilité prend ses racines. Elle peut relever du même phénomène de labilité de la chromatine évoqué pour le sperme frais. Personne n'a encore, à notre connaissance, recherché l'effet des biotechnologies sur la méthylation de l'ADN chez les animaux. Hao *et al.* (2001) ont montré un effet hypométhylant de la cryoconservation sur le niveau de méthylation des végétaux régénérés à partir d'apex ou de graines cryoconservées. Les végétaux sont très sensibles aux stress environnementaux, ce qui rend la comparaison avec notre étude difficilement envisageable.

Les difficultés rencontrées pour adapter le protocole d'extraction de l'ADN et d'analyse du niveau de méthylation chez les spermatozoïdes d'étalon ne nous ont pas permis de comparer les deux espèces. Une identification de la molécule à l'origine de l'inhibition des enzymes ou l'utilisation d'autres enzymes de restriction pourraient aboutir à l'appréciation du niveau de méthylation de la semence d'étalon. La méthode utilisée dans cette étude donne accès au niveau de méthylation global de la molécule d'ADN. Il serait intéressant de raisonner à l'échelle du gène. Le niveau de méthylation de chaque gène évolue au cours de la gamétogénèse puis du développement. À chaque étape, de nouveaux gènes sont amenés à être exprimés, ils vont se déméthyliser et d'autres vont se méthyliser pour stopper leur expression. Ce raisonnement à l'échelle du gène est plus compliqué à mettre en œuvre mais précis en terme de conséquences potentielles sur la fonction du spermatozoïde.

VI. CONCLUSION GENERALE

Les expériences d'extraction d'ADN et d'analyse de méthylation menées au cours de cette étude ont nécessité l'obtention de sperme de qualité en quantité suffisante, congelé dans des conditions permettant de conserver au mieux sa capacité de fécondance. Le sperme d'étalon est émis en quantité suffisante et la méthode de congélation est définie. Nous nous sommes assurés de sa qualité en utilisant le cahier des charges des Haras Nationaux. En revanche, la semence de poisson zèbre est émise en faible quantité, sa qualité est variable et le laboratoire ne disposait pas de méthode de congélation adaptée à ses conditions d'élevage. Nous avons mis en évidence qu'un régime alimentaire permet d'améliorer les capacités reproductrices des poissons. Les responsables de l'élevage vont compléter cette étude afin d'utiliser un seul aliment pour l'ensemble des poissons et de s'affranchir de l'élevage d'artémias, qui est contraignant. La mise au point de la méthode de congélation adaptée à nos conditions de laboratoire va permettre de répondre aux besoins de conservation des lignées d'intérêt et de création d'une cryobanque de l'espèce. L'analyse du niveau de méthylation du sperme sur une population importante de mâle (sperme frais : n=25, sperme congelé : n=22) a soulevé quelques interrogations. La grande variabilité du niveau de méthylation de la semence laisse supposer que la chromatine a un caractère labile. Une analyse plus fine de la méthylation,

gène à gène, permettrait d'avoir accès à l'effet de la cryoconservation sur la méthylation et de savoir si la congélation peut être à l'origine de caractères héréditaires.

VII. BIBLIOGRAPHIE

Articles de périodique :

- AMANN R.P., PICKETT B.W., 1987, *Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa*, Journal of Equine Veterinary Science, Vol. 7, p 145-173.
- BERGHMANS S., MORRIS J.P., KANDI J.P., LOOK A.T., 2004, *Zebrafish sperm cryopreservation*, Methods in cell biology, Vol.77, p 645-679.
- CAMPILLO A., 1975, *Données pratiques sur l'élevage au laboratoire des larves de Palaemon Serratus (Pennant)*, Rev. Trav. Inst. Pêches marit., Vol.39, p395-405.
- CORMIER N., SIRARD M.A., JANICE L. BAILEY, 1997, *Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation*, Journal of Andrology, Vol. 18, No. 4
- DEPINCE A., MARANDEL L., GOARDON L., LE BAIL P.Y., LABBE C., 2011, *Trout coelomic fluid suitability as goldfish oocyte extender can be determined by a simple turbidity test*, Theriogenology, Vol.75, p 1755-1761.
- HAGEDORN M., RICKER J., MCCARTHY M., MEYERS S.A., TIERSCH T. R., VARGA Z. M., KLEINHANS F.W., 2009, *Biophysics of zebrafish (Danio rerio) sperm*, Cryobiology, Vol. 58, p 12-19.
- HAO Y.J., LIU Q.L., DENG X.X., 2001, *Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels*, Cryobiology, Vol.43, p 46-53.
- HARVEY B., KELLEY R. N., ASHWOOD-SMITH M. J., 1982, *Cryopreservation of zebrafish spermatozoa using methanol*, Canadian Journal of Zoology, Vol. 60, p 1867-1870.
- HAYES M.C., RUBIN S.P., HENSLEIGH J.E., REISENBICHLER R.R., WETZEL L.A., 2005, *Performance of juvenile steelhead trout (Oncorhynchus mykiss) produced from untreated and cryopreserved milt*, Aquaculture, Vol. 249, p 291-302.
- HOLLIDAY R., 2006, *Epigenetics A Historical Overview*, Epigenetics, Vol. 1:2, p 76-80.
- JOHN E., PARKS and DANIEL V., LYNCH, 1992, *Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes*, Cryobiology, Vol.29, p255-266.
- KAWAI K., YUN-SHAN L., MING-FEN S., HIROSHI K., 2010, *DNA méthylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol.20, p260-265.
- KOPEIKA J., KOPEIKA E., ZHANG T., RAWSON D.M., HOLT W.V., 2003, *Detrimental effects of cryopreservation of loach (Misgurnus fossilis) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine*, Cryobiology, Vol.46, p43-52.
- LABBE C., MARTORIATI A., DEVAUX A., MAISSE G., 2001, *Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout*, Molecular Reproduction and Development, Vol. 60, p397-404.

