

## L'INSEMINATION ARTIFICIELLE DE LA TRUITE

### *Salmo Gairdneri* Richardson

#### V. - Effets de la dilution et définition du rapport optimum gamètes/dilueur

R. BILLARD

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

Laboratoire de Physiologie des Poissons  
Institut National de la Recherche Agronomique  
C.N.R.Z. 78350 JOUY-EN-JOSAS (France)

---

#### RESUME

Le pourcentage de fécondation des ovules de Truite arc-en-ciel est diminué lorsque le volume de dilueur employé lors de l'insémination artificielle est augmenté (Fig. 1). Les expériences sur la conservation de la fertilité des gamètes après dilution montrent que ce sont surtout les spermatozoïdes qui sont affectés par la dilution (Fig. 4). Par contre la dilution de grandes quantités de sperme dans des volumes réduits de dilueurs tend à diminuer le pourcentage de fécondation ce qui revient à mettre en cause la méthode sèche pratiquée en pisciculture. A volume constant de dilueur (20 ml) et avec des quantités variables de gamètes (100 à 1000 ovules et 0,2  $\mu$ l à 2 ml de sperme) le pourcentage maximum de fécondation est obtenu lorsque le nombre d'ovules ne dépasse pas 200 ou 600 pour des taux de dilution respectivement de  $10^{-4}$  à  $10^{-3}$ .

Dans les cas les plus favorables, c'est-à-dire lorsque tous les ovules fécondables sont fécondés à une dilution de  $10^{-4}$ , le nombre minimum de spermatozoïdes par œuf est de l'ordre de 10.000. Quant au nombre optimum de spermatozoïdes par œuf à utiliser lors de l'insémination, il est de l'ordre de 300.000 (avec un taux de dilution de  $10^{-3}$ ).

En conclusion, il existe un rapport optimum entre le nombre d'ovules, la quantité de sperme et le volume de dilueur à mettre en œuvre lors de l'insémination pour en obtenir l'efficacité maximum ; nombre d'ovules par ml de dilueur compris entre 10 et 20 pour un taux de dilution final du sperme dans le dilueur de  $10^{-3}$ .

### SUMMARY

ARTIFICIAL INSEMINATION OF RAINBOW TROUT *Salmo gairdneri* RICHARDSON  
V - Effects of the dilution and definition of optimum gamete/diluent ratio.

The percentage of fertilization of rainbow trout ovules is reduced when the volume of diluent added when inseminating is increased. Experiments conducted to check the effects of dilution on gamete survival before insemination showed that spermatozoa are more affected than ovules by the dilution. Conversely large amount of sperm diluted in small volumes of diluent reduces the rate of fertilization ; then the validity of the dry method for artificial insemination is questioned. At constant volume of diluent (20 ml) and various amount of gametes (100 to 1.000 ovules and 0,2  $\mu$ l to 2ml sperm) high percentage of fertilization was obtained when egg number was lesser than 200 and 600 at dilution rate of  $10^{-4}$  and  $10^{-3}$  respectively. In the best conditions, when most of the ovules are fertilized at a dilution rate of  $10^{-4}$ , the minimum number of spermatozoa per egg is about 10 000. But the optimum number of spermatozoa/egg to be used for insemination is 300.000 (dilution rate =  $10^{-3}$ ).

In conclusion, there is an optimum ratio to observe between number of ovules, quantity of sperm and amount of diluent when inseminating in order to obtain maximum efficiency ; number of ovules per ml diluent falls between 10 and 20 for a final dilution rate of sperm in the diluent of  $10^{-3}$ .

### INTRODUCTION

Dans le cadre de la mise au point d'une technique d'insémination artificielle, un certain nombre de paramètres concernant la composition du dilueur d'insémination chez la Truite ont déjà été examinés (BILLARD et al., 1973). Le volume de dilueur à utiliser lors de l'insémination fait l'objet de cette étude. La dilution est en effet susceptible d'affecter la fertilité des gamètes et l'objectif est de définir un taux de dilution optimum qui reste compatible avec un pourcentage de fécondation élevé, tout en utilisant une quantité de sperme minimum.

### MATERIEL ET METHODES

Le matériel animal et les conditions expérimentales ont été définies dans les notes précédentes (PETIT et al., 1973 ; BILLARD, JALABERT, BRETON, 1974). Les expériences spécifiquement conduites dans cette étude sont les suivantes :

#### **A - Effets de la dilution sur le succès de l'insémination et la conservation de la fertilité des gamètes**

##### **Expérience n° 1**

L'influence du taux de dilution est testée :

a) par la mise en présence des spermatozoïdes et des ovules dans des volumes de dilueur variables (effet immédiat sur l'efficacité de l'insémination). Des lots d'environ 200 ovules sont inséminés avec 2, 20, et 200  $\mu$ l de sperme dans 5, 10, 20 et 30 ml de dilueur d'insémination (solution de NaCl, posm. 250 mosm, pH 9,0, tampon Tris-HCl 0,02M, concentration finale).

b) par dilution du sperme ou des ovules avant insémination selon le schéma factoriel : taux de dilution x temps de dilution x composition du dilueur (cela revient à révéler les effets de la dilution sur la conservation de la fertilité des gamètes).

1 — Environ 200 ovules ont été placés dans des volumes croissants de dilueur d'insémination (10, 20, 40 et 100 ml) pendant des temps croissants (2, 4, 8, 12, 20 et 40 minutes) avant l'addition de 10  $\mu$ l de sperme.

2 — L'effet de dilution est testé sur le sperme avec le dilueur d'insémination et trois dilueurs enrichis en  $K^+$  (dilueurs de conservation).

