

# TOXICITE DU PYRALÈNE 3010 SUR LES OVULES ET LES SPERMATOZOÏDES DE TRUITES ARC-EN-CIEL AVANT ET PENDANT L'INSÉMINATION

R. BILLARD\*, J.C. CAZIN, J. DEQUIDT, F. ERB et P. COLEIN\*\*

---

## RESUME

Dans cette étude il a été montré que le Pyralène 3010 (polychlorobiphényle) exerce une inhibition de la fécondation des œufs de truites « arc-en-ciel » par une activité sur les ovules non fécondés et sur les spermatozoïdes avant insémination.

## SUMMARY

It is shown in this study that Pyralène 3010 (Polychlorobiphenyl) has an inhibiting effect on the fertilization of the eggs of the « rainbow » trout because it acts upon the unfertilized ovules and on the spermatozoons before insemination.

---

(\*) I.N.R.A., Laboratoire de Physiologie des Poissons, 78350 JOUY-EN-JOSAS.

(\*\*) Laboratoires de Pharmacodynamie, Toxicologie et Hydrologie  
Faculté de Pharmacie, rue du Pr Laguesse, 59045 LILLE Cedex.

Depuis quelques années certains pisciculteurs avaient attiré notre attention sur la mortalité importante d'alevins de truites et saumons élevés dans des bacs en matière plastique. Poursuivant des études sur le cheminement des polychlorobiphényles (Pyralène 3010) dans les écosystèmes aquatiques et leurs effets sur le plan biotoxicologique (1 à 5), il nous est apparu souhaitable d'envisager une première expérimentation sur la toxicité du pyralène 3010 sur les ovules et les spermatozoïdes de truites « Arc-en-ciel » avant et pendant l'insémination.

Ces expériences ont été menées dans plusieurs objectifs :

- 1) Toxicité du Pyralène 3010 sur les ovules avant fécondation.
- 2) Toxicité du Pyralène 3010 sur les ovules au moment de l'insémination.
- 3) Activité du Pyralène 3010 sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.
- 4) Toxicité du Pyralène 3010 sur les spermatozoïdes avant fécondation.

Pour l'ensemble de ces expériences nous avons utilisé les mêmes solutions :

#### 1) Solutions Témoins

T<sub>1</sub> = 10 ml = Dilueur DIA 532 (utilisé habituellement lors de l'insémination)

T<sub>2</sub> = 8 ml = Dilueur DIA 532 + 2 ml d'éthanol (solvant du pyralène)

#### 2) Solutions de Pyralène 3010

SA = 400 ppb de Pyralène dans le Dilueur DIA 532

SB = 40 ppb de Pyralène dans le Dilueur DIA 532

SC = 4 ppb de Pyralène dans le Dilueur DIA 532

### A) TOXICITE DU PYRALENE 3010 SUR LA FECONDABILITE DES OVULES DE TRUITES ARC-EN-CIEL AVANT ET PENDANT L'INSEMINATION.

Un protocole identique est utilisé pour les trois types d'expériences : seuls, les temps de contact des ovules avec les différentes solutions sont modifiés et nous opérons à la température de 10°C.

Dans tous les cas, les ovules non fécondés ont été prélevés extemporanément sur des truites Arc-en-ciel âgées de 3 ans. On ne conserve que les œufs vivants, les « blancs » étant éliminés.

Le sperme est également prélevé extemporanément sur des truites Arc-en-ciel âgées de dix-huit mois. On vérifie au microscope la mobilité des spermatozoïdes après dilution dans le Dilueur DIA 532 (dilution 1/100).

#### I. TOXICITE DU PYRALENE 3010 SUR LA FECONDABILITE DES OVULES AVANT L'INSEMINATION

L'expérience est réalisée en laissant, selon le cas, 20 mn, 40 mn et 60 mn les ovules en contact avec les solutions. Le protocole est identique et consiste

dans un premier temps à préparer dix flacons en verre renfermant respectivement :

Flacons A et B : 10 ml solution  $T_1$  + 200 œufs environ

Flacons C et D : 10 ml solution  $T_2$  + 200 œufs environ

Flacons E et F : 10 ml solution SA + 200 œufs environ

Flacons G et H : 10 ml solution SB + 200 œufs environ

Flacons I et J : 10 ml solution SC + 200 œufs environ

Chacun des flacons reçoit périodiquement une légère agitation pendant la durée des expériences.