- LEWIS S.E.M., AITKEN R.J., 2005, *DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy*, Cell and Tissue Research, Vol. 322, p 33-41.
- LOVE C.C., GARCIA M.C., RIERA F.L., HUGHES J.P., KENNEY R.M., 1991, *Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion*. Journal of Reproduction and Fertility Suppl., Vol. 44, p 99-105.
- MAZUR P., 1984, *Freezing of living cells: Mechanisms and implications*, American Journal of Physiology, Vol. 247, p 125-142.
- MORRIS J. P., BERGHMANS S., ZAHRIEH D., NEUBERG D. S., KANKI J. P., LOOK A. T., 2003, *Zebrafish sperm cryopreservation with N,N-dimethylacetamide*, Biotechniques, Vol. 35, p 956-968.
- PEREZ-CEREZALES S., MARTINEZ-PARAMO S., BEIRAO J., HERRAEZ M.P., 2010, *Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant*, Theriogenology, Vol. 74, p 282-289.
- PEREZ-CEREZALES S., MARTINEZ-PARAMO S., BEIRAO J., HERRAEZ M.P., 2010, *Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damage sperm and embryo developmental success*, Reproduction, Vol.139, p 989-997.
- PILLET E., BATELIER F., DUCHAMP G., FURTOSS V., LE VERN Y., KERBOEUF D., VIDAMENT M., MAGISTRINI M., 2008, *Freezing stallion semen in INRA96-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82*, Dairy Science and Technology, Vol.88, p 257-265.
- PILLET E., DUCHAMP G., BATELLIER F., BEAUMAL V., ANTON M., DESHERCES S., SCHMITT E., MAGISTRINI M., 2011, *Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders*, Theriogenology, Vol. 75, p 105-114
- RANSOM D. G., ZON L. I., 1999, *Collection, Storage, and Use of Zebrafish Sperm*, Methods in cell biology, Vol. 60, p 365-372.
- SCHERZER J., FAYER-HOSKEN R.A., ACEVES M., HURLEY D.J., JONES L., HEUSNER G.L., 2009, *Freezing equine semen: the effect of combinations of semen extenders and glycerol on post-thaw motility*, Australian Veterinary Journal Vol. 87.
- SPEYER B.E., PIZZEY A.R., RANIERI M., JOSHI R., DELHANTY J.D.A., SERHAL P., 2010, *Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation*. Human Reproduction, Vol.25, p1609–1618.
- VIDAMENT M., ECOT P., NOUE P., BOURGEOIS C., MAGISTRINI M., PALMER E., 2000, *Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa*, Theriogenology, Vol. 54, p907-919.
- SCHAGDARSURENGIN U., PARADOWSKA A., STREGER K., 2012, *Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction*,
- STRAHL B.D., ALLIS D., 2000, *The language of covalent histone modifications*, Nature, Vol.403 (6765), p41 - 5

- WATSON P.F., 2000, *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*, Animal Reproduction Science, Vol. 60-61, p481-492.
- WENDELL Q. SUN, CARL LEOPOLD A., CROWE LOIS M., CROWE JOHN H., 1996, *Stability of dry liposomes in sugar glasses*, Biophysical Journal, Vol.70, p1769-1776.
- WU Shan-Fu, ZHANG Haiying, CAIRNS Bradley R., 2011, *Genes for embryo development are packaged in blocks of multivalent chromatin in zebrafish sperm*, Genome Research, Vol. 21, p 578-589.
- YANG H., CARMICHAEL C., ZOLTAN M. VARGA, TIERSCH T.R., 2007, *Development of simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish Danio rerio*, Theriogenology, vol.68, p 128-136.
- YANG H., TIERSCH T. R., 2009, *Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, Medaka, and Xiphophorus*, Comparative Biochemistry and physiology, Part C, Vol. 149, p 224-232.

Ouvrages:

- THIBAUT C., LEVASSEUR M.C., 2001, *La reproduction chez les mammifères et l'Homme*, INRA et Ellipse, Paris, Chap. 17, p367-370.
- MAGISTRINI M., VIDAMENT M., 1992, *L'insémination artificielle chez les équidés*, Recueil de médecine vétérinaire spécial reproduction des équidés, Vol. 68, p 959-967.

Thèses et mémoire de fin d'études:

- CONRADT M., 2012, *Impact de la cryoconservation sur la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes chez le poisson rouge et le poisson zèbre*. Mémoire de fin d'études, Master Biologie, Agronomie, Santé (BAS), Spécialité Biologie Appliquée aux Productions et à la Santé Animales (BAPSA), soutenu le 20 juin 2012 à Agrocampus Ouest centre de Rennes.
- MEA-BATELIER F., 1997, *Identification, purification et mécanisme d'action d'éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoïdes équinés*. Thèse UFR Sciences et Techniques, soutenue le 5 juin 1997 à l'université François Rabelais de Tours.
- PILLET E., 2009, *Mise au point d'un milieu pour la cryopréservation de la semence équine et mécanismes de cryoprotection impliqués*. Thèse Agrocampus Ouest, soutenu le 18 décembre 2009 à Rennes, 291p.

Sites web :

- Les Haras Nationaux (2012). Stats et cartes : <http://statscheval.haras-nationaux.fr/core/tabbord.php> (consulté le 26/03/13).
- La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture (2012). Rapport de la FAO : <http://www.fao.org/docrep/016/i2727f/i2727f.pdf> (consulté le 21/05/2013).

INRA – RENNES Beaulieu LPGP	MODE OPERATOIRE	Code: Version : Date : 03/05/2013 Rédigé par : Pierre Milon
Procédure expérimentale		Nombre de pages : 5
Type de technique : Biologie moléculaire		
Récupération des gamètes par stripping chez le poisson zèbre.		

