

CONSERVATION DE LA MOTILITÉ ET DU POUVOIR FÉCONDANT DU SPERME DE TRUITE ARC EN CIEL MAINTENU A DES TEMPÉRATURES VOISINES DE 0 ° C

M. SANCHEZ-RODRIGUEZ, R. BILLARD

I.N.R.A., Laboratoire de Physiologie des Poissons
78350 JOUY-EN-JOSAS, France

INTRODUCTION

Les possibilités de conserver le sperme de poisson après prélèvement offrent de nombreux avantages tant du point de vue de l'expérimentation que de la pratique piscicole. Entre autres : transport du sperme, croisement et hybridation, simplification du travail lors des opérations d'insémination, etc. On peut envisager des conservations à long terme grâce à la congélation du sperme à basse température (-196°C) dans l'azote liquide. Cette méthode a été tentée avec succès chez les poissons marins (BLAXTER, 1953 ; MOUNIB *et al.*, 1968 ; PULLIN, 1972 ; BILLARD et DUPONT, 1975), mais chez les salmonidés (OTT et HORTON 1971 ; GRAYBILL et HORTON, 1969 ; STEIN, 1975 ; BILLARD *et al.*, non publié), du fait de l'hétérogénéité des résultats et des taux de fécondation sensiblement diminués par rapport au sperme frais, cette approche n'est pas encore utilisable en pisciculture. Une autre méthode consiste à pratiquer une conservation de durée plus limitée (quelques semaines) à des températures voisines de 0°C en utilisant des produits colloïdaux (BRATANOV et DIKOV, 1961) ou des cryoprotecteurs (TRUSCOTT *et al.*, 1968). Le présent travail rapporte l'emploi de cette méthode sur la truite arc-en-ciel.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel animal

Les géniteurs en provenance de piscicultures privées sont stockés au laboratoire en eau douce recyclée et thermorégulée (10-12°C). La spermiation des mâles a débuté vers la fin novembre et l'expérimentation a débuté au début janvier. Les gamètes sont prélevés sur animaux non anesthésiés de la façon suivante : après séchage de la région génitale, le sperme est recueilli dans les tubes à essais par légère pression manuelle sur la région abdominale, puis stocké en bain marie à + 5°C. Les échantillons contaminés par de l'eau, du sang ou des matières fécales sont éliminés.

Les ovules sont prélevés sur des femelles ayant ovulé dans les deux semaines précédentes. Le liquide coelomique est éliminé par filtration ; les œufs de plusieurs femelles sont soigneusement mélangés et répartis par lots de 200 environ.

2. Méthode de dilution

On emploie soit un mélange de sperme de plusieurs mâles, soit le sperme de mâles pris individuellement.

3. Méthodes utilisées

a) Détermination de la température de début de congélation

(température de congélation commençante = T°C.C.) (FAUCON, 1969)

Pour déterminer la T°C.C. du sperme de truite, nous utilisons la technique de microanalyse différentielle (micro ATD) qui consiste à étudier les variations de la température (ΔT) du sperme dilué au cours de son refroidissement quand il est plongé dans un bain d'alcool à -40°C. Pour chaque échantillon la température est enregistrée toutes les 30 secondes jusqu'au moment où elle se stabilise. L'établissement de la courbe ΔT en fonction du temps permet de

déterminer la vitesse moyenne de congélation : $V_m = \frac{T_o - T_f}{t}$

T_o : 0°C

T_f : température finale constante

t : temps pour passer de T_o à T_f en minutes.

b) Préparation du sperme pour la conservation à températures voisines de 0°C (au-dessus de la T°C.C.)

Le sperme prélevé est transporté en chambre froide (+ 2°C). Après équilibration de la température on effectue les dilutions avec les différents milieux tamponnés à PH 9.0 figurant dans le tableau 1, et auxquels on ajoute 5 % de cryoprotecteur, soit : 2,5 ml de sperme + 0,25 ml de cryoprotecteur (DMSO - Prolabo R.P. ou Ethylène-Glycol (EG) TOUZART ET MATIGNON)

