

CONSERVATION A COURT TERME DES GAMÈTES DE TRUITE ARC-EN-CIEL EN CONDITION *in vitro* SOUS ATMOSPHÈRE D'OXYGÈNE

R. BILLARD, M. LEGENDRE

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

RÉSUMÉ

La conservation du sperme de truite arc-en-ciel prélevé 1 mois et demi après le début de la spermiation a été testée *in vitro* à l'air ou sous atmosphère d'O₂ et à température ambiante (9° C) pendant 24 h. Le pouvoir fécondant a été mesuré par le pourcentage d'œufs embryonnés à 300 degrés-jours. Le sperme a été dilué au 1/1000 (10⁻³) pour inséminer des ovules prélevés à chaque test sur un groupe de 10 femelles. En conditions de stockage sous air la fertilité chute plus rapidement que sous O₂ (P < 0,05 à 12 h). Dans les deux cas, le pouvoir fécondant initial ne se maintient que pendant 6 h. Cette durée de conservation paraît relativement brève en comparaison avec les données de la littérature mais les taux de dilution élevés employés dans cette expérience ont probablement permis de déceler des phénomènes de vieillissement intervenant précocement en condition de conservation *in vitro*. Le stockage des ovules sous oxygène n'améliore que très légèrement leur survie par rapport à une conservation dans le liquide cœlomique.

SUMMARY

Short-term storage of rainbow trout gametes *in vitro* under oxygen.

The storage of rainbow trout sperm, taken 1 1/2 months after the onset of spermiation, was tested *in vitro* in the air and under O₂ at a room temperature of 9° C for 24 hrs. Fertilizing ability was assessed by the percentage of eyed-eggs at 300 degrees-days. Sperm was diluted to 1/1000 (10⁻³) to inseminate ova, taken for each test, from a group of females. When the sperm was stored in the air, the fertility rate dropped more rapidly than when it was kept under O₂ (P < 0,05 at 12 hrs). In both cases, initial fertilizing ability was only maintained for 6 hrs. This storage time is rather brief as compared to data in the literature but the high dilution rates used in this experiment probably allowed us to detect the aging processes occurring early in *in vitro* storage.

Ovum survival at 9° C under O₂ was only slightly improved as compared to survival in cœlomical fluid.

INTRODUCTION

La conservation des gamètes de salmonidés, même à très court terme, peut constituer un outil appréciable en pratique piscicole. Une simplification dans l'organisation des opérations d'insémination serait ainsi offerte, par exemple, en autorisant d'abord le prélèvement du sperme en début d'opération, sa conservation et son utilisation au fur et à mesure de la collecte des ovules qui se déroulerait pendant le reste de la journée ou d'une partie de celle-ci. L'opération inverse peut aussi être envisagée. En outre des possibilités fiables de conservation autoriseraient des transports de gamètes ce qui présenterait de nombreux avantages. Les connaissances concernant les possibilités de maintenir à court terme la survie du sperme en condition *in vitro* sont déjà importantes. A la température ambiante, c'est-à-dire aux environs de 10° C, ou bien au réfrigérateur à 4° C ou dans la glace à 0° C, la durée de survie du sperme *in vitro* est de l'ordre de quelques heures (BILLARD, 1978; CARPENTIER et BILLARD, 1978) à quelques jours (GINSBURG, 1968 pour revue). Des durées de 5 à 15 jours ont été rapportées: HENNEGUY (1877) et BUTCHER (1944) pour la truite fario, SCHEURING (1928) pour la truite arc-en-ciel. De telles variations sont surprenantes mais on doit tenir compte aussi de l'époque à laquelle les expériences ont été pratiquées car on sait que des phénomènes de vieillissement se produisent au cours de la période de spermiation à la fin de laquelle le sperme est de moins bonne qualité (BILLARD, 1978). A des températures légèrement inférieures à 0° C (-2 à -4° C) la conservation est possible à condition d'ajouter un cryoprotecteur (DMSO ou éthylène-glycol 5 à 10%) qui empêchera la congélation; des survies de plus de 10 jours ont alors été observées (TRUSCOTT *et al.*, 1968; SANCHEZ-RODRIGUEZ et

BILLARD, 1977). Une influence favorable de l'aération ou de l'oxygénation a été montrée par les observations de SCHEURING (1928) TRUSCOTT *et al.* (1968) et STÖSS *et al.* (1978) et sera reprise dans la présente expérience.

