



**HAL**  
open science

# Vieillessement des ovules et potentialisation par la température des effets des micropolluants du milieu aqueux sur les gamètes chez la truite

Roland Billard, Bernard Breton

## ► To cite this version:

Roland Billard, Bernard Breton. Vieillessement des ovules et potentialisation par la température des effets des micropolluants du milieu aqueux sur les gamètes chez la truite. Cahiers du Laboratoire d'Hydrobiologie de Montereau, 1981, 12, pp.35-42. hal-01600233

**HAL Id: hal-01600233**

**<https://hal.science/hal-01600233>**

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

# Vieillessement des ovules et potentialisation par la température des effets des micropolluants du milieu aqueux sur les gamètes chez la truite

## *Ageing of eggs and temperature potentialization of micropollutant effects of the aquatic medium on trout gametes*

R. Billard, C. Gillet \*

### Introduction

Toutes les espèces de poissons vivant dans les cours d'eau tempérés possèdent un mode de fécondation externe. Les gamètes sont émis dans le milieu aquatique où se déroule la fécondation. Cette phase haploïde du cycle est extrêmement brève, de quelques secondes à quelques minutes. Mais durant ce court laps de temps, les gamètes libérés dans le milieu externe peuvent être soumis à des agressions de toutes natures. Ces cellules sont très sensibles et elles peuvent être endommagées par des niveaux de pollution inoffensifs pour l'organisme diploïde. Il importe donc de bien connaître la sensibilité de ces gamètes aux variations des facteurs de l'environnement et aux divers agents polluants.

Nous avons étudié le vieillissement des ovules de la Truite arc-en-ciel et de la Truite fario à différentes températures (expérience I), ainsi que l'action de micropolluants : un pesticide organo-chloré, le Lindane et le PCB (Pyralène) sur les gamètes de la Truite arc-en-ciel et de la Truite fario à différentes températures (expérience II) afin de tester une éventuelle potentialisation des effets de ces polluants par la température.

### Expérience I

#### *Matériel et méthode*

#### *A) Truite arc-en-ciel (Salmo gairdneri)*

Des femelles de Truite arc-en-ciel, pesant 800 g environ prises en fin de vitellogenèse, reçoivent une injection de 17  $\alpha$ -hydroxy 20  $\beta$  hydroprogestérone (3 mg/kg) dans le but de synchroniser la ponte. 48 heures après l'o-

vulation, une partie des ovules est prélevée pour l'expérimentation *in vitro* et les animaux sont répartis en 2 lots de 5 individus. L'un est maintenu dans l'eau de la pisciculture à 10°C, l'autre acclimaté en quelques heures à 19°C.

#### *Expérience de vieillissement in vivo*

Au cours des 5 jours qui suivent l'adaptation des femelles aux températures expérimentales, des prélèvements de 200 ovules sont effectués sur chacune des femelles des 2 lots 3, 10, 24, 52, et 108 h après le début de l'expérience. Les ovules sont inséminés immédiatement après le prélèvement.

#### *Expérience de vieillissement in vitro*

Les ovules sont prélevés puis conservés *in vitro*, dans du liquide coelomique, à trois températures ; 1, 10 et 19°C. Périodiquement environ 200 de ces ovules sont prélevés et inséminés (3, 10, 24, 52 et 108 heures après le début de l'expérience).

La technique d'insémination artificielle avec dilueur est utilisée et se pratique sous abri. 5 mâles sont isolés en début d'expérience et un isovolume de sperme est prélevé, sur chacun d'entre eux juste avant l'insémination, mélangé puis employé à la concentration de  $2 \cdot 10^{-3}$  pour la fécondation. Les œufs sont ensuite incubés à 12°C pendant 10 jours (120 degrés jours). Ces œufs embryonnés sont alors dénombrés après clarification au liquide de Stokard, ce qui permet d'estimer le taux de fécondation. Afin de faciliter la lecture des résultats, les pourcentages de fécondation seront dans certains cas, non pas exprimés en fonction du temps, mais du nombre de degrés-jours (nombre de jours  $\times$  °C).

#### *B) Truite fario (Salmo trutta)*

4 femelles de Truite fario, provenant de la pisciculture de Moulin du Bois et arrivées ovulées au laboratoire,

\* Laboratoire de Physiologie des Poissons, I.N.R.A., 78350 Jouy en Josas, France

sont choisies pour cette expérience. Deux animaux sont maintenus à 10°C et 2 autres acclimatés à 15°C. en raison des exigences thermiques plus strictes de la Truite fario. Le protocole expérimental est le même que pour la Truite arc-en-ciel.

