

L'INSÉMINATION ARTIFICIELLE DE LA TRUITE (*SALMO GAIRDNERI* RICHARDSON)

II. — COMPARAISON DES EFFETS DE DIFFÉRENTS DILUEURS SUR LA CONSERVATION DE LA FERTILITÉ DES GAMÈTES AVANT ET APRÈS INSÉMINATION

R. BILLARD et B. JALABERT

avec la collaboration technique de Anne-Marie ESCAFFRE et Christiane LE GALLO

*Laboratoire de Physiologie des Poissons,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas*

RÉSUMÉ

Grâce à un protocole expérimental standard suivant lequel le sperme ou les ovules sont mélangés à différents milieux (tabl. 1) avant insémination, il a été possible de montrer qu'une solution minérale reconstituant la composition minérale du liquide séminal de Truite (dite milieu minéral de liquide séminal — MMLS) permet de conserver la fécondabilité des ovules pendant 2 heures et du sperme pendant 30 minutes.

Le milieu constitue donc un *dilueur de conservation* dans lequel les gamètes peuvent être maintenus, sans affecter leur fertilité, pendant des temps relativement longs, par opposition au *dilueur d'insémination* antérieurement défini (PETIT *et al.*, 1974) impropre à la conservation des gamètes mais favorable à l'efficacité de l'insémination (solution de NaCl posm 250, pH 9,5).

Une méthode d'insémination par double dilution peut être proposée en mettant à profit les propriétés de ces 2 dilueurs pour augmenter le rendement de l'insémination : 1^{re} dilution dans le dilueur de conservation qui maintient l'immobilité des spermatozoïdes et prolonge leur survie puis 2^e dilution avec le dilueur d'insémination qui provoque la mise en mouvement des spermatozoïdes.

INTRODUCTION

Dans les méthodes d'insémination artificielle dites sèche ou humide actuellement utilisées chez les Salmonidés, les gamètes sont mis en présence dans des milieux (eau ou liquide coelomique) où les spermatozoïdes deviennent mobiles. Chez les Salmonidés, les spermatozoïdes, une fois mis en mouvement, ne présentent jamais une durée

de motilité très longue et perdent très rapidement leur pouvoir fécondant (GINSBURG, 1963).

Dans le cas où des dilueurs d'insémination sont utilisés (PETIT *et al.*, 1973), il est possible de réduire la quantité de sperme employé mais les gamètes doivent être mélangés immédiatement avec le dilueur qui ne peut en aucun cas constituer un milieu de conservation au moins pour les spermatozoïdes. Dans le but de définir des dilueurs susceptibles d'assurer la survie des gamètes pendant au moins plusieurs minutes, avant et après insémination (dilueurs de conservation), plusieurs milieux ont été testés et les résultats sont rapportés dans cette étude.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Les expériences conduites sur Truites arc-en-ciel âgées de 3 à 5 ans et en provenance de plusieurs piscicultures, se sont déroulées pendant les saisons de reproduction 1972-1973 et 1973-1974. Les géniteurs dont l'état de maturité était contrôlé plusieurs fois par semaine, étaient anesthésiés dans une solution de MS 222 avant prélèvement des gamètes. Chaque expérience, conduite à une température de l'ordre de 10°C, a été effectuée avec le sperme d'un seul mâle. Les spermatozoïdes dans lesquels les spermatozoïdes présentaient, sous microscope, une faible motilité, étaient éliminés. La concentration en spermatozoïdes a été déterminée *a posteriori*, par comptage des spermatozoïdes sur hématimètre. En raison du nombre élevé de lots dans chaque expérience, les ovules de plusieurs femelles étaient mélangés. Dans tous les cas, le liquide cœlomique était éliminé lors du prélèvement.

Le taux de dilution du sperme correspond à la dilution finale : pour 10^{-3} , 10 ml de dilueur et 10 μ l de sperme dans la technique de simple dilution et 10 ml puis 5 ml de dilueur pour un volume initial de 15 μ l de sperme dans la technique de double dilution. Pour chaque expérience mettant en œuvre un mâle différent, le nombre moyen de spermatozoïdes par ovules est indiqué dans la légende des figures.

Les intervalles de confiance des pourcentages ($p = 95$ p. 100) d'après les tables de FISCHER et YATES (1963), sont reportés sur les différents graphiques.

