

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

III. — DÉFINITION DE LA NATURE ET DE LA MOLARITÉ DU TAMPON A EMPLOYER AVEC LES DILUEURS D'INSÉMINATION ET DE CONSERVATION

R. BILLARD, B. JALABERT et B. BRETON

avec la collaboration technique de Anne-Marie ESCAFFRE et M. CARPENTIER

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

RÉSUMÉ

Des expériences ont été conduites dans le but de définir la nature et la molarité du tampon à utiliser avec les deux dilueurs d'insémination et de conservation définis précédemment. Les effets des différents tampons ont été testés d'une part sur la stabilité du pH du dilueur après introduction de quantités croissantes de NaOH et HCl, de liquide célomique et d'ovules et d'autre part sur le pourcentage de fécondation établi sur de petits lots de 200 ovules. Les conclusions sont les suivantes :

1° Le dilueur d'insémination (solution de NaCl à 250 mosm) peut être avantageusement tamponné avec un tampon carbonate-bicarbonate 0,02 M, pH de 9,2 à 9,5. Ce tampon se révèle plus stable après introduction de grande quantité d'ovules que les autres tampons testés (*Tris*-HCl, Glycocolle-NaOH), mais le pourcentage de fécondation reste le même avec chacun de ces tampons.

2° Lorsque le milieu minéral de liquide séminal (MMLS) est utilisé comme dilueur de conservation, la conservation du pouvoir fécondant du sperme est meilleure si le tampon utilisé est le *Tris*-HCl ; le pH optimum est voisin de 9,0.

INTRODUCTION

Au cours de précédents travaux (BILLARD *et al.*, 1973 ; PETIT *et al.*, 1973), nous avons montré que l'emploi de dilueurs d'insémination ou de conservation permettait d'augmenter le pourcentage de fécondation des œufs de Truites, tout en réduisant

le volume de sperme utilisé. Le pH s'est avéré être un facteur important. La présente étude a été conduite dans le but de définir la nature et la molarité du tampon à utiliser avec les différents dilueurs.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Le matériel animal et les conditions d'expérimentation en petits lots ont été décrits précédemment (PETIT *et al.*, 1973). Les dilueurs suivants ont été testés :

- une solution minérale reconstituant la composition minérale du liquide séminal (MMLS) qui a été définie précédemment comme *dilueur de conservation* (BILLARD et JALABERT, 1974);
- une solution tamponnée de NaCl (Prolabo RP) dite *dilueur d'insémination*.

Ces deux types de dilueurs ont été ajustés ou tamponnés avec 4 tampons de nature différente : *Tris*-HCl selon GOMORI (1955), carbonate-bicarbonate selon DELORY et KING (1945), glycocolle-NaOH selon SÖRENSEN (1909) et borate-NaOH rapporté par KOHLER (1971).

Dans tous les cas, la pression osmotique finale est d'environ 250 milliosmoles. La stabilité du pH du dilueur après addition des ovules et du sperme lors de la fécondation pose un certain nombre de problèmes. En effet, les ovules autour desquels il subsiste toujours un peu de liquide cœlomique dont le pH propre est de l'ordre de 8, entraînent une chute du pH du mélange. Une stabilisation de ce pH a été tentée, d'une part en portant la molarité du tampon de 0,02 M à 0,1 M et d'autre part en augmentant le volume du dilueur utilisé lors de l'insémination : 20 ml au lieu de 10.

La stabilité du pH du dilueur d'insémination tamponné par différents tampons a été testée en ajoutant d'une part des quantités croissantes de NaOH et HCl (0,02 M) et d'autre part du liquide cœlomique ou des ovules.

Les effets du pH et des tampons ont été étudiés, à la fois sur le pourcentage de fécondation et la conservation de la fertilité des gamètes dans les mêmes conditions que précédemment (BILLARD et JALABERT, 1974).

RÉSULTATS

A. — Définition des caractéristiques optimum (pH, nature et molarité du tampon) des dilueurs

1. Dilueur d'insémination.

Nature du tampon.

Avec les systèmes *Tris*-HCl, carbonate-bicarbonate et glycocolle-NaOH, les pourcentages de fécondation obtenus dans l'expérience rapportée dans le tableau 1, sont supérieurs à 85 p. 100 pour des pH se situant aux alentours de 9,0. Avec le système borate-NaOH, les résultats sont légèrement plus faibles.