La conservation des ovules *in vitro* a également fait l'objet de nombreuses investigations et ici aussi on note des résultats extrêmement variables allant d'une heure de survie à sec (BILLARD, 1976) à quelques jours dans le liquide cœlomique (GINSBURG, 1968; WITHLER et MORLEY, 1968; TAKANO *et al.*, 1973; CARPENTIER et BILLARD, 1978). Des conservations sous O₂ ont aussi été tentées par HIROI (1978) mais sans comparaison avec d'autres modes de conservation.

Dans les travaux précédents les solutions proposées font souvent appel à une source de froid dont il est souvent difficile de disposer sur le terrain. Le travail qui va être exposé ci-après examine dans des conditions faciles à mettre en œuvre des techniques de conservation du sperme et d'ovules à température ambiante et sous atmosphère d'oxygène ainsi que l'ont déjà pratiqué STÖSS *et al.* (1978) et BILLARD (1981).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Conservation du sperme

Les géniteurs utilisés pour l'expérimentation sont âgés de 2 à 3 ans et proviennent de piscicultures privées de la région parisienne. L'expérience est pratiquée à la mi-décembre soit 1 mois et demi après le début de la spermiation. Les spermatozoïdes de 10 mâles, anesthésiés au Phénoxyéthanol (0,3 ml/l), sont recueillis par pression abdominale et mélangés. Le pool résultant est ensuite séparé en deux fractions réparties dans 2 erlenmeyers de 250 ml dans lesquels la hauteur de sperme atteint 1,5 cm. Dans l'un des erlenmeyers, de l'oxygène est soufflé pendant une dizaine de secondes, afin d'en chasser l'air, l'autre reste à l'air et constitue le témoin. Les deux erlenmeyers sont ensuite bouchés et laissés à température ambiante (9° C).

Le pouvoir fécondant est testé immédiatement après prélèvement du sperme puis après 2, 4, 6, 8, 12 et 24 heures de stockage.

Dix répétitions sont réalisées à chaque test de fécondation, à partir des ovules de 10 femelles identifiées par marquage et dont les ovules sont recueillis de façon fractionnée (environ 400 ovules par prélèvement et par femelle). Pour chaque femelle la moitié des ovules ainsi obtenus est inséminée par 10 µl de sperme témoin, l'autre moitié étant inséminée par 10 µl de sperme placé sous oxygène. Le mélange des gamètes est réalisé dans 10 ml du dilueur d'insémination D 532 (BILLARD, 1977) soit une dilution du sperme de 1/1000. Après insémination, les œufs sont laissés au repos 15 mn, puis sont transférés dans des incubateurs placés en eau recyclée et thermorégulée à 10° C. Les pourcentages de fécondations sont évalués d'après le pourcentage d'œufs embryonnés à 300 degrés-jours. Le pourcentage d'embryons anormaux est aussi établi.

Immédiatement avant chaque série d'insémination, la teneur en O₂ des deux spermatozoïdes stockés est mesurée à mi-hauteur avec un oxymètre (YSI). Après chaque prélèvement l'O₂ est renouvelé dans l'erlenmeyer contenant le sperme expérimental. Les deux erlenmeyers sont ensuite rebouchés jusqu'au prélèvement suivant.

Conservation des ovules

Des jeunes femelles de 2 ans sont utilisées pour cette expérience. Les ovules de plusieurs femelles sont poolés et divisés en deux parties égales. L'une, laissée dans une boîte de chlorure de polyvinyle, comporte environ 3000 ovules atteignant une hauteur de 3 cm dans la boîte et juste recouverts de liquide cœlomique. L'autre partie est divisée en lots d'environ 200 ovules qui sont placés avec un iso-volume de liquide cœlomique dans des sachets plastiques (1 l) gonflés d'oxygène. L'ensemble des ovules est laissé à l'obscurité et à température ambiante (9° C). L'aptitude à la fécondation des ovules est testée en triplication (3 fois 200 ovules) immédiatement après prélèvement et après 12, 24, 36 et 72 heures de stockage sous oxygène et dans le liquide cœlomique. L'insémination est pratiquée dans les mêmes conditions que ci-dessus (dilution 1/1000) avec un pool de sperme prélevé sur 5 mâles entrés en spermiation depuis 1 mois. Le dénombrement des œufs embryonnés est effectué après 25 jours d'incubation à 10° C.

