

INDUCTION PRÉCOCE DE L'OVULATION CHEZ LE SAUMON ATLANTIQUE *Salmo salar* ÉLEVÉ ENTIÈREMENT EN EAU DOUCE

B. JALABERT*, P.Y. LE BAIL*, et R. CUINAT**, avec la collaboration technique de
Micheline HEYDORFF et du garde chef principal J. FERRAND

INTRODUCTION

La survie de l'espèce Saumon atlantique (*Salmo salar* L.) est sérieusement menacée sur plusieurs bassins fluviaux français. Sur l'axe Loire-Allier notamment, l'accès aux frayères devient de plus en plus difficile, compromettant la reproduction naturelle (CUINAT, 1976). Parmi les mesures de sauvegarde mises en œuvre, le Conseil Supérieur de la Pêche prélève, pour les faire pondre à la salmoniculture d'AUGEROLLES (Puy-de-Dôme) (CUINAT, 1978), des Saumons adultes, soit au printemps soit à l'automne (mi-septembre à mi-octobre) dans l'Allier à VICHY (CUINAT *et al.*, 1980).

Les stress liés à la capture, au transport et au séjour en étang, peuvent augmenter les mortalités de ces géniteurs avant même qu'ils n'arrivent au stade d'ovulation et de spermiation où les gamètes pourront être utilisés pour la reproduction artificielle (novembre à début décembre)

Il est apparu utile, pour essayer de limiter les pertes de gamètes dues à ces mortalités, de hâter la ponte. Peu applicable chez les sujets capturés au printemps, une telle intervention semble par contre intéressante pour ceux prélevés et transportés en automne, dans la mesure notamment où les traitements pourront être effectués à l'occasion de ce transport.

Expérimentation effectuée dans le cadre de la convention « Environnement Cadre de Vie n° 20.78 — code I.N.R.A. 65/1327 — Maturation sexuelle chez le Saumon ».

* I.N.R.A., Laboratoire de Physiologie des Poissons, Campus de Beaulieu — 35042 RENNES CEDEX.
** Délégation Régionale du Conseil Supérieur de la Pêche, 84, avenue du Puy de Dôme — 63000 CLERMONT-FERRAND.

Des expériences antérieures avaient montré la possibilité d'avancer notablement la date d'ovulation chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) (JALABERT *et al.*, 1978 a) et chez le Saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*, WALBAUM) (JALABERT *et al.*, 1978 b). Ces résultats avaient été obtenus par injection soit de gonadotropine de saumon partiellement purifiée (G.S.P.P.), soit d'une hormone stéroïde voisine de la progestérone, la 17 α hydroxy-20 β dihydroprogestérone (17 α -20 β P). L'ovulation (libération des ovules mûrs dans la cavité abdominale, chez les Salmonidés) est nécessairement précédée du phénomène de maturation ovocytaire, ensemble de phénomènes complexes qui marquent la fin de l'ovogénèse et de la vitellogenèse en isolant le gamète femelle de l'ovaire maternel et en le préparant à la fécondation et au développement embryonnaire; les phénomènes de maturation les plus visibles intéressent le vitellus (qui change de structure et devient translucide) et le noyau, ou vésicule germinative, qui disparaît (reprise de la méiose jusqu'à la métaphase de 2^e division)

On sait maintenant que le déclenchement de la maturation ovocytaire est dû à l'action directe sur les ovocytes de la 17 α -20 β P produite dans l'ovaire sous l'action de la gonadotropine hypophysaire GtH (JALABERT, 1976). La 17 α -20 β P peut être synthétisée au laboratoire à partir de la 17 α hydroxy-progestérone (FOSTIER *et al.*, 1973) et il serait avantageux de l'utiliser pour déclencher artificiellement la maturation et l'ovulation de préférence à la gonadotropine, protéine complexe d'un poids moléculaire voisin de 30 000 extraite des hypophysés de Salmonidés (BRETON *et al.*, 1976).

En fait l'utilisation directe de la 17 α -20 β P à un stade trop précoce peut présenter l'inconvénient d'induire la maturation en l'absence d'ovulation (JALABERT *et al.*, 1978 a et b).

Les essais rapportés ici visaient à définir chez le Saumon atlantique le traitement le plus efficace et le plus avantageux pour avancer la date d'ovulation, compte tenu des observations antérieures chez la Truite arc-en-ciel et le Saumon coho.