Les conditions expérimentales sont analogues à celles exposées précédemment (PETIT *et al.*, 1973 ; BILLARD *et al.*, 1973) et comportent comme référence des inséminations témoins faites selon la méthode sèche. Les détails particuliers à chaque expérience sont développés ci-dessous.

1. — Composition et caractéristiques des différents dilueurs utilisés

Les dilueurs de conservation testés dans cette expérience simulent les compositions minérales de plusieurs milieux naturels (liquide séminal, liquide cœlomique, plasma sanguin) (tabl. 1). En outre, des eaux de sources fortement minéralisées (tabl. 1) et du liquide cœlomique recueilli lors de la récolte des ovules ont été employés. Les pH de tous les dilueurs ont été ajustés avec un tampon *Tris*-HCl 0,02 M.

En comparaison avec les dilueurs précédents, un dilueur d'insémination à base de NaCl (Prolabo RP posm 250, pH 9,0, tampon *Tris*-HCl 0,02 M) a aussi été utilisé.

2. — Effets sur la conservation de la fécondabilité des ovules

L'action des différents dilueurs sur la fécondabilité des ovules est testée de la façon suivante : des lots de 200 ovules environ sont mélangés avec 10 ml de dilueur et le sperme frais est ajouté au mélange immédiatement (témoins) ou après des délais variant entre 1 et 40 ou 120 minutes. Avant addition du sperme, le dilueur de conservation testé est remplacé par le dilueur d'insémination. quinze minutes après insémination, les œufs sont transférés en eau douce dans les incubateurs.

3. — Effets sur la conservation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes

Un protocole sensiblement symétrique au précédent est mis en œuvre : le sperme est d'abord mélangé au dilueur et les ovules sont ensuite ajoutés après des intervalles de temps croissants. Deux techniques d'insémination sont alors utilisées :

— *Technique de simple dilution.*

Le sperme dilué dans le milieu de conservation est ajouté aux ovules « secs » (sans liquide coelomique et sans autre dilueur).

— *Technique de double dilution.*

Les lots de 200 ovules sont mélangés à 5 ml de dilueur d'insémination à base de NaCl (p_{osm} 250, pH 9,0) avant l'addition du sperme dilué. L'objectif de cette double dilution est de permettre la mise en mouvement des spermatozoïdes qui sont immobilisés dans les dilueurs de conservation. Dans tous les cas les œufs inséminés sont transférés en eau douce dans les incubateurs 15 mn après insémination.

TABLEAU I

*Composition en mmol/l des solutions minérales utilisées
comme dilueurs de conservation des gamètes (Produits ProLabo RP)*

	Reconstitution minérale du		
	liquide séminal (MMLS)	plasma sanguin (MMPS)	liquide coelomique (MMLC)
NaCl.....	110	1,50	155
KCl.....	28,3	5,5	3,1
MgSO ₄ (7 H ₂ O).....	1,1	0,6	1,3
CaCl ₂ (2 H ₂ O).....	1,8	1,8	3,4
p o. finale (après addition des tampons).....	306	318	278
pH final.....	9,21	9,25	9,27

En comparaison la composition ionique de l'eau douce utilisée comme témoin était la suivante (en mEq/l) : Na⁺ = 1,17, K⁺ = 0, Mg⁺⁺ = 9,00, Ca⁺⁺ = 5,75.

4. — *Effets du MMLS sur les œufs après insémination*

L'objectif de cette expérience est de définir la durée optimum de séjour des œufs dans le MMLS où a eu lieu l'insémination lorsque celle-ci est pratiquée selon la technique de simple dilution (MMLS 10 ml + 1 ou 10 µl de sperme ajouté aux lots de 200 ovules dépourvus de liquide coelomique).