Avec les 4 tampons, le pH du dilueur après insémination (c'est-à-dire après addition de 200 ovules et de 10 ou 1 μ l de sperme dans 10 ml de dilueur) s'est trouvé légèrement diminué.

Molarité du tampon (tabl. 2).

Lorsque la molarité du tampon ajouté au dilueur est augmentée (passage de 0,02 M à 0,1 M), la stabilité du pH du milieu après insémination est améliorée, mais le pourcentage de fécondation s'est trouvé légèrement diminué, surtout pour les pH supérieurs à 9,4 — sauf dans le cas du milieu tamponné par le *Tris*-HCl.

TABLEAU I

Effets du pH et de la nature du tampon ajouté au dilueur d'insémination sur le pourcentage de fécondation d'ovules de Truite arc-en-ciel

(dilueur : solution de NaCl à 250 milliosmoles)

Tampon (0,02 M)	pH du dilueur		P. 100 de fécondation selon dilution du sperme	
	initial	après insémination	10 ⁻⁴ (1)	10 ⁻³ (1)
Tris-HCl	8,40	8,40	75,7	67,4
	8,65	8,70	89,9	81,5
	8,90	8,80	78,2	84,5
	9,10	8,88	88,2	87,4
	9,20	9,00	79,8	88,2
Carbonate-bicarbonate	9,00	8,85	87,0	79,6
	9,18	9,00	86,0	82,5
	9,40	9,35	79,8	82,4
	9,65	9,60	57,1	68,0
	9,90	9,80	34,0	63,1
Glycocolle-NaOH	8,15	8,10	60,3	82,3
	8,30	8,20	78,1	73,7
	8,66	8,35	86,5	86,1
	8,85	8,45	82,3	83,1
	9,00	8,55	—	85,5
	9,10	8,60	81,2	85,9
	9,55	9,25	82,2	81,3
Borate-NaOH	8,20	8,10	76,9	73,8
	8,35	8,20	64,0	79,3
	8,50	8,30	80,5	58,5
	8,80	8,55	56,8	76,0
	8,95	8,60	70,3	78,7
	9,25	8,85	56,4	84,5
	9,55	9,15	59,9	76,7
Témoin (sperme non dilué) « Méthode sèche »	Début expérience		82,6	
	Fin expérience		74,5	

(1) Taux de dilution du sperme après mélange avec le dilueur.

TABLEAU 2

*Effets du pH et de la molarité du tampon du dilueur d'insémination
sur le pourcentage de fécondation d'ovules de Truite arc-en-ciel
(dilueur : solution de NaCl à 250 milliosmoles)*

Expériences 1 et 2 : répétition avec 2 lots de femelles et 2 mâles différents

Tampon	Molarité	Expérience n° 1			Expérience n° 2		
		pH du dilueur tamponné		p. 100 de fécondation (dilution sperme : 10^{-3})	pH initial	p. 100 de fécondation selon dilution du sperme	
		initial	après mélange avec les ovules			10^{-4} (1)	10^{-3} (1)
Glycocolle	0,02	8,2	8,0	86,0	8,1	71,3	51,0
		8,6	8,45	87,6	8,6	58,0	65,8
		9,0	8,80	83,0	9,0	49,5	62,6
		9,4	9,15	88,5	9,5	62,5	58,4
		9,75	9,40	84,5	9,75	46,8	59,3
Carbonate-bicarbonate	0,02	8,8	8,50	86,0	8,7	57,8	63,2
		9,3	9,05	86,6	9,25	62,6	64,2
		9,8	9,55	77,2	9,75	58,7	64,0
		10,1	9,85	78,7	10,15	32,3	49,3
Tris-HCl	0,02	8,7	8,50	81,0	8,7	69,9	65,2
		9,0	8,90	81,3	9,0	66,5	60,9
		9,45	9,30	79,7	9,5	52,1	59,9
Glycocolle	0,1	8,3	8,25	83,8	8,3	75,0	62,0
		8,8	8,77	90,1	8,9	71,8	58,5
		9,25	9,10	81,3	9,2	56,9	54,4
		9,7	9,65	58,8	9,7	25,0	30,7
Carbonate-bicarbonate	0,1	10,1	10,00	34,2	10,0	2,5	18,9
		8,9	8,97	78,3	9,0	64,1	58,8
		9,4	9,40	82,3	9,4	45,6	54,7
		9,95	9,98	53,1	9,95	14,6	16,7
Tris-HCl	0,1	10,4	10,28	4,5	10,4	0	2,0
		8,6	8,55	84,0	8,5	71,3	74,0
		9,05	9,00	82,9	9,0	65,1	69,9
Témoin (sperme non dilué) « Méthode sèche »		9,55	9,40	80,0	9,55	56,4	67,4
				75,6		65,6	

(1) Taux de dilution final du sperme après mélange avec le dilueur.