I. Objet, domaine d'application et limites d'utilisations

- Prélèvement de sperme de Zebrafish (poisson zèbre - *brachydanio rerio*, de la famille des cyprinidés) anesthésié et à jeun, en vue de :

1 - réaliser des fécondations *in vitro* (F.I.V.)

ou

2 - de le cryo-conserver.

Le sperme : liquide opalescent, blanchâtre, laiteux, plus ou moins épais, en fonction du nombre des spermatozoïdes (cellules) qu'il véhicule.

-Prélèvement d'ovocyte de Zebrafish (poisson zèbre – *brachydanio rerio*) anesthésié et à jeun, en vue de réaliser des fécondations *in vitro* (F.I.V).

→Limites :

La maturité sexuelle chez cette espèce est atteinte au bout de 10 à 12 semaines, pour les poissons les plus précoces, mais en élevage, pour obtenir un grand nombre d'embryons les reproductions se réalisent avec des poissons de 7 à 18 mois.

II. Matériel, produits et solutions

II.1. Matériel :

- tubes Eppendorf 1.5 ml (autoclavés)
- boîte polystyrène
- pipette pasteur
- cuillère à café en plastique
- boîte de pétrie
- 3 aquariums (un avec les poissons, un pour anesthésier et un de réveil)
- épuisette
- p200 et cônes associés

III.2. Produits

- Phénoxy-2-éthanol

Produit liquide, produit par SANOFI (Santé nutrition animale), distribué par le Département. Pisciculture et Aquaculture, La Ballastière , 33501 LIBOURNE.

Ce réactif est livré en bidon de plastique de 30 litres.

Un distributeur automatique équipe ce bidon de stock, pour permettre le prélèvement de plusieurs centilitres, dans un flacon en verre, stocké à proximité des zones de manipulation des poissons.

Le prélèvement des quelques ml, nécessaires à l'anesthésie programmée, se réalise avec une seringue.

Aspect : liquide huileux, incolore, de faible odeur aromatique, (MM : 138.16, d_{20}^{20} : 1.109).

La dilution du réactif est à réaliser extemporanément, l'opérateur portant une blouse fermée, des gants et des lunettes de sécurité,

- sous vive agitation, pour favoriser la dispersion du réactif modérément soluble dans l'eau.
- dans un récipient couvert.
- à raison d'une dilution à **1,17 %** du liquide huileux, incolore dans un volume déterminé et mesuré, d'eau de l'aquarium maintenue à 28°C.

III.3. Solutions

- Liquide coelomique de truite (LCT)

- HBSS 300

Milieu utilisé pour la dilution des spermatozoïdes de poisson zèbre (Yang *et al.*, 2007).

pour 500 ml :

NaCl	(58.44 g/mol)	0.137M	4 g
KCl	(74.55 g/mol)	5.4 mM	0.2 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	(246.47 g/mol)	1.0 mM	0.12g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	(147.02 g/mol)	1.3 mM	0.096g
Na ₂ HPO ₄	(358.14 g/mol)	0.25 mM	0.045 g
KH ₂ PO ₄	(136.1 g/mol)	0.44 mM	0.03 g
NaHCO ₃	(84.01 g/mol)	4.2 mM	0.18g
Glucose	(180.16 g/mol)	5.5 mM	0.5g

Le pH est de 8 (pas besoin de l'ajuster), PO 300 mOsm/kg

IV. Mode opératoire

IV.1. Anesthésie des poissons

Les poissons sont récupérés dans les circuits, et placés dans un aquarium contenant de l'eau à 28°C. Le stripping est réalisé à l'intérieur de la salle Zebrafish du bâtiment 5.

- Dans un aquarium, verser 250mL d'eau des circuits, ajouter 250µL de **phénoxy-2-éthanol**.
- Plonger 2 poissons dans l'aquarium d'anesthésie.
- Attendre 2min, récupérer un poisson à l'aide de l'épuisette.

Faire très attention à ne faire aucune pression sur la partie ventrale du poisson anesthésié!

- Déposer le poisson sur du sopalin humide.
- Plonger un nouveau poisson dans l'aquarium d'anesthésie.

IV.2. Récupération des gamètes par stripping

- Pour les femelles :
 - Prendre le poisson dans une main. L'autre main réalise une pression sur la partie ventrale. Une autre personne place la cuillère à café au niveau de la pupille pour récupérer la ponte.
 - Déposer l'ensemble de la ponte dans une boîte de pétrie.
 - Ajouter **500µL de LCT**.

- Déposer la boîte sur la glace.
- Pour les mâles :
 - Mettre **50 µL de HBSS300 dans Eppendorf.**
 - Mettre le poisson anesthésié sur le dos (privilégier une prise au niveau de la tête pour ne faire aucune pression sur la partie ventrale du poisson).
 - À l'aide d'une pipette pasteur, rincer la pupille avec du HBSS300.
 - Placer la pipette pasteur **à plat** sur la pupille, réaliser avec les doigts une légère pression sur le ventre du poisson.
 - Aspirer le sperme émis.
 - Mettre le sperme dans Eppendorf. Réaliser 2-3 aspi-refoule (**ne pas faire de bulles**).
 - Rajouter **150 µL de HBSS300** dans Eppendorf et le piquer sur glace.
- Placer le poisson dans l'aquarium de réveil qui contient l'eau des circuits à 26°C.
- Recommencer jusqu'au dernier poisson.

V. Hygiène et sécurité

Nom du produit	N° CAS	Phrases de risque	Risque et précautions d'utilisation/d'élimination
Phénoxy-2-éthanol	122-99-6	22,36	Irritation, corrosion.

