



Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs



Motilité des spermatozoïdes du chevalier cuivré dans les différents traitements de cryopréservation en 2013

Décembre 2019

VACHON, N., S. VELÁSQUEZ-MEDINA et P. GRONDIN (2019). *Motilité des spermatozoïdes du chevalier cuirré dans les différents traitements de cryopréservation en 2013*, ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Direction de la gestion de la faune de l'Estrie, de Montréal, de la Montérégie et de Laval, Secteur de la faune, Rapport technique 16-47, 24 p.

La version intégrale de ce document est accessible sur le site Internet du Ministère à : mffp.gouv.qc.ca.

Crédit photo de la page couverture : Nathalie Vachon, MFFP.

© Gouvernement du Québec

Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs

Dépôt légal — Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2019

ISBN (PDF) : 978-2-550-85689-4

ÉQUIPE DE RÉALISATION 2013

Plusieurs personnes sont impliquées dans la réalisation de ces travaux visant le développement de techniques de cryopréservation de la laitance du chevalier cuirvé.

Chargée de projet et coordination : Nathalie Vachon¹

Développement de dilueurs pour la laitance

Paul Grondin²
Nathalie Vachon¹
Sandra Velásquez³

Cryopréservation de la laitance

Sandra Velásquez³
Nathalie Vachon¹
Paul Grondin²

Évaluation du taux de fécondation

Paul Grondin²

Examen des échantillons cryopréservés

Sandra Velásquez³

Reproduction artificielle et prélèvement de gamètes

Paul Grondin²
Huguette Massé¹
Nathalie Vachon¹
Sandra Velásquez³

Entretien de la banque de laitance

Sandra Velásquez³
Claude Sirois¹

Analyse et rédaction

Nathalie Vachon¹
Sandra Velásquez³

Révision finale du document

Chantal Côté
Paul Grondin
Daniel Pouliot

Mise en page

Jessica Dubé
Sophie Lebarbé

¹ MDDEFP, Direction régionale de l'Estrie, de Montréal et de la Montérégie, Secteur de la faune.

² MDDEFP, Direction de la faune aquatique, Direction générale de l'expertise sur la faune et ses habitats.

³ COVABAR : Comité de concertation et de valorisation du bassin de la rivière Richelieu.

⁴ MDDEFP, Direction régionale de Laval et de Lanaudière, Secteur de la faune

TABLE DES MATIÈRES

ÉQUIPE DE RÉALISATION 2013.....	I
TABLE DES MATIÈRES	II
LISTE DES TABLEAUX	III
LISTE DES FIGURES.....	III
AVANT-PROPOS	IV
RÉSUMÉ	V
1 INTRODUCTION	1
2 LA CRYOPRÉSERVATION EN BREF	1
3 MATÉRIEL ET MÉTHODES	2
3.1 Capture et manipulation des géniteurs	2
3.2 Prélèvement et évaluation de la qualité de la laitance	2
3.3 Méthodes de cryopréservation	3
3.4 Évaluation de la motilité après la congélation	4
3.5 Évaluation de la toxicité d'un cryoprotecteur.....	4
3.6 Fécondation et suivi du développement embryonnaire et larvaire	4
3.7 Analyses statistiques.....	5
4 RÉSULTATS	5
4.1 Caractéristiques de la laitance.....	5
4.2 Toxicité des cryoprotecteurs.....	5
4.3 Congélation et décongélation de la laitance chez le chevalier cuivré.....	6
4.4 Motilité postcongélation	6
4.4.1 Généralités.....	6
4.4.2 Effet de la concentration du cryoprotecteur	10
4.4.3 Effet de la méthode de congélation	10
4.4.4 Effet du format des paillettes	10
4.4.5 Effet de l'osmolalité du dilueur.....	12
4.4.6 Taux de motilité postcongélation en fonction de la date de congélation des échantillons	12
4.5 Fécondation	14
5 DISCUSSION.....	15
6 CONCLUSION.....	17
RECOMMANDATIONS	18
LEXIQUE	20
PARTENAIRES FINANCIERS.....	21
REMERCIEMENTS	21
BIBLIOGRAPHIE	23

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Description du type de mouvement des spermatozoïdes associé à différentes catégories de motilité (modifié de Legendre et Billard, 1980). 3
- Tableau 2.** Tests de toxicité du méthanol et du DMSO à différentes concentrations avec la laitance de chevalier cuivré dans trois dilueurs à différentes osmolalités. 7
- Tableau 3.** Résultats détaillés de la motilité postcongélation (taux et durée) des spermatozoïdes du chevalier cuivré dans les différents traitements de 2013 en fonction des formats de paillettes. 8
- Tableau 4.** Motilité postcongélation (taux et durée) des spermatozoïdes du chevalier cuivré dans les différents traitements de 2013 sans égard au format des paillettes. 9
- Tableau 5.** Comparaison de la motilité postcongélation (taux et durée) des spermatozoïdes du chevalier cuivré congelés dans le contenant de conservation à sec au LN₂ dans le RATH et le HBSS à différentes osmolalités. 13

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Motilité moyenne des spermatozoïdes du chevalier cuivré mesurée en 2013 dans les différents formats de paillettes selon les deux méthodes de congélation, sans égard au traitement (dilueur et cryoprotecteur). Effet du médium de congélation (format des paillettes) n = nombre de paillettes examinées, *dry-shipper* : contenant de conservation à sec au LN₂. 11
- Figure 2.** Taux de motilité moyen (axe de gauche) des spermatozoïdes postcongélation dans le RATH (335)-Méthanol (11 %)-congelés dans le contenant de conservation à sec au LN₂ (tous formats de paillettes confondus) à différentes dates de congélation et températures de l'eau (axe de droite) en 2013. La droite représente la régression linéaire à partir des données de la motilité. 14

AVANT-PROPOS

Ce rapport est une version révisée et mise à jour du livrable final produit grâce au financement obtenu de la Fondation de la faune du Québec pour le projet NO : 6-6150-0129. Les travaux de reproduction artificielle et de cryopréservation de la laitance du chevalier cuivré ont obtenu un certificat de bons soins aux animaux (CPA-FAUNE 13-22). Ce rapport fait également office de livrable pour le permis de recherche et de collecte de l'Agence Parcs Canada NO : CSO-2007-1114.



RÉSUMÉ

Le chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*) est une espèce menacée vivant uniquement au Québec, qui est soutenue par la reproduction artificielle depuis 2004 dans le but de reconstituer le stock reproducteur de cette population unique à l'échelle mondiale. Comme les mâles reproducteurs se faisaient de plus en plus rares (taux de recapture élevé depuis 2007 et abondance en déclin) et que l'asynchronie parfois importante entre les mâles et les femelles lors de leur capture limitait les performances du plan de reproduction, des travaux visant le développement de protocoles de cryopréservation de la laitance ont été amorcés en 2012. La cryopréservation est un procédé permettant de conserver et de stocker des cellules en les maintenant à très basse température (-196 °C) dans l'azote liquide. Ces travaux visent d'abord à remédier aux problèmes rencontrés, mais permettent également de maximiser la diversité génétique de l'espèce par la production d'un plus grand nombre de familles. La capture de géniteurs a débuté le 3 juin 2013 et s'est poursuivie sans interruption jusqu'au 26 juin. Ces travaux ont été réalisés au Lieu historique national du Canal-de-Saint-Ours, plus précisément à la passe migratoire Vianney-Legendre. À la lumière des résultats de 2012, des éléments supplémentaires ont été expérimentés. Au total, 12 traitements ont été expérimentés en 2013. Deux dilueurs, soit le HBSS ainsi que le CryoFish, ont été ajoutés au RATH et testés à différentes osmolalités en 2013. Les cryoprotecteurs utilisés à différentes concentrations en 2013 ont été le méthanol et le diméthylsulfoxyde (DMSO; nouveau en 2013). Des tests de toxicité des cryoprotecteurs, en combinaison avec tous les dilueurs, ont été réalisés à différentes concentrations. Les paillettes de 1,2 ml ont été ajoutées aux formats déjà utilisés (0,5 et 2,5 ml). Le contenant de conservation à sec au LN₂ (*dry-shipper*) a principalement été utilisé comme technique pour la première phase de congélation. Onze des treize chevaliers cuivrés mâles manipulés (LT moy. = 616,3 mm et poids moy. = 3,33 kg) ont pu être intégrés aux activités de cryopréservation. Au total, 416 paillettes de 0,5 ml, 94 paillettes de 1,2 ml et 164 paillettes de 2,5 ml ont été congelées en 2013. Des taux moyens de motilité postcongélation variant de 1 % à 31 % (2 à 10 secondes) ont été obtenus dans les différents traitements. En 2013, les meilleurs taux de motilité ont été obtenus par la technique de congélation dans le contenant de conservation à sec au LN₂ avec le cryoprotecteur DMSO à des concentrations de 10 % et de 7,5 %, en combinaison avec le CryoFish (taux respectifs de 18,8 % et de 25 %) et le RATH à une osmolalité de 335 mOsm à une concentration de 10 % (23,3 % à 31 %). Quelques traitements impliquant le méthanol à des concentrations de 10 % et de 11 % en combinaison avec le RATH ont également donné des résultats satisfaisants, avec des taux de motilité variant de 10 % à 15 % dans les paillettes de 0,5 et de 1,2 ml après la congélation. Peu importe le traitement, les taux de motilité ont été plus faibles dans les paillettes de 2,5 ml. En 2013, il a été possible de développer les techniques de manipulation pour la fécondation de plus grands volumes d'ovocytes avec la laitance cryopréservée en 2012, ce qui a permis de bonifier de 11 % le nombre de familles. Quelque 3 550 fretins d'automne issus de laitance cryopréservée ont été ensemencés dans la rivière Richelieu en septembre 2013. Les essais de 2012 et de 2013 permettent de mettre en évidence que la performance des résultats de cryopréservation de la laitance serait liée à des variations interannuelles et même individuelles. Par rapport aux résultats obtenus l'année dernière, les taux de motilité postcongélation étaient inférieurs en 2013. Les analyses montrent aussi qu'en 2013 les taux de motilité mesurés dans les échantillons congelés au début de la saison sont légèrement plus faibles que dans ceux congelés plus tardivement. La température de l'eau au moment des activités pourrait être un facteur important qui explique certains écarts. L'année 2013 a été la plus froide depuis le début des activités et ce facteur pourrait avoir ralenti la maturation finale des gonades chez les mâles. Des observations similaires ont été réalisées chez d'autres espèces et cette hypothèse ne peut être exclue chez le chevalier cuivré. La cryopréservation de la laitance constitue une technique de choix pour maximiser l'efficacité du plan de reproduction de cette espèce. Grâce aux travaux de 2013, il est possible de préciser plusieurs orientations pour les prochaines années. Bien que ces travaux soient

encore au stade de la recherche et du développement, ils trouvent déjà leur application grâce à la banque de laitance cryopréservée de chevalier cuivré disponible depuis 2012. Cette banque, qui a été enrichie en 2013, permettra également de procéder à des fécondations en l'absence de mâle, si la situation se présente durant les prochaines années.