Effets de l'augmentation du volume de dilueur sur le pourcentage de fécondation (fig. 1).

Le doublement du volume du dilueur qui atténue la chute de pH sans modification de la molarité du tampon entraîne une légère élévation du pourcentage de fécondation, parfois significative pour une dilution finale du sperme de 10^{-4} .

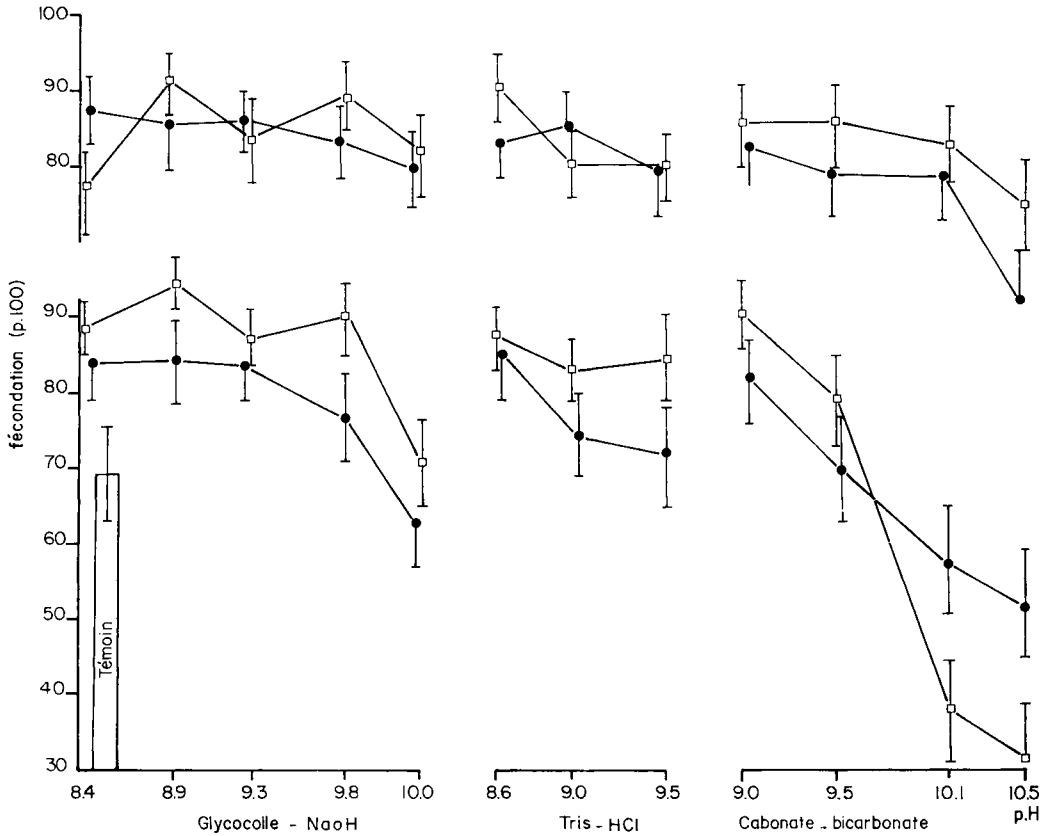


FIG. 1. — Effets de la nature du tampon et du pH du dilueur sur le pourcentage de fécondation

Dilution finale du sperme : en haut 10^{-3} ; en bas 10^{-4} . Volume de dilueur ajouté pour chaque lot d'environ 200 ovules : ● 10 ml ; □ 20 ml.

Dilueur : solution de NaCl posm 250 mosm.

Les limites de l'intervalle de confiance d'une proportion (intervalle de confiance 95 p. 100) sont figurées sur les graphiques.

2. Dilueur de conservation.

Dans cette expérience, la solution simple à base de NaCl et le MMLS sont utilisés comme dilueurs de conservation.

Conservation de la fécondabilité des ovules.