**Dilueur I** : KCl 40 mmo1/1, NaCl 85 mmo1/1 ;

**Dilueur II** : KCl 75 mmo1/1, NaCl 50 mmo1/1 (BILLARD, 1975) ;

**Un 3ème dilueur est constitué** par le milieu minéral de liquide séminal (MMLS) (BILLARD et JALABERT, 1974).

Les dilueurs sont tamponnés à pH 9,0 avec Tris-HCl 0,02M. La posm. finale après addition du tampon est de 250 mosm. Le sperme (50  $\mu$ l) est dilué 1, 5, 10, 100 et 1.000 fois pendant 5, 10, 20 et 40 minutes avant l'addition des œufs. Plusieurs mâles ont été utilisés dans ces différentes expériences : si le volume du sperme est constant, la concentration en spermatozoïdes (établie après l'expérimentation) varie d'un mâle à l'autre, de sorte que le nombre de spermatozoïdes/ovule n'est pas exactement le même dans chaque expérience.

#### **B - Définition des quantités optimum de gamètes et de dilueur à employer lors de l'insémination**

Les inséminations sont faites dans un volume constant (20 ml) de dilueur d'insémination par lot expérimental ; le nombre d'ovules varie de 100 à 1 000 et le volume de sperme entre 0,2  $\mu$ l et 2 ml (dilution finale entre  $10^{-1}$  et  $10^{-5}$ ).

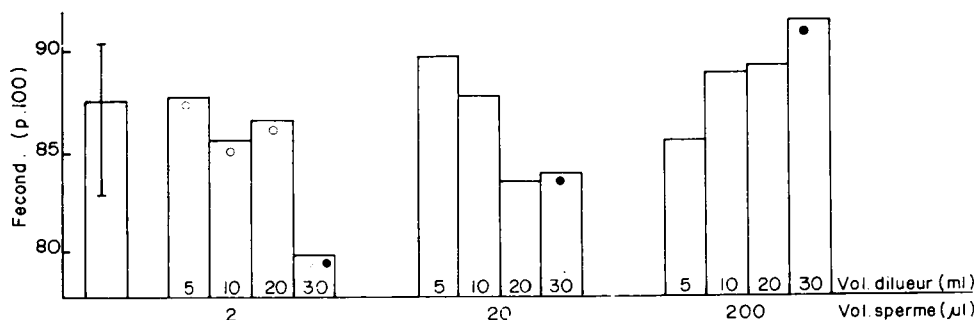
### **RESULTATS**

#### **A - Effets de la dilution sur :**

##### **— Le succès de l'insémination (Fig. 1)**

Lorsque l'insémination de lots d'environ 200 ovules avec 2  $\mu$ l de sperme est pratiquée dans des volumes croissants de dilueur, le taux de fécondation diminue de façon significative. Avec 20  $\mu$ l de sperme le pourcentage de fécondation tend à diminuer lorsque le volume de dilueur augmente (diminution à la limite de la signification). Avec 200  $\mu$ l de sperme, le pourcentage de fécondation tend au contraire à augmenter avec le volume de dilueur (l'augmentation n'est pas significative) lorsque 30 ml de dilueur sont utilisés. Si l'on compare les résultats obtenus en utilisant un volume de 30 ml, on constate que le pourcentage de fécondation augmente significativement avec la quantité de sperme.

En conclusion, les pourcentages de fécondation tendent à être plus réduits lorsque les faibles quantités de sperme sont diluées dans un grand volume de dilueur, mais les grandes quantités de sperme diluées dans un petit volume de liquide n'entraînent pas une amélioration du taux de conservation.



**Fig. 1** — Evolution du pourcentage de fécondation en fonction du taux de dilution du sperme (volume de sperme et volume de dilueur variables).

Concentration du sperme :  $12,5 \cdot 10^9$  spz/ml.

Les intervalles de confiance des pourcentages à 95 p. 100 d'après FISHER et YATES (1963) sont reportés sur les graphiques. L'insémination témoin est réalisée selon la méthode sèche.

O et ● : différences significatives à 95 %

Effect of insemination diluent volume on fertilization rate for various amount of sperm. Number of ovules : about 200.

Sperm concentration :  $12.5 \cdot 10^9$  spz/ml.

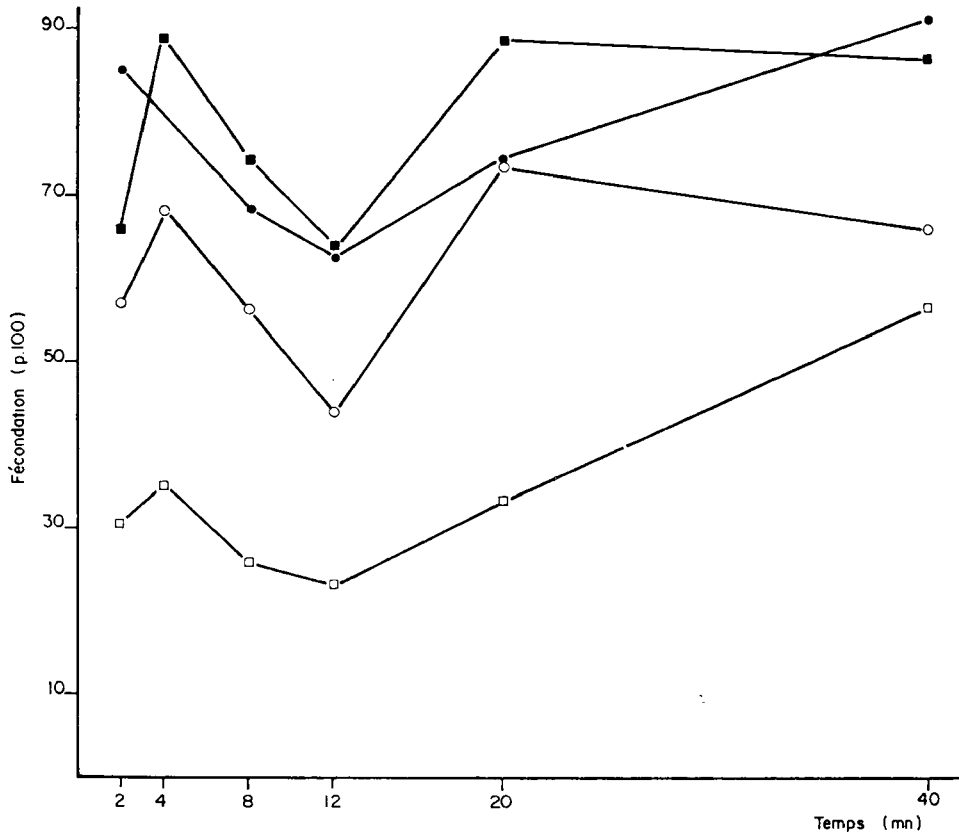
95 % confidence limits of percentages, according to FISHER and YATES (1963) are shown on graphs. Control insemination is done with the dry method.