1 INTRODUCTION

Le chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*) a été désigné menacé par le Comité sur le statut des espèces menacées de disparition au Canada (CSEMDC) en 1987 (Mongeau et coll., 1988), puis en 1999 en vertu de la Loi sur les espèces menacées ou vulnérables du Québec (Comité d'intervention, 1995; La Haye et Huot, 1995). Depuis 2004, l'espèce est considérée en voie de disparition (COSEPAC, 2004) et est légalement désignée comme telle, depuis 2007, en vertu de la Loi sur les espèces en péril du Canada (LEP). Tel que le prévoit le processus de désignation des espèces à statut précaire au Canada, qui recommande une révision tous les 10 ans, son statut sera évalué de nouveau en 2014 par le Comité sur la situation des espèces en péril au Canada (COSEPAC). Considérant les importantes acquisitions de connaissances sur l'espèce survenues depuis la dernière décennie, un nouveau rapport de statut a été produit pour le COSEPAC et est actuellement à l'étape de la révision finale.

En raison de l'extrême rareté et précarité de l'espèce, la population est soutenue par des activités de reproduction artificielle réalisées depuis 2004 par le ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs. Comme les mâles reproducteurs se faisaient de plus en plus rares (taux de recapture élevé depuis 2007 et abondance en déclin) et que l'asynchronie parfois importante entre les mâles et les femelles lors de leur capture limitait les performances (Vachon, 2010), il est devenu impératif de développer un protocole de cryopréservation de la laitance. Ce protocole vise non seulement d'utiliser de la laitance congelée et préservée dans l'azote liquide pour la fécondation dans les années à venir, mais aussi de maximiser la diversité génétique de l'espèce par la production d'un plus grand nombre de familles. Des essais de cryopréservation ont été réalisés avec succès en utilisant les surplus de laitance en 2012 (Vachon et coll., 2013) et les travaux de recherche et développement se sont poursuivis en 2013. Comme l'année dernière, des essais ont aussi été réalisés en début de saison sur le chevalier de rivière (*Moxostoma carinatum*). Ces essais impliquent également l'évaluation, au préalable, de la toxicité de cryoprotecteurs et de leurs concentrations sur la viabilité du sperme en examinant le taux et la durée de la motilité des spermatozoïdes.

2 LA CRYOPRÉSERVATION EN BREF

La cryopréservation¹ est un procédé permettant de conserver et de stocker des cellules en les maintenant à très basse température (-196 °C) dans l'azote liquide. Cette technique permet de préserver des échantillons pendant plus de 200 ans s'ils sont maintenus dans les conditions optimales et trouve de nombreuses applications en aquaculture, mais aussi pour la conservation et le rétablissement d'espèces en situation précaire.

La laitance doit, dans un premier temps, être mise dans une solution (dilueur) qui favorise la viabilité des spermatozoïdes. La teneur en sels (osmolalité) des dilueurs doit être telle que les spermatozoïdes demeurent inactifs (isotonique par rapport au liquide séminal).

¹ Le domaine de la cryopréservation comprend de nombreux termes techniques, plusieurs ont été décrits dans un lexique à la fin du document.

La laitance de chevalier cuivré peut être conservée pendant plusieurs jours au réfrigérateur (4 °C) dans ces solutions. Cette méthode est utilisée depuis de nombreuses années pour le chevalier cuivré. La conservation d'échantillons à plus long terme se fait par congélation. L'ajout d'un cryoprotecteur est toutefois requis afin de protéger les cellules des dommages inhérents à la congélation comme à la décongélation. Les cryoprotecteurs peuvent toutefois être toxiques à des concentrations élevées. Des tests de toxicité, à différentes concentrations, doivent être réalisés au préalable. Enfin, comme les échantillons ne peuvent être immergés directement dans l'azote liquide, ils doivent être congelés d'abord dans les vapeurs d'azote. Cette technique requiert donc plusieurs manipulations et des essais de plusieurs combinaisons de dilueurs (à différentes osmolalité), de cryoprotecteurs (à différentes concentrations), de différents médiums de congélation (formats de paillettes). Une évaluation des courbes de congélation et de décongélation (vitesse) est aussi requise pour optimiser la survie des spermatozoïdes, l'objectif final étant l'obtention de taux de fécondation et d'embryons normaux avec la laitance cryopréservée qui se rapprochent de ceux obtenus avec la laitance fraîche.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Capture et manipulation des géniteurs

La capture de géniteurs a débuté dès le 3 juin 2013 et s'est poursuivie sans interruption jusqu'au 26 juin. Ces travaux ont été réalisés au Lieu historique national du Canal-de-Saint-Ours, plus précisément à la passe migratoire Vianney-Legendre et au bief aval du barrage de Saint-Ours, sur la rivière Richelieu (voir la description détaillée dans Vachon [2019]). La manipulation des poissons a été réalisée selon les protocoles habituels, c'est-à-dire sous anesthésie dans un bain de Tricaine méthanesulfonate (MS222). Les géniteurs ont été traités par injection intrapéritonéale d'Ovaprim^{MC} (hormone de libération de gonadotrophines).

3.2 Prélèvement et évaluation de la qualité de la laitance

Lorsque possible, un petit prélèvement de laitance était fait à l'arrivée du poisson afin de permettre une évaluation des caractéristiques initiales de la laitance, c'est-à-dire sans induction et sans avoir séjourné dans un dilueur. Les autres prélèvements ont été effectués de 24 à 48 heures suivant l'injection, et ce, d'abord pour répondre aux besoins du programme de reproduction, puis pour les activités de cryopréservation.

Avant de prélever le sperme, une légère pression a été appliquée à proximité du pore urogénital afin d'éliminer la plus grande quantité d'urine possible. La région abdominale était ensuite asséchée avec un papier absorbant avant qu'une pression soit exercée sur l'abdomen de la portion antérieure vers la région postérieure pour expulser la laitance. Celle-ci a été collectée dans des tubes de centrifugeuse de 50 ml. Les échantillons ont été examinés pour en déterminer les caractéristiques : aspect, coloration, pH, volume, osmolalité. Des échantillons de laitance (1 µl) ont été fixés (solution de formol saline 4 % tamponné), si possible, à chaque manipulation du poisson pour évaluer la concentration et permettre l'examen de la morphologie. Les résultats de ces analyses ne sont toutefois pas présentés dans ce rapport.

Avant toute autre manipulation, la qualité du prélèvement était évaluée afin de déterminer s'il était contaminé. Pour chaque poisson et à chaque prélèvement, un échantillon de 1 µl de laitance a été examiné sous un microscope optique à 400x. Trois emplacements différents ont été regardés sur la lame pour vérifier si l'échantillon n'était pas contaminé par de l'urine ou de

l'eau. Les échantillons frais non contaminés ne sont pas motiles. Si l'échantillon était exempt de contamination, sa motilité était évaluée en l'activant au moyen d'une solution d'activation hypoosmotique préparée à base de la solution ActiFish^{MC 2} (127 mOsm). La motilité est déterminée par une analyse subjective. Une description des types de mouvements des spermatozoïdes pouvant être associés à différentes catégories de motilité est présentée dans le Tableau 1. L'échantillon était, par la suite, immédiatement préparé pour être conservé pour les étapes suivantes : reproduction artificielle, tests de toxicité et cryopréservation. Pour ce faire, l'éjaculat était immédiatement placé dans un ou différents dilueurs (dilution 1:3) dans un flacon de culture cellulaire de 50 ml et conservé au réfrigérateur dans un bain d'eau glacée (0 à 2 °C).

Tableau 1. Description du type de mouvement des spermatozoïdes associé à différentes catégories de motilité (modifié de Legendre et Billard, 1980).

Pourcentage des spermatozoïdes motiles	Type de mouvement des spermatozoïdes
0	Tous les spermatozoïdes sont immobiles.
1-20	Seuls quelques spermatozoïdes affichent une légère agitation.
20-40	Peu de spermatozoïdes se déplacent rapidement; quelques-uns se déplacent lentement. La majorité des spermatozoïdes est immobile.
40-60	Les spermatozoïdes motiles présentent deux types de comportements en proportion égale : déplacement rapide, déplacement lent et les autres sont immobiles.
60-80	La majorité des spermatozoïdes se déplace encore rapidement; seuls quelques-uns sont visibles du fait de leur déplacement plus lent.
80-100	Tous les spermatozoïdes se déplacent vigoureusement et il est impossible de fixer le regard sur un seul.

3.3 Méthodes de cryopréservation

À la lumière des résultats de 2012, des éléments supplémentaires ont été expérimentés. En 2013, des paillettes de 1,2 ml ont été ajoutées aux formats déjà utilisés (0,5 ml et 2,5 ml) pour entreposer la laitance. Le RATH, principal dilueur utilisé en 2012, a encore été employé tout en effectuant des essais supplémentaires à différentes osmolalités. Le méthanol a été le principal cryoprotecteur utilisé à des concentrations de 10 % à 11 %, valeurs qui s'étaient avérées optimales en 2012. De nouveaux essais ont été faits avec le HBSS, un dilueur qui donne aussi de bons résultats avec la laitance réfrigérée (0 à 2 °C) du chevalier cuivré, à des osmolalités

² IMV Technologies (dilution 2:33).

semblables à celles du RATH. Quelques essais ont aussi été réalisés avec un dilueur commercial, le CryoFish³. Au total, 12 traitements ont été expérimentés en 2013.