Après ce temps de contact, on sépare les œufs des différentes solutions. Dans l'expérience d'une durée de 20 mn, les solutions SA, SB, SC recueillies, ont été dosées afin de déterminer par différence la quantité de Pyralène 3010 restée fixée sur les œufs.

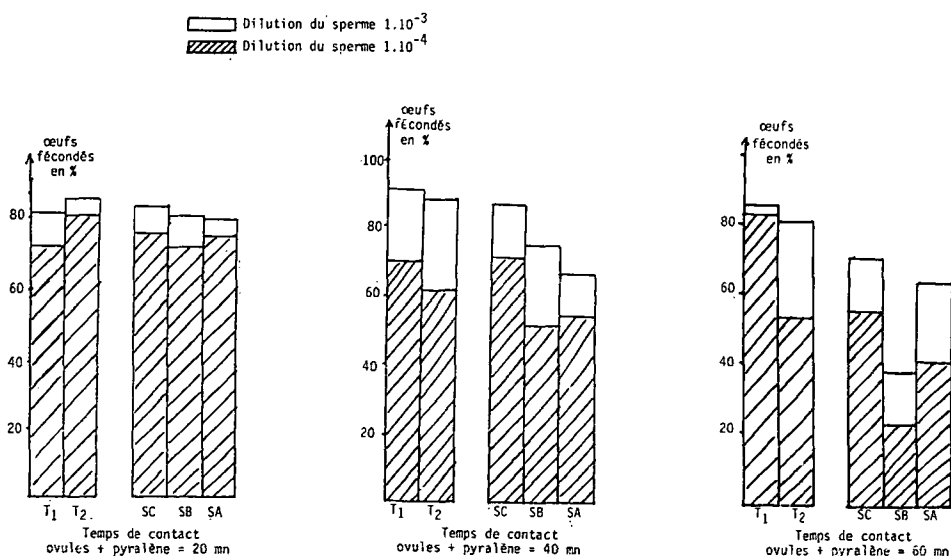
On procède ensuite à l'insémination en ajoutant aux différents lots 10 ml de dilueur DIA 532 et le sperme à 2 taux de dilution :

Flacons A, C, E, G, I + 1  $\mu$ l de sperme (dilution  $1.10^{-4}$ )

Flacons B, D, F, H, J + 10  $\mu$ l de sperme (dilution  $1.10^{-3}$ )

Après agitation, les spermatozoïdes sont laissés 15 mn en contact avec les ovules. Les solutions sont alors éliminées et les différents lots d'œufs sont placés dans de petits incubateurs de type Californien, à l'obscurité, dans une eau maintenue à 10°C et recyclée. Après dix jours on compte le nombre d'œufs embryonnés, ce qui donne une estimation du pourcentage de fécondation.

## RESULTATS - (Tableau I)



EFFET DU TEMPS DE CONTACT DES OEUFS AVEC LE PYRALENE 3010 SUR LEUR FECONDABILITE

Tableau I

1. Temps de contact avec le pyralène : 20 mn, température : 10 °C

a) Quantité de Pyralène fixée sur les œufs non fécondés

Teneur en pyralène	Solution SA 400 ppb		Solution SB 40 ppb		Solution SC 4 ppb	
	flacon E 10 <sup>-4</sup>	flacon F 10 <sup>-3</sup>	flacon G 10 <sup>-4</sup>	flacon H 10 <sup>-3</sup>	flacon I 10 <sup>-4</sup>	flacon J 10 <sup>-3</sup>
Taux de dilution du sperme						
Teneur (ppb) en pyralène au départ	400	400	40	40	4	4
Teneur (ppb) des solutions en pyralène après 20 mn de contact	240	255	25	22	1	1
Quantité (en ppb) de pyralène fixée sur les ovules	160	145	15	18	3	3

b) Pourcentage d'œufs fécondés avec 1 µl de sperme (dilution 1.10<sup>-4</sup>)

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	72 54	81 -	75 74	72 43	76 67

Des ennuis expérimentaux ne nous ont pas permis de noter les résultats du T<sub>2</sub>, de la deuxième expérience.

c) Pourcentage d'œufs fécondés avec 10 µl de sperme (dilution 1.10<sup>-3</sup>)

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	82 81	86 93	80 84	81 92	84 96

d) Conclusion

Un temps de contact de 20 mn des ovules non fécondés dans des solutions de 4, 40 et 400 ppb de pyralène 3010 ne semble pas influencer la fécondabilité ultérieure de ces ovules.