RÉSULTATS

I. — *Conservation de la fécondabilité des ovules*

La fécondabilité se maintient de façon satisfaisante dans toutes les solutions minérales pendant 40 minutes, mais elle est réduite considérablement après une minute de séjour dans l'eau douce (fig. 1) ; lorsque l'expérience est poursuivie dans les milieux minéraux pendant 2 heures, la fécondabilité est encore maintenue. Les

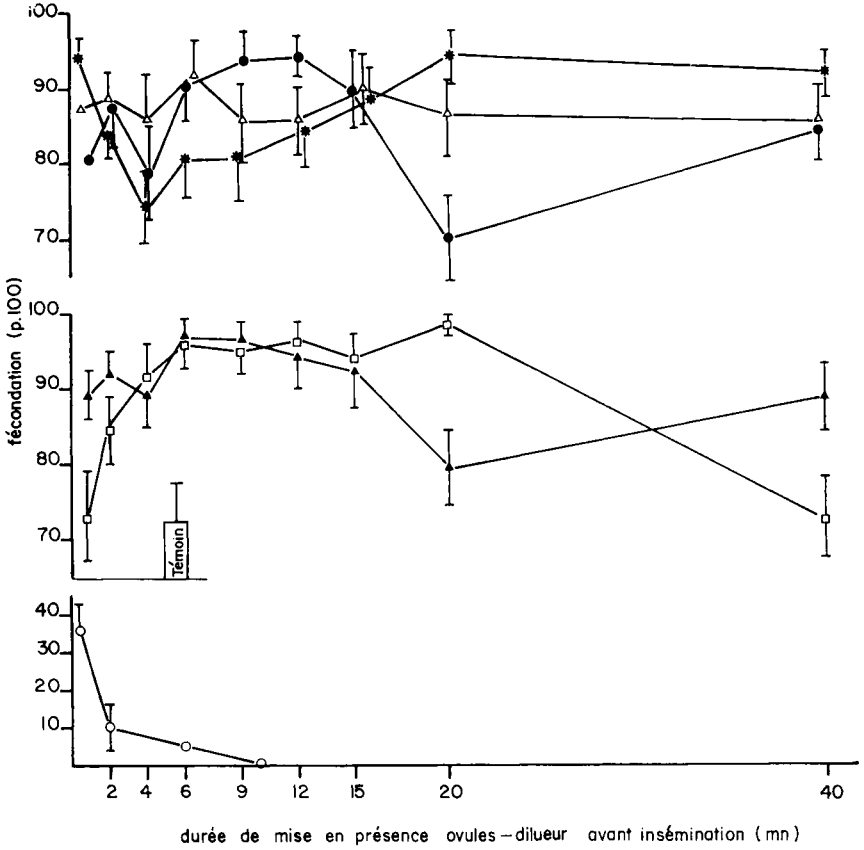


FIG. 1. — Effets de plusieurs dilueurs sur la conservation de l'aptitude à la fécondation des ovules

Dilution finale du sperme : 10^{-3} (900 000 spermatozoïdes par ovule)

- * Solution de NaCl
- Δ Milieu minéral de plasma sanguin (MMPS)
- Milieu minéral de liquide séminal (MMLS)
- ◻ Milieu minéral de liquide cœlomique (MMLC)
- ▲ Liquide cœlomique naturel (LCN)
- Eau douce

meilleurs résultats sont obtenus après des séjours de 6 à 15 minutes, dans le liquide cœlomique naturel ou dans sa reconstitution minérale. Au-delà de la 15^e minute, les pourcentages de fécondation présentent des variations plus importantes. Dans la plupart des expériences réalisées, la fécondabilité, qui était à son niveau le plus élevé au cours des 2 ou 3 premières minutes, présentait ensuite une diminution significative entre la 4^e et la 8^e ou 10^e minute, avant de revenir au niveau initial. Ce phénomène est particulièrement net lorsque le niveau de fertilité des femelles est faible et que la dilution du sperme est élevée (fig. 2).