Le DMSO⁴, un autre cryoprotecteur connu, a été testé à des concentrations de 7,5 % et 10 % en combinaison avec le RATH, le HBSS et le CryoFish. En 2013, tous les échantillons ont été congelés dans le contenant de conservation à sec au LN₂. Quelques essais avec l'unité de congélation munie d'un radeau flottant ont été réalisés, mais la plupart n'ont pas été fructueux en raison de problèmes techniques. Enfin, toutes les paillettes de 0,5 et de 1,2 ml ont été scellées au moyen de poudre de polyvinyle, alors que les billes métalliques ont été utilisées pour les paillettes de 2,5 ml.

Tous les essais ont été réalisés avec un mélange d'une part de sperme dans trois parts de dilueur (dilution 1:3) et tous les échantillons ont été congelés quelques heures après le prélèvement. Un bain d'eau contrôlé à une température variant de 37 °C à 38 °C a été utilisé pour la décongélation des paillettes de 0,5 ml (environ 8 secondes), de 1,2 ml (environ 20 secondes) et 2,5 ml (environ 40 secondes). La motilité (taux et durée) a été évaluée au moment du prélèvement et après la décongélation.

3.4 Évaluation de la motilité après la congélation

La motilité était examinée subjectivement (Tableau 1) de la manière décrite plus haut, mais en ajoutant 10 µl de solution d'activation et en mélangeant avec la pointe de la micropipette pendant une seconde. Le temps de motilité a été estimé à partir de l'homogénéisation jusqu'au moment où il y avait moins de 10 % de spermatozoïdes motiles. Seuls les spermatozoïdes qui affichaient un mouvement progressif étaient considérés comme motiles.

3.5 Évaluation de la toxicité d'un cryoprotecteur

Douze tests de toxicité ont été réalisés en 2013 selon différentes combinaisons de dilueurs (RATH, HBSS et CryoFish) et de cryoprotecteurs (méthanol et DMSO). Les tests de toxicité consistent à évaluer, à intervalles réguliers, la motilité (taux et durée) des spermatozoïdes, dans un dilueur donné, après l'ajout d'un cryoprotecteur à différentes concentrations.

3.6 Fécondation et suivi du développement embryonnaire et larvaire

Des fécondations de plus grands volumes d'ovocytes au moyen de laitance cryopréservée en 2012 ont aussi été effectuées. Au total, 12 fécondations avec de la laitance cryopréservée ont été réalisées, dont quatre essais avec des volumes d'ovocytes de 6 ml et huit autres avec des volumes plus grands, soit de 20 ml (n = 4), 25 ml (n = 2) et 50 ml (n = 2). Le ratio du volume d'ovocytes et de laitance cryopréservée utilisé en 2013 était de 5:1. Comme en 2012, l'activation a eu lieu en présence d'une solution d'activation, car les spermatozoïdes décongelés sont plus fragiles. Pour chacun des échantillons, les taux de fécondation et d'embryons normaux ont été déterminés lorsque les clivages comportaient entre 16 à 32 cellules (généralement de 5 à 6 heures après la fécondation). Un suivi du développement embryonnaire et larvaire a aussi été réalisé sur le site même des opérations en 2013 et plusieurs échantillons

³ IMV Technologies. Le CryoFish est vendu en kit avec d'autres produits. Seul le dilueur CryoFish a été utilisé.

⁴ Diméthylsulfoxyde.

ont été fixés (Vachon, 2019). Ces travaux visent, entre autres, à examiner le développement et la morphologie des embryons et des larves issus de laitance cryopréservée. Ces échantillons n'ont pas encore été examinés.

3.7 Analyses statistiques

Les valeurs moyennes des taux de motilité ont été comparées statistiquement au moyen de tests de Kruskal-Wallis ou ANOVA, selon la distribution des variables ($\alpha = 0,05$), de même que des comparaisons multiples de moyennes (test de Tukey-Kramer). Au besoin, la correction de Bonferonni a été appliquée. Les traitements statistiques ont été réalisés avec le logiciel JMP® SAS Institute Inc. version 3.2.1 (Sall et Lehman, 1996). Il est à noter que les résultats doivent, dans certains cas, être abordés avec prudence, notamment lorsque les analyses reposent sur des analyses fines, car le nombre d'échantillons est faible.

4 RÉSULTATS

Treize chevaliers cuivrés mâles ont été capturés dans la rivière Richelieu du 4 au 23 juin 2013. Les détails au sujet des engins de capture sont présentés dans Vachon (2019). La taille moyenne (longueur totale) et le poids moyen des mâles manipulés en 2013 étaient de 616,3 mm et de 3,33 kg. Onze de ces mâles ont pu être intégrés aux activités de cryopréservation. La récolte de laitance chez deux mâles était insuffisante, probablement en raison de leur jeune âge, pour permettre la congélation d'échantillons.

4.1 Caractéristiques de la laitance

Les échantillons de laitance des 11 mâles étaient blanchâtres et semi-denses. En moyenne, 10,8 ml de laitance ont été récoltés à chaque prélèvement après l'induction (variant de 2 à 33 ml). Les prélèvements ne visaient pas nécessairement à récupérer toute la laitance disponible, mais plutôt un volume requis pour procéder d'abord à la reproduction artificielle avec les femelles sur place, puis à la congélation de certaines quantités afin de poursuivre la constitution de la banque de laitance tout en permettant de nouveaux essais. En 2013, le taux de motilité, évalué sur les échantillons de laitance fraîche (avant la cryopréservation), variait de 90 % à 100 % et le temps de motilité, de 7 à 25 secondes.

4.2 Toxicité des cryoprotecteurs

Douze tests de toxicité ont été réalisés avec la laitance des différents mâles pour déterminer la toxicité du méthanol et du DMSO à différentes concentrations. Ces tests permettent d'évaluer le pourcentage et la durée de la motilité des spermatozoïdes à intervalles prédéterminés après l'ajout du cryoprotecteur. La période maximale (45 minutes) a été testée et a été jugée suffisante pour permettre toutes les manipulations visant la congélation. Comme en 2012, tous les essais ont été réalisés avec de la laitance diluée (1:3) dans trois dilueurs différents (RATH, HBSS et CryoFish). Certains dilueurs ont été testés à différentes osmolalités.

Un taux de motilité supérieur à 80 % après 45 minutes d'équilibre entre le cryoprotecteur et la laitance est acceptable pour procéder à la cryopréservation, et ce délai est rarement écoulé entre l'ajout du cryoprotecteur et la congélation des échantillons. En effet, en 2013, de 1 à

10 minutes, selon le nombre de paillettes à préparer, se sont écoulées entre l'ajout du cryoprotecteur et le début de la congélation.

Des taux de motilité supérieurs à 90 % et des durées de motilité de 8 à 13 secondes ont été obtenus pour trois des traitements expérimentés⁵ après 45 minutes, soit le CryoFish (241)-DMSO (7,5 %), le RATH (335)-méthanol (11 %) ainsi que le RATH (335)-DMSO (7,5 %) (Tableau 2).

Peu importe le dilueur et la concentration de cryoprotecteur, une très grande proportion des spermatozoïdes est demeurée motile après 45 minutes. La valeur moyenne minimale (25 %) a été enregistrée avec la combinaison HBSS (332)-DMSO (10 %) et la maximale (95 %), avec la combinaison RATH (332)-DMSO (7,5 %). Globalement, les résultats montrent que le DMSO, à une concentration de 10 %, est plus toxique que le méthanol à une concentration de 11 %.

4.3 Congélation et décongélation de la laitance chez le chevalier cuivré

Au total, 416 paillettes de 0,5 ml, 94 paillettes de 1,2 ml et 164 paillettes de 2,5 ml ont été congelées en 2013. Les paillettes ont été scellées de deux façons : avec des billes métalliques (paillettes de 2,5 ml) ou de la poudre de polyvinyle (paillettes de 0,5 et 1,2 ml). Tous les échantillons congelés étaient dilués dans trois dilueurs RATH, HBSS et CryoFish (1:3) à différentes osmolalités. Deux cryoprotecteurs ont été utilisés à des concentrations de 7,5 % (DMSO), 10 % (DMSO et méthanol) et 11 % (méthanol). En 2013, presque tous les échantillons ont été congelés dans le contenant de conservation à sec au LN₂, à l'exception de quelques paillettes de 2,5 ml qui ont été congelées dans l'unité de congélation avec radeau flottant. En tout, 64 paillettes de 0,5 ml, 31 paillettes de 1,2 ml et 38 paillettes de 2,5 ml ont été décongelées pour évaluer la qualité de la laitance après un temps de congélation variant de 2 jours à 4 mois.

4.4 Motilité postcongélation

4.4.1 Généralités

Des taux moyens de motilité variant de 1 % à 31 % (durée moyenne de 2 à 10 secondes) ont été obtenus dans les différents traitements de 2013 (Tableau 3). Sans tenir compte du format de la paillette, les premières comparaisons montrent généralement que les meilleurs taux de motilité ont été obtenus dans le contenant de conservation à sec au LN₂ avec le CryoFish (241)-DMSO (7,5 %) ainsi que dans le RATH (335)-DMSO (10 %). Des taux de motilité moyens de 25 % et de 28,1 % et des durées moyennes de 10 et 8 secondes ont été respectivement enregistrés dans ces deux traitements, et aucune différence statistiquement significative n'a été détectée entre les deux ($p = 0,2769$) (Tableau 4). Les échantillons congelés avec le CryoFish (241)-DMSO (10 %) ont également obtenu de bons résultats, soit un taux de motilité moyen de 18,8 %, 7,5 secondes (Tableau 4).

⁵ La description d'un traitement se lit comme suit :

Dilueur (osmolalité du dilueur en milliosmole [mOsm]) — Cryoprotecteur (concentration du cryoprotecteur en %).