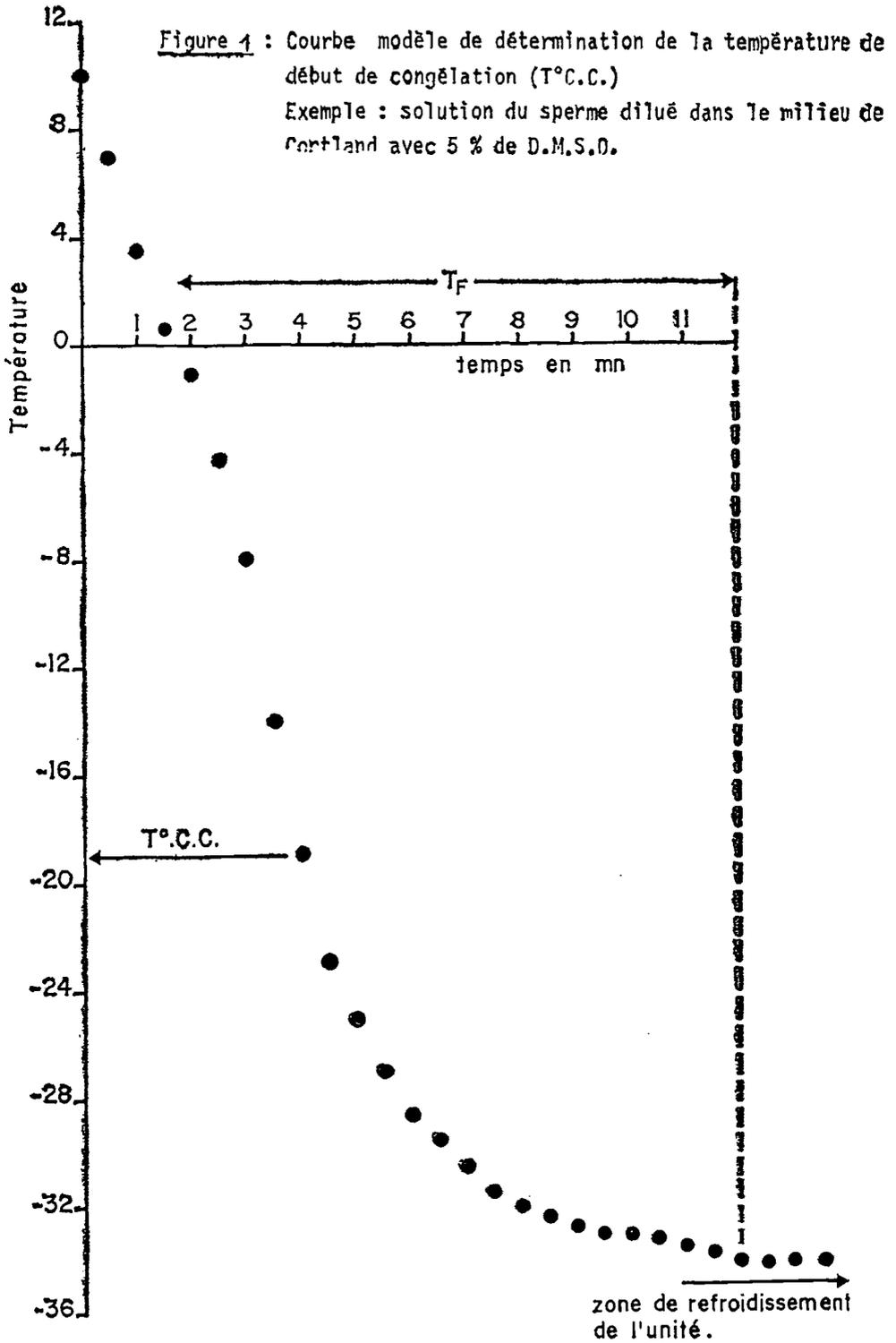
TABLEAU 1
COMPARAISON DES DILUEURS UTILISES

Dilueurs	Milieu minéral de liquide séminal (d'après BILLARD <i>et al.</i> 1974)	Cortland modifié (d'après TRUSCOTT <i>et al.</i> 1968)	Dilueur d'insémination enrichi en K ⁺ (d'après BILLARD, 1975)
NaCl	5,775 g/l	1,88 g/l	5,55
CaCl ₂ . H ₂ O	0,237	0,23	0,06
KCl	1,886	7,20	2,236
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O		0,41	
NaHCO ₃		1,00 (1)	
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,243	0,23	0,06
Glucose		1,00	
Tampon (nature et volume)	glycolle 0,02 M Tris 0,02 M 10 %	Glycolle 0,02 M Tris 0,02 M 10 %	Hepès-NaOH 0,04 M 5 %
Pression osmotique finale	255	261	250
pH	9.0	9.0	9.0

(1) NaHCO₃ est dissous à part et ajouté après.