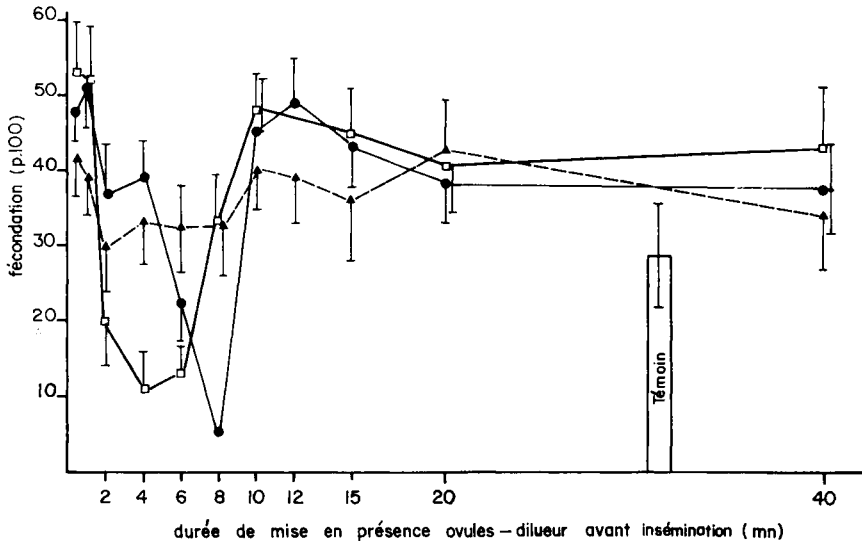


FIG. 2. — Évolution de la fécondabilité d'ovules placés pendant des temps croissants dans 3 dilueurs différents

Taux de dilution du sperme 10^{-4} soit environ 47 500 spermatozoïdes par ovule.
Insémination témoin réalisée selon la méthode sèche

- MMPS
- LCN
- ▲ MMLS

2. — Conservation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes

— Technique de simple dilution.

L'étude de l'effet des différents dilueurs sur la survie des spermatozoïdes effectuée en ajoutant des ovules dans le mélange sperme-dilueur à des temps croissants, montre l'action favorable du milieu minéral de liquide séminal dans le maintien du pouvoir fécondant après dilution. Après 40 minutes, le pourcentage de fécondation reste de l'ordre de 30 p. 100 ; alors qu'il est nul après une minute dans de l'eau douce et après 2 à 4 minutes dans le milieu minéral de plasma sanguin (MMPS) et la solution de NaCl (dilueur d'insémination). Dans le liquide cœlomique naturel et son équivalent minéral quelques fécondations restent possibles après séjour des spermatozoïdes pendant 2 heures (fig. 3).

L'examen du sperme sous microscope montre que les spermatozoïdes sont immobilisés dans le MMLS et qu'après le mélange des ovules avec le sperme dilué, selon la

technique de simple dilution, une partie seulement des spermatozoïdes est mise en mouvement probablement du fait de la présence d'un film de liquide cœlomique