RESUME :

1/ Anesthésier poisson

2/ Récupération des gamètes par stripping

Être très vigilant pendant la manipulation des poissons car la plus faible pression provoque une émission de sperme chez le mâle et une pression trop forte peut engendrer la mort de l'animal.

Annexe II: Protocole de récupération du sperme testiculaire chez le poisson zèbre par dissection

INRA – RENNES Beaulieu LPGP	MODE OPERATOIRE	Code: Version : Date : 03/05/2013 Rédigé par : Pierre Milon
<i>Procédure expérimentale</i>		Nombre de pages : 5
Type de technique : Biologie moléculaire		
Prélèvement de sperme testiculaire chez le poisson zèbre.		

I. Objet, domaine d'application et limites d'utilisations

Prélèvement de sperme de Zebrafish (poisson zèbre - *brachydanio rerio*, de la famille des cyprinidés) anesthésié et à jeun, en vue de :

1 - réaliser des fécondations *in vitro* (F.I.V.)

ou

2 - de le cryo-conserver.

Le sperme : liquide opalescent, blanchâtre, laiteux, plus ou moins épais, en fonction du nombre des spermatozoïdes (cellules) qu'il véhicule.

→Limites :

La maturité sexuelle chez cette espèce est atteinte au bout de 10 à 12 semaines, pour les poissons les plus précoces, mais en élevage, pour obtenir un grand nombre d'embryons les reproductions se réalisent avec des poissons de 7 à 18 mois.

II. Principe et références

Protocole tiré de :

Yang H., Carmichael C., Zoltan M. Varga, Tiersch T.R., 2007, *Development of simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish Danio rerio*, Theriogenology, vol.68, p 128-136.

III. Matériel, produits et solutions

III.1. Matériel :

- tubes Eppendorf 1.5 ml (autoclavés)
- boîte polystyrène
- boîte à dissection (4 aiguilles, ciseaux, 2 pinces, plaque polystyrène)
- épuisette
- Bécher 500 mL
- piston à tube de 1.5mL.
- p200 et cônes associés

III.2. Produits

- Phénoxy-2-éthanol

Produit liquide, produit par SANOFI (Santé nutrition animale), distribué par le Département Pisciculture et Aquaculture, La Ballastière , 33501 LIBOURNE.

Ce réactif est livré en bidon de plastique de 30 litres.

Un distributeur automatique équipe ce bidon de stock, pour permettre le prélèvement de plusieurs centilitres, dans un flacon en verre, stocké à proximité des zones de manipulation des poissons.

Le prélèvement des quelques ml, nécessaires à l'anesthésie programmée, se réalise avec une seringue.

Aspect : liquide huileux, incolore, de faible odeur aromatique, (MM : 138.16, d_{20}^{20} : 1.109).

La dilution du réactif est à réaliser extemporanément, l'opérateur portant une blouse fermée, des gants et des lunettes de sécurité,

- sous vive agitation, pour favoriser la dispersion du réactif modérément soluble dans l'eau

- dans un récipient couvert

- à raison d'une dilution à **1,17 ‰** du liquide huileux, incolore dans un volume déterminé et mesuré, d'eau de l'aquarium maintenue à 26°C

III.3. Solutions

- HBSS 300

Milieu utilisé pour la dilution des spermatozoïdes de poisson zèbre (Yang *et al.*, 2007).

pour 500 ml :

NaCl	(58.44 g/mol)	0.137M	4 g
KCl	(74.55 g/mol)	5.4 mM	0.2 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	(246.47 g/mol)	1.0 mM	0.12g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	(147.02 g/mol)	1.3 mM	0.096g
Na ₂ HPO ₄	(358.14 g/mol)	0.25 mM	0.045 g
KH ₂ PO ₄	(136.1 g/mol)	0.44 mM	0.03 g
NaHCO ₃	(84.01 g/mol)	4.2 mM	0.18g
Glucose	(180.16 g/mol)	5.5 mM	0.5g

Le pH est de 8 (pas besoin de l'ajuster), PO 300 mOsm/kg

IV. Mode opératoire

IV.1. Anesthésie des poissons

Les poissons sont préalablement récupérés dans les circuits, transportés jusque dans le laboratoire à l'aide d'un aquarium contenant de l'eau des circuits à 26°C.

- Dans bécber de 500mL, verser 100mL d'eau de l'aquarium y ajouter **100µL de phénoxy-2-éthanol** (sous hotte et agitation).
- Plonger les poissons dans le bécber, attendre 2 min.
- Rincer les poissons à l'eau de l'aquarium.
- Placer les poissons sur glace.

IV.2. Dissection

Utiliser la loupe binoculaire de la salle de micromanip pour réaliser la dissection.

- Préparer autant de tube Eppendorf que de poisson à collecter.
- Mettre **60µL de HBSS300** dans chaque tube et les piquer dans la glace.
- Fixer à l'aide des aiguilles le poisson sur le dos sur la plaque en polystyrène.
- Réaliser une incision depuis l'orifice urogénital jusqu'à la base des ouïes.
- Dégager les testicules en retirant les viscères et le tissu adipeux (les testicules sont

- bien visibles, ils forment un H blanchâtre de part et d'autre de la vessie gazeuse).
- Prélever les testicules à l'aide d'une pince et les déposer dans un tube contenant du HBSS300.
- Piquer tube dans la glace.

IV.3. Traitement du sperme testiculaire récupéré

- Broyer les testicules à l'aide d'un piston.
- Laver le piston dans le tube par un ajout de **60µL de HBSS300**.
- Filtrer le sperme dilué sur nylon :
- Utiliser un bouchon troué d'Eppendorf.
- Placer un filtre nylon entre le tube et le bouchon troué.
- Prélever le sperme dilué et le déposer sur le filtre.
- Centrifuger à 600 g pendant 5 sec.