#### — La conservation de la fertilité des gamètes

1) Lorsque les lots d'environ 200 ovules sont exposés pendant des temps croissants avec insémination à différents volumes de dilueurs, on constate que la dilution n'a pas affecté la fécondabilité des ovules puisque pour chaque dilution les taux de fécondation restent au même niveau 40 mn après le mélange. Pour la plus forte dilution le pourcentage de fécondation tend même à augmenter de façon significative (à 5 %) avec la durée de la dilution (Fig. 2).

Dans tous les cas, il faut noter la diminution de la fécondabilité des ovules après 8 et 12 minutes (diminution significative à 5 %).

2) Les effets du taux de dilution sur la conservation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes apparaissent dans la figure 4. Avec le dilueur d'insémination la chute du pouvoir fécondant après dilution est d'autant plus rapide que le taux de dilution est élevé. Avec le MMLS, la fécondance du sperme est mieux conservée aux fortes dilutions, quelle que soit la durée d'exposition (Fig. 4a). Avec le dilueur I, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes se maintient à un niveau élevé pendant la durée de l'expérience (40 mn) mais seulement aux dilutions intermédiaires (Fig. 4b). Avec le dilueur II le pouvoir fécondant diminue aux plus fortes dilutions, après 10 mn de dilution, mais se maintient à son niveau initial pendant 40 mn pour les taux de dilution les plus faibles (Fig. 4c).



**Fig. 2** — Effets du volume du dilueur sur la conservation de la fertilité des ovules. Expérience à quantité de gamètes constante (10  $\mu$ l de sperme et 200 ovules). Concentration du sperme :  $11,7 \cdot 10^9$  spz/ml.

Volume du dilueur : ● 10 ml  
■ 20 ml  
○ 40 ml  
□ 100 ml

Les temps en mn correspondent à la durée de séjour des ovules dans le dilueur avant insémination.

Effects of diluent volume on conservation of ovule fertilizing ability. Experiment with a constant amount of gametes (10  $\mu$ l sperm and 200 ovules). Sperm concentration :  $11,7 \cdot 10^9$  spz/ml.

Times in min. correspond to the time ovules are in diluent before insemination.

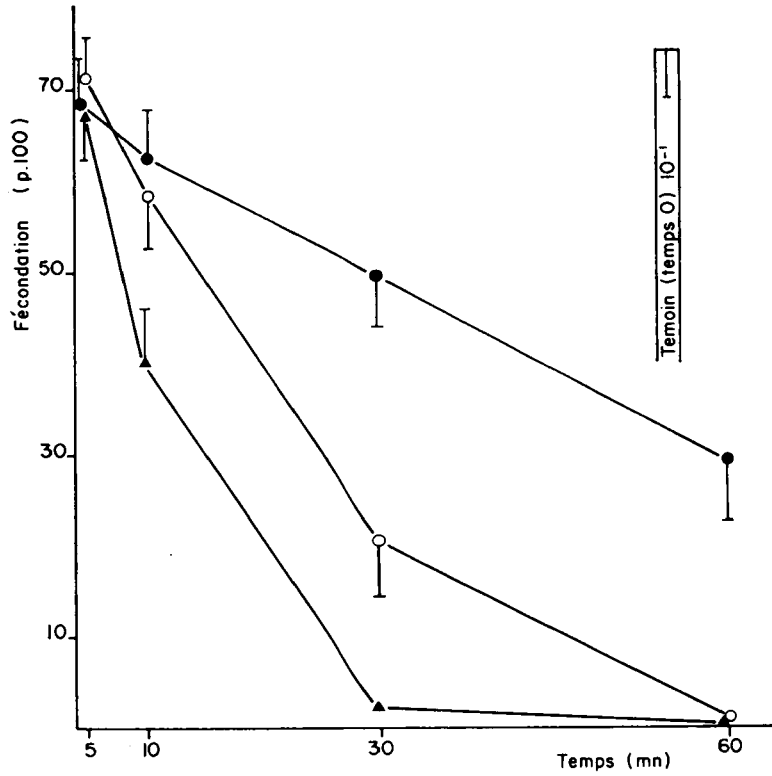


Fig. 3 — Evolution du pouvoir fécondant du sperme après mélange avec le dilueur d'insémination pendant des temps croissants et pour différents taux de dilution : ● 10<sup>-1</sup>; ○ 10<sup>-2</sup>; ▲ 10<sup>-3</sup>