Les dilueurs à base de NaCl tamponnés avec du *Tris* ou du glycolle à 0,02 M conservent mieux la fécondabilité des ovules que les solutions tamponnées avec un

tampon minéral (carbonate-bicarbonate), au moins pendant les 15 premières minutes (fig. 2). Une dépression de fertilité apparaît entre la 2^e et la 6^e minute qui suit la mise en présence des ovules avec le dilueur quel que soit le tampon utilisé.

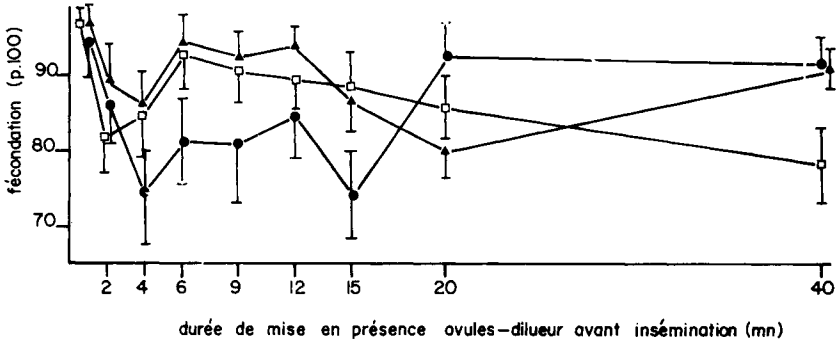


FIG. 2. — Effets de la nature du tampon ajouté au dilueur sur la conservation de la fécondabilité des ovules avant insémination

Tampons 0,02 M ● Carbonate-bicarbonate
▲ Tris-HCl
□ Glycocolle

Dilueur : solution de NaCl posm 250, pH 9,0
Taux de dilution final du sperme : 10^{-3}

Conservation du pouvoir fécondant du sperme.

Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est mieux conservé lorsque le dilueur à base de NaCl est tamponné avec le glycocolle (tabl. 3). Au contraire, avec le MMLS

TABLEAU 3

Effet de la nature du tampon sur la conservation du pouvoir fécondant du sperme après mélange avec le dilueur

Le protocole expérimental comporte le mélange du dilueur (10 ml de sol. NaCl posm = 250 mosm) et du sperme (dilution finale = 10^{-4}), pendant des temps variables (30 s à 40 mn) avant l'addition des ovules.

Dans cette expérience la solution de NaCl est utilisée comme dilueur de conservation. (Pourcentage de fécondation après insémination immédiate = 98,1 p. 100).

Tampon (0,02 M)	pH	p. 100 de fécondation après conservation du sperme dilué pendant							
		30 s	1 mn	2 mn	4 mn	7 mn	10 mn	15 mn	40 mn
Carbonate-bicarbonate	9,50	28,0	13,0	4,6	0,5	0	0	0	0
Tris-HCl	9,52	21,2	6,4	1,5	1,0	0	0	0	0
Glycocolle-NaOH	9,32	54,9	31,7	25,1	0,5	0,5	0,5	0	0

l'utilisation du tampon *Tris*-HCl (0,02 M) permet une amélioration et une prolongation de la conservation du pouvoir fécondant par rapport au tampon glycolle-NaOH (tabl. 4),

TABLEAU 4

Pourcentage de fécondation d'ovules de Truite arc-en-ciel obtenu après dilution du sperme et conservation pendant 1 à 30 minutes dans un milieu minéral de liquide séminal (10 ml) tamponné avec du *Tris* et du glycolle 0,02 M

(pourcentage de fécondation témoin obtenu après insémination dans solution de NaCl : 97,5 p. 100)

Tampon	pH	Temps de mise en présence dilueur et sperme avant fécondation								
		1 minute			15 minutes			30 minutes		
		10 ⁻⁵ (1)	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
<i>Tris</i> -HCl	8,0	3,4	14,3	78,0	22,2	5,4	33,1	4,5	5,5	37,3
	8,5	16,6	60,8	82,8	51,6	40,3	65,8	15,6	33,7	66,7
	9,0	16,4	88,2	89,7	31,1	41,6	80,9	24,8	29,1	71,1
Glycolle-NaOH	9,0	8,3	54,3	92,0	34,1	41,2	67,5	9,4	27,0	36,5
	9,5	7,0	74,8	79,6	28,3	22,3	71,7	12,2	36,8	19,4
	10,0	14,0	60,5	77,6	11,8	12,7	64,9	11,5	20,8	21,4

(1) Taux de dilution du sperme.