MATERIEL ET METHODES

Etant donné la grande taille, le faible nombre et la valeur des Saumons adultes sauvages disponibles, il aurait été très difficile de procéder à une expérimentation comportant plusieurs lots, avec des effectifs suffisants dans chacun d'eux.

Les essais ont donc été menés sur des Saumons issus d'œufs de reproducteurs sauvages (souche Allier), mais élevés en pisciculture à AUGEROLLES et conservés en captivité après le stade smolt. La plupart de ces animaux « enfermés en eau douce » étaient âgés de trois ans et effectuaient leur première maturation sexuelle, alors que quelques individus seulement, survivants d'une reproduction antérieure, étaient âgés de quatre ans; ils ont été répartis au hasard dans les différents lots expérimentaux. La distribution de la population par classes de poids est représentée sur la fig. 1.

A l'exception de 30 femelles conservées comme témoins pour connaître la date d'ovulation naturelle en l'absence de toute manipulation excessive, les femelles utilisées pour l'expérience ont été marquées individuellement (marques plastiques souples floy-tag, insérées sous la nageoire dorsale).

Lors de chaque manipulation, les poissons ont été anesthésiés dans une solution aqueuse de 2-phénoxy-éthanol (Merck) (0,5 %). Les différentes doses d'hormones ont été administrées dans un volume de solution physiologique (Na Cl 9 ‰) ajusté au poids corporel à raison de 1 ml/kg, en injection intrapérinéale.

La gonadotropine partiellement purifiée (G.S.P.P.) a été préparée à partir d'hypophysés lyophilisés de femelles de Saumon chinook (*Oncorhynchus tshawitcha*) collectées lors de la ponte à l'écloserie de SPRINGCREEK (WASHINGTON, U.S.A.); les étapes de purification de la G.S.P.P. sont identiques à celles décrites pour la purification de la gonadotropine s-GtH (BRETON *et al.*, 1978) mais ne comportent pas les deux phases chromatographiques finales sur DEAE-cellulose et sur ACA 54. Sous forme lyophilisée,

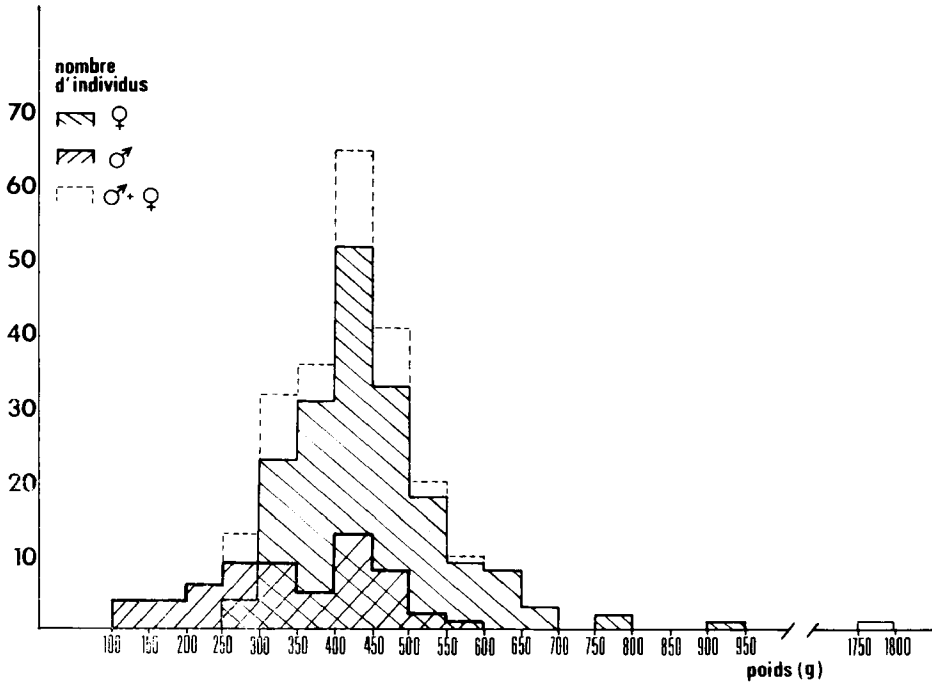


Figure 1 : Distribution de la population de Saumons « enfermés en eau douce » utilisés pour l'expérience, en fonction du poids (intervalles de classes de 50 g).

100 mg de G.S.P.P. présentent une activité biologique équivalente à 17,4 mg de s-GtH (déterminée par dosage biologique selon JALABERT *et al.*, 1973).