Evolution of spermatozoa survival after exposure of sperm to insemination diluent during 5, 10, 30 or 60 min. at various rate of dilution : ● 10<sup>-1</sup>; ○ 10<sup>-2</sup>; ▲ 10<sup>-3</sup>

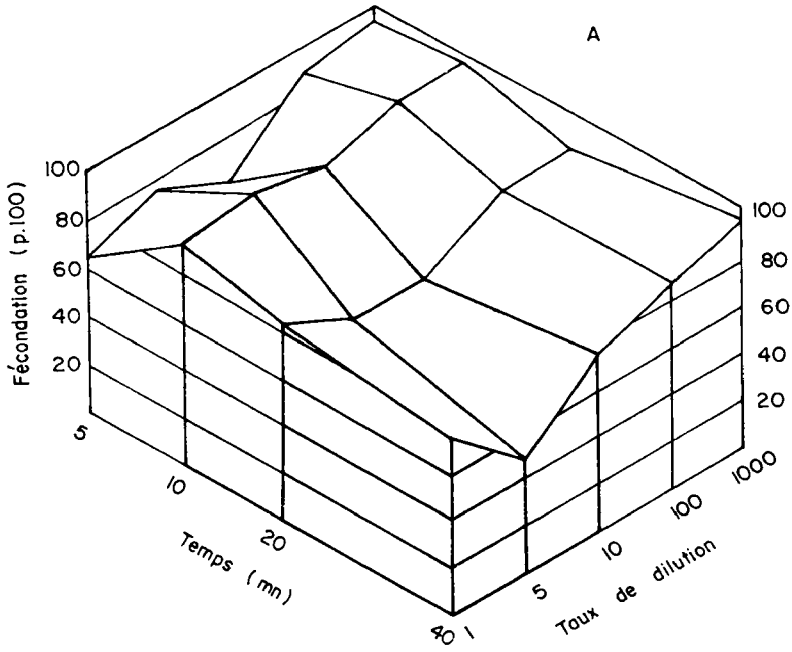
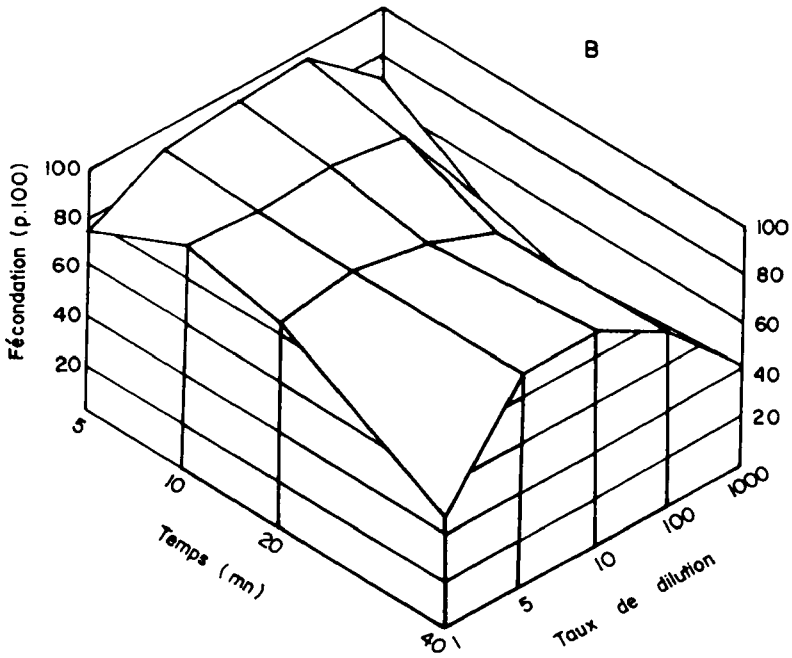
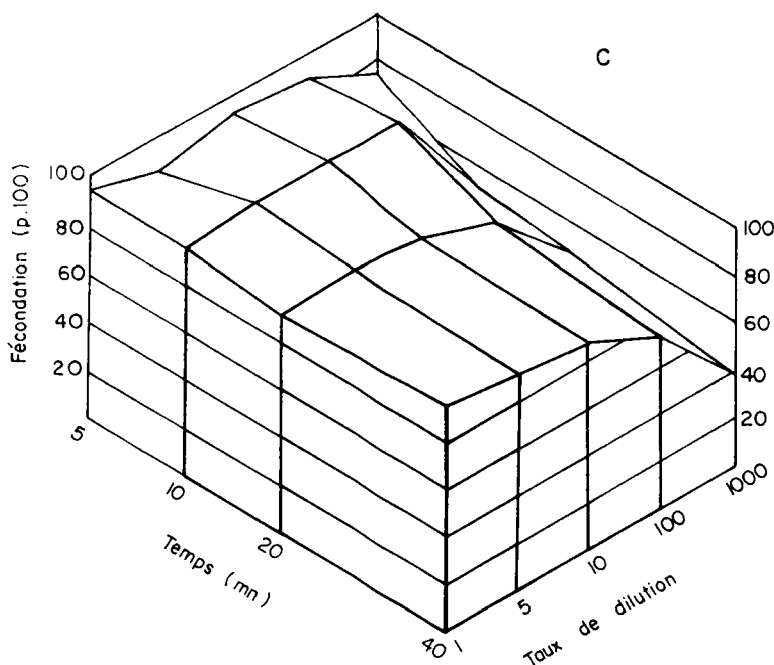


Fig. 4 — Effets du taux de dilution sur la fécondance du sperme dilué dans des milieux enrichis en KCl

A : MMLS



B : dilueur I



C : dilueur II

Effects of dilution rate on diluted sperm fertility in KCl enriched media.