### Résultats

#### A) Vieillessement des ovules de la Truite arc-en-ciel

*In vivo*, à 10°C, la fécondabilité des ovules de la Truite arc-en-ciel, se maintient au voisinage de 90 % durant 3 jours. Le 5<sup>e</sup> jour, la survie des ovules diminue légèrement mais significativement ( $P < 0,01$ ). A 19°C, la perte de fécondabilité des ovules apparaît dès le 2<sup>e</sup> jour. La survie des ovules est pratiquement nulle au 6<sup>e</sup> jour ( $P < 0,01$ ) (Fig. 1).

*In vitro*, la survie des ovules demeure élevée durant toute la durée de l'expérimentation à 1°C, bien que la fécondabilité le 5<sup>e</sup> jour, soit significativement plus faible qu'au début ( $P < 0,01$ ). A 10°C tous les ovules ont perdu leur fécondabilité, après 2 jours. A 19°C, cette perte apparaît après 24 heures de conservation *in vitro*. (Fig. 1).

Les résultats, exprimés en degrés-jours, pour les températures de 10 et 19°C sont rapportés sur la figure 2, et montrent que *in vivo* et *in vitro*, l'évolution de la survie des ovules est la même à 10 et 19°C,

#### B) Vieillessement des ovules de la Truite fario

*In vivo*, la fécondabilité des ovules ne varie pas pendant toute la durée de l'expérience à 10°C, mais diminue dès le 1<sup>er</sup> jour de l'expérience à 15°C (Fig. 3).

*In vitro*, la fécondabilité des ovules décroît significativement aux trois températures testées. Mais la perte

de fécondabilité intervient d'autant plus précocement que la température est élevée (Fig. 3).

Les résultats exprimés en degrés-jours pour les températures de 10 à 15°C sont rapportés sur la figure 4. L'évolution de l'aptitude à la fécondation des ovules conservés *in vivo* reste très différente à 10 et 15°C pour un même nombre de degrés-jours. *In vitro*, les différences sont moins marquées.

## Expérience II

### Matériel et méthode

A deux températures expérimentales (10 et 20°C), des gamètes de Truite sont exposés à différentes concentrations de Lindane et de Pyralène introduits dans le dilueur d'insémination artificielle, -D532- (Billard, 1977). Le Lindane (à 0,25 ; 2,5 ; 26 ppm) utilisé à l'état purifié, est dilué dans l'acétone (500 ppm) avant d'être incorporé au dilueur. Les polychlorobiphényles représentés par le Pyralène 3010 sont dilués dans l'éthanol avant incorporation (concentration finale en éthanol dans le dilueur : 20 %). Les détails de la procédure ont été précédemment décrits pour le Pyralène (Billard *et al.*, 1978). Les ovules sont exposés par lots d'environ 200, pendant 20 et 40 minutes dans le D532 contenant le micropolluant, puis sont rincés avec du dilueur frais.

L'insémination est immédiatement pratiquée avec un mélange de sperme provenant de 5 mâles prélevés extemporanément. Le sperme est exposé aux micropolluants dans un dilueur enrichi en  $K^+$  (milieu minéral de liquide séminal MMLS, Billard et Jalabert (1974) ; Sanchez-Rodriguez et Billard (1977)), dans lequel les spermatozoïdes n'entrent pas en mouvement. La durée de