Tableau 2. Tests de toxicité du méthanol et du DMSO à différentes concentrations avec la laitance de chevalier cuivré dans trois dilueurs à différentes osmolalités.

MOHU ID ^a	Dilueur		Cryoprotecteur		Taux (%) et durée (seconde) de la motilité									
	Type	Osmolalité (mOsm)	Type	Concentration (%)	Contrôle (avant)		5 min		15 min		30 min		45 min	
					%	durée	%	durée	%	durée	%	durée	%	durée
2679	CryoFish	241	DMSO	7,5	100	12	95	10	90	10	90	10	90	8
			DMSO	10	100	12	80	10	80	10	60	7	40	7
2679	HBSS	332	DMSO	7,5	95	10	90	7	90	7	80	6	80	6
7656	HBSS	332	Méthanol	11	80	15	60	15	60	15	60	12	60	12
			DMSO	10	80	15	40	15	25	15	25	15	25	15
1813	RATH	335	Méthanol	11	90	15	90	15	90	15	90	13	90	13
			DMSO	10	80	12	70	12	70	12	50	12	40	13
	RATH	395	Méthanol	11	90	12	90	12	85	12	85	12	85	12
			DMSO	10	80	12	70	12	60	12	60	12	50	12
	HBSS	332	Méthanol	11	95	15	95	15	90	13	90	12	85	10
			DMSO	10	80	15	80	15	65	12	60	12	60	12
	HBSS	402	Méthanol	11	85	12	85	12	85	12	85	12	85	11
			DMSO	10	50	12	40	10	40	10	45	12	45	12
4734	RATH	332	DMSO	7,5	95	14	95	14	95	14	95	12	95	12

^a Quatre derniers caractères de la micropuce.

Tableau 3. Résultats détaillés de la motilité postcongélation (taux et durée) des spermatozoïdes du chevalier cuivré dans les différents traitements de 2013 en fonction des formats de paillettes.

Dilueur		Cryoprotecteur		Méthode de congélation	Paillette		Taux de motilité (%)		Durée de motilité (secondes)	
Type	Osmolalité (mOsm)	Type	Concentration (%)		Format (ml)	N	Moyen	σ	Moyenne	σ
CryoFish	241	DMSO	7,5	<i>Dry-shipper</i>	0,5	4	25,0	4,1	10,0	0,0
					0,5	4	18,8	6,3	7,5	0,6
HBSS	332	Méthanol	11	<i>Dry-shipper</i>	0,5	7	6,7	4,3	6,7	1,7
					1,2	3	6,7	2,9	5,7	1,2
					2,5	3	3,0	1,7	5,0	2,0
	402	Méthanol	11	<i>Dry-shipper</i>	0,5	4	8,8	4,8	7,0	1,4
					1,2	3	6,0	3,6	6,0	1,7
					2,5	3	2,0	0,0	5,0	0,0
RATH	335	DMSO	7,5	<i>Dry-shipper</i>	0,5	9	3,0	1,9	5,9	2,3
					1,2	4	6,3	2,5	8,0	0,0
					2,5	4	6,8	5,7	7,0	1,4
		10	<i>Dry-shipper</i>	0,5	5	31,0	2,2	8,0	2,1	
				1,2	3	23,3	2,9	8,0	0,0	
				2,5	3	2,0	0,0	5,0	0,0	
	Méthanol	10	<i>Dry-shipper</i>	2,5	4	5,8	1,5	6,0	0,8	
				2,5	6	8,0	6,3	7,3	0,5	
				0,5	4	13,8	4,8	8,0	0,8	
	11	<i>Dry-shipper</i>	1,2	4	4,5	1,0	6,3	1,5		
			2,5	5	8,6	6,9	7,6	1,8		
			0,5	19	10,4	7,4	6,4	1,4		
395	DMSO	10	<i>Dry-shipper</i>	1,2	8	13,5	7,8	7,4	1,4	
				2,5	7	5,3	4,5	6,7	1,7	
				0,5	3	0,7	1,2	2,0	3,5	
	Méthanol	11	<i>Dry-shipper</i>	1,2	3	8,3	2,9	7,0	1,7	
				2,5	3	8,3	5,8	6,0	1,7	
				0,5	5	15,0	7,1	6,8	0,8	
1,2	3	10,0	5,0	6,3	1,2					
2,5	3	8,3	2,9	7,7	0,6					

N : nombre d'échantillons examinés.

Tableau 4. Motilité postcongélation (taux et durée) des spermatozoïdes du chevalier cuivré dans les différents traitements de 2013 sans égard au format des paillettes.

Dilueur		Cryoprotecteur		Méthode de congélation	N	Taux de motilité (%)		Durée de la motilité (secondes)	
Type	Osmolalité (mOsm)	Type	Concentration (%)			Moyen	σ	Moyenne	σ
CryoFish	241	DMSO	7,5	<i>Dry-shipper</i>	4	25,0	4,1	10,0	0,0
		DMSO	10	<i>Dry-shipper</i>	4	18,8	6,3	7,5	0,6
HBSS	332	Méthanol	11	<i>Dry-shipper</i>	13	5,8	3,7	6,1	1,7
	402	Méthanol	11	<i>Dry-shipper</i>	10	5,9	4,4	6,1	1,4
RATH	335	DMSO	7,5	<i>Dry-shipper</i>	17	4,6	3,5	6,6	1,9
		DMSO	10	<i>Dry-shipper</i>	8	28,1	4,6	8,0	1,6
		Méthanol	10	Unité de congélation	4	5,8	1,5	6,0	0,8
		Méthanol	11	Unité de congélation	6	8,0	6,3	7,3	0,5
		Méthanol	10	<i>Dry-shipper</i>	13	8,9	6,0	7,3	1,5
		Méthanol	11	<i>Dry-shipper</i>	34	10,1	7,4	6,7	1,5
	395	DMSO	10	<i>Dry-shipper</i>	9	5,8	5,0	5,0	3,1
		Méthanol	11	<i>Dry-shipper</i>	11	11,8	6,0	6,9	0,9

N : nombre d'échantillons examinés, peu importe le format (paillettes de 0,5 ml, 1,2 ml ou 2,5 ml).

4.4.2 Effet de la concentration du cryoprotecteur

Toujours sans tenir compte du format de la paillette, la seule différence significative mise en évidence par rapport à la concentration du cryoprotecteur a été trouvée lors de la comparaison des résultats dans le RATH (335) avec le DMSO aux concentrations de 7,5 % et 10 % ($p < 0,0001$). Des taux et des durées de motilité de 4,6 % (6,6 secondes) et de 28,1 % (8 secondes) ont respectivement été mesurés dans ces deux traitements. Il s'agit d'ailleurs des valeurs moyennes de motilité extrêmes présentées dans le Tableau 4.

Les autres résultats de motilité les plus élevés ont été trouvés dans le CryoFish aux deux concentrations de DMSO (7,5 % et 10 %). En effet, des valeurs moyennes de 25 % et de 18,8 % ont été mesurées respectivement dans ces deux traitements (Tableau 4). La comparaison statistique n'a toutefois pas révélé de différence significative ($p = 0,1466$) entre les deux concentrations de ce cryoprotecteur. Des taux de motilité nettement plus faibles ($\leq 11,8$ %) ont été enregistrés dans tous les autres traitements et aucune différence statistique ($p > 0,05$) n'a été décelée lors des comparaisons entre les différentes concentrations de cryoprotecteurs.

4.4.3 Effet de la méthode de congélation

Comme les essais dans l'unité de congélation avec le radeau flottant à une hauteur de 18 mm ont été réalisés uniquement avec les paillettes de 2,5 ml dans le RATH (335)-méthanol (10 %) et le RATH (335)-méthanol (11 %), les comparaisons avec l'autre méthode de congélation (contenant de conservation à sec au LN₂) sont limitées à ces traitements. Dans le premier traitement (méthanol 10 %), le taux de motilité moyen mesuré dans les paillettes de 2,5 ml congelées dans le contenant de conservation à sec au LN₂ a été de 8,6 % (7,6 secondes) et de 5,8 % (6 secondes) dans l'unité de congélation. Dans le second traitement (méthanol 11 %), des valeurs de 5,3 % (6,7 secondes) et de 8 % (7,3 secondes) ont respectivement été obtenues dans ce format de paillette congelée dans le contenant de conservation à sec au LN₂ et l'unité de congélation (Tableau 3). Aucune différence statistique n'a été mise en évidence entre les méthodes de congélation ($p > 0,05$).

Il est important de souligner que les taux de motilité les plus faibles ont été enregistrés dans les paillettes de 2,5 ml, et ce, peu importe la méthode et le traitement de congélation. En effet, les valeurs moyennes de motilité dans les paillettes de 2,5 ml sont de l'ordre de 6 % pour celles congelées dans le contenant de conservation à sec au LN₂ et de 7 % dans pour celles de l'unité de congélation et ne diffèrent pas statistiquement ($p > 0,05$) (Figure 1).

4.4.4 Effet du format des paillettes

Les résultats de 2013 montrent que le format de la paillette influence la qualité de la laitance après la congélation. Les différences se reflètent dans les taux de motilité plutôt que dans la durée. Les taux de motilité les plus élevés ont été enregistrés dans les paillettes de plus petit format. En effet, sans tenir compte du type de traitements, des valeurs moyennes de motilité de 10 % ont été mesurées dans les paillettes de 1,2 ml et de 12 % dans celles de 0,5 ml, alors que les résultats sont ≤ 7 % dans celles de 2,5 ml (Figure 1). Cette tendance se maintient lorsque les résultats sont présentés plus en détail selon les types de traitements.