V. Hygiène et sécurité

Nom du produit	N° CAS	Phrases de risque	Risque et précautions d'utilisation/d'élimination
Phénoxy-2-éthanol	122-99-6		Irritation, corrosion.

RESUME :

1/ Anesthésier poisson

2/ Dissection des gonades

3/ Traitement du sperme testiculaire

- Broyer testicules.
- Filtrer sur nylon.

INRA – RENNES Beaulieu LPGP	MODE OPERATOIRE	Code: Version : Date : 25/04/2013 Rédigé par : Pierre Milon
Procédure expérimentale		Nombre de pages : 6
Type de technique : Biologie moléculaire		
Congélation du sperme de poisson zèbre.		

I. Objet, domaine d'application et limites d'utilisations

La cryoconservation permet de conserver le patrimoine génétique des mâles indéfiniment. Le processus de congélation/décongélation altère la qualité des spermatozoïdes. La méthode doit limiter ces altérations afin de préserver le pouvoir fécondant de la semence.

L'utilisation de semence congelé permet de conserver des souches d'intérêts au sein de cryobanque. Elle permet également de limiter les coûts dans les schémas de sélection en réduisant le temps de conservation des reproducteurs *in situ*.

II. Principe et références

Protocole tiré de :

Yang H., Carmichael C., Zoltan M. Varga, Tiersch T.R., 2007, *Development of simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish Danio rerio*, Theriogenology, vol.68, p 128-136.

III. Matériel, produits et solutions

III.1. Matériel :

- tubes Eppendorf 1.5 ml (autoclavés)
- paillettes de 250 µL
- seringue

- gaine en caoutchouc
- congélateur programmable (CryoBioSystem Planer Kryo 360-3.3)
- cuve en inox
- p1000 et cônes associés
- p200 et cônes associés

III.2. Produits

- Methanol 100%
- Saccharose, 126 mM (M=342.3 g/mol, m=43g dans un litre)

III.3. Solutions

- HBSS 300

Milieu utilisé pour la dilution des spermatozoïdes de poisson zèbre (Yang et *al.*, 2007).

pour 500 ml :

NaCl	(58.44 g/mol)	0.137M	4 g
KCl	(74.55 g/mol)	5.4 mM	0.2 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	(246.47 g/mol)	1.0 mM	0.12g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	(147.02 g/mol)	1.3 mM	0.096g
Na ₂ HPO ₄	(358.14 g/mol)	0.25 mM	0.045 g
KH ₂ PO ₄	(136.1 g/mol)	0.44 mM	0.03 g
NaHCO ₃	(84.01 g/mol)	4.2 mM	0.18g
Glucose	(180.16 g/mol)	5.5 mM	0.5g

Le pH est de 8 (pas besoin de l'ajuster), PO 300 mOsm/kg

-HBSS600

Pour 250 ml :

NaCl	(58.44 g/mol)	0.137M	4 g
KCl	(74.55 g/mol)	5.4 mM	0.2 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	(246.47 g/mol)	1.0 mM	0.12g

CaCl ₂ , 2 H ₂ O (147.02 g/mol)	1.3 mM	0.096g
Na ₂ HPO ₄ (358.14 g/mol)	0.25 mM	0.045 g
KH ₂ PO ₄ (136.1 g/mol)	0.44 mM	0.03 g
NaHCO ₃ (84.01 g/mol)	4.2 mM	0.18g
Glucose (180.16 g/mol)	5.5 mM	0.5g

Le pH est de 8 (pas besoin de l'ajuster), PO 600 mOsm/kg

IV. Mode opératoire

IV.1. prélèvement et conservation du sperme

1/ prélèvement

* Sperme : prélever le sperme dans les circuits, le diluer dans 200µL de HBSS300 (voir protocole de stripping des poissons zèbres).

2/ conservation

Conserver les Eppendorfs de 1.5mL contenant le sperme dilué piqués dans la glace.

IV.2. Comptage du nombre de cellule

Pour s'assurer qu'il y a du sperme dans l'Eppendorf il est nécessaire de compter les spermatozoïdes sur cellule de Toma sans dilution supplémentaire.

IV.3. Congélation de la semence

- Préparer dilueur de congélation

42 volumes de HBSS600	}	MeOH 16% + saccharose 10 %
16 volumes de MeOH 100%		
10 volumes de saccharose (126 mM)		
32volumes d'eau distillée		

- Préparer Méthanol 8%

46 volumes de HBSS600	}	MeOH 8%
8 volumes de MeOH 100%		
46 volumes d'eau distillée		

- Mettre en paillette

Ajouter à chaque échantillon de sperme **200µL de dilueur de congélation (MeOH 16%)**, de façon à avoir du MeOH 8% en concentration finale.

NB : Si le sperme n'a pas été dilué dans 200 μ L de HBSS300, faire une dilution à volume équivalent de façon à avoir pour 1 volume de sperme dilué 1 volume de dilueur.

À l'aide d'un feutre, identifier les paillettes et diviser les en 5 parties égales.

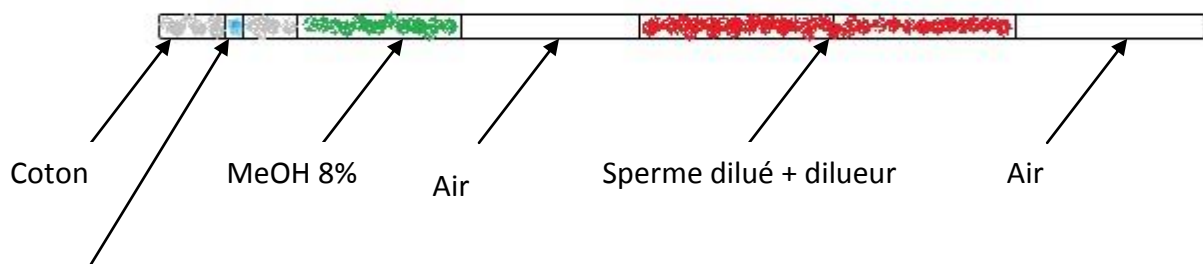
Allumer le congélateur programmable.

