



**HAL**  
open science

# Mise en évidence de quelques enzymes dans le sperme de la carpe (*Cyprinus carpio* L.) et de la truite (*Salmo gairdnerii* Richardson) et dans le liquide coélomique de la truite

Bernard Breton, Yves Menezo, Roland Billard

## ► To cite this version:

Bernard Breton, Yves Menezo, Roland Billard. Mise en évidence de quelques enzymes dans le sperme de la carpe (*Cyprinus carpio* L.) et de la truite (*Salmo gairdnerii* Richardson) et dans le liquide coélomique de la truite. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D, Sciences naturelles*, 1974, 278, pp.1285-1288. hal-01600220

**HAL Id: hal-01600220**

**<https://hal.science/hal-01600220>**

Submitted on 2 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ENZYMOLOGIE. — *Mise en évidence de quelques enzymes dans le sperme de la Carpe (Cyprinus carpio L.) et de la Truite (Salmo gairdnerii Richardson) et dans le liquide cœlomique de la Truite.* Note (\*) de MM. Bernard Breton, Yves Menezo et Roland Billard, présentée par M. Maurice Fontaine.

L'utilisation de la méthode Auxotab a permis la mise en évidence semi-quantitative de 16 enzymes dans les spermes de la Carpe et de la Truite, ainsi que dans le liquide cœlomique de la Truite. Il existe des différences d'équipement enzymatique sensibles entre le sperme total, le liquide séminal et les spermatozoïdes isolés ; elles portent essentiellement sur les phosphatases. Deux liquides cœlomiques dont l'activité biologique sur l'ovulation *in vitro* était connue, ont pu être différenciés par l'apparition d'une activité trypsique.

Les études sur l'équipement enzymatique du sperme de Poisson sont peu nombreuses et n'ont porté jusqu'ici que sur un petit nombre d'enzymes parmi lesquelles l'ATPase (1). Une étude plus complète du zymogramme, outre l'intérêt qu'elle présente pour une meilleure compréhension du métabolisme général du spermatozoïde, peut aussi apporter un critère d'appréciation de la qualité du sperme éventuellement intéressant pour la pratique de l'insémination artificielle. Une analyse semi-quantitative a été réalisée sur 16 enzymes du sperme de la Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii* Richardson) et de la Carpe (*Cyprinus carpio* L.) ainsi que du liquide cœlomique de la Truite arc-en-ciel qui baigne les ovocytes après ovulation. L'étude du sperme de la Truite a porté sur le sperme total, le liquide séminal et les spermatozoïdes isolés après centrifugation du sperme 5 mn à 1 000 tr/mn. Chez la Carpe seul le sperme total a été étudié.

MÉTHODE. — Les déterminations enzymatiques ont été réalisées selon le procédé Buissière (zymochrome) (2). Ce procédé, imaginé en vue de la détermination de l'équipement enzymatique des micro-organismes, a été adapté à celui du zymogramme des broyats tissulaires (3) et des liquides physiologiques (4).

L'échantillon à analyser est dilué dans une solution tampon convenable selon l'enzyme à déterminer. Afin d'éviter leur mise en mouvement les spermatozoïdes sont lavés dans une solution riche en potassium (5,9 mEq/litre), inhibant leur motilité. Le principe de la technique précédemment décrite consiste à incuber les liquides ou les spermatozoïdes en présence d'un substrat chromogène spécifique de chaque enzyme. Ce substrat imprègne une feuille d'un papier spécial sertie entre deux feuilles plastiques dont l'une est transparente. Les deux feuilles délimitent des capillaires qui jouent le rôle de chambres réactionnelles.

L'incubation a été réalisée à deux températures différentes : 15 et 37 °C pendant 2 h. Le résultat de la réaction enzymatique est estimé visuellement par observation de la coloration développée après révélation par le réactif approprié. Trois niveaux sont établis d'après l'intensité de la coloration. Un essai témoin est effectué rendant compte de l'autohydrolyse éventuelle de certains substrats. La liste de ces substrats et des enzymes correspondant est donnée par le tableau. Il s'agit de produits « K et K », et « Calbiochem ».