TABLEAU 2
ECHELLE ARBITRAIRE POUR APPRECIER LA MOTILITE DES SPERMATOZOIDES

Valeur	Observations
5	Tous les spermatozoïdes se déplacent vigoureusement ; impossibilité de fixer la vue sur aucun d'entre eux
4	La majorité des spermatozoïdes se déplace encore rapidement ; seuls quelques-uns sont visibles du fait de leur déplacement plus lent
3	Les spermatozoïdes présentent trois comportements (en nombre sensiblement égaux) : — soit ils se déplacent vigoureusement — soit ils se déplacent lentement — soit ils sont immobiles
2	Peu de spermatozoïdes se déplacent rapidement ; quelques-uns se déplacent lentement. La majorité des spermatozoïdes est immobile
1	Seuls quelques spermatozoïdes ont une légère agitation
0	Tous les spermatozoïdes sont immobiles



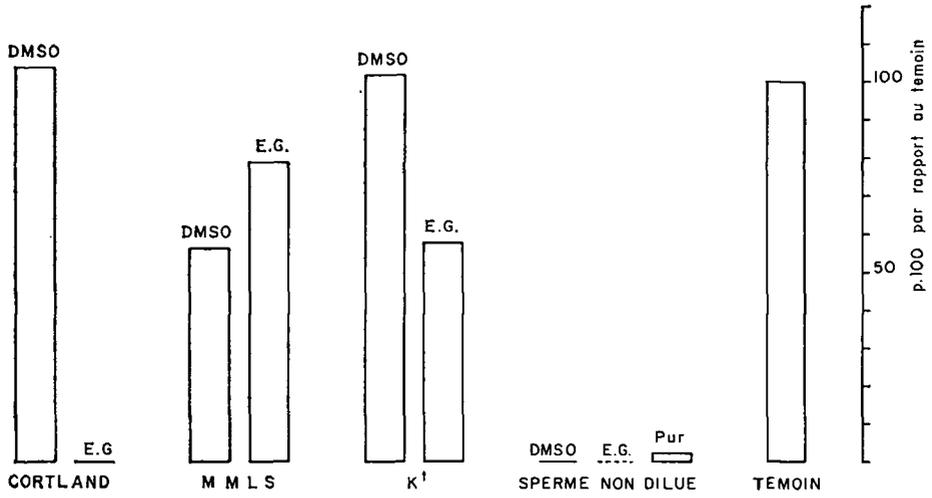


Figure 1 : Pourcentage de fécondation obtenu avec du sperme de Truite conservé à -4°C pendant 9 jours dans différents milieux

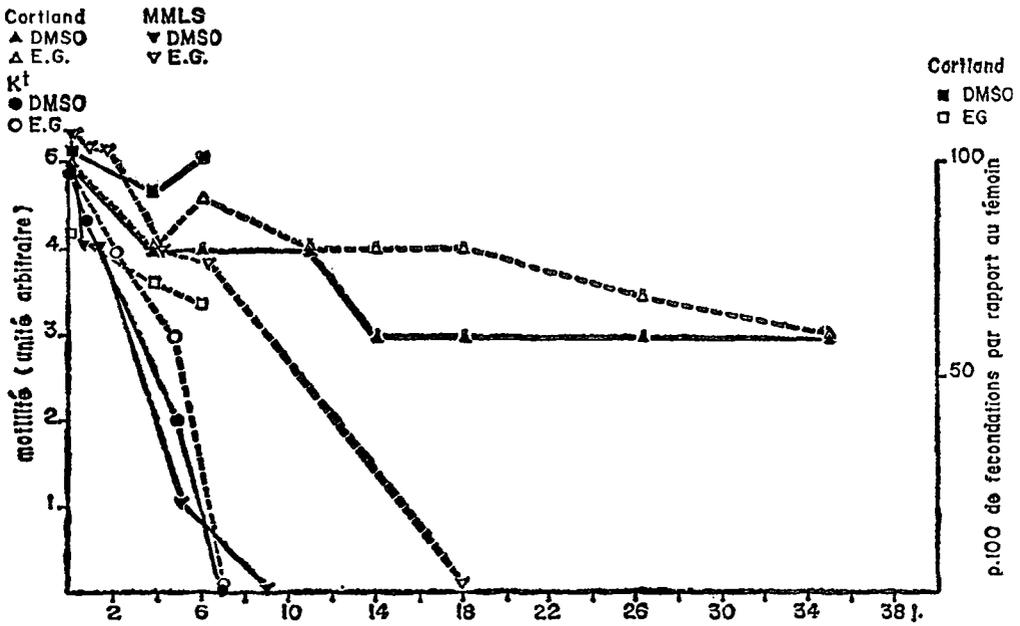


Figure 2 : Evolution de la motilité et du pouvoir fécondant du sperme de Truite conservé à -4°C