Choisir le profil « Zebr » (descente de +2°C à -80°C selon une vitesse de -10°C/min).

Laisser la chambre du congélateur refroidir jusqu'à +2°C.

Mettre en paillette avec la seringue surmontée d'un tube en caoutchouc :

- Aspirer jusqu'à la première marque du MeOH 8% seul ;
- Aspirer de l'air, l'équivalent d'une partie de la paillette ;
- Aspirer le mélange (vol/vol) de sperme + dilueur, l'équivalent de 2 parties ;
- Aspirer de l'air sur la dernière partie.



Poudre polymérisée

- Placer les paillettes une fois remplies sur glace.
- Transférer les paillettes sur les tiges du congélateur programmable.
- Placer les tiges dans le congélateur programmable.
- Lancer la descente de température.

Pendant la descente de température, aller chercher de l'azote liquide à l'aide de la cuve en inox pour transférer les paillettes du congélateur à la cuve. Penser à préparer un gobelet identifié.

- Transférer les paillettes dans la cuve de stockage.

V. Hygiène et sécurité

Nom du produit	N° CAS	Phrases de risque	Risque et précautions d'utilisation/d'élimination
Méthanol	67-56-1	11-23/24/25- 39/23/24/25	-Toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion -Inflammable - Peut se charger électrostatiquement avec risque d'ignition

RESUME :

1/ Collecter sperme

* Sperme dilué dans 200 μ L de HBSS300 (Voir protocole de collecte du sperme de poisson zèbre).

2/ Compter nombre de spermatozoïdes

Compter spermatozoïdes sur cellule de Toma.

3/ Congélation de la semence

Ajouter un volume équivalent à celui du sperme dilué de dilueur (MeOH16% + saccharose).

Mettre en paillette.

Appliquer la descente de température.

Transférer les paillettes dans la cuve de stockage

Annexe IV: Protocole de congélation de la semence équine

Protocole d'utilisation du milieu de congélation INRA-IMV de semence équine

(Thèse Elodie PILLET)

Ce mode d'emploi tient compte des résultats in vitro et in vivo obtenus au sein de l'Unité de Recherche de Physiologie de la Reproduction et des Comportements et de l'Unité Expérimentale Equine de l'INRA, 37380 Nouzilly, France.

☞ Les références bibliographiques ci-dessous concernent le milieu INRA96 + jaune d'œuf + glycérol et en particulier le protocole de congélation et de préparation du milieu.

PILLET E. et al., 2008. Freezing stallion semen in INRA96[®] based extender improves fertility rates in comparison to INRA82, Dairy Science and Technology, vol.88, n 2, p257-265.

PILLET E. et al., 2008. Le milieu INRA96[®] supplémenté de jaune d'œuf et de glycérol améliore la fertilité en Insémination Artificielle de semence Congelée, 35^{ème} Journée de la Recherche Equine, p39-48.

☞ Collecte de la semence et 1^{ère} dilution

1°/ Collecter la semence, la filtrer puis évaluer sa concentration en spermatozoïdes au photomètre.

2°/ Diluer la semence dans le milieu INRA96[®] dans un bain-marie à +37°C : 1/4 de semence pour 3/4 de milieu. Remarque : pour les étalons dont la semence est peu concentrée la dilution minimum est de 1/3 de semence pour 2/3 de milieu.

3°/ Refroidir la semence diluée, dans un bain-marie à +22°C, pendant 10 minutes.

☞ 2^{ème} dilution et congélation

1°/ Centrifuger la semence refroidie, à 600g, pendant 10 minutes. Eliminer le surnageant.

2°/ Resuspendre le culot de spermatozoïdes dans le milieu de congélation, afin d'obtenir une concentration finale de 100×10^6 spermatozoïdes par mL.

Pour cela :

- Ajouter la moitié du volume théorique de milieu de congélation, soit :

Volume à ajouter = $\frac{1}{2} \times [\text{volume de semence} \times \text{concentration évaluée}] / 100$

- Mesurer avec exactitude à la cellule hématimétrique la concentration en spermatozoïdes

- Ajouter le reste du volume de milieu de congélation afin d'ajuster la concentration à 100×10^6 spermatozoïdes par mL soit :

Volume à rajouter = [concentration exacte mesurée x volume de milieu de congélation précédemment ajouté] / 100.

3°/ Refroidir la semence ainsi diluée à +4°C pendant 75 minutes.

4°/ Mettre la semence en paillettes.

5°/ Congeler les paillettes dans une cuve à large ouverture, en les plaçant 10 minutes à 4cm au dessus du niveau d'azote liquide, ou bien congeler les paillettes dans un congélateur programmable, selon une descente de température de -60°C par minute, de +4°C à -140°C.

6°/ Plonger les paillettes dans l'azote liquide à -196°C, où elles seront stockées.

INRA – RENNES Beaulieu LPGP	MODE OPERATOIRE	Code: Version : Date : 30/04/2013 Rédigé par : Pierre Milon
<i>Procédure expérimentale</i>		Nombre de pages : 6
Type de technique : Biologie moléculaire		
Enzyme de restriction pour analyse du niveau de méthylation d'ADN de spermatozoïde.		

I. Objet, domaine d'application et limites d'utilisations

L'utilisation d'enzyme de restriction permet après migration sur gel d'agarose d'évaluer le niveau de méthylation de l'ADN.