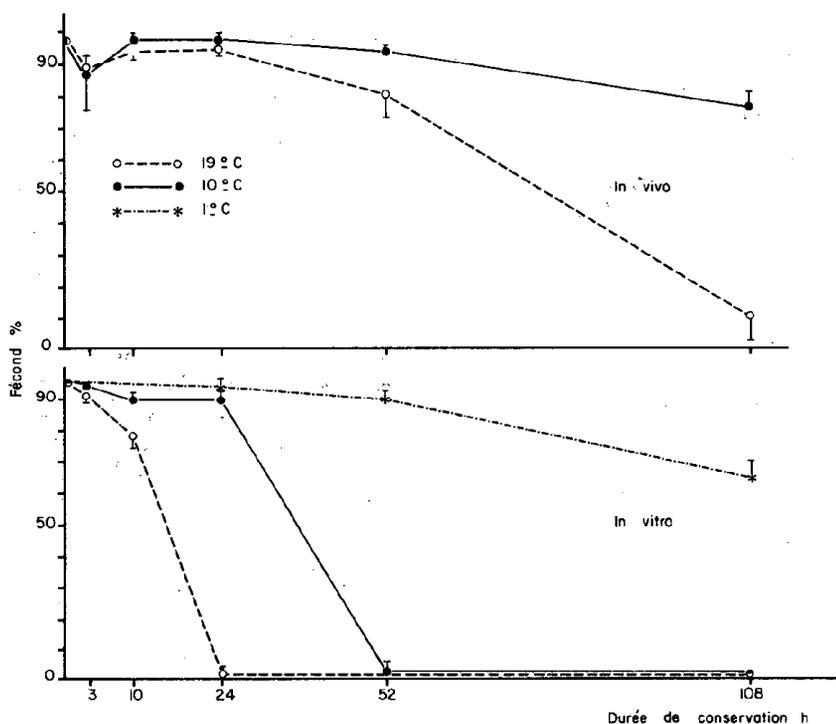


Figure 1 - Evolution du pourcentage de fécondation (appréciée à 100 degrés-jour) d'ovules de truite arc-en-ciel conservés *in vivo* à 10 et 19°C et *in vitro* à 1,10 et 19°C.

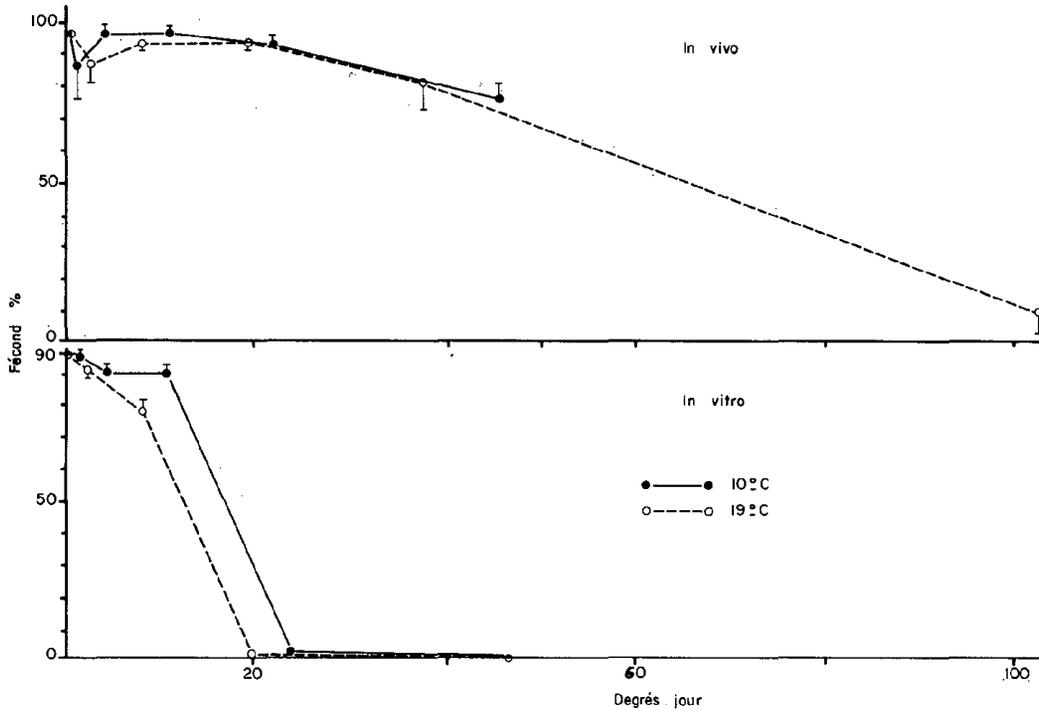


Figure 2 – Données de la figure 1 exprimées pour un même nombre de degrés-jour aux températures de 10 et 19°C.