2. Temps de contact avec le pyralène : 40 mn, température 10 °C

a) Pourcentage d'œufs fécondés avec 1  $\mu$ l de sperme (dilution  $1.10^{-4}$ )

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation	69	61	54	51	70
en %	85	51	29	75	59

b) Pourcentage d'œufs fécondés avec 10  $\mu$ l de sperme (dilution  $1.10^{-3}$ )

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation	90	87	66	74	86
en %	98	86	55	88	89

c) Conclusions

Contrairement à l'expérience précédente, il faut constater l'influence, souvent néfaste sur la fécondabilité des ovules, des trois solutions SA (400 ppb), SB (40 ppb) et SC (4 ppb) de Pyralène 3010 lorsqu'elles sont maintenues 40 mn en contact avec les ovules non fécondés pour une dilution sperme =  $1.10^{-4}$ .

On peut par contre considérer que seule la solution la plus concentrée (SA 400 ppb) influence la fécondabilité des ovules pour dilution sperme =  $1.10^{-3}$ .

Signalons, par ailleurs, que la quantité dix fois plus importante de sperme utilisée dans la deuxième partie des expériences augmente sensiblement le pourcentage de la fécondation.

3. Temps de contact avec le pyralène : 60 mn, température 10°C

a) Pourcentage d'œufs fécondés avec 1  $\mu$ l de sperme (dilution  $1.10^{-4}$ )

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation	83,8	54,6	41,3	22,2	55,6
en %					

b) Pourcentage d'œufs fécondés avec 10  $\mu$ l de sperme (dilution  $1.10^{-3}$ )

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation	85,9	81,2	64,7	38,9	71,1
en %					

c) Conclusions

Pour une durée de contact de 60 mn, on est amené à faire les mêmes constatations que précédemment, à savoir l'influence dans l'ensemble néfaste des différentes solutions de pyralène sur la fécondabilité des ovules.

## II. TOXICITE DU PYRALENE 3010 SUR LA FECONDABILITE

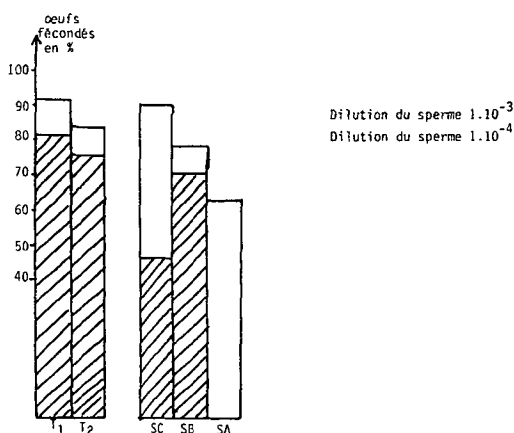
### DES OVULES AU MOMENT DE L'INSEMINATION

Le protocole expérimental utilisé est identique au précédent, à ceci près que les ovules ne sont pas soumis, préalablement à l'insémination, à un contact avec les solutions de Pyralène 3010.

On utilise donc les mêmes solutions T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, SA, SB, SC dont 10 ml sont introduits dans les 10 flacons A à J avec 200 œufs, à la température de 10°C.

Aux flacons A, C, E, G, I, on ajoute immédiatement 1 µl de sperme (1.10<sup>-4</sup>) et aux flacons B, D, F, H, J, 10 µl de sperme (1.10<sup>-3</sup>). Après un séjour de quinze minutes dans le dilueur, les œufs sont placés dix jours dans des incubateurs de type Californien comme dans l'expérience précédente, et on détermine alors le pourcentage de fécondation.

### RESULTATS - (Tableau II)



EFFET DU PYRALENE 3010 SUR LA FECONDABILITE DES OVULES AU MOMENT DE L'INSEMINATION

Tableau II

#### 1° Pourcentage d'œufs fécondés avec 1 µl de sperme (dilution 1.10<sup>-4</sup>)

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	81	75	-	70	46

#### 2° Pourcentage d'œufs fécondés avec 10 µl de sperme (dilution 1.10<sup>-3</sup>)

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	92	84	63	77	90

### 3° Conclusions

Malheureusement pour la première partie de l'expérience (sperme en dilution à  $1.10^{-4}$ ), des ennuis d'expérimentation ne nous permettent pas de donner des résultats convenables pour la solution SA à 400 ppb de pyralène. Pour les deux autres solutions SB et SC, bien qu'il semble qu'une certaine activité néfaste soit mise en évidence à la dilution  $1.10^{-4}$ , il est curieux de constater que la solution la moins concentrée semble la plus toxique. Ces résultats plus ou moins aberrants peuvent être dûs à la forte dilution du sperme utilisée. Les erreurs expérimentales sont dans ce cas amplifiées et perturbent les résultats.