B. — Variation du pH du dilueur d'insémination après introduction expérimentale de NaOH ou HCl, de liquide célomique et d'ovules

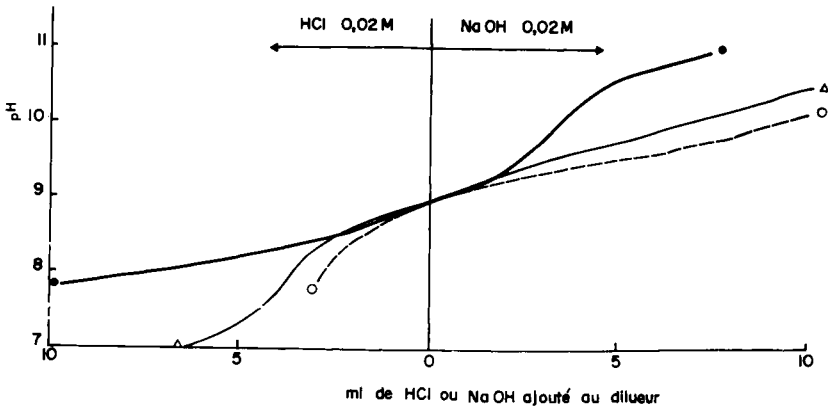


FIG. 3. — Variations du pH du dilueur d'insémination (solution simple de NaCl tamponnée, pression osmotique finale 250 mosm, pH 9,0) après addition de volumes croissant de NaOH ou HCl 0,02 M

Volume du dilueur = 20 ml

Tampons (0,02) Δ Carbonate-bicarbonate

● *Tris*-HCl

○ Glycolle-NaOH

Après introduction de quantités croissantes de NaOH ou de HCl 0,02 M, le pH du dilueur varie de façon importante quel que soit le tampon testé (fig. 3). A la concentration utilisée (0,02 M) ces tampons n'assurent donc pas une stabilité remarquable du pH du dilueur. L'introduction de liquide cœlomique ou d'ovules (fig. 4) montre cependant que cette stabilité reste suffisante pour maintenir le pH dans une zone favorable. En effet, le volume de liquide cœlomique (pH 8,12) à introduire pour diminuer de 0,2 unité le pH d'un volume de 20 ml de dilueur est de 11 ml avec l'acide borique-NaOH, de 10 ml avec le carbonate-bicarbonate, de 8,5 ml avec le *Tris*-HCl et de 4,5 ml avec le glyocolle-NaOH (fig. 4 a). Après introduction de quantités croissantes d'ovules, les tampons carbonate-bicarbonate et *Tris* stabilisent beaucoup mieux le pH du dilueur que le glyocolle-NaOH (fig. 4 b).

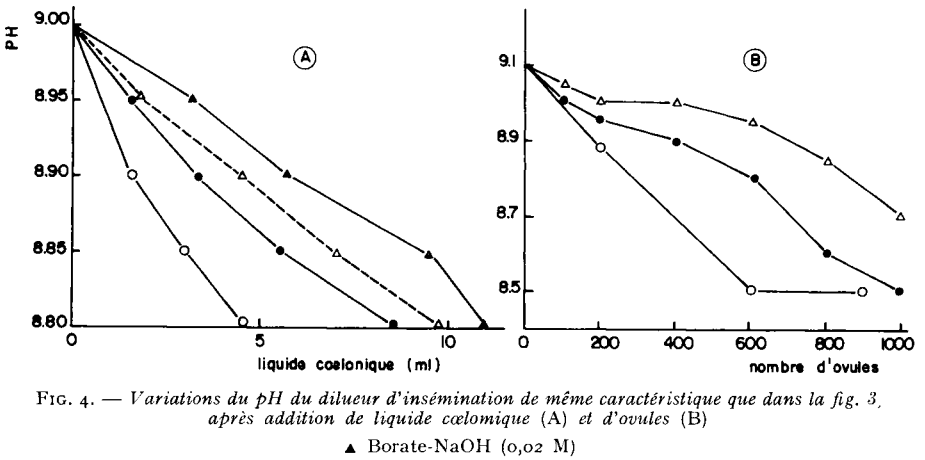


FIG. 4. — Variations du pH du dilueur d'insémination de même caractéristique que dans la fig. 3, après addition de liquide cœlomique (A) et d'ovules (B)

▲ Borate-NaOH (0,02 M)