TABLEAU 3

Température de début de congélation (T°C.C.)
des trois dilueurs additionnés de DMSO et d'E.G.
Vitesse de congélation des trois dilueurs et des deux cryoprotecteurs

Dilueur	Cryoprotecteur	T° C. C.	Vitesse de congélation
Cortland modifié	D.M.S.O.	— 19	3°/mn
M.M.L.S.	D.M.S.O.	— 21	3,1°/mn
K ⁺	D.M.S.O.	— 20	2,6°/mn
Cortland modifié	E.G.	— 20	3,5°/mn
M.M.L.S.	E.G.	— 22	3,3°/mn
K ⁺	E.G.	— 20	3,1°/mn

(selon MERYMAN, 1971). Du sperme non dilué ou ne recevant que le cryoprotecteur est conservé en parallèle (cf. fig. 2).

Le mélange est laissé une heure à + 2°C puis il est réparti soit en flacons ouverts (1 volume de solution/16 volumes d'air), soit en paillettes de 200 µl de couleurs différentes. Le pouvoir fécondant est contrôlé après 9 jours et la motilité du sperme est testée après des temps de conservation croissants (cf. fig. 3). A chaque fois, un témoin à tester la qualité des œufs est constitué par un lot de 200 ovules inséminés avec du sperme frais. Le pouvoir fécondant est représenté par le pourcentage d'œufs embryonnés établi à 100 degrés-jour de développement embryonnaire.

La motilité du sperme est estimée selon l'échelle du tableau 2.

RESULTATS

1) Détermination de la T°C.C. et de la vitesse de congélation en fonction du milieu de conservation utilisé

Un exemple de courbe de refroidissement obtenue suivant la technique de microanalyse thermique différentielle est porté sur la figure 1. Sur le tableau 3 sont rassemblés les résultats associés à deux cryoprotecteurs différents (DMSO et E.G.). Les résultats sont les suivants :

— Quel que soit le dilueur utilisé, la vitesse de refroidissement est plus lente avec le DMSO qu'avec le E.G.

— Les dilueurs de Cortland et le milieu enrichi en K⁺ (tableau 1) ont une T°C.C. plus élevée de 1,5°C que le MMLS.

2) Conservation des gamètes mâles à des températures voisines de 0°C

Le sperme maintenu en paillettes n'a pas maintenu son pouvoir fécondant et seuls les résultats correspondant aux conservations en flacons sont rapportés ci-dessous.

A $+2^{\circ}\text{C}$ et à -6°C nous avons observé une perte quasi totale du pouvoir fécondant au-delà du deuxième jour. Seul le sperme dilué et conservé à -4°C conserve motilité et pouvoir fécondant pendant plus de 2 jours. Après 9 jours (figure 2) quel que soit le dilueur, les spermatozoïdes conservés en présence de DMSO ont gardé leur pouvoir fécondant. Dans les dilueurs de Cortland et K^+ , les meilleurs pourcentages de fécondation sont obtenus avec le DMSO. Par contre lorsqu'on utilise le MMLS, c'est en présence d'E.G. que les résultats obtenus sont les meilleurs. On constate d'autre part que le sperme non dilué a perdu tout pouvoir fécondant quel que soit le cryoprotecteur utilisé. L'évolution de la motilité des spermatozoïdes (figure 3) montre que dans le milieu de Cortland additionné de DMSO ou E.G. une activité des spermatozoïdes subsiste après 35 jours de conservation à -4°C . Le pourcentage de fécondation mesuré parallèlement pendant les 7 premiers jours est plus élevé avec DMSO qu'avec E.G.

DISCUSSION

La motilité et le pouvoir fécondant du sperme de truite arc-en-ciel peuvent être prolongés notablement pendant plusieurs jours par un stockage à -4°C après dilution dans un liquide physiologique additionné d'un cryoprotecteur (DMSO ou E.G.). Des résultats ont été obtenus chez le Saumon atlantique (TRUSCOTT et al., 1968). L'addition du cryoprotecteur seul n'est pas suffisante pour maintenir la survie des spermatozoïdes et une dilution du sperme par un apport de dilueur est nécessaire. TRUSCOTT et al. (1968) avaient déjà noté la nature toxique du cryoprotecteur sur le sperme complet.