Cette remarque n'est plus valable dans la deuxième partie de l'expérience (sperme en dilution à  $1.10^{-3}$ ). On constate alors, la très forte activité de la solution de Pyralène 3010 à 400 ppb qui peut faire régresser de près de 30 % la fécondabilité des œufs de truites.

## III. CONCLUSION GENERALE

Dans ces différentes expériences, on peut dans certains cas noter l'activité néfaste des solutions de Pyralène 3010 sur la fécondabilité des ovules de Truites Arc-en-Ciel. Il nous a donc semblé judicieux d'effectuer des expériences comparables au niveau des spermatozoïdes de ces poissons.

### B) TOXICITE DU PYRALENE 3010 SUR LES SPERMATOZOIDES DE TRUITES ARC-EN-CIEL

Le but de ces études est de tester d'une part l'influence éventuelle des solutions de Pyralène 3010 sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes, d'autre part de rechercher la toxicité possible des solutions de Pyralène sur les spermatozoïdes.

#### 1) ACTIVITE DES SOLUTIONS DE PYRALENE 3010 SUR LE POUVOIR FECONDANT DES SPERMATOZOIDES DE TRUITES

Nous avons opéré à la température de  $10^{\circ}\text{C}$  et avons préparé dans un premier temps des solutions identiques à celles des expériences précédentes, en utilisant le dilueur d'insémination (DIA 532).

Dans ce dilueur les spermatozoïdes de truites, dont la durée de motilité est brève — 2 à 4 mn —, sont immédiatement mis en mouvement. L'objectif de cette expérience est donc de tester la toxicité du Pyralène 3010 sur le sperme après des durées d'exposition brèves comparables à celles qui peuvent être rencontrées en cas de fécondation naturelle.

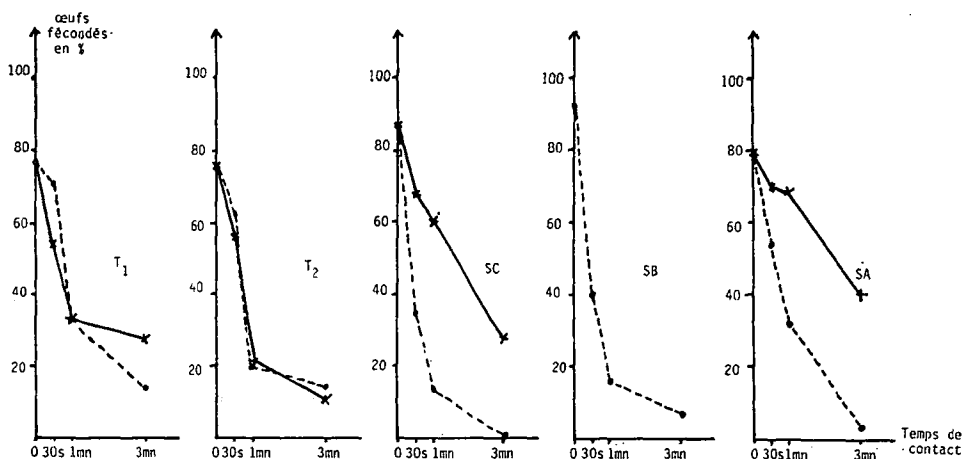
(Dans une des expériences la solution SB à 40 ppb de Pyralène n'a pas permis, pour des ennuis expérimentaux, de donner une interprétation convenable des résultats. Nous n'en tenons donc pas compte dans nos résultats).

A chacune des quatre solutions, nous ajoutons  $10\ \mu\text{l}$  de la dilution de sperme que nous laissons en contact pendant 30 secondes, 1 ou 3 minutes. Au bout de ce temps, nous ajoutons à chaque flacon 200 œufs de truites fécondés et l'on agite l'ensemble. Après 15 minutes de contact, les œufs sont placés dans les

incubateurs de type Californien : après 10 jours on estime le pourcentage de fécondation par le nombre d'œufs embryonnés.