II. Matériel, produits et solutions

II.1. Matériel :

- Pipettes P10 et P200
- Tubes PCR
- Centrifugeuse pour tubes PCR
- Bain marie
- Vortex

II.2. Produits

- Promega 1 kb DNA Ladder réf G5711 = marqueur de taille et tampon de charge :

*** marqueur de taille : réf G571A (500µl)**

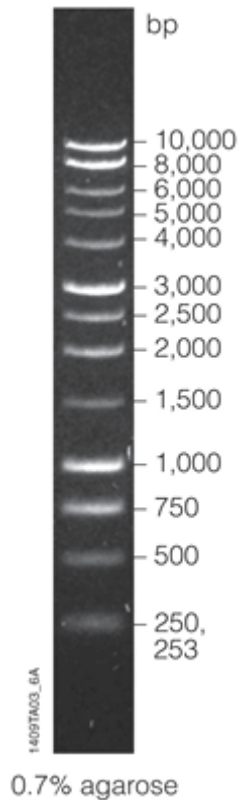
Mettre 100 µl du tampon de charge dans le tube du marqueur de taille qui devient prêt à l'emploi.

Stocker à 4°C (frigo labo, étagère Alex)

*** tampon de charge : réf G190A (1 ml) Blue/Orange 6X Loading Dye**

Prêt à l'emploi

Stocker à 4°C (frigo labo, étagère Alex)



- Gel Red Nucleic Acid Gel Stain, 10 000X in water :
Biotum cat. n° 41 003 (frigo labo, étagère Alex)

RQ : Utilisation possible de Syber Green (salle BM) – voir les conditions d'utilisation

- BSA : 10 mg/ml 100X : Bovine Serum Albumin Acetylated (congélateur, étagère Alex)
- Buffer A : 10X (congélateur, étagère Alex)
- Buffer B : 10X (congélateur, étagère Alex)
- MspI (congélateur, étagère Alex)
- HpaII (congélateur, étagère Alex)

II.3. Solutions

- tampon TAE solution stock à 50X (labo PYLB, @RT)

Produit	Fournisseur et Référence	PM en g/mol	Conc. en M	QSP
Tris Base		121.14	2M	242 g
Acide acétique glacial				57.1 ml
EDTA 0.5 M pH 8	Sigma E5134	372.2	0.5M	100 ml

- tampon TAE 1X

Diluer 50 fois la solution mère dans de l'eau mQ.

Stocker dans le labo @RT

- agarose

Agarose Molecular Biology Grade Eurogentec réf. EP-0010-05 (labo)

III. Mode opératoire

III.1. Préparer les échantillons pour digestion

Identifier la quantité d'ADN en solution nécessaire pour avoir 1 µg d'ADN par puits à l'aide du gel d'agarose réalisé lors de l'extraction d'ADN.

Sortir les échantillons d'ADN du réfrigérateur, les placer dans un bain marie pendant 5 minutes puis réaliser un vortex doux.

Mettre dans chaque tube la bonne quantité d'ADN.

Remplir le tableau suivant.

	spz			spz			spz			spz			Nageoire contrôle @ 1.2 µg/µl		
	témoin	Mspl	Hpall	témoin	Mspl	Hpall	témoin	Mspl	Hpall	témoin	Mspl	Hpall	témoin	Mspl	Hpall
Buffer B pour témoin et Mspl Buffer A pour Hpall	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
BSA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
ADN 1 µg													1	1	1
H2O													16,8	16,3	16,2
Mspl ou Hpall	X	0,5	0,6	X	0,5	0,6	X	0,5	0,6	X	0,5	0,6	X	0,5	0,6

Ajouter pour chaque tube le tampon, la BSA, l'eau et l'enzyme.

RQ : Les pipetages de la BSA, des enzymes des tampons et de l'eau sont très petits, il est plus judicieux de préparer au préalable les mélanges.

Centrifuger.

Incuber 1h30 à 37°C.

III.2. Couler le gel d'agarose

Pendant l'incubation couler un gel d'agarose à 0.8%.

Préparer le mélange tampon de charge + gel red. Prévoir 3µl de tampon de charge et 0.2µl de gel red par échantillon.

RQ : conserver le mélange au réfrigérateur enveloppé dans de l'aluminium.

III.3. Préparer échantillons pour déposer sur gel

Déposer sur chaque échantillon 3µl du mélange tampon de charge + gel red.

Centrifuger.

III.4. dépôt des échantillons

- déposer le gel (avec le support) dans le système de migration (bien enlever tout le gel qui colle sous le support et sur les côtés).

- recouvrir de tampon de migration = TAE 1X (ou vérifier le niveau si la cuve est déjà pleine, le tampon doit recouvrir le gel).

- déposer **3.5 µl du marqueur de taille + 3.5µl d'eau mQ (additionné de 3µl du mélange tampon de charge + gel red)** dans le 1er puits.

- déposer les échantillons dans les puits suivants.

III.5. migration

- faire migrer le gel à 100V.
- arrêter la migration quand la première bande colorée (orange) arrive en bas du gel.

Cela prend environ 20-25 minutes.

RQ : A la fin de la migration, laisser le tampon dans la cuve, il s'utilise plusieurs fois (jusqu'à ce qu'il soit sali par une migration trop longue (couleur orange du tampon). Il est de toute façon partiellement renouvelé à chaque migration.

III.6. lecture et prise de photo du gel

Dans la salle des séquenceurs.

Logiciel Fusion.

Suivre les instructions affichées sur l'appareil.

RQ : Pour pouvoir analyser les photos des gels d'ADN digéré par des enzymes de restriction, il ne faut pas que l'image soit saturée donc, penser à afficher la saturation et choisir un temps d'exposition approprié.

Penser à noter le temps d'exposition, cela facilite la comparaison entre plusieurs gels.