## B - Définition des quantités optimum de gamètes et de dilueur

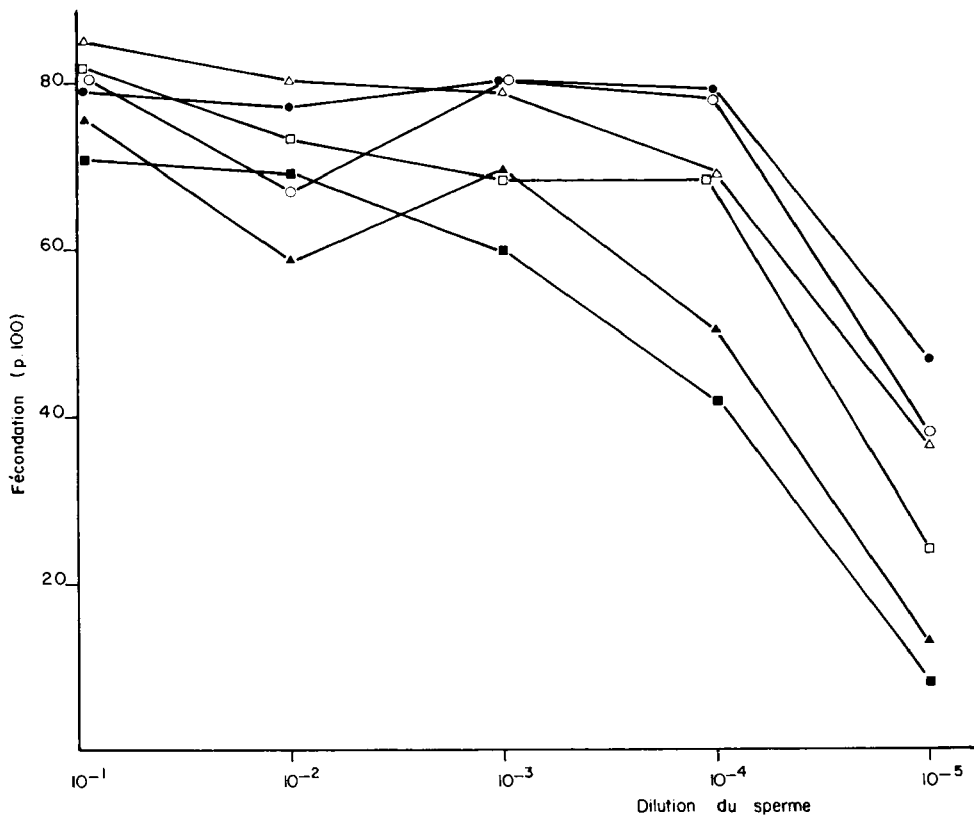
### 1) Résultats expérimentaux

Pour les dilutions de  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  le taux de fécondation n'est pas significativement différent entre les lots. A la dilution de  $10^{-3}$  la diminution du pourcentage de fécondation est significative pour les lots dont le nombre d'ovules est égal ou supérieur à 600. A la dilution de  $10^{-4}$  seuls les lots de 100 et 200 ovules ne présentent pas de diminution significative dans le pourcentage de fécondation ; dans les autres lots, la diminution est très hautement significative.

### 2) Définition de la concentration optimum en spermatozoïdes

Le nombre minimum de spermatozoïdes par ovule à mettre en œuvre lors de l'insémination artificielle et permettant de féconder la totalité des œufs fécondables varie suivant les couples utilisés (Tableaux 1 et 2). Lorsque des taux de fécondation élevés sont obtenus avec des dilutions de sperme de  $10^{-4}$  le nombre minimum de spermatozoïdes par ovule fécondé est de 67.000 dans l'expérience rapportée dans le tableau 1. Ce nombre peut descendre jusqu'à 10.000 (Fig. 5). Dans d'autres répétitions des valeurs de 26.000 et 54.000 ont été enregistrées. Dans le cas des expériences où seules les dilutions inférieures ou égales à  $10^{-3}$  ont permis d'obtenir des taux de fécondation comparables ou supérieurs aux témoins (méthode sèche), le nombre optimum de spermatozoïdes est plus élevé ( $\geq 250.000$ , tableau 2).





**Fig. 5** — Taux de fécondation obtenus après insémination de quantités variables de gamètes dans 20 ml de dilueur d'insémination.

Concentration du sperme :  $14 \cdot 10^9$  spz/ml

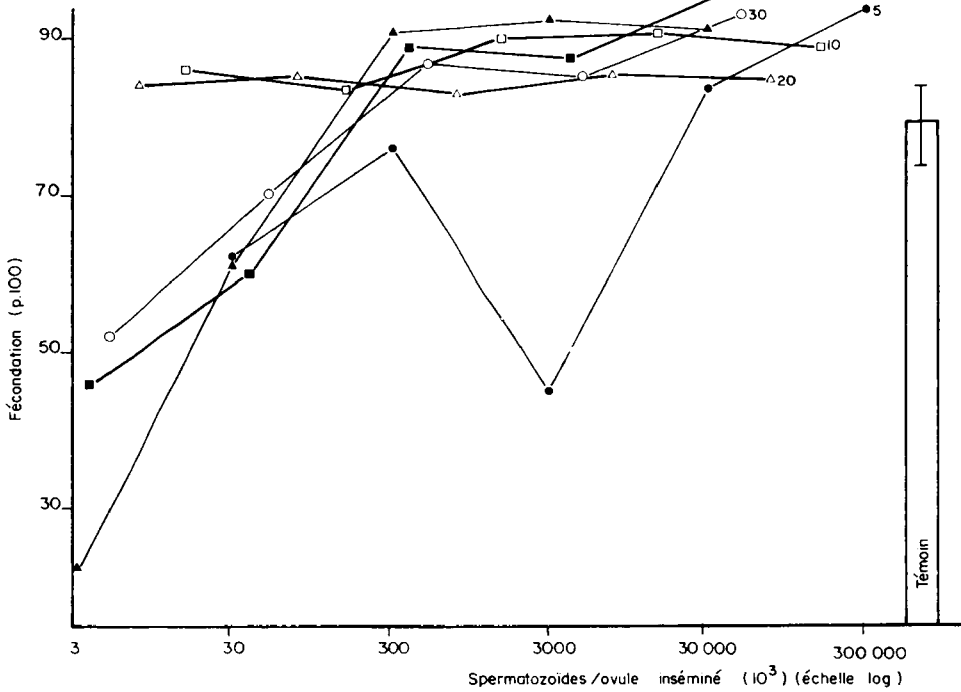
- 100 ovules
- 200 "
- △ 400 "
- 600 "
- ▲ 800 "
- 1000 "