DISCUSSION ET CONCLUSION

A. — Choix de la nature et de la molarité du tampon du dilueur d'insémination

L'amélioration du pourcentage de fécondation qui résulte de l'emploi, lors de l'insémination, de dilueurs tamponnés à un pH relativement élevé semble pouvoir être mis en relation avec l'augmentation de l'intensité et de la durée de motilité des spermatozoïdes dans la zone de pH 9 et 9,5 (BILLARD *et al.*, données non publiées). Également chez la Truite arc-en-ciel et en prenant pour critère la motilité des spermatozoïdes, INABA *et al.* (1958) observent une activité dans une gamme de pH très large (entre 4,5 et 10,4) mais les mouvements seraient plus actifs dans la zone basique. L'effet favorable des pH alcalins a aussi été signalé sur l'attraction chimiotactique des spermatozoïdes vers le micropyle de l'œuf chez la Bouvière (SUZUKI, 1960). Chez le Mulet (*Mugil cephalus*) la durée de motilité des spermatozoïdes semble être maximum à un taux voisin de la neutralité (HINES et YASHOUV, 1971).

Il est donc important de disposer d'un dilueur d'insémination dont le pH reste stable après introduction des gamètes. L'utilisation de tampons à 0,02 M dans le di-

leur d'insémination n'assure pas une stabilité parfaite du pH du milieu ainsi que le montre l'introduction expérimentale de NaOH et HCl, de liquide cœlomique ou d'ovules dans le milieu. Cette chute de pH peut être réduite par l'emploi d'un tampon à 0,1 M, mais dans ce cas, au moins pour les tampons carbonate-bicarbonate et glycolle, le pourcentage de fécondation s'en trouve affecté. Le doublement du volume de dilueur utilisé lors de l'insémination permet de limiter la chute de pH, tout en conservant un tampon à 0,02 M. Il en résulte même aux fortes dilutions (10^{-4}) une amélioration du pourcentage de fécondation qui peut cependant être due à l'augmentation du nombre de spermatozoïdes (ce dernier reste constant par unité de volume de dilueur, mais le nombre théorique de spermatozoïdes par ovule s'est trouvé augmenté). Toutefois, dans les conditions de la pratique, il est au contraire préférable de limiter le volume de dilueur afin de réduire la quantité de sperme et de respecter un certain rapport entre la quantité d'ovules et le volume de dilueur (BILLARD *et al.*, 1974).

Du fait que le pourcentage de fécondation subsiste à un niveau maximum dans une gamme de pH relativement large — entre 8,5 et 9,5 (fig. 1), il reste préférable de tamponner le dilueur à un pH compris entre 9,2 et 9,5 avec un tampon 0,02 M ; dans ces conditions, la chute de pH d'environ 0,2 unité qui suit l'introduction des ovules dans le dilueur, ne risque pas de porter le pH du mélange hors de la zone favorable.

Quant au choix du tampon, pour les taux de dilution conseillés en pisciculture (10^{-3} à 10^{-2}), chacun des tampons testés dans cette étude pourrait, en se référant aux pourcentages de fécondation obtenus, être retenus pour stabiliser le pH de la solution de NaCl à *posm* 250 proposée comme dilueur d'insémination. Le système borate-NaOH qui a le meilleur pouvoir tampon a cependant un effet dépressif sur le taux de fécondation. Le tampon carbonate-bicarbonate, bien qu'entraînant, aux fortes dilutions, une diminution du pourcentage de fécondation pour les pH < 9,5, se révèle pour les pH compris entre 9 et 9,4 aussi satisfaisant que les tampons organiques et présente en outre l'avantage de mieux stabiliser le pH du dilueur. Le tampon carbonate-bicarbonate à 0,02 M est actuellement celui que nous retenons pour tamponner le dilueur d'insémination mais l'emploi de tampons organiques n'est pas à exclure.

B. — Choix du tampon du dilueur de conservation

Des solutions de NaCl tamponnées avec *Tris*-HCl, glycolle-NaOH ou carbonate-bicarbonate peuvent constituer de bons milieux de conservation des ovules. Par contre le pouvoir fécondant du sperme n'est pas maintenu bien que l'utilisation du tampon glycolle-NaOH permette, après 2 minutes, d'obtenir davantage de fécondations qu'avec les autres tampons testés (tabl. 3). Cela pourrait correspondre à un effet protecteur au moins temporaire de l'acide aminé sur les spermatozoïdes.