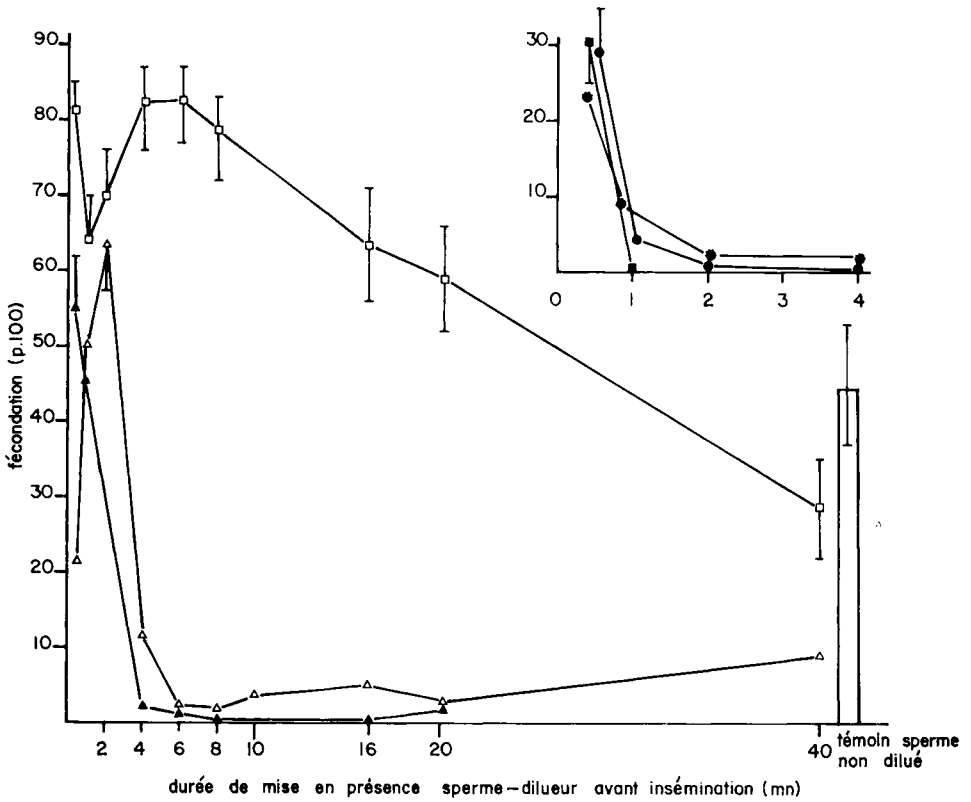


FIG. 3. — Évolution du pouvoir fécondant du sperme dilué dans plusieurs milieux avant insémination avec des ovules frais

Dilution du sperme après mélange avec les dilueurs : 10^{-3} (750 000 spermatozoïdes par ovule).
Technique de simple dilution

- MMLS
- △ LCN
- ▲ MMLC
- MMPS
- * Solution de NaCl
- Eau douce

autour des ovules. Dans ces conditions d'insémination les pourcentages de fécondation sont plus faibles, au moins pour les fortes dilutions, avec le MMLS qu'avec le dilueur d'insémination (fig. 4).

— *Technique de double dilution* (fig. 5).

Avec la technique de double dilution dans laquelle l'examen microscopique révèle que la plupart des spermatozoïdes sont remis en mouvement, le pourcentage de fécondation est maintenu au niveau maximum pendant 30 minutes, c'est-à-dire pendant une période plus longue qu'avec la technique de simple dilution pour le même taux de dilution (10^{-3} soit 700 000 spz/ovule).

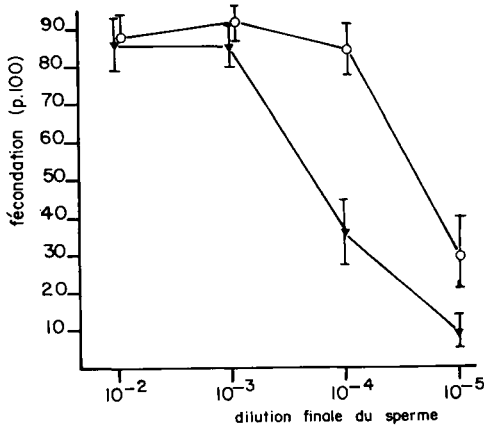


FIG. 4. — Comparaison des pourcentages de fécondation obtenus après utilisation d'une solution de NaCl (○) et du MMLS (▼) utilisés comme dilueurs d'insémination (concentration du sperme utilisé 19.10⁹ spermatozoïdes/ml)