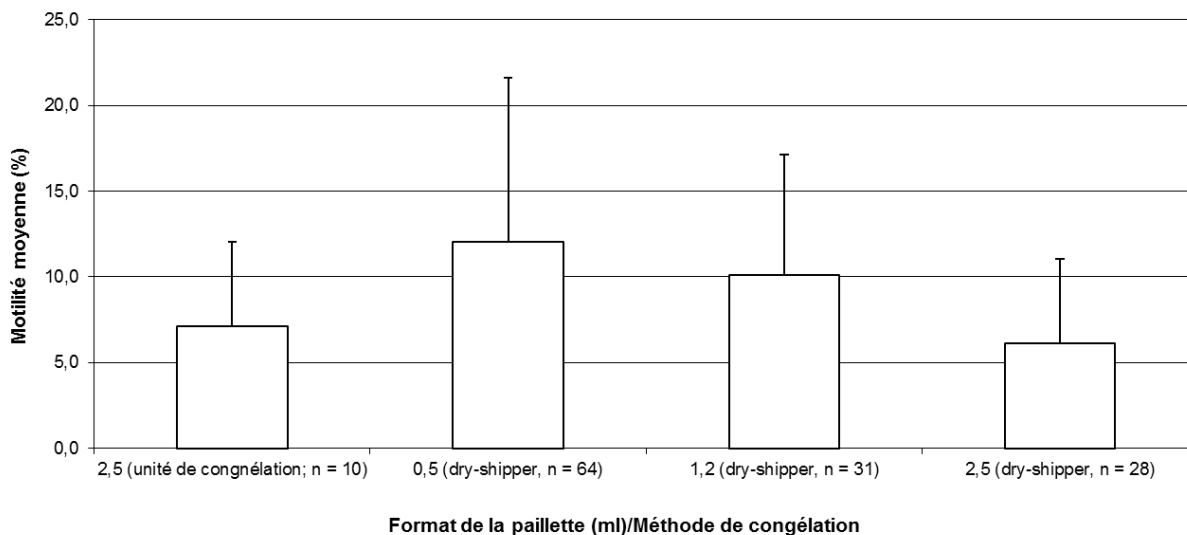


Figure 1. Motilité moyenne des spermatozoïdes du chevalier cuivré mesurée en 2013 dans les différents formats de paillettes selon les deux méthodes de congélation, sans égard au traitement (dilueur et cryoprotecteur). Effet du médium de congélation (format des paillettes) n = nombre de paillettes examinées, *dry-shipper* : contenant de conservation à sec au LN₂.

Les paillettes de plus faible gabarit (0,5 et 1,2 ml) sont généralement plus performantes que celles de 2,5 ml (Tableau 3).

Les comparaisons plus fines des résultats entre les formats de paillettes en considérant les différents traitements (dilueur et cryoprotecteur) (voir Tableau 3) font ressortir certaines différences statistiquement significatives.

Traitement CryoFish (241)-DMSO avec congélation en contenant de conservation à sec au LN₂

Bien que seulement quelques essais aient été réalisés avec cette combinaison de dilueur-cryoprotecteur, et ce, uniquement avec des paillettes de 0,5 ml, les résultats montrent que la motilité moyenne est supérieure à une concentration de 7,5 % en DMSO (motilité = 25 %) comparativement à une concentration de 10 % en DMSO (motilité = 18,8 %), mais la différence n'est toutefois pas significative statistiquement (Tableau 3). À la lumière de ces résultats très intéressants obtenus dans les paillettes de 0,5 ml, il est pertinent de poursuivre les essais avec les paillettes de 1,2 ml afin de déterminer si la motilité postcongélation est plus élevée avec le DMSO à une concentration de 7,5 %, comparativement à une concentration de 10 % dans ce format de paillette.

Traitement RATH (335)-DMSO (10 %) avec congélation en contenant de conservation à sec au LN₂

Les résultats obtenus avec ce traitement figurent parmi les plus élevés. La comparaison du format de la paillette montre que le taux de motilité moyen est statistiquement supérieur dans les paillettes de 0,5 ml (motilité = 31 %), comparativement à celles de 1,2 ml (motilité = 23 %) ($p = 0,0165$) (Tableau 3).

Traitement RATH (335)-méthanol (11 %) avec congélation en contenant de conservation à sec au LN₂

La comparaison des résultats obtenus dans les différents formats de paillettes montre, contrairement au traitement précédent, que les paillettes de 1,2 ml seraient les plus appropriées. En effet, des motilités moyennes de 10,4; 13,5 et 5,3 % ont été enregistrées respectivement dans les paillettes de 0,5, 1,2 et 2,5 ml ($p = 0,0456$).

4.4.5 Effet de l'osmolalité du dilueur

Sans égard au format des paillettes, les traitements impliquant le cryoprotecteur méthanol 11 % ont donné des résultats similaires (sans différence statistiquement significative) quant au taux de motilité (< 12 %) dans les deux dilueurs testés à différentes osmolalités, soit le HBSS (332 et 402) et le RATH (335 et 395) (Tableau 4). Par contre, une différence significative a été enregistrée dans les traitements impliquant le cryoprotecteur DMSO à une concentration de 10 % qui ont été réalisés en combinaison avec le RATH. En effet, le taux moyen de motilité des spermatozoïdes dans le RATH (335)-DMSO (10 %) est nettement supérieur à celui enregistré dans le RATH (395)-DMSO (10 %), alors que des valeurs moyennes de 28,1 % et de 5,8 % ont respectivement été mesurées dans ces deux traitements ($p < 0,001$) (Tableau 4).

La compilation de ces données en tenant compte du format de la paillette est également présentée dans le Tableau 5. Les comparaisons plus fines entre les formats de paillettes n'ont pas permis de mettre en évidence des différences statistiquement significatives.

4.4.6 Taux de motilité postcongélation en fonction de la date de congélation des échantillons

Le traitement le plus utilisé en 2013 a été le RATH (335)-méthanol (11 %) congelé dans le contenant de conservation à sec au LN₂, puisqu'il avait produit d'excellents résultats en 2012. Des réplicats sont donc disponibles sur une séquence temporelle assez longue pour explorer les effets de la date de congélation des échantillons sur les taux de motilité après la décongélation. Il est à noter que les analyses ne tiennent pas compte du format de la paillette et qu'elles reposent sur un nombre d'échantillons assez limité, soit de deux à huit par date de congélation⁶.

⁶ Tous les échantillons de laitance ont été congelés le jour même du prélèvement.

Tableau 5. Comparaison de la motilité postcongélation (taux et durée) des spermatozoïdes du chevalier cuivré congelés dans le contenant de conservation à sec au LN₂ dans le RATH et le HBSS à différentes osmolalités.

Sans égard au format de la paillette

Dilueur		Cryoprotecteur		Paillette		Taux de motilité (%)		Durée de motilité (secondes)		Taux de motilité (%)		Durée de motilité (secondes)	
Type	Osmolalité (mOsm)	Type	Concentration (%)	Format (ml)	N	Moyen	α	Moyenne	α	Moyen	α	Moyenne	α
RATH	335	DMSO	10	0,5	5	31,0	2,2	8,0	2,1	28,1	4,6	8,0	1,6
			10	1,2	3	23,3	2,9	8,0	0,0				
	395	DMSO	10	0,5	3	0,7	1,2	2,0	3,5	5,8	5,0	5,0	3,1
			10	1,2	3	8,3	2,9	7,0	1,7				
			10	2,5	3	8,3	5,8	6,0	1,7				
	335	Méthanol	11	0,5	19	10,4	7,4	6,4	1,4	10,1	7,4	6,7	1,5
			11	1,2	8	13,5	7,8	7,4	1,4				
			11	2,5	7	5,3	4,5	6,7	1,7				
	395	Méthanol	11	0,5	5	15,0	7,1	6,8	0,8	11,8	6,0	6,9	0,9
			11	1,2	3	10,0	5,0	6,3	1,2				
11			2,5	3	8,3	2,9	7,7	0,6					
HBSS	332	Méthanol	11	0,5	7	6,7	4,3	6,7	1,7	5,8	3,7	6,1	1,7
			11	1,2	3	6,7	2,9	5,7	1,2				
			11	2,5	3	3,0	1,7	5,0	2,0				
	402	Méthanol	11	0,5	4	8,8	4,8	7,0	1,4	5,9	4,4	6,1	1,4
			11	1,2	3	6,0	3,6	6,0	1,7				
			11	2,5	3	2,0	0,0	5,0	0,0				

N : nombre d'échantillons examinés.

Ces analyses montrent que les taux de motilité des échantillons congelés au début de la saison sont légèrement plus faibles que dans ceux congelés plus tardivement. Par exemple, les taux moyens de motilité mesurés dans les paillettes (tous formats confondus) congelées du 7 au 14 juin étaient inférieurs à 10 %, alors qu'ils étaient plus élevés (11,7 % à 21,3 %) dans celles congelées à partir du 15 jusqu'au 25 juin, sauf pour le 19 juin où le taux moyen a été de 3,4 %.

La courbe de régression linéaire laisse voir une très faible tendance à la hausse au fil de la saison sans toutefois être significative (Figure 2). Les taux plus élevés vers la fin de la saison, alors qu'on se rapproche du pic de reproduction en milieu naturel, pourraient s'expliquer par une maturité plus avancée des spermatozoïdes au moment de la congélation. Il est plausible de penser que les membranes cellulaires des spermatozoïdes sont, à ce moment, plus résistantes et peuvent ainsi mieux tolérer les processus de congélation.

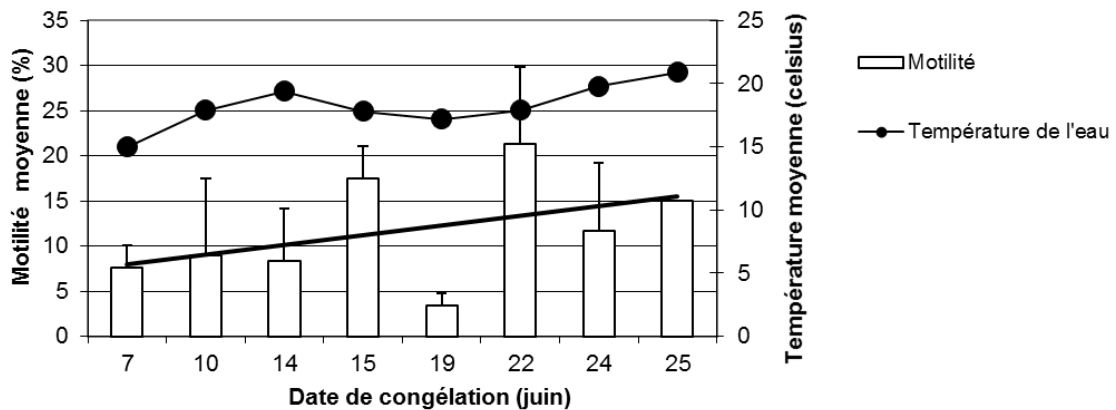


Figure 2. Taux de motilité moyen (axe de gauche) des spermatozoïdes postcongélation dans le RATH (335)-Méthanol (11 %)-congelés dans le contenant de conservation à sec au LN₂ (tous formats de paillettes confondus) à différentes dates de congélation et températures de l'eau (axe de droite) en 2013. La droite représente la régression linéaire à partir des données de la motilité.