IV. Traitements et éliminations des déchets

- Gel Red :
Classé non dangereux et pouvant être jeté avec les ordures ménagères.
Cependant, les gels d'agarose sont à jeter dans un seau avec les déchets Syber (seau présent dans la salle des séquenceurs).
- TAE : à jeter dans bidon blanc (salle BM)

V. Hygiène et sécurité

Nom du produit	N° CAS	Phrases de risque
Agarose	9012-36-6	Non dangereux
Marqueur de taille et tampon de charge		Non dangereux
Gel Red		Non dangereux

RESUME :

A/ Préparer échantillons

Il faut déposer 1 µg d'ADN (eau qsp 17 µl dans la plupart des cas)

Compléter en ajoutant, 2µL de tampon, 0.2µL de BSA et l'enzyme de restriction

Bien homogénéiser

Centrifuger (centri de paillasse quelques secondes)

B/ Couler gel d'agarose 0.8%.

- peser 0.4 g (ou 0.5g) d'agarose dans un Erlen en verre.
- ajouter 50 ml de TAE.
- chauffer au micro-onde pour dissoudre l'agarose.
- mettre en place le rack dans le support pour couler le gel (la bande noir vers le haut pour mieux visualiser l'échantillon lors du dépôt).
- mettre le peigne (peigne à petites dents ou grandes dents selon le nombre d'échantillons)
- couler l'agarose
- attendre la polymérisation du gel


C/ dépôt des échantillons

- Ajouter à chaque échantillon 3µl du mélange tampon de charge + gel red.
- Centrifuger.
- déposer le gel (avec le support) dans le système de migration (enlever l'excédent de gel avec un sopalin).
- recouvrir de tampon de migration = TAE 1X
- déposer **3.5 µl du marqueur de taille + 3.5µl d'eau mQ (additionné de 3 µl du mélange tampon de charge et gel red)** dans le 1er puits.
- déposer les échantillons dans les puits suivants.

D/ migration

- faire migrer le gel à 100V.
- arrêter la migration quand la dernière bande arrive en bas du gel (environ 20-25 minutes).

E/ lecture et prise de photo du gel (dans la salle des séquenceurs)

	Diplôme : Ingénieur Agronome Spécialité : Productions Animales Spécialisation/option : Ingénierie Zootechnique Enseignant référent : Frédéric Lecerf
Auteur : Pierre Milon	Organisme d'accueil : INRA LPGP
Date de naissance : 20/10/1989	Adresse : Campus de Beaulieu
Nb pages : 20	Avenue du Général Leclerc 35042, Rennes Cedex
Annexes : 5	Maître de stage : Catherine Labbé
Année de soutenance : 2013	
Titre français : Étude de l'impact de trois conditions d'élevage du poisson zèbre et mise au point d'une méthode de congélation de sa semence, dans l'optique de réaliser une analyse comparative entre le niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de poisson zèbre et d'étalon après congélation/décongélation. Titre anglais : Impact of three zebrafish rearing conditions and optimization of semen cryopreservation in zebrafish, in the context of a comparative analysis between the level of DNA methylation of zebrafish and stallion spermatozoa after freezing/thawing.	
Résumé : La méthylation de l'ADN est une marque épigénétique qui participe à la régulation de l'expression des gènes, et il est avancé que le profil de méthylation des spermatozoïdes est important pour le développement embryonnaire précoce. La finalité du présent travail est d'évaluer l'impact de la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN. Deux espèces dont l'organisation nucléaire des spermatozoïdes est très différente ont été choisies, le poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>) et le cheval. En préalable, nous devions optimiser la méthode de cryoconservation du sperme de poisson zèbre. Face à la très faible production de gamètes chez cette espèce, nous avons recherché une amélioration de la production gamétique en jouant sur l'alimentation des géniteurs. Nous avons montré que le régime Tétramin® + Gemma Wean® améliorait la croissance et favorisait l'émission des gamètes. La qualité des gamètes avec ce régime est équivalente à celle obtenue avec un régime supplémenté en proies vivantes. La méthode de cryoconservation optimale dans nos conditions a consisté à utiliser un cryoprotecteur contenant 8 % de méthanol et 63 mM de saccharose, à une vitesse de -10 °C/min. Après cryoconservation, le niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de poisson est affecté de façon complètement aléatoire, certains spermatozoïdes montrant une hyperméthylation, d'autres une hypométhylation. Aucune donnée de méthylation n'a pu être obtenue sur le sperme d'étalon, du fait de difficultés méthodologiques dont nous avons cherché à comprendre l'origine.	
Abstract: DNA methylation is an epigenetic mark which participates in the regulation of gene expression. It is suggested that the methylation profile of spermatozoa is an important factor for early embryonic development. The purpose of this study was an evaluation of the impact of cryopreservation on sperm DNA methylation. We have selected two species with very different sperm nuclear organization, the zebrafish (<i>Danio rerio</i>) and the stallion. Zebrafish produce a very low quantity of gametes. In a first step, we sought to improve gamete production by way of the fish diet. We have shown that the Tétramin® + Gemma Wean® diet improved growth and favored gametes release. Gametes quality was equivalent to that obtained with a diet supplemented with live brine shrimps. In a second step, we tried to optimize the method of zebrafish sperm cryopreservation. The optimal cryopreservation method in our conditions was to use a cryoprotectant containing 8% of methanol and 63mM of sucrose at a cooling rate of -10°C/min. After cryopreservation, the level of DNA methylation of fish spermatozoa was altered completely randomly. Some sperm showed hypermethylation, other hypomethylation. No methylation data were obtained on stallion sperm, due to methodological difficulties whose origin was sought.	
Mots-clés : poisson zèbre, cheval, spermatozoïdes, semence congelée, ADN, méthylation.	
Key Words: zebrafish, stallion, spermatozoa, frozen sperm, DNA, methylation.	