La 17α -20 β P a été préparée selon la méthode décrite par FOSTIER *et al.*, (1973) et présente une contamination (inférieure à 20%) par de la 17α hydroxy-progestérone non réduite. Avant injection, ce stéroïde est préalablement dissous dans l'éthanol pur (15 mg/ml) puis flocculé par dilution au 15^e dans la solution physiologique d'injection (concentration finale de la suspension injectée : 3 mg/ml).

La température de l'eau, 9°C le 17/10, s'est abaissée progressivement jusqu'à 6°C le 20/10 et s'est maintenue sensiblement à 6°C jusqu'au 28/10 (tabl. 1).

Compte tenu de la durée des processus de maturation connue chez la Truite arc-en-ciel (JALABERT, 1978 a) et chez le Saumon coho (JALABERT *et al.*, 1978 b) ainsi que de la température de l'eau mentionnée ci-dessus, les animaux n'ont été manipulés à nouveau que le 26/10, le 28/10, le 31/10 et enfin le 7/12 pour déceler, par massage abdominal, les femelles ovulées.

La production d'œufs de chaque femelle a été pesée, puis les pontes ont été regroupées par lots correspondant aux différents traitements, et inséminées artificiellement selon la méthode de BILLARD *et al.*, 1974. La proportion de mâles spermiant spontanément à cette époque n'a pas nécessité de recourir à une stimulation hormonale.

Les œufs ont été incubés sur clayettes et les œufs blancs ont été dénombrés et éliminés régulièrement.

Tableau 1 : CALENDRIER ET NATURE DES INJECTIONS PRATIQUÉES DANS LES DIFFÉRENTS LOTS EXPERIMENTAUX.

P : 17 hydroxy-20 dihydroprogestérone 3 mg/kg

f et F : Gonadotropine de Saumon partiellement purifiée (GSPP)

f 1	0.1 mg/kg	F 1	0.8 mg/kg
f 2	0.05 mg/kg	F 2	0.4 mg/kg
f 3	0.025 mg/kg	F 3	0.2 mg/kg

Lot n°	Nombre de Femelles	17 10 après midi	19 10 matin	20 10 après midi
1.1	20	f 1	—	F 1
1.2	20	f 1	f 1	F 1
1.3	21	f 1	f 1	P
2.1	20	f 2	—	F 2
2.2	20	f 2	f 2	F 2
2.3	20	f 2	f 2	P
3.1	21	f 3	—	F 3
3.2	21	f 3	f 3	F 3
3.3	21	f 3	f 3	P

DATE	TEMPERATURE
17/10	9° C
18/10	8° 5 C
19/10	7° 2 C
20/10	6° C
26/10	6° C
28/10	6° C

RESULTATS

Le pourcentage des femelles ovulées à partir du 26 10 dans les différents lots est indiqué sur la figure 2.

L'analyse de variance (après transformation des proportions p grâce à la transformation $X = \arcsin \sqrt{p}$) met en évidence un effet nettement significatif (au seuil $p = 5\%$) de la dose de traitement d'une part, et du type de traitement d'autre part, le 26 10. A partir du 28 10 aucune différence significative entre lots ne peut plus être mise en évidence.

La signification de la différence entre les proportions de réponses le 26 10 dans les différents lots pris deux à deux est présentée dans le tableau 2. A cette date le traitement le plus efficace est constitué par la double sensibilisation gonadotrope à forte dose f1 - f1, suivie du traitement par la 17 α -20 β P; le pourcentage de réponse est voisin de 100, alors que 2 femelles témoins seulement sur 30 seront ovulées le 7 11, ce qui permet d'évaluer l'avance obtenue à 2 semaines au minimum.

La quantité moyenne d'œufs émis par les femelles des différents lots est indiquée dans le tableau 3. Ces quantités varient de 12 à 15 % du poids corporel selon les lots et ne présentent généralement pas de différences significatives.

La proportion de survie des œufs jusqu'à l'éclosion a été de l'ordre de 25 % en moyenne. Compte tenu du mode d'incubation (pontes regroupées par lots) il n'a pas été possible de mettre en évidence de différences significatives éventuellement liées à la nature du traitement.

Figure 2 : Pourcentage de femelles ovulées dans les différents lots en fonction de la date après la première injection.