Pourcentage de fécondation du lot témoin inséminé selon la méthode sèche 81,8 %.

Fertilization rate obtained after insemination of varying amounts of gametes in 20 ml of insemination diluent. Sperm concentration :  $14 \cdot 10^9$  spz/ml. Percentage of fertilization in control inseminated according to the dry method : 81,8 %.

### 3) Définition de la concentration optimum en ovule

La quantité de spermatozoïdes nécessaire à la fécondation d'un ovule est minimum lorsque la quantité d'ovule/ml de dilueur est de 10 ou 20 (Fig. 6). Dans ces conditions le pourcentage de fécondation reste constant et aussi élevé que dans les inséminations témoins obtenues avec la méthode sèche. Pour les concentrations en ovules de 5,30 ou 40 par ml de dilueur, il faut un nombre de spermatozoïdes par ovule plus élevé ( $\geq 300.000$ ) pour obtenir un taux élevé de fécondation.



**Fig. 6** — Taux de fécondation obtenus selon le même protocole expérimental que pour la figure 5. Les résultats sont exprimés en fonction du rapport spermatozoïdes/ovules inséminés et pour différentes concentrations d'ovules. Concentration du sperme  $17,1 \cdot 10^9$  spz/ml.

- 5 ovules/ml
- 10 «
- △ 20 «
- 30 «
- 40 «
- ▲ 50 «

Nombre d'œufs au litre : 20.000.

Fertilization rates obtained in the same experimental conditions as in Fig. 5. Results are expressed in terms of the ratio spermatozoa/inseminated ovules and for different ovule concentrations. Sperm concentration :  $17,1 \cdot 10^9$  spz/ml.

Number of eggs/l ; 20.000.

## DISCUSSION

### — Les effets de la dilution

Le taux de dilution des gamètes pratiqué au moment de l'insémination est susceptible de modifier le pourcentage de fécondation. Les expériences sur la conservation de la fertilité des gamètes après dilution montrent que ce sont surtout les spermatozoïdes qui sont affectés par la dilution.

Dans le dilueur d'insémination lorsque le taux de dilution du sperme est faible ( $10^{-1}$  ou  $10^{-2}$ , Fig. 3) une fraction seulement des spermatozoïdes est mise en mouvement; lors de l'addition des ovules, l'apport de petites quantités de liquide coelomique provoque une nouvelle dilution qui entraîne la mise en mouvement de spermatozoïdes restés immobiles, et la fécondation. C'est ainsi que le pouvoir fécondant du sperme peut se conserver après dilution pendant plusieurs dizaines de minutes bien que la durée de motilité des spermatozoïdes ne dépasse pas 1 mn (BILLARD et JALABERT 1974). De même lors de l'insémination l'augmentation des quantités de sperme n'augmente le taux de fécondation que dans la mesure où le volume de dilueur est aussi augmenté. Lorsque le taux de dilution est plus élevé ( $\geq 10^{-3}$ ) tous les spermatozoïdes sont mis en mouvement, et le pouvoir fécondant ne subsiste pas plus de quelques minutes. Cependant cette perte de la motilité et du pouvoir fécondant serait brève puisque GINSBURG (1963) signale une reprise du pouvoir fécondant après 40 mn de dilution dans une solution de Ringer. Il semble également qu'après dilution du sperme dans le liquide coelomique la motilité soit brève (BILLARD et JALABERT, 1974), bien que pour OKADA et ITO (1956), OMURA (1964) et YOSHIDA et NOMURA (1972) ce milieu soit capable de prolonger la motilité pendant des temps beaucoup plus longs. Dans toutes ces solutions salines, après cessation de la motilité, les spermatozoïdes ne présentent pas de modifications morphologiques importantes (BILLARD et BRETON, 1970); au contraire, après dilution dans l'eau douce qui provoque une phase de motilité intense connue depuis longtemps (HUXLEY, 1930), les modifications morphologiques des spermatozoïdes sont beaucoup plus importantes et vraisemblablement irréversibles (SCHLENK et KAHMANN, 1937; ROTHELI et ROTH, 1950; HUG et al, 1953; GEIGER, 1955; GINSBURG, 1963).

Après mélange dans les dilueurs enrichis en KCl le sperme conserve son pouvoir fécondant pendant plusieurs dizaines de minutes même aux fortes dilutions (Fig. 4). Dans ce cas les spermatozoïdes ne sont pas mis en mouvement lors de la dilution, mais restent immobilisés par le  $K^+$ . Avec le MMLS les fortes dilutions sont les plus favorables, par contre, avec des milieux plus simples à base de NaCl ou KCl, le pourcentage de fécondation reste le plus élevé aux dilutions intermédiaires — cas du dilueur I — et aux faibles dilutions — cas du dilueur II, beaucoup plus riche en  $K^+$  —. Le taux optimum de dilution du sperme est donc susceptible de varier selon la composition du dilueur.