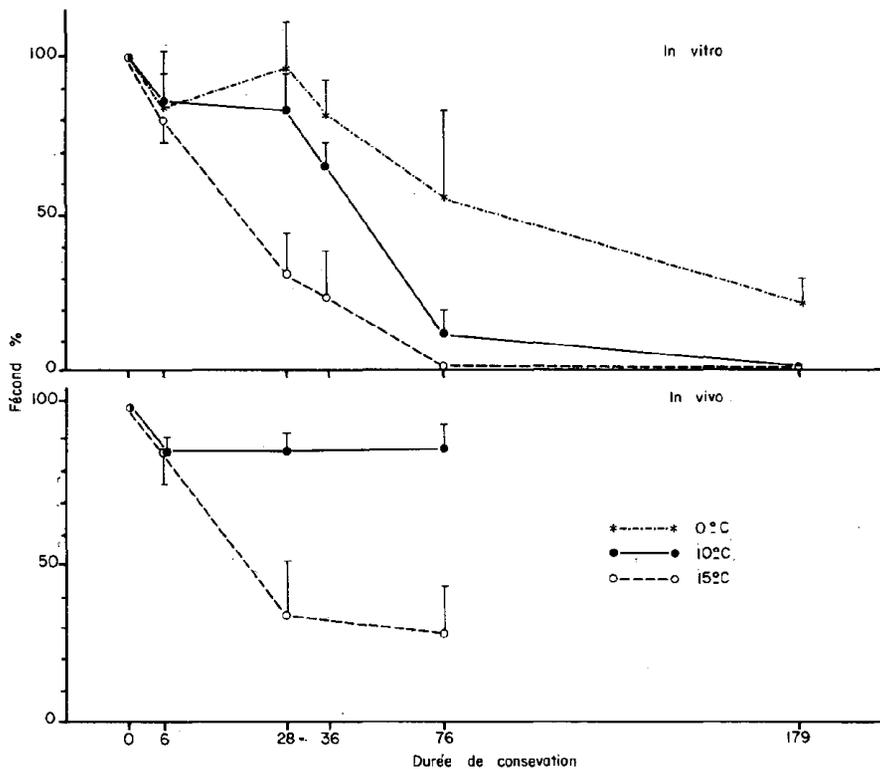


Figure 3 – Evolution du pourcentage de fécondation d'ovules de truite fario conservés *in vivo* à 10 et 15°C et *in vitro* à 0, 10, 15°C.

contact est comme dans le cas précédent de 20, 40 ou 60 mn.

L'insémination est ensuite pratiquée comme précédemment en ajoutant du D. 532, ce qui a pour effet de diminuer la concentration des ions potassium du milieu et de mettre en mouvement les spermatozoïdes. Dans certains cas, les spermatozoïdes sont dilués directement dans le D. 532 contenant le micropolluant et après

un temps de contact de 0,5, 1, et 3 mn, on procède à l'insémination (dilution du sperme  $10^{-3}$ ). Toutes les opérations de prélèvements et d'exposition sont pratiquées sous abri, en lumière atténuée. Après la fécondation, les œufs sont incubés à 11°C puis le pourcentage de fécondation est déterminé d'après le nombre d'embryons à 100 degrés-jours.

Résultats

A) Effets du Lindane sur la fécondabilité des gamètes.

— Truite arc-en-ciel : A 10°C, ni l'acétone, ni le Lindane ne diminuent la fécondabilité des ovules, quelle que soit la durée d'exposition (Fig. 5). A 20°C, la fécondabilité des ovules est significativement diminuée dans

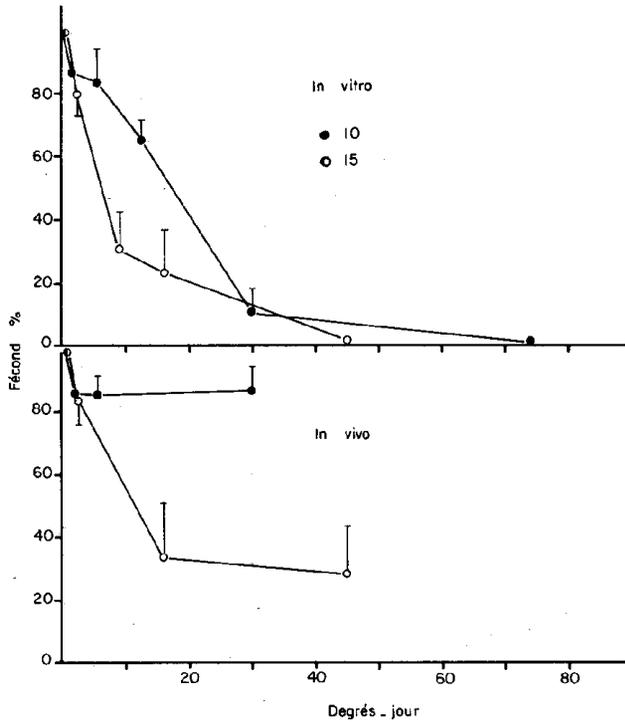


Figure 4 - Données de la figure 3 exprimées pour un même nombre de degrés-jour aux températures de 10 et 15°C.