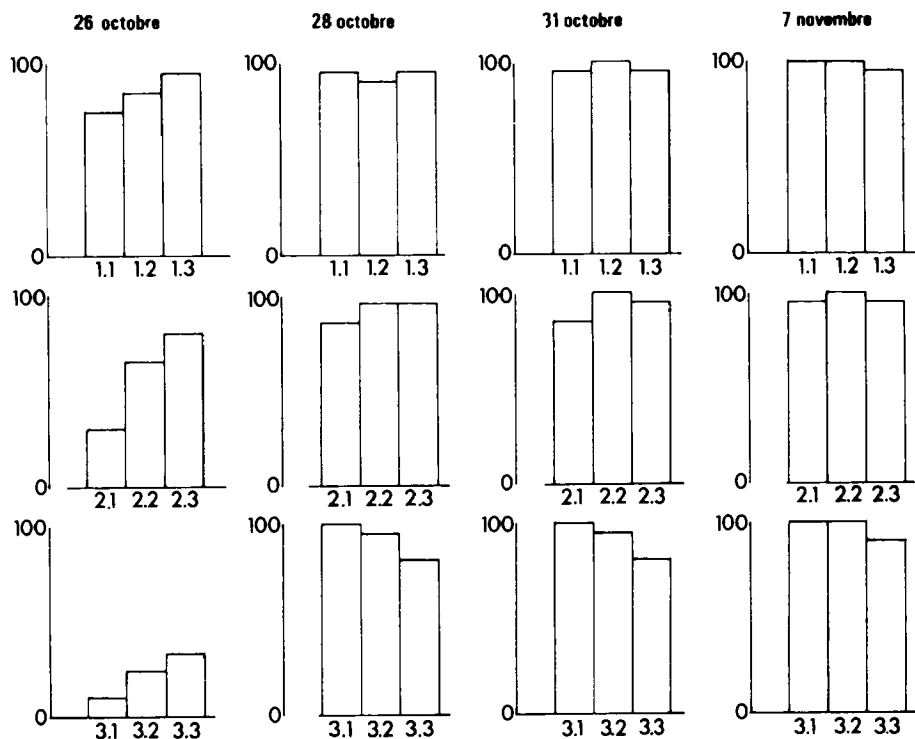


Tableau 2 : EFFET DU TRAITEMENT DE LA DOSE SUR LE POURCENTAGE D'ANIMAUX OVULES LE 26 OCTOBRE

Différence entre lots non significative (NS), significative (S, seuil $p = 0.5$), hautement significative (HS, seuil $p = 0.1$) ou très hautement significative (THS, seuil $p = 0.01$).

EFFET DU TRAITEMENT :

DOSE 1		DOSE 2		DOSE 3	
f1 - 0 - F1	} NS } THS	f2 - 0 - F2	} NS } THS	f3 - 0 - F3	} NS } NS
f1 - f1 - F1		f2 - f2 - F2		f3 - f3 - F3	
f1 - f1 - P		f2 - f2 - P		f3 - f3 - P	

EFFET DE LA DOSE :

Traitement f-0-F		Traitement f-f-F		Traitement f-f-P	
dose 1	} S } THS	dose 1	} NS } THS	dose 1	} NS } THS
dose 2		dose 2		dose 2	
dose 3		dose 3		dose 3	

Tableau 3 : Quantité moyenne (en % du poids corporel) d'œufs émis par les femelles des différents lots les 26 et 28 octobre.

Lot n°	Nombre d'animaux ovulés les 26 et 28 octobre	Quantité moyenne d'œufs émis (% du poids corporel) (± écart-type)
1.1	19	15.2 ± 5.1
1.2	18	11.6 ± 3.4
1.3	20	13.4 ± 4.2
2.1	17	12.2 ± 3.5
2.2	19	12.1 ± 5.0
2.3	19	12.6 ± 3.1
3.1	21	14.0 ± 3.2
3.2	20	14.6 ± 2.6
3.3	17	14.5 ± 5.4

DISCUSSION

Les bons résultats obtenus, en partie grâce à l'expérience antérieure acquise chez la Truite arc-en-ciel (JALABERT et al., 1978 a) et chez le Saumon coho (JALABERT et al., 1978 b), démontrent qu'il est possible d'induire le déclenchement précoce de la ponte ovulaire chez le Saumon atlantique *Salmo salar* dans les conditions analogues, grâce à l'administration soit d'hormone gonadotrope partiellement purifiée, soit d'une combinaison hormone gonadotrope -17 α -20 β P.