**RESULTATS - Tableau (III)**

Série d'expériences n° 1  
Série d'expériences n° 2



EFFET DU PYRALENE 3010 SUR LE POUVOIR FECONDANT DES SPERMATOZOÏDES DE TRUITES

Tableau III

**1° Pourcentage d'œufs fécondés après 0 seconde de contact (témoins)**

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	77	76	80	93	88

**2° Pourcentage d'œufs fécondés après 30 secondes de contact**

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	54 71	56 63	70 54	- 40	68 35

**3° Pourcentage d'œufs fécondés après 1 minute de contact**

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	34 33	21 20	69 32	- 16	61 14



4° Pourcentage d'œufs fécondés après 3 minutes de contact

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation	28	11	40	-	28
en %	14	14	3	7	1

**Conclusion**

Ces expériences semblent prouver que dans certains cas les solutions de Pyralène 3010 à 400 et 4 ppb inhibent le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

**2) TOXICITE DES SOLUTIONS DE PYRALENE 3010 SUR LE POUVOIR FÉCONDANT DES SPERMATOZOÏDES DE TRUITES ARC-EN-CIEL APRES EXPOSITION PROLONGEE**

Nous avons opéré à la température de 10°C et avons laissé les spermatozoïdes en contact avec les solutions de Pyralène 3010 pendant 20 minutes, 40 minutes et 60 minutes.

Les spermatozoïdes sont maintenus immobiles par l'emploi de chlorure de potassium contenu dans le dilueur MM LS (6).

Nous préparons donc les solutions suivantes :

Solution T<sub>1</sub> = 10 ml de dilueur MM LS

Solution T<sub>2</sub> = 8 ml de dilueur MM LS + 2 ml éthanol

Solution SA = 10 ml de solution de Pyralène à 400 ppb dans dilueur MM LS

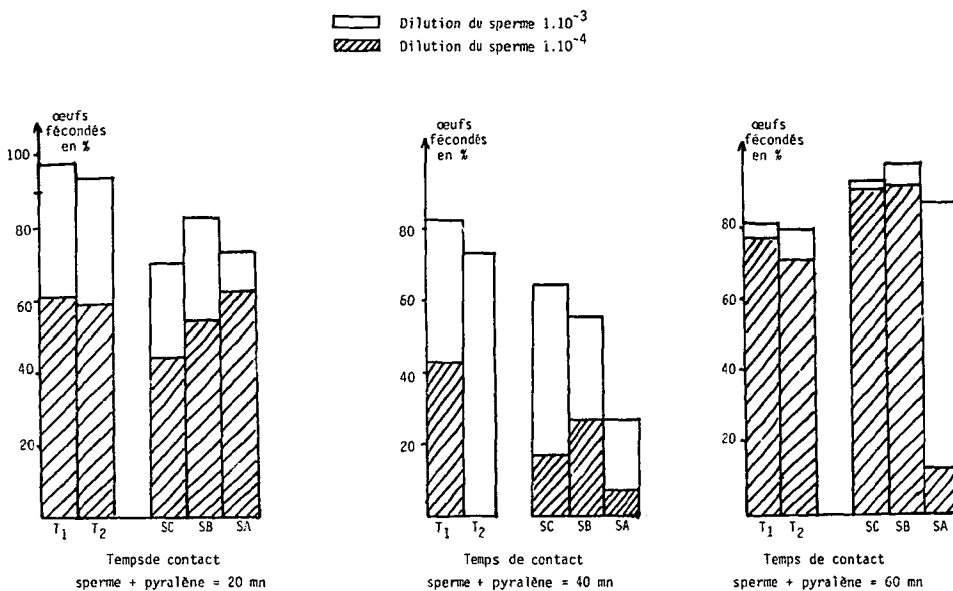
Solution SB = 10 ml de solution de Pyralène à 40 ppb dans dilueur MM LS

Solution SC = 10 ml de solution de Pyralène à 4 ppb dans dilueur MM LS

A ces différentes solutions on ajoute dans le 1<sup>er</sup> cas 1 µl de solution de sperme (dilution : 1.10<sup>-4</sup>) qu'on laisse en contact soit 20 minutes, soit 40 minutes, soit 60 minutes. Après ce temps de contact, 200 œufs non fécondés sont ajoutés à chaque flacon ainsi que 10 ml de dilueur MM LS sans chlorure de potassium, permettant ainsi de retrouver la mobilité des spermatozoïdes. Après un temps de contact de 15 minutes, les œufs sont prélevés et placés pendant 10 jours dans des incubateurs de type Californien. On détermine alors le pourcentage de fécondation.

Dans le deuxième cas, on ajoute aux différentes solutions 10 µl de sperme (dilution : 1.10<sup>-3</sup>) puis on procède de la même façon que ci-dessus.