RÉSULTATS. — Le tableau résume les résultats obtenus après analyse de plusieurs échantillons de sperme total ou fractionné. Il n'a jamais été trouvé d'activité galactosidasique.

*Sperme de Carpe.* — Il est caractérisé par une activité phosphatasique intense. Cette même intensité réactionnelle est retrouvée pour les deux types d'estérases. Les lipases et les aminopeptidases sont également présentes en quantité importante. Par contre, il n'a pas été possible de mettre en évidence d'activité tryptique, alors qu'il existe une faible activité chymotryptique. Les activités osidasiques sont inexistantes, une faible activité glucuronidase a pu être détectée.

*Sperme total de Truite.* — Ce zymogramme diffère du précédent par l'apparition d'une activité glucosidase et la disparition de la lipase stéarate. Toutes les autres enzymes mises en évidence dans le sperme de Carpe sont présentes avec cependant une baisse sensible du niveau d'activité des phosphatases.

*Liquide séminal de Truite.* — On constate une disparition presque totale des activités phosphatasiques. Seule subsiste une faible réaction avec les phosphatases aspécifiques. La  $\beta$ -glucosidase disparaît également. Les autres caractéristiques du zymogramme varient peu.

*Spermatozoïdes de Truite.* — Dans ce cas on observe un renforcement global de toutes les activités phosphatasiques, supérieures la plupart du temps, à celles observées dans l'éjaculat total. Parmi les autres composants du zymogramme, les osidasés, les estérases et les lipases montrent aussi une augmentation de leurs activités. Les aminopeptidases restent stables, l'activité de type chymotryptique disparaît.

*Liquide cœlomique.* — Deux types de liquides cœlomiques ont été utilisés. L'un (8238) présente une activité ovulante intense<sup>(5)</sup> sur des ovocytes de truites incubés *in vitro* au stade de la vésicule germinative périphérique, l'autre (8241) s'était avéré inactif sur le même phénomène.

Dans leur ensemble, ils sont caractérisés par une faible activité phosphatasique, l'absence totale d'osidasés, la présence d'estérase et de lipase nonanoate et celle d'aminopeptidase et de chymotryptine.

Par contre, le liquide cœlomique 8238 se différencie du 8241 par des activités aminopeptidasiques et chymotryptique plus importantes et surtout par l'apparition de trypsine. Les résultats obtenus par incubation à 15 °C ne diffèrent pas de ceux enregistrés à 37 °C.

DISCUSSION. — La trypsine qui est mise en évidence dans le spermatozoïde de mammifère par cette même méthode<sup>(6)</sup> n'apparaît pas dans les spermatozoïdes de la Carpe et de la Truite chez lesquels il n'y a pas d'acroosome<sup>(7)</sup>. Il se confirme que cette enzyme acrosomienne typique n'existe pas sous des formes diffuses.

La disparition de l'activité chymotryptique dans les spermatozoïdes isolés, montre que cette enzyme est liée au liquide séminal. Ce résultat va dans le même sens que le précédent.

TABLEAU

*Activités enzymatiques révélées par la méthode Auxotab dans le sperme de Carpe et dans le liquide célomique de Truite*

Enzyme	Substrat	Sperme total		Liquide séminal	Spermatozoïde		Liquide célomique	
		Carpe	Truite		Truite	Truite	8238	8241
Phosphatase alcaline (1), pH 7,6	Phénol phtaléine diphosphate	3	2	0	3	0	0	0
Phosphatase non spécifique (2)	$\beta$ naphthyl phosphate	3	2	1	3	2	2	1
Estérase acétate (2)	$\beta$ naphthyl acétate	3	3	2	3	2	2	2
Estérase butyrate (2)	$\beta$ naphthyl butyrate	3	2	2	3	2	2	2
Lipase nonanoate (2)	$\beta$ naphthyl nonanoate	2	2	1	3	1	1	1
Lipase stéarate (2)	$\beta$ naphthyl stéarate	1	0	0	0	0	0	0
Alanyl aminopeptidase (2)	DL alanyl $\beta$ naphthylamide	2	3	3	3	2	2	2
Leucyl aminopeptidase (2)	L leucyl $\beta$ naphthylamide	2	3	2	2	3	1	1
Valine aminopeptidase (2)	Valine $\beta$ naphthylamide	1	2	1	1	2	2	2
Trypsine (2)	N benzoyl DL arginine $\beta$ naphthylamide	0	0	0	0	1	0	0
Chymotrypsine (2)	N benzoyl DL phenylalanine $\beta$ naphthylamide	1	1	1	0	2	1	1
Phosphatase acide (1), pH 5,4	Phénolphtaléine diphosphate	2	2	0	2	0	0	0
Glucosaminidase (2)	Naphtol ASBI N acétyl $\beta$ D glucosaminide	0	1	2	1	0	0	0
Glucuronidase (2)	Naphtol AS glucuronide	1	1	1	2	0	0	0
$\beta$ glucosidase (2)	$\beta$ bromo 2 naphtol $\alpha$ glucopyranoside	0	1	0	2	0	0	0
Galactosidase (2)	Nitrophenyl galactopyranoside	0	0	0	0	0	0	0