Les pourcentages moyens de fécondation obtenus pour chaque temps de conservation (10 répétitions) avec le sperme témoin et le sperme sous oxygène sont comparés par un test t après transformation angulaire des pourcentages. L'évolution de la fertilité des ovules est comparée par analyse de variance également après transformation angulaire des pourcentages.

RÉSULTAT

L'évolution du pouvoir fécondant du sperme, en fonction de la durée de stockage, est présentée dans la figure 1. On constate que les pourcentages d'œufs embryonnés obtenus avec le sperme maintenu sous oxygène sont légèrement supérieurs à ceux obtenus avec le témoin après la 4ème heure de stockage. Cependant cet effet favorable de l'oxygène n'est significatif qu'à la 12ème heure ($p < 0,05$) et s'accroît à 24 h ($p < 0,025$).

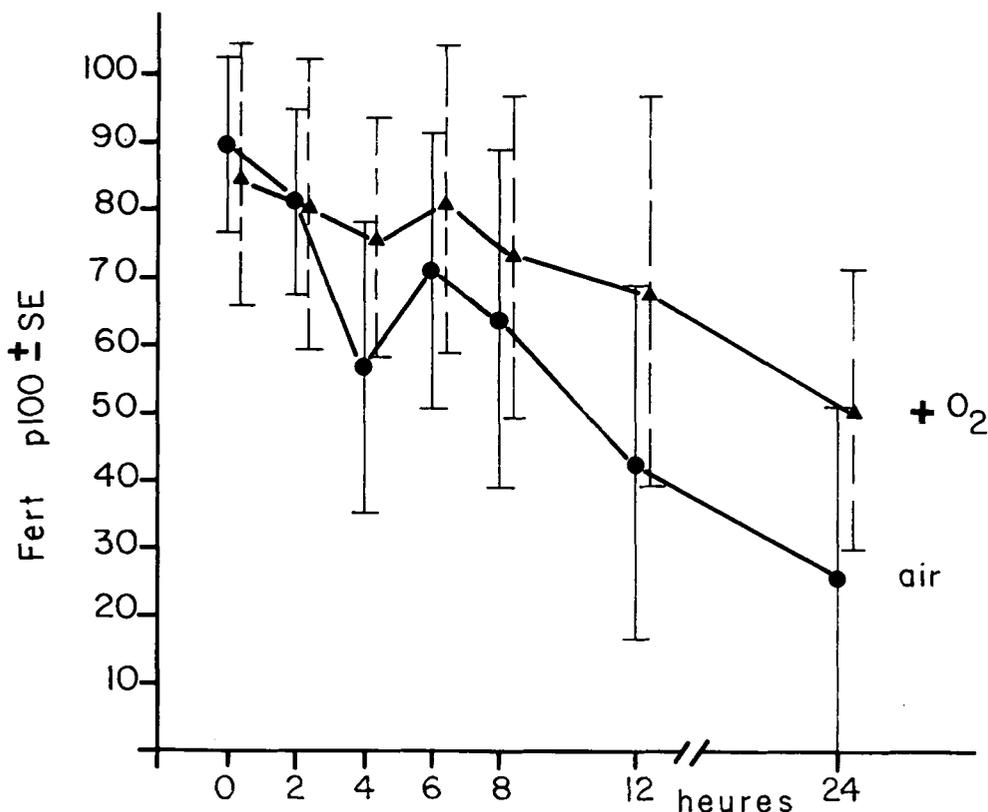


Figure 1 : Evolution du pouvoir fécondant en fonction de la durée de stockage (à 9°C) pour du sperme laissé à l'air et du sperme maintenu sous oxygène (+ O₂).

La teneur en O₂ du sperme augmente légèrement au cours de la période expérimentale dans le flacon sous O₂ et s'effondre brusquement entre 4 et 6 h dans le flacon sans air (fig. 2). Les pourcentages de fécondation n'étant significativement différents qu'au-delà de 8 h de conservation, il apparaît que les spermatozoïdes peuvent supporter une anoxie partielle (ici de l'ordre de 3 ppm) durant une période de quelques heures, après quoi leur pouvoir fécondant s'effondre et n'autorise plus qu'environ la moitié des performances du sperme oxygéné.