La température de l'eau au moment des activités pourrait aussi être un facteur important qui explique certains écarts. De façon générale, les taux de motilité postcongélation obtenus en 2013 étaient inférieurs à ceux de 2012, et ce, dans tous les traitements. La comparaison de la température de la rivière Richelieu en 2013 avec les valeurs enregistrées durant les années antérieures confirme que l'année 2013 a été la plus froide. La température moyenne journalière (calculée à partir des données sur 24 heures) durant les activités de 2012 était de 20,3 °C, alors qu'elle était de 17,2 °C en 2013. Le seuil de 20 °C (température moyenne journalière) n'a été dépassé en 2013 qu'à partir du 25 juin. Les écarts entre les températures nocturnes et diurnes étaient aussi beaucoup plus grands en 2013 qu'en 2012 (Vachon, 2019).

4.5 Fécondation

En 2013, il a été possible de développer les techniques de manipulation pour la fécondation de plus grands volumes d'ovocytes par de la laitance cryopréservée, ce qui a permis de bonifier de 11 % le

nombre de familles. Soixante-six croisements fructueux ont été réalisés en 2013 auxquels s'ajoutent huit familles qui ont pu être produites grâce aux échantillons de laitance cryopréservée de géniteurs de 2012. Quelque 3 550 fretins d'automne issus de laitance cryopréservée ont été ensemencés dans la rivière Richelieu en septembre 2013.

5 DISCUSSION

Les travaux de cryopréservation de la laitance du chevalier cuivré 2013 ont permis de raffiner les techniques et d'explorer certains traitements supplémentaires qui avaient été expérimentés avec succès chez d'autres espèces, notamment des Catostomidés. C'est le cas du cryoprotecteur DMSO qui est utilisé chez *Moxostoma robustum* (*Robust redhorse*) (Zelko, 2013) et *Xyrauchen texanus* (*Razorback sucker*) (Jenkins et coll., 2011).

Les essais de 2012 et de 2013 permettent de mettre en évidence que la performance des résultats serait liée à des variations interannuelles et même individuelles. Par exemple, bien que plusieurs types de traitements aient été testés en 2012, les meilleurs résultats de la cryopréservation de la laitance de chevalier cuivré ont été obtenus avec le méthanol aux concentrations de 10 % et 11 % en combinaison avec le RATH (dilueur), avec un taux de motilité de 37 % mesuré après la congélation. En 2013, bien que la combinaison RATH et méthanol à ces mêmes concentrations ait de nouveau été utilisée, d'autres traitements ont aussi été expérimentés. Les meilleurs résultats (25 % et 31 %) ont été obtenus en utilisant le DMSO (un nouveau cryoprotecteur) à 7,5 % et 10 % en combinaison avec les deux dilueurs suivants, soit le CryoFish (241) et le RATH (335).

Ces observations démontrent l'importance de développer les techniques de cryopréservation de façon à disposer d'une certaine diversité de traitements pour optimiser les résultats. Après deux années d'essais, nos travaux montrent que, chez le chevalier cuivré, les essais impliquant le dilueur RATH sont un succès, alors que ceux impliquant le dilueur HBSS ont été nettement moins efficaces (cette étude et Vachon et coll., 2013). Le HBSS ne devrait donc pas être réutilisé dans le protocole de cryopréservation. Néanmoins, ce dernier demeure un dilueur intéressant, puisque, chez certains mâles, il permet une meilleure conservation de la laitance à court terme (2 à 4 °C) durant les opérations de reproduction artificielle.

Les résultats des essais de cryopréservation réalisés chez le chevalier cuivré impliquant différents dilueurs ne peuvent être comparés avec des travaux menés sur des espèces de la même famille, puisque les essais chez *Moxostoma robustum* et *Xyrauchen texanus* ont été faits exclusivement dans le HBSS (Jenkins, 2011; Tiersch, 2011; Zelko, 2013). Il n'est pas possible d'expliquer plus précisément pourquoi le RATH est plus efficace que le HBSS lors des essais de cryopréservation chez le chevalier cuivré. Le RATH, bien qu'il n'ait pas été expérimenté chez d'autres Catostomidés, a été utilisé avec succès (taux de motilité de 46 % après la congélation) dans des protocoles de cryopréservation de semence de doré jaune (*Sander vitreus*) (Bergeron, 2001). Des dilueurs préparés à base de glucose comme le RATH ont aussi donné de bons résultats chez plusieurs espèces de Characiformes du Brésil (Viveiros et Godinho, 2009). Il est plausible de penser que la composition chimique du RATH serait plus semblable à celle du liquide séminal de chevalier cuivré, ce qui permettrait ainsi une meilleure réponse après la congélation. Des analyses chimiques plus détaillées sont toutefois requises pour vérifier cette hypothèse. Le CryoFish est un dilueur qui a été développé en France. Il a été utilisé chez plusieurs espèces ou groupes dont les Salmonidés, le tilapia, le turbot, le bar, etc., et des taux de fertilisation supérieurs à 50 % ont été obtenus (Haffray et coll., 2008). À notre connaissance, le CryoFish n'avait jamais été utilisé chez les Catostomidés.

En ce qui concerne le choix du cryoprotecteur, certaines comparaisons peuvent être faites. Les deux cryoprotecteurs expérimentés avec succès chez le chevalier cuivré jusqu'à présent (méthanol et DMSO) ont aussi permis d'obtenir de bons résultats chez *Xyrauchen texanus* et *Moxostoma robustum*. En général, les concentrations de cryoprotecteur (7,5 %, 10 % et 11 %) qui ont donné de bons résultats chez le chevalier cuivré s'avèrent également efficaces chez ces espèces (Jenkins et coll., 2011; Tiersch et coll., 2011; Zelko, 2013). En effet, aux termes d'essais menés avec différents cryoprotecteurs (méthanol, DMSO, DMA⁷ et glycérol) chez *Xyrauchen texanus*, Tiersch et coll. (2011) ont obtenu des taux de motilité moyens supérieurs (9 % et 25 %, selon l'expérience) avec le méthanol à une concentration de 10 % (en combinaison avec le HBSS) par rapport aux concentrations de méthanol 5 % et 20 % et aux autres cryoprotecteurs testés. Chez cette même espèce, les meilleurs taux de motilité après la congélation (27 %) ont été enregistrés avec le DMSO à une concentration de 10 % en combinaison avec le HBSS à 500 mOsm/kg (Jenkins et coll., 2011). Chez *Moxostoma robustum*, les travaux de cryopréservation de la laitance sont réalisés avec le DMSO à une concentration de 10 % (Zelko, 2013).

En ce qui concerne le cryoprotecteur DMSO, le test de toxicité a révélé que le taux de survie des spermatozoïdes de chevalier cuivré était plus élevé s'il était utilisé à une concentration plus faible, soit 7,5 % au lieu de 10 %. Par contre, la combinaison du DMSO à une concentration de 10 % avec le RATH (335) a donné les meilleurs résultats de la saison 2013 après la congélation (taux de motilité moyen de 31 %). La combinaison du DMSO à une concentration de 7,5 % avec le CryoFish a aussi donné de bons résultats (motilité de 25 %) (Tableau 2). Des observations similaires ont déjà été rapportées dans la littérature. Par exemple, chez le bar rayé (*Morone saxatilis*), malgré les taux de motilité plus élevés mesurés dans le méthanol à des concentrations de 5 % et 10 % lors du test de toxicité, les meilleurs taux de motilité après la congélation ont été enregistrés dans le DMSO à une concentration de 5 % (He et Woods, 2003). Ces résultats confirment que l'élaboration de protocoles de cryopréservation est complexe, qu'elle repose sur l'expérimentation de plusieurs traitements et que les tests de toxicité constituent une étape préliminaire. En somme, les protocoles de cryopréservation les plus efficaces permettent non seulement d'obtenir les meilleurs taux de motilité après la congélation, mais également le moins de dommages cellulaires liés à la congélation et à la décongélation (« cryodommages ») et, ultimement, les taux de fertilisation et d'embryons normaux les plus élevés.

Le DMSO (cryoprotecteur) ainsi que le CryoFish (dilueur), intégrés dans les essais en 2013, constituent des traitements intéressants et pertinents à développer durant la prochaine saison dans le but de raffiner les protocoles et, éventuellement, de développer trois ou quatre traitements standards qui permettront d'optimiser les résultats et qui pourront être utilisés avec confiance durant les prochaines années.

Pour l'instant, la comparaison des résultats de cryopréservation de la laitance du chevalier cuivré de 2013 repose uniquement sur l'analyse de la motilité après la congélation. Il est important de souligner que le choix final d'une technique implique une combinaison d'analyses parmi lesquelles figure l'examen de la morphologie des spermatozoïdes après la décongélation afin d'évaluer les « cryodommages ». L'examen de la morphologie des spermatozoïdes avant et après la congélation dans les différents traitements est en cours et permettra de raffiner notre choix et de guider les travaux de la prochaine année en ce qui concerne l'utilisation du DMSO et du CryoFish.

À la lumière des analyses de 2013, il apparaît évident que les basses températures de l'eau de la rivière Richelieu durant la saison ont certainement eu une influence sur les processus de maturation finale des gonades, et ce, tant chez les mâles que chez les femelles. Une maturation très lente des gonades chez les femelles a été observée en 2013. Cela se traduisait par des frayes partielles plus

⁷ Diméthylamine ou N-méthylméthanamine.

fréquentes et des taux de fécondation et d'embryons normaux un peu plus faibles au début de la saison (Vachon, 2019).