La première publication sur l'induction prématurée de l'ovulation chez un Salmonidé (HASLER et al., 1939) fait état de l'utilisation d'hypophyses de Carpes. Plus récemment des essais analogues ont été réalisés chez le Saumon du Danube (*Hucho hucho* L.) (JUNGWIRTH, 1979) en utilisant des extraits de poudre acétonique d'hypophyses de Carpes.

L'utilisation de matériel gonadotrope provenant de la Carpe peut se justifier, dans la mesure où l'hormone gonadotrope purifiée de Carpe ne présente pas sur un Salmonidé une activité biologique très différente de l'hormone gonadotrope des Salmonidés (JALABERT, 1974 et données non publiées).

Par contre l'injection de broyats hypophysaires bruts présente de nombreux inconvénients : hétérogénéité, qualité et teneur gonadotrope variable des hypophyses utilisées, conditions d'extractions variables, et enfin injection d'un ensemble d'hormones hypophysaires dont certaines sont susceptibles de perturber inutilement la physiologie des animaux traités, voire même de contrebalancer partiellement l'effet de la gonadotropine.

A l'inverse, la gonadotropine de Saumon partiellement purifiée utilisée ici, sans présenter le degré de pureté maximum de la s-GtH (BRETON et al., 1978) constitue cependant un produit de haute activité biologique dépourvu de la plupart des contaminants hypophysaires. Sa préparation est suivie d'un dosage biologique qui permet d'établir son activité biologique par rapport à la gonadotropine hautement purifiée s-GtH (ici 100 mg de G.S.P.P. équivalent à 17,4 mg de s-GtH). Par ailleurs la 17 α -20 β P dont l'utilisation combinée abaisse notablement les doses de gonadotropine nécessaire est une hormone stéroïde naturelle, synthétisée en laboratoire, et de pureté connue. L'ensemble des traitements fondés sur l'utilisation de ces deux produits se prête donc parfaitement à une normalisation.

En ce qui concerne les différentes modalités de traitement, les travaux antérieurs menés chez la Truite arc-en-ciel et le Saumon coho avaient montré la nécessité de réaliser un pré-traitement de « sensibilisation » avec une faible dose de gonadotropine

(f) avant un traitement plus massif par la gonadotropine (F) ou par la 17α -20 β P (P). Cette notion n'est pas nouvelle, elle est utilisée empiriquement dans les traitements « d'hypophysation » chez les Cyprinidés, et JUNGWIRTH (1979) vient aussi de montrer que l'administration fractionnée d'extraits hypophysaires de Carpes, chez le Saumon du Danube, permet d'obtenir des œufs de meilleure qualité qu'une seule injection.

Dans le cadre de l'expérience réalisée ici sur *Salmo salar*, la qualité des œufs issus des différents traitements n'a pu être comparée, compte tenu des conditions d'incubation ; par ailleurs la qualité des œufs obtenus sur ce type de populations « enfermées » en eau douce est généralement considérée comme très mauvaise (CUINAT, 1978) et aurait très bien pu masquer l'effet du traitement.

Si la qualité des œufs émis par chaque femelle ne semble pas varier en fonction du type de traitement et de la dose de gonadotropine, au contraire des nuances importantes apparaissent quant à la vitesse de réponse : les fortes doses de gonadotropine provoquent une réponse plus rapide ; à dose équivalente, après double sensibilisation f-f, le traitement par la 17α -20 β P est le plus efficace, suivi du traitement gonadotropine seul (f-f-F).

Tous les sujets traités sont morts peu après la ponte ; par ailleurs, seule une infime proportion des Saumons sauvages de l'Allier survit après la reproduction naturelle ou artificielle ; il n'est donc pas surprenant que les multiples manipulations effectuées sur les animaux expérimentaux d'élevage aient encore accentué le phénomène naturel. Il serait néanmoins avantageux de chercher à diminuer la fréquence de ces manipulations, pour abaisser peut-être la mortalité après ponte, mais surtout pour simplifier, à l'avenir, la mise en œuvre pratique du traitement.

CONCLUSION

Les essais réalisés ont démontré la possibilité d'avancer de 15 jours au moins la ponte ovulaire chez le Saumon atlantique grâce à l'administration soit d'hormone gonadotrope de Saumon partiellement purifiée (G.S.P.P.), soit d'une combinaison G.S.P.P. 17α hydroxy-20 β dihydroprogestérone (17α -20 β P).