La conservation du pouvoir fécondant du sperme est optimum lorsque le MMLS est tamponné à un pH de 9,0. Avec ce milieu et à la différence des dilueurs à base de NaCl précédents, le tampon *Tris*-HCl se révèle supérieur au tampon glycolle-NaOH.

En conclusion, le MMLS qui assure une bonne conservation du pouvoir fécondant à la fois des ovules et des spermatozoïdes peut être tamponné avec du *Tris*-HCl 0,02 M à un pH de 9,0.

Ces techniques de dilution dans des solutions salines simples qui entraînent une

immobilisation rapide des spermatozoïdes et qui n'ont jamais été retenues chez les Mammifères sont cependant compatibles avec le mode de fécondation externe chez la Truite et aboutissent, dans le cas du dilueur d'insémination, à des taux de fécondation très satisfaisants, en général plus élevés qu'après insémination selon la méthode sèche.

Reçu pour publication en mars 1974.

REMERCIEMENTS

M. BONICEL a participé à la conduite des incubations. La frappe du manuscrit est due à M^{me} MARCEL.

SUMMARY

ARTIFICIAL INSEMINATION OF THE TROUT (*SALMO GAIRDNERI* RICHARDSON).

III. — DEFINITION OF THE NATURE AND MOLARITY OF THE BUFFER TO USE WITH INSEMINATION AND CONSERVATION DILUENTS

In experiments to determine the nature and molarity of the buffer to use with two previously defined insemination and conservation diluents, the effects of different buffers on diluent pH stability are tested after introduction of increasing quantities of NaOH and HCl, coelomic fluid and ovules. We also tested effects of these buffers on the percentage of fertilization obtained in small lots of 200 ovules. The following results are observed :

1. The insemination diluent (solution of NaCl at 250 mosm) may be favorably buffered with carbonate-bicarbonate buffer 0.02 M, 9.2-9.5 pH. This buffer is more stable after introduction of a large quantity of ovules than the other buffers tested (*Tris*-HCl, Glycocolle-NaOH), but fertility rate is the same with each of these buffers.

2. When the mineral medium of the seminal fluid (MMLS) is used as a conservation diluent, conservation of sperm fertilizing ability is better when the buffer used is *Tris*-HCl ; optimum pH is about 9.0.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BILLARD R., PETIT J., JALABERT B., SZOLLOSI D., 1973. Artificial insemination in trout using a sperm diluant. *Symp. Early Life History Fish*, OBAN, BLAXTER Edit., 715-723.
- BILLARD R., JALABERT B., 1974. L'Insémination artificielle de la Truite (*Salmo gairdneri* RICHARDSON). II. Comparaison des effets de différents dilueurs sur la conservation du pouvoir fécondant des gamètes avant insémination. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **14**, 601-610.
- BILLARD R., PETIT J., CHEVASSUS B., 1974. V. Définition du rapport gamètes/dilueur optimum lors de l'insémination (en préparation).
- DELORY, KING, 1945. *Biochem. J.*, **39**, 245. Cité par GOMORI, 1955.
- GOMORI G., 1955. Preparation of buffers for use in enzyme studies, 138-146 in COLOWICK and KAPLAN. *Methods in Enzymology*, **1**, Acad. Press NY.
- HINES R., YASHOUV A., 1971. Some environmental factors influencing the activity of spermatozoa of *Mugil capito* CUVIER, a grey mullet. *J. Fish Biol.*, **3**, 123-127.
- INABA D., NOMURA M., SUYAMA M., 1958. Studies on the improvement of artificial propagation in trout culture. II. On the pH values of eggs, coelomic fluid and others. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **23**, 762-765.
- KOHLER R., 1971. Buffer solutions, 280-282 ; in *Scientific Tables*, DIER and LETNER, Ciba Geigy, Basel.

- PETIT J., JALABERT B., CHEVASSUS B., BILLARD R., 1973. L'Insémination artificielle de la Truite (*Salmo gairdneri* RICHARDSON). I. Effets du taux de dilution du pH et de la pression osmotique du dilueur sur la fécondation. *Ann. Hydrobiol.*, **4**, 201-210.
- SÖRENSEN S. P. L., 1909. *Biochem. Z.*, **21**, 131-304. Cité par GOMORI, 1955.
- SUZUKI R., 1960. Sperm activation and aggregation during fertilization in some fishes. IV. Effects of pH, heat and other agents upon sperm-stimulating factor. *Jap. J. Zool.*, **12**, 465-476.
-