L'évaluation de la qualité de la laitance durant la saison 2013 montre qu'au début de la saison les spermatozoïdes n'étaient pas aussi matures comparativement aux observations réalisées l'année précédente. Cela se manifestait surtout dans la durée de la motilité, en début de saison, qui était plus courte alors que les taux de motilité étaient plutôt comparables. Les conditions froides qui ont prévalu durant les travaux de cryopréservation de 2013 pourraient expliquer, du moins en partie, les résultats moins satisfaisants (motilité postcongélation) obtenus cette année par rapport à 2012.

L'effet de la température sur les processus de maturation finale des gonades a été démontré chez plusieurs espèces de poissons. La maturation des gamètes est en effet modulée par des signaux endocrinologiques qui, eux-mêmes, sont influencés par la température et la photopériode. Pour chaque espèce, il existe une température optimale à laquelle s'achève la spermatogenèse. Des écarts importants par rapport à la température qui prévaut normalement pendant la période de reproduction modifient ces processus (Alavi et coll., 2008) et influencent les activités de fraye (Kwak et Skelly, 1992; Cooke et Bunt, 1999). Kopeika et Kopeika (2008) et Williot et coll. (2000) ont également démontré, chez l'esturgeon sibérien (*Acipenser baeri*), que la survie des spermatozoïdes après la congélation était davantage liée à l'état de maturation de la gonade (spermatozoïdes) au moment de la congélation qu'à leur degré de motilité. Leurs travaux montrent que les échantillons congelés au moment où les testicules étaient moins matures (spermatozoïdes moins développés) présentaient des taux de motilité postcongélation plus faibles que ceux qui avaient été congelés à un stade de maturation plus avancé. Ces résultats montrent que les spermatozoïdes moins matures ont une moins grande résistance à la congélation. Cette « cryorésistance » serait liée au fait que les membranes cellulaires des spermatozoïdes sont moins développées. En effet, lorsque les poissons se trouvent dans des conditions thermiques non favorables, ils doivent prendre du temps pour s'acclimater. Leurs dépenses énergétiques sont alors davantage orientées vers l'adaptation à la température que vers le système reproducteur et, inévitablement, vers le processus final de spermatogenèse. Considérant ces observations, l'hypothèse selon laquelle, en raison des températures plus froides, le processus de maturation des gonades chez les mâles serait ralenti et que cela aurait une influence sur les résultats de cryopréservation ne peut être exclue chez le chevalier cuirvé.

La capacité de féconder des spermatozoïdes préservés dans l'azote liquide depuis un an a été démontrée en 2013. Les travaux de 2013 sont très encourageants par rapport au développement du savoir-faire lié à la fécondation de plus grands volumes d'ovocytes et permettent de nous rassurer, du même coup, sur nos techniques d'entretien de la banque de laitance. La mise en charge d'un étang par des larves produites uniquement par la laitance cryopréservée a permis de démontrer que leur taux de survie était similaire en étang et que les individus ainsi produits pouvaient se développer normalement.

6 CONCLUSION

La cryopréservation de la laitance constitue une technique de choix pour maximiser l'efficacité du plan de reproduction de cette espèce. Bien que ces travaux soient encore au stade de la recherche et du développement, ils trouvent déjà leur application et ont permis de bonifier de 11 % le nombre de familles produites en 2013 grâce à la banque de laitance cryopréservée depuis 2012. Cette banque, qui a été enrichie en 2013, permettra également de procéder à des fécondations en l'absence de mâle, si la situation se présente durant les prochaines années, puisqu'une asynchronie dans l'arrivée et dans la maturité des géniteurs a déjà été observée au cours des années antérieures. De telles opérations nécessitent toutefois la préservation de grandes quantités de laitance dans l'azote liquide et une saine gestion et un entretien adéquat de la banque de laitance.

RECOMMANDATIONS

Considérant les résultats et les expériences de 2012 et de 2013, les recommandations suivantes sont formulées :

1. Poursuivre les travaux de recherche et de développement avec le cryoprotecteur DMSO ainsi qu'avec le dilueur CryoFish;
2. Procéder à des tests de fécondation avec de la laitance cryopréservée dans les nouveaux traitements expérimentés en 2013, soit ceux impliquant le DMSO et le CryoFish;
3. Poursuivre les travaux avec le méthanol, puisqu'il a donné de bons résultats en 2012 et parce que ce cryoprotecteur est connu pour être moins toxique pour plusieurs espèces;
4. Poursuivre des travaux avec le dilueur RATH en réalisant des essais à des osmolalités plus faibles qui se rapprochent davantage des valeurs mesurées dans la laitance du chevalier cuirvé (280 mOsm);
5. Évaluer et comparer le taux de motilité postcongélation en fonction de différents temps d'équilibre entre l'ajout du cryoprotecteur et le début de la congélation (dans les limites des tests de toxicité);
6. Limiter la cryopréservation avec le dilueur HBSS étant donné qu'après deux années d'essais ce dilueur s'est avéré le moins efficace de tous les dilueurs testés pour la cryopréservation;
7. Poursuivre les congélations avec les paillettes de 0,5 ml et de 1,2 ml. Ces dernières ayant donné de bons résultats lors des essais de 2013, elles peuvent représenter un bon compromis par rapport à celles de 2,5 ml;
8. Parfaire les techniques de décongélation et de manipulation lors de la fécondation de grands volumes d'ovocytes;
9. Tester de nouveaux temps et températures (39-40 °C) de décongélation, fréquemment utilisés chez *Moxostoma robustum* pour vérifier si cela contribue à améliorer le taux de motilité postcongélation;
10. Tester et comparer la performance de solutions d'activation à différentes osmolalités afin d'optimiser les résultats;
11. Procéder aux analyses statistiques des données portant sur la morphologie des spermatozoïdes avant et après la congélation dans le but d'évaluer les cryodommages et de permettre ainsi une analyse plus complète pour orienter les choix de traitements;
12. Procéder à l'examen des échantillons d'œufs et de larves issus de laitance cryopréservée afin d'évaluer leur développement dans les différents traitements;

13. Abandonner la congélation d'échantillons dans les paillettes de 2,5 ml. Les résultats obtenus dans ce type de paillette ont été nettement inférieurs à ceux obtenus dans les autres formats. La fermeture des paillettes de 2,5 ml (aussi appelées macrotubes) se fait avec des billes métalliques et demeure dangereuse malgré les efforts que nous avons faits pour remédier à la situation cette année. Une grande proportion éclate à la congélation ou lors de la décongélation, ce qui engendre une perte d'échantillons;
14. Abandonner l'usage de l'unité de congélation, puisqu'elle présente de nombreux désavantages :
- résultats incertains et possibilités de gaspillage d'échantillons en raison du manque de stabilité du radeau,
 - environnement de congélation moins stable en raison de divers paramètres (ouverture/fermeture, niveau d'azote plus ou moins élevé, radeau qui penche d'un côté, etc.),
 - évaluation et ajustement de la hauteur du radeau peu précis,
 - temps requis pour les manipulations considérablement augmenté : pour une même période, il est possible de congeler trois fois plus de laitance avec le contenant de conservation à sec au LN₂,
 - consommation de très grandes quantités d'azote liquide contrairement au contenant de conservation à sec au LN₂,
 - occasionne plus de manipulations des échantillons après la congélation pour les placer et les classer dans le dewar,
 - plus dangereuse de façon générale en raison des manipulations pour remplir ou vider l'unité de congélation et manipuler les échantillons,
 - interruptions plus importantes de la chaîne de froid. Comme cette technique ne peut être utilisée dans un espace fermé et climatisé, puisque l'espace est insuffisant, l'unité de congélation est à l'extérieur et donc soumise à l'air ambiant. L'installation du radeau dans l'unité de congélation ainsi que la sortie des échantillons pour le rangement dans le dewar impliquent donc une interruption de la chaîne de froid beaucoup plus importante que lorsque la congélation initiale est faite dans le contenant de conservation à sec au LN₂, lequel peut être placé dans l'espace climatisé sur le terrain;
15. Vérifier et ajuster le niveau d'azote liquide dans les dewars sur une base hebdomadaire afin d'assurer la conservation optimale de la banque de laitance. Poursuivre l'utilisation du réservoir auxiliaire pour entreposer l'azote liquide. Cette méthode, développée en 2013, contribue à réaliser d'importantes économies d'azote liquide en permettant de limiter l'évaporation.

LEXIQUE

Contenant de conservation à sec au LN₂ (*dry-shipper*) : Bouteille d'aluminium isothermique qui contient de l'azote liquide entièrement absorbé dans un matériau poreux. Les échantillons, insérés dans le réservoir du centre, sont congelés dans les vapeurs d'azote à -196 °C.

Cryoprotecteurs : Les cryoprotecteurs sont des substances qui, ajoutées au dilueur et au sperme, protègent les spermatozoïdes lors de la congélation et de la décongélation. Les cryoprotecteurs limitent les cryolésions, mais peuvent devenir toxiques pour les spermatozoïdes lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations élevées. Il existe plusieurs types de cryoprotecteurs. Certains, comme le méthanol, agissent de façon intracellulaire. D'autres, comme le jaune d'œuf, agissent de façon extracellulaire en protégeant la membrane cellulaire.

Dewar : Réservoir isolant en aluminium avec un goulot en fibre de verre qui permet le stockage d'échantillons dans l'azote liquide.

Dilueurs : Les dilueurs sont des solutions de sels ou d'hydrates de carbone dont la fonction est de maintenir la viabilité des spermatozoïdes au cours de la réfrigération ou de la congélation. Les dilueurs doivent être isotoniques pour ne pas activer la motilité des spermatozoïdes avant la congélation et pendant la décongélation. Leur composition doit être semblable à celles du plasma séminal et leur conductivité thermique doit être élevée afin de permettre le transfert rapide de la température du milieu extérieur à la laitance. Enfin, ces solutions doivent être exemptes de micro-organismes (stériles).

HBSS : Dilueur composé principalement de sels.

RATH : Dilueur composé principalement de glucose.