RESULTATS - (Tableau IV)



EFFET DU PYRALÈNE 3010 SUR LE POUVOIR FÉCONDANT DES SPERMATOZOÏDES DE TRUITES  
 Tableau IV

1° Temps de contact avec le pyralène : 20 mn

a) Pourcentage d'œufs fécondés avec  $1 \mu\text{l}$  de sperme (dilution  $1.10^{-4}$ )

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	61 87	59 84	62 2	54 66	44 67

b) Pourcentage d'œufs fécondés avec  $10 \mu\text{l}$  de sperme (dilution  $1.10^{-3}$ )

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	98	94	73	83	70

2° Temps de contact avec le pyralène : 40 mn

a) Pourcentage d'œufs fécondés avec  $1 \mu\text{l}$  de sperme (dilution  $1.10^{-4}$ )

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	43 26	* 37	7 1	27 0	17 67

\* Un défaut d'expérimentation ne nous permet pas de donner des résultats interprétables pour T<sub>2</sub>

**b) Pourcentage d'œufs fécondés avec 10 µl de sperme (dilution 1.10<sup>-3</sup>)**

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	82	73	27	55	64

**3° Temps de contact avec le pyralène : 60 mn**

**a) Pourcentage d'œufs fécondés avec 1 µl de sperme (dilution 1.10<sup>-1</sup>)**

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	76,2	70,7	13,7	91,9	90,4

**b) Pourcentage d'œufs fécondés avec 10 µl de sperme (dilution 1.10<sup>-3</sup>)**

Solutions	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	SA	SB	SC
Fécondation en %	80,6	79,5	86,5	96,5	92,5

**4° Conclusion**

Quelle que soit la dilution du sperme et le temps de contact sperme-toxique, ces expériences nous permettent de constater que les différentes solutions de Pyralène 3010 (400 - 40 et 4 ppb) semblent influencer de façon défavorable la fécondation des œufs de truites par une activité au niveau des spermatozoïdes.

**CONCLUSION GENERALE**

De l'ensemble de cette expérimentation, qui demande d'ailleurs confirmation, il convient d'observer que, à des degrés divers, les solutions de Pyralène 3010 à 400, 40 et 4 ppb, semblent provoquer une inhibition certaine de la fécondation des œufs de truites « Arc-en-Ciel » par une activité, d'une part sur les ovules non fécondés, d'autre part sur les spermatozoïdes avant insémination.

Des expériences ultérieures sur les géniteurs mâles et femelles semblent indispensables pour envisager une toxicité éventuelle du Pyralène dès le début de la spermatogénèse et de l'ovulogénèse.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. F. ERB, J. POMMERY, Ch. VAN AERDE, G. VERMEERSCH  
Synthèse et étude structurale de quelques isomères de polychlorobiphényles.  
Bull. Soc. Chim. France, 1976, n° 5-6, 964-968.
2. J. DEQUIDT, F. ERB, J.C. CAZIN, J. POMMERY  
Toxicité à court terme du Pyralène 3010 chez la truitelle.  
Bull. Fr. Pisciculture, 1977, n° 264, 82-87.
3. J. DEQUIDT, F. ERB, J.C. CAZIN, D. DIVE, F. GOUDALIEZ, Ph. COLEIN  
Essais de bioaccumulation et de transfert de polychlorobiphényles dans les éléments d'une chaîne trophodynamique en eau douce.  
Tribune du Cebedeau, 1977, n° 403-404, 277-282.
4. F. ERB, J. DEQUIDT, J.C. CAZIN, A. BRICE, D. DIVE et Ph. COLEIN (avec la collaboration technique de Ch. RENARD)  
Quelques aspects de l'étude des polychlorobiphényles dans l'eau et les systèmes aquatiques.  
Présenté au Congrès AGHIM à Lucerne le 18-6-1977.  
Sciences et Techniques Municipales (sous presse).
5. J.C. CAZIN, J. DEQUIDT, F. ERB, Ph. COLEIN  
Note sur la recherche de la toxicité du pyralène 3010 sur des œufs fécondés de truites *Fario* et de brochets.  
Bull. Fr. Pisciculture, 1977, n° 268, 155-161.
6. R. BILLARD, B. JALABERT  
L'insémination artificielle de la truite (RICHARDSON) II Comparaison des effets dilueurs sur la conservation de la fertilité des gamettes avant et après insémination.  
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 14, 601-610.