La fertilité des ovules conservés sous oxygène ou dans le liquide coelomique diminue significativement ($P < 0,05$) au cours d'une période de conservation de 3 jours (fig. 3). Quel que soit le mode de stockage la chute de fertilité est importante (15 et 20 %) au cours des douze premières heures. Ensuite la décroissance est légèrement plus rapide dans le cas de conservation dans le liquide coelomique que sous oxygène mais les différences entre les deux modes de conservation ne sont significatives qu'à 48 h ($P < 0,005$).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Du sperme de truite arc-en-ciel maintenu sous atmosphère de O₂ conserve mieux son pouvoir fécondant que le sperme témoin laissé simplement à l'air. La fertilité initiale du sperme ne se maintient que quelques heures (6 h) et décroît notablement ensuite. La durée de conservation *in vitro* du sperme reste donc relativement brève même sous O₂,

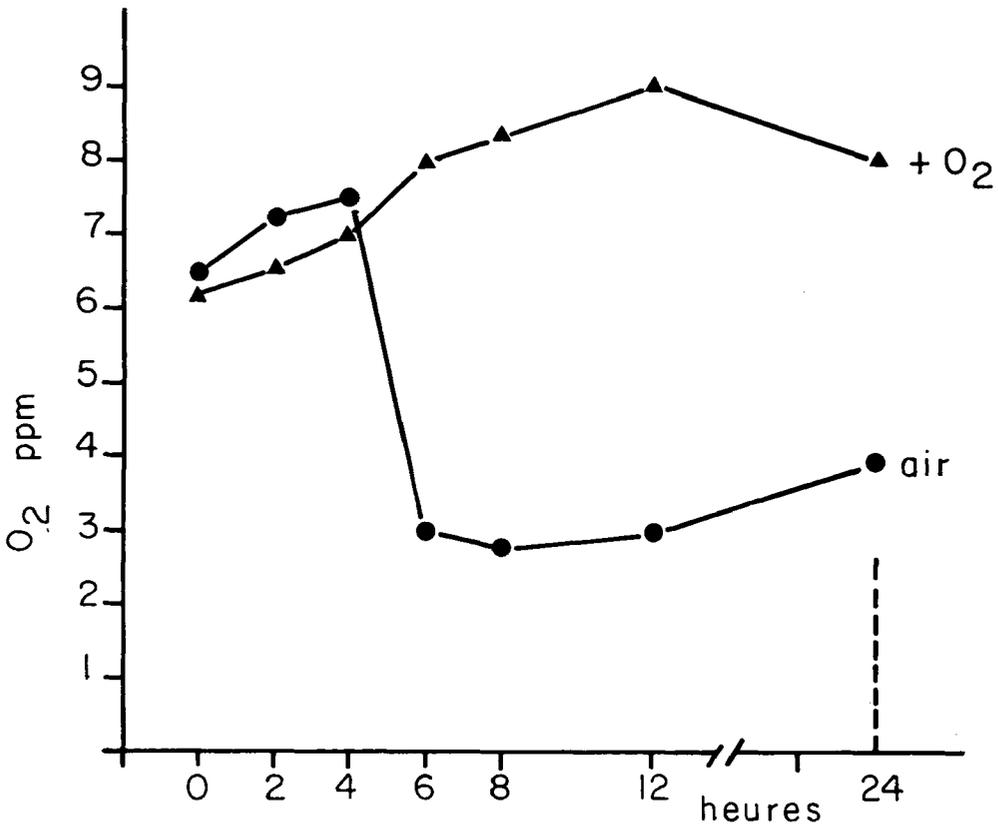


Figure 2: Evolution de la teneur en oxygène au niveau des spermés témoins (air) et stockés en présence d'oxygène (+ O₂) en fonction de la durée de conservation.