La fécondabilité des ovules ne semble pas être très fortement altérée par la dilution. On doit cependant noter une chute temporaire du pourcentage de fécondation après 8 et 12 mn de dilution (chute déjà observée précédemment BILLARD et JALABERT, 1974), et une augmentation de la fécondabilité à la plus forte dilution après 40 mn d'exposition au dilueur (Fig. 2). Une explication pourrait résider dans la dilution de facteurs tels que le  $Ca^{++}$  dont le dilueur d'insémination est dépourvu et dont on sait qu'il est nécessaire à la fécondation (GINSBURG, 1968). On sait d'autre part que la fécondabilité des ovules est beaucoup plus fortement diminuée après lavage dans le simple dilueur d'insémination que dans un milieu où apparaissent les constituants minéraux

du liquide cœlomique (BILLARD, non publié). Après 40 mn de dilution il est possible que des facteurs favorisant la fécondation aient été libérés par l'ovule dans le milieu.

#### — Définition du taux optimum de dilution des gamètes

Dans la pratique de l'insémination artificielle l'objectif est d'obtenir le pourcentage de fécondation le plus élevé possible, c'est-à-dire de féconder tous les ovules fécondables, avec des quantités minimum de sperme. Il faut cependant définir des conditions standards qui présentent une marge de sécurité suffisante pour s'affranchir des variabilités individuelles. Pour le sperme le taux de dilution optimum va dépendre de la concentration du sperme en spermatozoïdes et la qualité de ces spermatozoïdes, facteurs qui varient selon les individus et le temps écoulé depuis le début de la spermiation. Si dans les cas les plus favorables les taux de dilution de  $10^{-5}$  permettent de féconder tous les ovules fécondables, dans d'autres cas au contraire, le taux de dilution ne doit pas dépasser  $10^{-3}$ . Actuellement en l'absence de tout critère d'appréciation objective de la qualité du sperme, le taux de dilution ne doit pas être supérieur à  $10^{-3}$ .

Compte tenu du taux de dilution du sperme défini ci-dessus, il reste à préciser quel est le nombre optimum d'ovules à inséminer par unité de volume de dilueur. L'expérimentation montre (Fig. 6) que la concentration optimale est de 10 à 20 ovules/ml de dilueur. Il existe ainsi un rapport optimum entre les quantités de sperme et d'ovules et le volume de dilueur. Dans ces conditions tous les spermatozoïdes sont mis en mouvement dès l'addition du dilueur et la concentration en ovules est telle qu'un espace suffisant est ménagé entre chacun d'entre eux pour obtenir le maximum de fécondation.

L'existence d'un rapport optimum quantité de gamètes/volume du dilueur explique les inséminations témoins réalisées selon la méthode sèche aboutissent à des taux de fécondation toujours plus faibles. Cette observation conduit à remettre en cause la méthode sèche actuellement pratiquée en salmoniculture. Dans cette méthode les spermatozoïdes sont mélangés aux ovules séparés du liquide cœlomique, mais en réalité il subsiste toujours autour des ovules une quantité suffisante de liquide cœlomique pour mettre en mouvement une partie des spermatozoïdes qui peuvent pénétrer ainsi dans une partie au moins des œufs, une autre partie étant fécondée lorsque de l'eau est ensuite ajoutée au mélange. Il s'ensuit donc un gaspillage de gamètes. Dans le cas de la méthode semi-sèche la quantité de liquide cœlomique peut ne pas être optimum et le liquide cœlomique présenter lui-même un pH inférieur (8,1, INABA *et al*, 1958) au pH le plus favorable à la fécondation (9 à 9,5, PETIT *et al*, 1973). En outre, le liquide cœlomique peut être défavorable dans le cas des femelles hydriques (DORIER, 1949) (cf. BILLARD, 1975).

#### — Définition des quantités minimum et optimum de spermatozoïdes/ovule

Si dans les conditions pratiques il est plus facile de se référer au volume de sperme qu'au nombre de spermatozoïdes, il est cependant intéressant de définir le nombre de spermatozoïdes qu'il est nécessaire d'utiliser pour obtenir la fécondation d'un ovule. Les nombres minimum sont donnés par les expériences faites avec des taux de dilution de  $10^{-4}$  et dans les cas les plus favorables des quantités de spermatozoïdes de l'ordre de 10.000/ovule suffisent. C'est avec les dilutions de  $10^{-3}$  qu'il faut rechercher le nombre optimum de spermatozoïdes/ovule. Des chiffres de l'ordre de 200.000 ressortent des présentes expériences et sont comparables aux valeurs déjà publiées (BILLARD *et al*, 1973 ;

BILLARD et CARPENTIER, 1974). En réalité d'après des données de la figure 6 et pour tenir compte des variabilités individuelles dans le pouvoir fécondant du sperme, ce sont des valeurs de l'ordre de 300.000 qu'il faut retenir. Ces chiffres peuvent sembler élevés si l'on considère que les gamètes sont placés en contact direct. Cependant, la pénétration du spermatozoïde ne peut pas se faire en un point quelconque de l'ovule, mais seulement par le micropyle. Bien que l'existence de substances micropylaires attractives pour le spermatozoïde ait été envisagée dans les œufs de Truite (HARTMANN, 1944 : HARTMANN *et al*, 1947 a et b), la probabilité pour qu'un spermatozoïde donné accède au micropyle est très faible, d'autant plus que la durée de motilité est brève.