La conservation du sperme à des températures voisines de 0°C ou légèrement supérieures a été fréquemment tentée chez les salmonidés avec des durées de survie variables, mais généralement brèves, avec diminution sensible du pouvoir fécondant après quelques jours de conservation (BARRETT, 1951; WITHLER et HUMPHREYS, 1967; WITHLER et MORLEY, 1968; POON et JOHNSON, 1970; PLOSILA et al., 1972; PLOSILA et KELLER, 1974; STEIN et LAMINA, 1976). Mais des durées de conservation de l'ordre de la semaine ont aussi été rapportées (HIROI et al., 1975; HOLTZ et al., 1976). Ces derniers auteurs montrent que le sperme de truite arc-en-ciel maintenu à 4°C dans l'obscurité et en atmosphère saturée d'humidité conserve son pouvoir fécondant initial pendant 9 jours. En outre, BRATANOV et DIKOV (1961) ont prétendu avoir conservé le pouvoir fécondant du sperme de truite pendant 6 mois à 0°C , mais ces données n'ont pas été confirmées.

La conservation du sperme d'autres espèces à des températures voisines de 0°C semble possible pour des durées de plusieurs semaines : 14 jours à 3°C pour *Roccus chrysoptus* (CLEMENS et HILL, 1969) et 2 mois à 4°C pour le poisson chat *Ictalurus punctatus* (GUEST et al., 1976).

En conclusion, il apparaît que la durée de conservation du sperme de poisson aux températures voisines de 0°C ne puisse avec sécurité dépasser quelques jours. Les grandes variations rapportées dans la littérature peuvent être dues à de nombreux paramètres qui n'ont pas toujours été définis par les expérimentateurs, comme l'âge du sperme dont on sait qu'il peut affecter la durée de motilité et l'aptitude à la congélation (BILLARD et de MONTALEMBERT, 1977; BILLARD et al., 1977), la charge en protéines (BILLARD, BRETON, 1977; SANCHEZ-RODRIGUEZ, non publié), l'équipement enzymatique (BILLARD et BRETON, 1976). La technique de conservation reste donc à améliorer pour des

durées supérieures à quelques jours et, dans tous les cas, il est préférable de contrôler sous microscope la motilité du sperme conservé avant de procéder à l'insémination.

REMERCIEMENTS

Ce travail s'intègre dans un contrat de recherche entre le Ministère de la Qualité de la Vie et l'I.N.R.A.

Nous remercions vivement le Club Halieutique interdépartemental et son président, Monsieur DUCRET, pour la bourse qu'il a bien voulu accorder à Mario SANCHEZ-RODRIGUEZ pendant une partie de son séjour en France.

RESUME

Le sperme de truite arc-en-ciel prélevé sur des mâles plus d'un mois après le début de la spermiation a été dilué par moitié dans le milieu de Cortland modifié ou dans un milieu physiologique enrichi en KCl (2g/l) additionné de 10 % de DMSO ou d'éthylène-glycol (E.G.). Le sperme ainsi dilué (1 volume sperme + 1 volume dilueur) a été placé à l'obscurité à -4°C à l'état non congelé. Il conserve une motilité voisine de la motilité initiale pendant 10 jours dans le milieu de Cortland. Après 35 jours de conservation dans les mêmes conditions, la motilité n'est que légèrement diminuée. Le pouvoir fécondant testé après 9 jours de conservation dans le milieu de Cortland se maintient à son niveau initial avec le DMSO, mais diminue notablement (environ 50 %) avec E.G.

SUMMARY

Rainbow trout sperm taken from males in spermiation for more than one month was diluted in modified Cortland or in a saline plus KCl (2g/l). Cryoprotectors were added : DMSO and Ethylene-Glycol (E.G.) at a rate of 10 %. After dilution (sperm 1 vol + diluant 1 vol) the mixture was taken in the dark at -4°C in a non frozen state. In the Cortland medium motility was maintained for ten days at its initial value using either DMSO and E.G. (fig. 3). After 35 days storage motility decreased slightly. Fertilizing ability tested after 9 days storage was maintained at its initial value only with Cortland medium + DMSO. In the other combination Cortland + E.G. fertilizing ability dropped by nearly 50 % after 9 days storage.