5 L° (1) Révélation par la phénolphtaléine.

(2) Révélation par le naphtol.

0 : réaction négative ; 1 : réaction faible positive ; 2 : réaction positive ; 3 : réaction fortement positive.

Il est également intéressant de constater que les enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique (phosphatases, lipases ou osidases) ont une activité accrue dans des spermatozoïdes isolés. La plus grande partie de ces enzymes serait donc liée aux spermatozoïdes et impliquée dans leur métabolisme propre, alors que la part plus faible contenue dans le plasma séminal pourrait fournir aux spermatozoïdes des métabolites plus directement assimilables lors de leur stockage testiculaire, lequel peut se prolonger plusieurs mois.

Dans les spermatozoïdes isolés, on constate aussi une augmentation importante des activités phosphatâsiques, qui pourrait avoir une signification dans l'explication de l'hydratation testiculaire avant spermiation, les phosphatases étant étroitement impliquées dans les variations de perméabilité membranaire. Ces mêmes enzymes sont plus actives dans le sperme de la Carpe que dans celui de la Truite ce qui laisserait supposer leur intervention dans des processus énergétiques puisque la durée de motilité des spermatozoïdes de Carpe est beaucoup plus longue que celle des spermatozoïdes de Truite.

Contrairement au liquide séminal, le liquide cœlomique ne contient que peu de lipases, pas d'osidase et pas de phosphatase spécifique.

Il est surtout important de noter les différences qui existent entre les deux types de liquides cœlomiques analysés. Le premier est caractérisé par des activités aminopeptidasique et chymotrypsique élevées et surtout par l'apparition d'une activité trypsique. Par incubation *in vitro* [(<sup>5</sup>), (<sup>8</sup>)], il a été démontré que ce liquide cœlomique pouvait entraîner l'ovulation d'œuf de Truite sans maturation préalable. Ces enzymes protéolytiques pourraient intervenir, entre autres, dans le décollement de la membrane du follicule avant l'ovulation.

(\*) Séance du 28 janvier 1974.

(1) J. TIBBS, *Biochem. Biophys. Acta*, 33, 1959, p. 220.

(2) J. BUISSIÈRE, A. FOURCARD et L. COLOBERT, *Comptes rendus*, 264, Série D, 1967, p. 415.

(3) Y. MENEZO et P. LAVIOLETTE, *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 12, 1972, p. 383.

(4) P. NARDON et G. PLANTEVIN, *Comptes rendus*, 271, Série D, 1970, p. 2137.

(5) B. JALABERT, C. BRY, D. SZOLLOZI et A. FOSTIER, *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 13, 1973, hors série, p. 59.

(6) Y. MENEZO et J.-E. FLÉCHON, *Comptes rendus*, 277, Série D, 1973, p. 1037.

(7) R. BILLARD, *Quaderno*, Bacetti, 137, 1969, p. 71.

(8) B. JALABERT, C. BRY et B. BRETON, *Comptes rendus*, 275, Série D, 1972, p. 1139.

B. B., R. B., *Laboratoire de Physiologie des Poissons, INRA.*  
CNRZ, 78350 Jouy-en-Josas ;

Y. M., *Laboratoire de Biologie, INSA, 69-Villeurbanne.*