### REMERCIEMENTS

M. BONICEL a assuré l'entretien des géniteurs et la surveillance des incubations. La préparation du manuscrit a été réalisée par Mme MARCEL, et les graphiques par M<sup>lles</sup> CLAUSS et NABOT.

TABLEAU 1

Nombre de spermatozoïdes en millier par œuf fécondé en fonction de la concentration en gamètes. Les pourcentages de fécondation correspondants apparaissent dans la fig. 5.

Ratio : number of spermatozoa/fertilized egg for various concentration of gametes (for percentage of fertilization (embryonation) see fig. 5).

Nombre approché d'ovules inséminés (dans 20 ml)	Taux de dilution du sperme (1)				
	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$
100	58	598	2.284	45.018	226.866
200	36	184	1.420	23.235	183.516
400	19	100	878	9.117	84.493
600	19	67	682	6.431	59.406
800	25	70	502	4.993	46.849
1000	48	66	467	3.670	40.017

(1) Concentration du sperme :  $14,1 \cdot 10^9$  spermatozoïdes/ml

TABLEAU 2

Pourcentage de fécondation et nombre de spermatozoïdes par millier par œuf fécondé en fonction de la concentration en gamètes pour 2 couples de géniteurs I et II.

Percentage of fertilization and number of spermatozoa per fertilized egg in relation to the concentration of gametes inseminated.

Numéro du couple et concentration du sperme								
I - $9,7 \cdot 10^9$					II - $8,9 \cdot 10^9$			
Nbre approché d'ovule	dilution du sperme				dilution du sperme			
	$10^{-3}$		$10^{-4}$		$10^{-3}$		$10^{-4}$	
	% Fec.	N	% Fec.	N	% Fec.	N	% Fec.	N
100	67,6	1.367	10,6	1.078	93,4	968	45,4	200
200	82,0	591	22,3	277	92,9	484	38,7	129
400	86,5	271	35,6	68	92,3	245	53,4	42
800	73,5	220	35,1	39	86,1	131	50,2	22
1 000	74,2	151	15,4	35				

### REFERENCES

- BILLARD R. BRETON B., 1970. Modifications ultrastructurales et cytochimiques des spermatozoïdes après dilution, chez les poissons d'eau douce. VII<sup>e</sup> Congrès Int. Micro. Elect., Grenoble, 637-638.
- BILLARD R., PETIT J., JALABERT B., SZOLLOSI D., 1973. Artificial insemination in trout using a sperm diluent. 715-723 in J.H.S. BLAXTER Early life history of Fish, Springer Verlag Heidelberg.
- BILLARD R., CARPENTIER M., 1974. Détermination du nombre optimum de spermatozoïdes nécessaires à la fécondation d'un ovule au cours de l'insémination artificielle de la Truite. Bull. Franç. Pisc., 251, 73-76.
- 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., JALABERT B., BRETON B., 1974. L'insémination artificielle de la Truite *Salmo gairdneri* Richardson. III - Définition de la nature et de la molarité du tampon à employer avec les dilueurs d'insémination et de conservation. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 14, 611-621.
- BILLARD R., L'insémination artificielle de la Truite *Salmo gairdneri* Richardson. IV - Effets des ions K et Na sur la conservation de la fertilité des gamètes. Bull. Franç. Pisci., 256, 88-100.
- DORIER A., 1949. Action du liquide cœlomique sur les spermatozoïdes de Truite arc-en-ciel. Trav. Lab. Hydrobiol. Pisc., Univ. Grenoble, 41, 69-73.
- GEIGER W., 1955. Elektronenoptische Untersuchungen am Salmonidensperma. Rev. Suisse Zool., 62, 325-334.
- 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., 1968. Fertilization in Fishes and the problem of polyspermy. Publishing House « Nauka », Moscou.
- HARTMANN M., 1944. Befruchtungsstoffe (Gamone) bei Fischen (Regenbogenforelle). Naturwiss., 32, 231.

- HARTMANN M., GRAF-MEDEN F., KUHN R., BIELIG H.J. 1947a. Untersuchungen über die Befruchtungsstoffe der Regenbogenforelle. Z. Naturforsch., 2b, 330-349.
- HARTMANN M., GRAF-MEDEN F., KURN R., BIELIG H.J., 1947b. Über die Gynogamone der Regenbogenforelle. Naturwiss., 34, 25-26.
- HUG. O., LIPPERT W., FISCHER H., 1953. Das elektronenoptische Bild der Salmonidenspermatozoen. Protoplasma, 42, 94-99.
- HUXLEY J.S., 1930. The maladaptation of trout spermatozoa to fresh water. Nature 125, 494.
- INABA D., NOMURA M., SUYAMA M., 1958. Studies on the improvement of artificial propagation in trout culture. II - On the pH values of eggs, milt, coelomic fluid and others. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 23, 762-765.
- 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. Sci. Fish., 30, 723-733.
- OKADA S., ITOT T., 1956. The influences of the medium on the activity of spermatozoa of dog salmon *Oncorhynchus keta* (Japonais). Mem. Fac. Agric. Hokkaido Univ., 2, 162-164.
- 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.
- ROTHELI A., ROTH H., 1950. Elektronenoptische Untersuchungen an Salmonidenspermien. Rev. Suisse Zool., 57, 503-510.
- SCHLENK W., KAHMANN M., 1937. Die chemische Zusammensetzung des spermaliquors und ihre physiologische Bedeutung. Biochem. Z., 295, 283-301.
- YOSHIDA T., NOMURA M., 1972. A substance enhancing sperm motility in the ovarian fluid of rainbow trout. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 38, 1073.