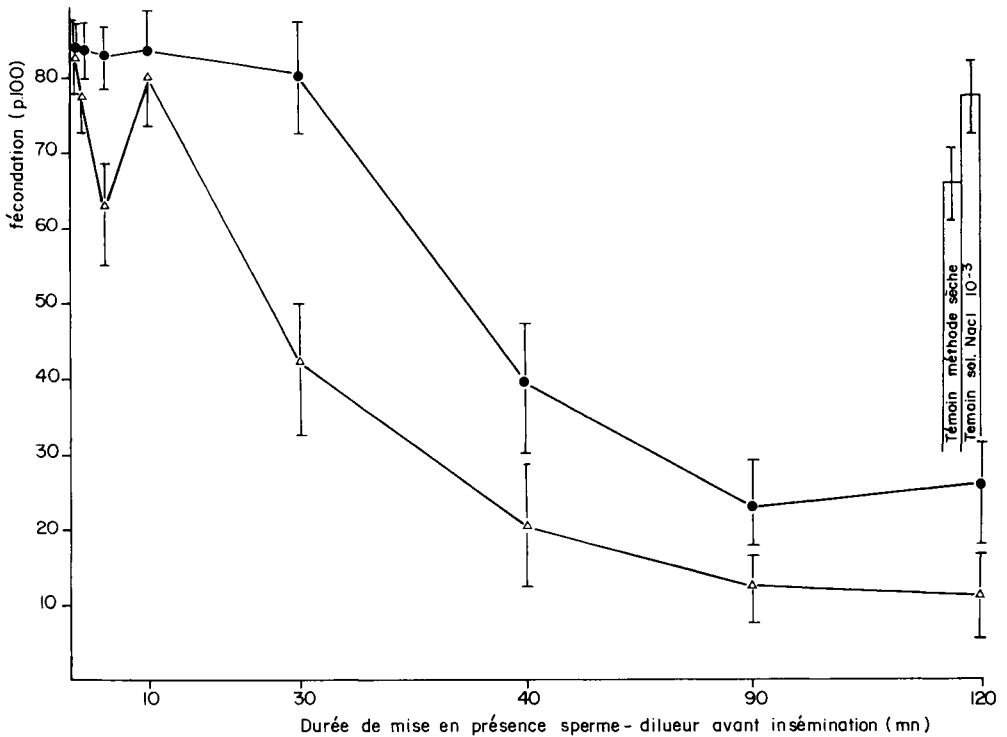


FIG. 5. — Évolution du pouvoir fécondant du sperme dilué dans le MMLS

Dilution finale du sperme { ● 10⁻³ (700 000 spz/ovule)
 Δ 10⁻⁴ (70 000 spz/ovule)

Technique de double dilution

Lorsque le taux de dilution est plus élevé (10^{-4} soit environ 70 000 spz/ovule), le pourcentage de fécondation diminue plus rapidement. Il faut aussi souligner l'existence d'une dépression de fertilité entre la 2^e et 10^e minute.

3. — Effets du MMLS sur les œufs après insémination (fig. 6)

Lorsque les œufs sont maintenus dans le MMLS après insémination, le pourcentage d'œuf en développement n'est pas modifié de façon importante dans les 2 heures qui suivent. Le niveau initial de fertilité reste, vraisemblablement du fait de la technique de simple dilution utilisée, inférieur aux témoins inséminés selon la « méthode sèche ».

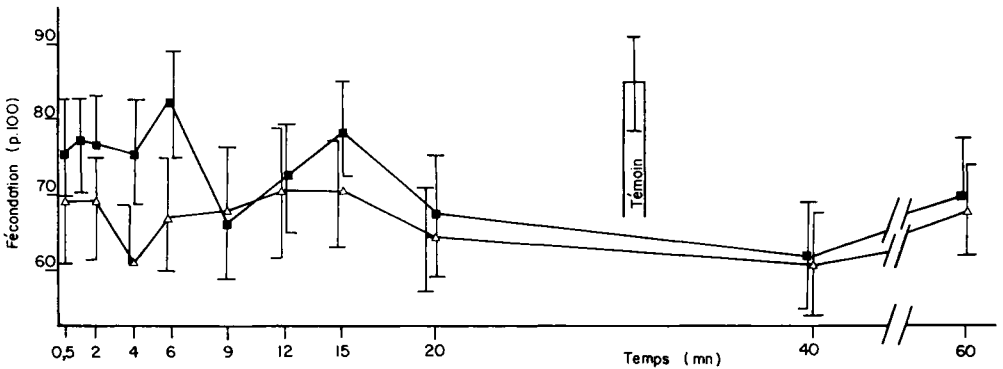


FIG. 6. — Effets de la durée d'exposition des œufs au MMLS après insémination selon la technique de simple dilution

Taux de dilution final du sperme $\left\{ \begin{array}{l} 10^{-3} \quad \blacksquare \quad 250\,000 \text{ spz par ovule} \\ 10^{-4} \quad \triangle \quad 125\,000 \text{ spz par ovule} \end{array} \right.$

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dilueur de conservation et dilueur d'insémination

Une solution minérale simulant la composition minérale du liquide séminal de Truite (MMLS) constitue un milieu qui permet une conservation satisfaisante de la fertilité des gamètes de Truite arc-en-ciel. La fécondabilité des ovules peut être maintenue pendant au moins 2 heures et la fécondance des spermatozoïdes subsiste sans diminution pendant 30 minutes. Dans ce milieu, les spermatozoïdes restent immobiles, surtout du fait des fortes concentrations en ions potassium (SCHLENK et KAHMANN, 1937 ; BILLARD *et al.*, 1974). Pour permettre une reprise de la motilité des spermatozoïdes lors de l'addition des ovules, il est préférable d'avoir recours à une technique de double dilution dans laquelle une solution de NaCl est ajoutée au sperme préalablement dilué dans le MMLS et aux ovules lors de l'insémination.