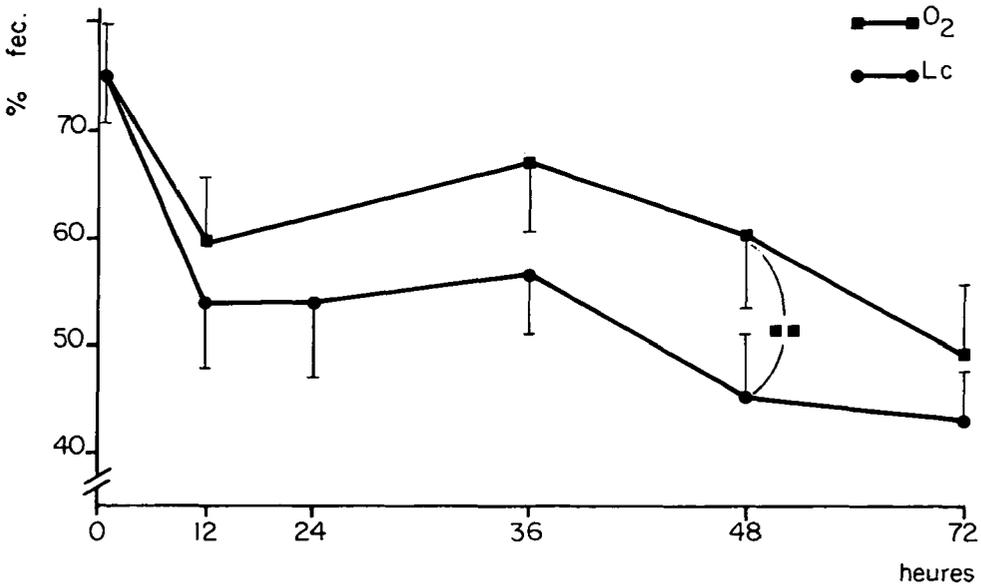


Figure 3: Evolution de l'aptitude à la conservation d'ovules maintenus à 4° C en sachets plastiques sous oxygène (O₂) ou dans du liquide cœlomique (LC) ■ ■ P < 0,005

plus brève que celles généralement rapportées dans la littérature où les durées de survie sont toujours exprimées en jours. Cependant BILLARD (1978) rapporte des durées de conservation (maintien du pouvoir fécondant initial) de 7 heures. Les données de la présente expérience et celles rapportées dans BILLARD (1978) sont concordantes. Elles ont été obtenues sur des ovules provenant de femelles prélevées individuellement par aliquotes durant la période expérimentale. On sait que pendant une telle période (24 h) la fertilité des ovules se maintient parfaitement dans la cavité générale de la femelle (ESCAFFRE *et al.*, 1977, ESCAFFRE et BILLARD, 1979) de sorte que les décroissances dans le pourcentage d'œufs embryonnés ne sont imputables qu'au facteur spermatozoïde. Ces différences peuvent aussi être dues au facteur température; WITHLER et MORLEY (1968) ont déjà montré que la durée de conservation était nettement plus longue à 3 qu'à 9°C tandis que STOSS *et al.* (1978) signalent que la température de 20°C est très défavorable à la conservation du sperme; MATEI *et al.* (1980) en conditions *in vitro* et à 4°C conservent intégralement le pouvoir fécondant du sperme de truite arc-en-ciel pendant près de 2 jours. Dans la présente expérience la conservation est pratiquée à 9°C, température qui n'autoriserait pas des survies prolongées. La présence d'O₂ ne provoque donc pas d'amélioration très spectaculaire mais il est possible que le sperme ait été maintenu en couche trop épaisse (1.5 cm) pour autoriser des échanges gazeux suffisants dans toute la masse de spermatozoïdes. La rapide perte du pouvoir fécondant identifiée dans cette expérience peut aussi être due au taux de dilution élevé pratiqué lors de l'insémination (10⁻³). Se plaçant ainsi en condition limite il est possible de déceler des changements que des taux de dilution plus faibles (ce qui est généralement le cas dans la plupart des expériences rapportées dans la littérature) n'auraient pas permis de mettre en évidence. On sait en effet que des pertes de fertilité dues au vieillissement peuvent être compensées en augmentant la quantité de spermatozoïdes mis en œuvre lors de l'insémination (CARPENTIER et BILLARD, 1978). Il en est de même après congélation où il faut 10 fois plus de sperme décongelé (dilution 10⁻²) pour retrouver un taux de fertilité analogue à celui obtenu avec du sperme frais (dilution 10⁻³) (LEGENDRE et BILLARD, 1980).

En conclusion des phénomènes de vieillissement interviennent très rapidement après conservation *in vitro* du sperme à 9°C. La proposition de départ qui visait à simplifier les opérations d'insémination artificielle en manipulant d'abord les mâles et en stockant le sperme pendant le reste de la journée n'est justifiable que si l'opération porte sur une demi-journée. Cependant, compte tenu de la diminution de la qualité du sperme en fin de période de spermiation, il est probable que la chute du pouvoir fécondant du sperme soit à ce moment plus rapide et qu'on soit en présence de durée de conservation plus brève. La technique proposée ne peut donc l'être pour l'instant qu'en début de période de spermiation. Il reste à tester si une conservation à une température plus basse (à 4°C au réfrigérateur ce qui constitue une technique facilement applicable en pisciculture) améliore sensiblement la durée de conservation du sperme.