Osmolalité : Correspond au nombre de particules osmotiquement actives par litre de solution et permet de mesurer la pression osmotique. La solution est isotonique quand la concentration est égale en solutés de part et d'autre d'une membrane semi-perméable, hypertonique quand la concentration est supérieure en solutés à celle du cytoplasme et hypotonique quand l'environnement a une concentration inférieure en solutés par rapport au cytoplasme.

Paillette : Petits tubes fins dans lesquels sont conservés les spermes congelés des banques de sperme.



Paillette : A) 0,5 ml B) 1,2 ml C) 2,5 ml (macrotube)

Photo : Alain Beaudoin

Réceptacle cryogénique (*canister*) : Gobelet métallique s'insérant dans un dewar et permettant l'entreposage de paillettes ou de macrotubes.

Technique de congélation : La technique de congélation de cellules implique le transfert de température et le transport de l'eau. Elle se divise en trois étapes : 1) les cellules sont soumises à une solution cryoprotectrice (p. ex., méthanol) qui pénètre dans la cellule et remplace une grande quantité d'eau intracellulaire; 2) à la suite de l'ajout de cryoprotecteur, la cellule doit adapter son osmolalité en devenant isotonique par rapport au milieu extracellulaire. Durant ce processus, des chocs toxiques et osmotiques peuvent survenir; 3) au cours de la dernière étape (congélation), la température baisse jusqu'au point de congélation de l'eau et de la solution cryoprotectrice. Selon la courbe de congélation obtenue (relation entre la température et le temps), il pourra y avoir plus ou moins formation de cristaux qui sont susceptibles d'endommager les cellules. La courbe de congélation est donc un élément important à surveiller.

Unité de congélation avec radeau flottant : Boîte de polystyrène avec un contenant métallique pour l'azote liquide. Les échantillons sont placés sur un radeau flottant muni de supports qui permettent de contrôler la hauteur de 15 à 50 mm. Cette variation de hauteur permet d'avoir un certain contrôle sur la vitesse de congélation dans les vapeurs d'azote.

Vitesse de congélation : La vitesse de congélation est une étape importante de la cryopréservation. L'immersion directe des paillettes ou des macrotubes (paillettes de 2,5 ml) dans l'azote liquide peut entraîner la disparition complète de la membrane plasmique et de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes. La congélation dans la vapeur d'azote est progressive et réduit considérablement les dommages causés aux structures membranaires.

Vitesse de décongélation : La vitesse de décongélation est aussi une étape importante de la cryopréservation et doit être faite progressivement pour réduire l'effet de la recristallisation dans les cellules spermatiques et l'effet thermique sur la membrane plasmique. La décongélation des paillettes et des macrotubes dans le cadre de ces essais a été effectuée par immersion dans un bain d'eau à 37 °C.

PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux de recherche et de développement des techniques de cryopréservation de la laitance du chevalier cuivré ont été rendus possibles grâce à la participation financière de la Fondation de la faune du Québec (FFQ). Ils s'inscrivent dans un projet plus vaste de rétablissement et de suivi de la population du chevalier cuivré auquel le ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs (MDDEFP)⁸ contribue financièrement et pour lequel il assume la plus grande partie des ressources humaines qui y sont associées. Ces travaux bénéficient également du soutien financier du MPO (ministère des Pêches et Océans du Canada) depuis plusieurs années.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à souligner la participation de plusieurs techniciens et techniciennes de la faune qui, par leur implication dans ce vaste projet, contribuent indirectement aux travaux de cryopréservation de la laitance. Nous remercions Sylvain Desloges, Claude Sirois et Mélissa Lamoureux du MDDEFP pour leur soutien à la capture des géniteurs ainsi que Delphine Durette-Morin, étudiante en biologie à l'Université de Dalhousie, qui a accompagné l'équipe bénévolement en participant à la capture de

⁸Direction régionale de l'Estrie, de Montréal et de la Montérégie, Secteur de la faune;
Direction de la faune aquatique, Direction générale de l'expertise sur la faune et ses habitats;
Station piscicole de Baldwin-Coaticook.

géniteurs ainsi qu'à certaines manipulations de congélation des échantillons. Ces travaux sont rendus possibles grâce à l'étroite collaboration développée entre le MDDEFP et le COVABAR depuis quelques années. Nous tenons à souligner l'excellent travail du personnel de la station piscicole de Baldwin-Coaticook qui, par l'expertise qu'il a développée, nous a permis de suivre la croissance et la survie des jeunes chevaliers cuivrés produits au moyen de laitance cryopréservée. Ce document a été révisé par Chantal Côté, Paul Grondin et Daniel Pouliot et nous les remercions. Jessica Dubé a également révisé le document et participé à la mise en page.

BIBLIOGRAPHIE

- ALAVI, S. M. H., O. LINHART, K. COWARD et M. RODINA (2008). "Fish Spermatology: Implications for Aquaculture Management", Chapter 12 in *Fish Spermatology*, Alpha Science International Ltd, 484 p.
- BERGERON, A. (2001). Augmentation de la disponibilité de gamètes du doré jaune (*Stizostedion vitreum*) : étalement de la période de reproduction et cryoconservation des spermatozoïdes, mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de maître en sciences, 94 p.
- COMITÉ D'INTERVENTION (1995). Plan d'intervention pour la survie du suceur cuivré (*Moxostoma hubbsi*), Québec, ministère de l'Environnement et de la Faune, Direction de la faune et des habitats, 40 p.
- COOKE, S. J. et C. M. BUNT (1999). "Spawning and reproductive biology of the greater redhorse, *Moxostoma valenciennesi*, in the Grand river, Ontario", *Can. Field. Nat.*, 113: 497-502.
- COSEPAC (2004). Évaluation et rapport de situation du COSEPAC sur le chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*) au Canada — *Mise à jour*, Comité sur la situation des espèces en péril au Canada, Ottawa, vii+ 43 p. [www.registrelep.gc.ca/Status/Status_f.cfm].
- JENKINS, J., B. EILTS, A. GUITREAU, C. FIGIEL, R. DRAGELIS-DALE et T. TIERSCH (2011). "Sperm quality assessments for endangered razorback suckers *Xyrauchen texanus*", *Reproduction*, 141: 55-65.
- HAFFRAY, P., C. LABBE, IMV TECHNOLOGIES et G. MAISSE (2008). "Fish sperm cryopreservation in France: from laboratory studies to application in selective breeding programs", *Cybium*, 32(2) suppl.: 127-129.
- HE, S. et L. WOOD (2003). "The effects of osmolality, cryoprotectant and equilibration time on striped bass *Morone saxatilis* sperm motility", *Journal of the World Aquaculture Society*, 34: 255-265.
- KWAK, T. J. et T. M. SKELLY (1992). "Spawning habitat, behavior, and morphology as isolating mechanisms of the golden redhorse, *Moxostoma erythrurum*, and the black redhorse *M. duquesnei*, two syntopic fishes", *Env. Biol. Fish.*, 34: 127-137.
- KOPEIKA, E. et J. KOPEIKA (2008). "Variability of sperm quality after cryopreservation", Chapter 11 in *Fish Spermatology*, Alpha Science International Ltd, 484 p.
- LEGENDRE, M. et R. BILLARD (1980). Cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.), *Bulletin Français de Pisciculture*, 278: 12-33.
- LA HAYE, M. et M. HUOT (1995). Situation du suceur cuivré (*Moxostoma hubbsi*) au Québec : espèce susceptible d'être désignée menacée ou vulnérable, Québec, Le Groupe de recherche SEEEQ ltée pour le ministère de l'Environnement et de la Faune, Direction de la faune et des habitats, 50 p.
- MONGEAU, J.-R., P. DUMONT, L. CLOUTIER et A.-M. CLÉMENT (1988). Le statut du chevalier cuivré, *Moxostoma hubbsi*, au Canada, *Can. Field. Nat.*, 102: 132-139.

- SALL, J. et A. LEHMAN (1996). “*JMP Start Statistics. A guide to statistics and data analysis using JMP® and JMP IN® software*”, version 3.2.1, Copyright by SAS Institute Inc., Duxbury Press, An imprint of Wadsworth Publishing Company, Scarborough, 521 p.
- TIERSCH, T., C. FIGIEL, W. WAYMAN, J. HOLT, G. CARMICHAEL et O. GORMAN (1998). “Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker”, *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 127: 95-104.
- VACHON, N. (2010). Reproduction artificielle, ensemencements et suivi du recrutement du chevalier cuivré en 2009, ministère des Ressources naturelles et de la Faune, Unité de gestion des ressources naturelles et de la faune de Montréal-Montérégie, Longueuil, Rapp. tech. 16-44, vii + 28 p. + 5 annexes.
- VACHON, N., S. VELÁSQUEZ, P. GRONDIN et H. MASSÉ (2013). Premiers essais de cryopréservation de la laitance du chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*), résumé de la conférence présentée à l'atelier sur la faune aquatique, Québec, 19-21 février 2013, dans Fournier, D. et V. Cauchon (éd.) 2013, *Compte rendu de l'atelier sur la faune aquatique 2013*, document de régie interne, ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, Direction générale de l'expertise sur la faune et ses habitats, Direction de la faune aquatique, Québec, 77 p.
- VACHON, N. (2019). Reproduction artificielle, ensemencements et suivi de la population de chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*) en 2013, ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Direction de la gestion de la faune de l'Estrie, de Montréal, de la Montérégie et de Laval, Rapport technique 16-46, xii + 35 pages
- VIVEIROS, A. et H. GODINHO (2009). “Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review”, *Fish. Physiol. Biochem.*, 35: 137-150.
- WILLIOT, P., E. F. KOPEIKA et B. F. GONCHAROV (2000). “Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the culture Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt)”, *Aquaculture*, 189: 53-61.
- ZELKO, J. (2013). “*Cryopreservation of Robust Redhorse Sperm: A Prelisted Recovery Tool*”, Warm Springs Fish Technology Center US Fish & Wildlife Service, Conference presented at Robust Redhorse Conservation Committee (RRCC) Annual Meeting.

**Forêts, Faune
et Parcs**

Québec 