REFERENCES

- BARRETT I., 1951. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. J. Fish. Res. Bd. Can., 8, 125-133.
- BILLARD R., JALABERT B., 1974. 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. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 14, 601-610.
- BILLARD R., 1975. L'insémination artificielle de la Truite *Salmo gairdneri* Richardson. IV - Effets des ions K^+ et Na^+ sur la conservation du pouvoir fécondant des gamètes. Bull. Franç. Pisci., 256, 88-100.
- BILLARD R., DUPONT J., 1975. Etudes sur la congélation du sperme des poissons marins (Bar, Daurade, Turbot). Compte rendu d'activité C.N.E.X.O. 15 pp ronéoté.
- BILLARD R., BRETON B., 1976. Sur quelques problèmes de physiologie du sperme chez les poissons téléostéens. II Congrès Ichtyol., Paris.
- BILLARD R., de MONTALEMBERT G., 1977. The unadaptability of freshwater and marine fish spermatozoa to their natural external environment. Env. Biol. Fish., soumis pour publication.
- BILLARD R., BRETON B., 1977. Effects of washing on fertilizing ability of rainbow trout gametes. In preparation.
- BLAXTER J.H.S., 1953. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. Nature, 172, 1189-1190.
- BRUTANOV C., DIKOV V., 1961. Sur certaines particularités du sperme chez les poissons C.R. IV Congr. Int. Reprod. Anim. la Haye. 895-897.
- CLEMENS H.P., HILL L.G., 1969. The collection and short term storage of milt of white Bass. Prog. Fish. Cult., 31, 26.
- FAUCON P., 1969. Etude préliminaire sur l'application de la lyophilisation à la conservation de *rhizobium meliloti*. Mémoire, Université Dijon.
- GRAYBILL J.R., HORTON H.F., 1969. Limited fertilization of steelhead trout eggs with cryo-preserved sperm. J. Fish Res. Bd. Can., 26, 1400.
- GUEST W.C., AVAULT J.W., ROUSSEL J.D., 1976. Preservation of channel catfish sperm. Trans. Am. Fish. Soc., 76, 469-474.
- HIROI O., YASUKAWA M., SUETAKE T., 1973. Studies on the retention of gametes in salmonid fishes. 2. On the storage of chum salmon *Oncorhynchus keta* sperm. Scient. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery, 27, 39-44.
- HOLTZ W., BUYUKHATIPOGLU S., STOSS J., OLDIGS B., 1976. Preservation of trout spermatozoa for varying periods. FAO Tech. Conf. Aquacult. Kyoto, 3 pp.
- MERYMAN H.R., 1971. Cryoprotective agents. Cryo. Biology, 8, 173-183.
- MOUNIB M.S., HWANG P.C., IDLER D.R., 1968. Cryogenic preservation of atlantic cod (*Gadus morrhua*) sperm. J. Fish. Res. Bd. Can., 25, 2623-2632.
- OTT A.G., HORTON H.F., 1971. Fertilization of chinook and coho salmon eggs with cryo preserved sperm. J. Fish. Res. Bd. Can., 28, 745-748.

- PLOSILA D.S., KELLER W.T., 1974. Effects of quantity of stored sperm and water on fertilization of brook trout eggs. *Progress. Fish. Cult.*, 36, 42-45.
- PLOSILA D.S., KELLER W.T., Mc CARTNEY T.J., 1972. Effects of sperm storage and dilution on fertilization of brook trout eggs. *Progress. Fish. Cult.*, 34, 179-181.
- POON D.C., JOHNSON A.K., 1970. The effect of delayed fertilization on transported salmon eggs. *Progress. Fish. Cult.*, 32, 81-84.
- PULLIN R.S.V., 1972. The storage of plaice (*Pleuronectes platessa*) sperm at low temperatures. *Aquaculture*, 1, 279-283.
- STEIN H., LAMINA J., 1969. Versuche zur Haltbarkeit von Milch und Rogen der Forellen. *Osterreichs Fischerei*, 29, 105-109.
- STEIN H., 1975. Spezielle untersuchungen am fischsperma unter besonderer berücksichtigung der spermakonservierung. Thesis München (summary 25 pp).
- TRUSCOTT B., IDLER D.R., HOYLE R.J., FREEMAN H.C., 1968. Subzero preservation of atlantic salmon sperm. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 25, 363-372.
- WITHLER F.C., MORLEY R.B., 1968. Effects of chilled storage on viability of stored ova and sperm of sokeye and pink salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 25, 2695-2699.
- WITHLER F.C., HUMPHREYS R.M., 1967. Duration of fertility of ova and sperm of sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and pink (*O. Gorbuscha*) salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 24, 1573-1578.