Comme dans le cas du sperme, la conservation des ovules sous atmosphère d'azote semble ralentir et différer légèrement la chute de fécondabilité qui se produit au cours du stockage dans le liquide coelomique. La mise sous oxygène n'a pas permis de supprimer la forte chute de fertilité observée après 12 heures. L'emploi de ce mode de conservation est donc d'un usage limité mais peut se révéler utile en cas de stockage ou de transport portant sur quelques jours. Il pourrait utilement être combiné avec un abaissement de température (conservation dans de la glace) car, comme pour le sperme, la durée de conservation des ovules est notablement prolongée aux températures voisines de 0°C (GINSBURG, 1968 pour revue).

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat Conseil Supérieur de la Pêche — I.N.R.A. La présentation dactylographique est due à Madame C. CLAPPIER. L'élevage des animaux et l'entretien des équipements ont été assurés par MM. LEVILAIN et LE BRENN.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BILLARD R., 1976. Effet de l'agitation des ovules et des œufs de truite arc-en-ciel sur la fécondabilité et le début du développement embryonnaire. *Bull. Fr. Pisc.*, 262, 5-11.
- BILLARD R., 1977. A new technique of artificial insemination for salmonids using a sperm diluent. *Fisheries*, 1, 24-25.

- BILLARD R., 1978. Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. *Actes de colloques du CNEXO*, 8, 59-73.
- BILLARD R., 1981. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 23, 287-293.
- BUTCHER A.D., 1944. Preliminary observations on the storage of milt of milt of trout. *Aust. J. Sci.*, 7, 23-25.
- CARPENTIER P., BILLARD R., 1978. Conservation à court terme des gamètes de salmonidés à des températures voisines de 0° C. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 18, 1083-1088.
- ESCAFFRE A.M., PETIT J., BILLARD R., 1977. Evolution de la quantité d'ovules récoltés et conservation de leur aptitude à être fécondés au cours de la période post-ovulatoire chez la truite arc-en-ciel. *Bull. Fr. Pisc.*, 265, 134-142.
- ESCAFFRE A.M., BILLARD R., 1979. Evolution de la fécondabilité des ovules de truite arc-en-ciel, *Salmo gairdneri*, laissés dans la cavité abdominale au cours de la période post-ovulatoire. *Bull. Fr. Pisc.* 272, 57-70.
- GINSBURG A.S., 1968. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. *Publishing House "Nauka"*, 351 p.
- HENNEGUY L.F., 1877. Recherches sur la vitalité des spermatozoïdes de la truite. *C.R. Acad. Sci.*, 23, 1333-1335.
- HIROI O., 1978. Studies on the retention of gametes of salmonids. III - Change in fry liberation rate of stored chum salmon eggs inseminated with sperm preserved in the same conditions. *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery*, N° 32, 19-26.
- LEGENDRE M., BILLARD R., 1980. Cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). *Bull. Fr. Pisc.*, 278, 11-33.
- MATEI D., MARCEL J., BILLARD R., 1980. Survie des gamètes en conditions *in vitro* et *post mortem* chez la truite arc-en-ciel. *Bull. Acad. Sci. Agr. For.*, 10, 211-218.
- SANCHEZ-RODRIGUEZ M., BILLARD R., 1977. Conservation de la motilité et du pouvoir fécondant du sperme de truite arc-en-ciel maintenu à des températures voisines de 0° C. *Bull. Fr. Pisc.*, 265, 144-152.
- SCHEURING L., 1928. Weitere biologische und physiologische untersuchungen am Salmoniden sperme. *Zool. Jahrb. (Allg. Zool.)*, 43, 651-706.
- STOSS J., BUYUKHATIPOGLU S., HOLTZ W., 1978. Short term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 18, 1077-1082.
- TAKANO K., HIROI O., YASUKAWA M., SHETAKE T., 1973. Studies on the retention of gametes of salmonid fishes. I - On the fertility of chum salmon eggs after storage. *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery*, 27, 31-37.
- TRUSCOTT B., IDLER D.R., HOYLE R.J., FREEMAN H.C., 1968. Sub-zero preservation of atlantic salmon sperm. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 25, 363-372.
- WITHLER F.C., MORLEY R.B., 1968. Effects of chilled storage on viability of stored ova and sperm of sockeye and pink salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 25, 2695-2699.