Deux types de dilueurs peuvent donc être définis :

— *Un dilueur de conservation* qui permet une bonne conservation de la survie des gamètes comme le MMLS aussi bien avant qu'après insémination.

— *Un dilueur d'insémination* qui permet d'obtenir un pourcentage de fécondation maximum. La solution de NaCl déjà définie (posm 250, pH 9 à 9,5, PETIT *et al.*, 1973 ; BILLARD *et al.*, 1973) se révèle à cet égard très satisfaisante.

Par contre le MMLS ne constitue pas un dilueur d'insémination intéressant (fig. 4).

Le problème du maintien de la fertilité des gamètes

Lorsque les effets des différents dilueurs sont testés directement sur les ovules non fécondés, la supériorité des solutions salines par rapport à l'eau douce, déjà signalée par RUNNSTRÖM (1920) et KUSA (1950), apparaît clairement (fig. 1). La rapide perte de la fertilité des ovules de Salmonidés dans l'eau douce est bien connue (GINSBURG, 1961, 1963) et semble pouvoir être mise en relation avec l'obstruction du micropyle qui intervient très rapidement après la mise en contact des œufs avec l'eau (GINSBURG, 1961 ; YAMAMOTO, 1961 ; SZÖLLÖSI et BILLARD, 1973). La dépression du pourcentage de fécondation qui intervient entre la 2^e et la 10^e minute et qui est particulièrement nette dans la figure 2 se retrouve dans toutes les répétitions faites surtout si le taux de dilution est élevé (10⁻⁴). Une telle dépression se retrouve aussi dans les minutes qui suivent le transfert des œufs inséminés dans les incubateurs (BILLARD *et al.*, 1973).

La survie des spermatozoïdes de Truite est très courte dans l'eau douce, ainsi que l'ont déjà montré de très nombreux auteurs (HUXLEY, 1930 ; ELLIS et JONES, 1939 ; NOMURA, 1964 ; GINSBURG, 1963). On ne peut manquer de s'interroger sur une aussi faible durée de survie, en comparaison avec celle d'autres espèces de Poissons d'eau douce, telle que la Bouvière dont les spermatozoïdes peuvent survivre environ 7 minutes dans de l'eau distillée (SUZUKI, 1959) et ceux de l'Esturgeon qui peuvent survivre de 3 à 5 minutes dans l'eau douce. Les solutions de NaCl ou des milieux minéraux plus complexes comme la reconstitution minérale du plasma sanguin n'améliorent pas notablement la durée de survie des spermatozoïdes de Truite. Le liquide cœlomique naturel, qui est considéré comme favorable à la survie des spermatozoïdes (HARTMANN, 1944 ; NOMURA, 1964), ne prolonge pas davantage le pouvoir fécondant du sperme que sa reconstitution minérale (MMLC).

Cette comparaison ne permet pas d'attribuer, au moins aux concentrations utilisées dans la présente étude, le maintien du pouvoir fécondant des spermatozoïdes à l'existence dans le liquide cœlomique de facteurs organiques qui, selon YOSHIDA et NOMURA (1972), excerceraient un effet favorable sur la durée et l'intensité de la motilité des spermatozoïdes. Le taux de survie reste faible et très inférieur à celui obtenu après dilution du sperme dans le MMLS.

Reçu pour publication en mars 1974.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le docteur LE HOUEROU qui a bien voulu nous fournir une partie des géniteurs utilisés dans ces expériences. L'entretien des animaux et la surveillance des incubations ont été assurés par MM. CARPENTIER et BONICEL et la frappe du manuscrit est due à M^{lle} MATET. L'analyse minérale des eaux de sources a été assurée par M^{lle} NISBER (Laboratoire du C. E. T. E. G. R. E. F., avenue de Saint-Mandé, Paris).

SUMMARY

ARTIFICIAL INSEMINATION OF THE TROUT (*SALMO GAIRDNERI* RICHARDSON).II. — COMPARISON OF EFFECTS OF DIFFERENT DILUENTS
ON CONSERVATION OF GAMETE FERTILITY BEFORE AND AFTER INSEMINATION

Using standard experimental procedure in which sperm and ovules are mixed in different media (table 1) before insemination, we show that a mineral solution which reconstitutes the mineral composition of trout seminal fluid (called mineral medium of seminal fluid — MMLS) permits ovule fertilizing ability to be conserved for 2 hours and that of sperm for 30 minutes.