Le traitement optimal (dose de gonadotropine minimale pour une réponse rapide) paraît réalisé par la combinaison f2-f2-P (tableau 1) qui n'utilise au total que 0,1 mg/kg de G.S.P.P. et 2 mg/kg de 17α -20 β P.

Des essais ultérieurs devront définir les modalités pratiques d'un traitement combiné simplifié exigeant au plus 2 injections.

RESUME

Des essais réalisés sur une population de Saumon Atlantique de l'Allier, élevée entièrement en eau douce, ont démontré la possibilité d'induire artificiellement l'ovulation avec une avance d'au moins 15 jours sur la date d'ovulation naturelle.

Le traitement le plus avantageux (dose minimale de gonadotropine de Saumon partiellement purifiée, G.S.P.P. de 0,1 mg/kg) fournissant une réponse rapide est constitué par deux injections successives de G.S.P.P. (0,05 mg/kg) suivies d'une injection de 17α hydroxy-20 β dihydroprogestérone (2 mg/kg).

SUMMARY

Experiments performed in artificially landlocked atlantic Salmon (*Salmo salar* from Allier river) have shown that ovulation can be induced at least 15 days in advance by the use of hormonal stimulation.

The cheaper treatment (lowest dose of partially purified salmon gonadotropin, G.S.P.P., 0,1 mg/kg) giving a rapid response is obtained by two successive injections of G.S.P.P. (0,05 mg/kg) followed by one injection of 17 α hydroxy-20 β dihydroprogesterone (2 mg/kg).

BIBLIOGRAPHIE

- BILLARD R., PETIT J., JALABERT B., SZOLLOSI D., 1974. Artificial insemination in Trout using a sperm diluant. Symposium on the early life history of fish. OBAN, Blaxter Edt., 715-723.
- BRETON B., JALABERT B., REINAUD P., 1976. Purification of gonadotropin from rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson) pituitary glands. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 16, 25-36.
- BRETON B., PRUNET P., REINAUD P., 1978. Sexual differences in salmon gonadotropin. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 18, 759-765.
- CUINAT R., 1976. Principaux facteurs menaçant la survie du Saumon Loire-Allier. Conseil Supérieur de la Pêche, 6^e Délégation Régionale (Auvergne-Limousin), polyc. 7 p.
- CUINAT R., 1978. La Salmoniculture du Conseil Supérieur de la Pêche à AUGEROLLES. C.S.P. 6^e Délégation Régionale (Auvergne-Limousin), Bull. Inf. C.S.P. 113, 94-112.
- CUINAT R., BOMASSI P., CARRIER A. 1980. Amélioration des conditions de captures printanières et de stabulation de Saumons adultes pour la reproduction artificielle. Bull. Fr. Piscic., 276, 123-141.
- FOSTIER A., JALABERT B., TERQUI M., 1973. Action prédominante d'un dérivé hydroxylé de la progestérone sur la maturation *in vitro* des ovocytes de la Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). C.R. Acad. Sci., 277, 421-424.
- HASLER A.D., MEYER R.K., FIELD H.M., 1939. Spawning induced prematurely in Trout with the aid of pituitary glands of the Carp. Endocrinology, 25, 978-983.
- JALABERT B., 1976. *In vitro* oocyte maturation and ovulation in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*), Northern Pike (*Esox lucius*) and Goldfish (*Carassius auratus*). J. Fish. Res. Bd. Can., 33, 974-988.
- JALABERT B., 1978. Production of fertilizable oocytes from follicles of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) following *in vitro* maturation and ovulation. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 18, 461-470.
- JALABERT B., BRETON B., BILLARD R., 1973. Dosage biologique des hormones gonadotropes de poissons par le test de maturation *in vitro* des ovocytes de Truite. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 14, 217-228.
- JALABERT B., BRETON B., FOSTIER A., 1978 a. Precocious induction of oocyte maturation and ovulation in rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) : problems when using 17 α hydroxy-20 β dihydroprogesterone. Ann. Biol. anim. Biophys., 18, 977-984.
- JALABERT B., GOETZ F.W., BRETON B., FOSTIER A., DONALDSON E.M., 1978 b. Precocious induction of oocyte maturation and ovulation in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). J. Fish. Res. Bd. Can., 35, 1423-1429.
- JUNGWIRTH M., 1979. Ovulation inducement in prespawning adult Danube Salmon (*Hucho hucho* L.) by injection of acetone dried Carp pituitary (CP). Aquaculture, 17, 129-135.