This medium is a *storage diluent* in which gametes may be kept without affecting their fertility for relatively long times, as compared to the *insemination diluent* previously defined (PETIT *et al.*, 1973). This latter diluent is unsuitable for gamete storage, but favorable to efficiency of insemination (solution of NaCl osmotic pressure 250, pH 9.5).

A method of insemination by double dilution may be proposed by using the properties of the 2 diluents to increase insemination yield: 1st dilution in the storage diluent where spermatozoa are motionless, the 2nd dilution in the insemination diluent where spermatozoa are put into motion.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BILLARD R., PETIT J., JALABERT B., SZÖLLÖSI D., 1973. Artificial insemination in trout using a sperm diluant in J. M. S. BLAXTER. *Early Life History of Fish*, Springer-Verlag Heidelberg, 715-723.
- BILLARD R., JALABERT B., PETIT J., 1974. L'insémination artificielle de la Truite *Salmo gairdneri* RICHARDSON. IV. Effets des ions K et Na sur la conservation de la fertilité des gamètes et la fécondation (soumis pour publication).
- ELLIS W. G., JONES J. W., 1939. The activity of the spermatozoa of *Salmo salar* in relation to osmotic pressure. *J. Exp. Biol.*, **16**, 530-534.
- FISHER R. A., YATES F., 1963. *Statistical tables 6th Ed.*, Oliver et Boyd, Edinburg-London édit.
- GINSBURG A. S., 1961. The block to polyspermy in sturgeon and trout with special reference to the role of cortical granules (alveoli). *J. Embryol., exp. morph.* **9**, 173-190.
- GINSBURG A. S., 1963. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes. *J. Embryol., exp. morph.* **11**, 13-33.
- GINSBURG A. S., 1963. Differences in morphology and properties of gametes in fishes and their importance for the elaboration of adequate methods of artificial insemination. *VI^e Congr. Inter. Reprod. Anim. insem. artif.*, Paris, **2**, C. Thibault édit., 1037-1040.
- HARTMANN M., 1944. Befruchtungstoffe (Gamone) bei Fishen (Regenbogenforelle). *Naturwissenschaften*, **28**, 807-813.
- HUXLEY J., 1930. The maladaptation of trout spermatozoa to freshwater. *Nature*, **125**, 494.
- KUSA M., 1950. Physiological analysis of fertilization in the egg of the salmon, *Oncorhynchus keta*. *Ann. Zool. Jap.*, **21**, 22-28.
- NOMURA M., 1964. Studies on reproduction of rainbow trout *Salmo gairdneri* with special reference to egg taking. VI. The activities of spermatozoa in different diluents, and preservation of semen. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, **30**, 723-733.
- PETIT J., JALABERT B., CHEVASSUS B., BILLARD R., 1973. L'insémination artificielle de la Truite (*Salmo gairdneri* RICHARDSON). I. *Ann. Hydrob.*, **4**, 201-210.
- RUNNSTRÖM J., 1920. Über osmotischen Druck und Eimembranfunktion bei den Lachsfischen. *Acta Zool.*, **1**, 321-336.
- SCHLENK W., KAHMANN H., 1937. Die chemische Zusammensetzung des Spermaliquors und ihre physiologische Bedeutung. *Biochem. Z.*, **295**, 283-301.
- SUZUKI R., 1959. Sperm activation and aggregation during fertilization in some fishes. *Embryologie*, **4**, 359-367.
- SZÖLLÖSI D., BILLARD R., 1973. La structure du micropyle des œufs de Truite. Les modifications après insémination dans différentes conditions (abst.). *J. Microscopie*, **17**, 99 a-100 a.
- YAMAMOTO T., 1961. Physiology of fertilization in fish eggs. *Inter. Rev. Cytol.*, **12**, 361-405.
- YOSHIDA T., NOMURA M., 1972. A substance enhancing sperm motility in the ovarian fluid of rainbow trout. *Bull. Japan Soc. Scient. Fish.*, **38**, 1073.