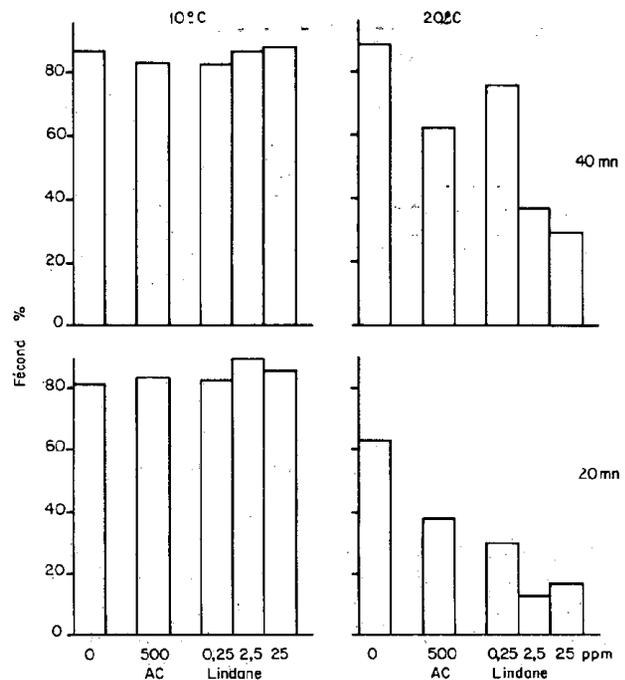


Figure 5 - Effets de doses croissantes de lindane sur la fécondabilité des ovules de truite arc-en-ciel après des durées de mise en contact dans le dilueur de 20 et 40 mn A 10 et 20°C.

les milieux contenant l'acétone (P < 0,01) et le Lindane (P < 0,01) par rapport au témoin contenant l'acétone, après 20 et 40 minutes d'exposition. Après 60 minutes, les effets de la température deviennent plus importants que ceux du Lindane (Fig. 6).

A 10°C, la conservation du pouvoir fécondant du sperme est toujours la même quelle que soit la concentration du milieu de dilution (Fig. 7). A 20°C, le pouvoir fécondant du sperme chute significativement (P < 0,01) avec l'adjonction d'acétone et de Lindane (0,25 ppm) au MMLS. Les doses de Lindane les plus élevées (2,5 et 25 ppm) n'altèrent pas la survie des ovules.

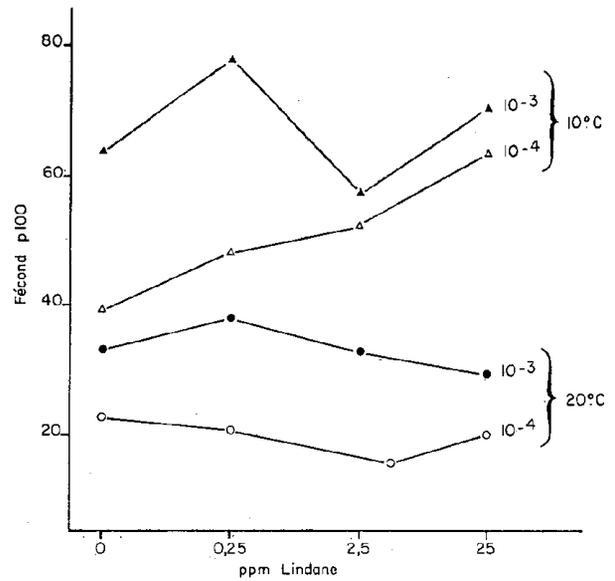


Figure 6 - Effets du lindane sur la fécondabilité des ovules de truite arc-en-ciel après mise en contact de 60 mn. Dans la dose 0 seul le solvant (acétone 500 ppm) est présent.

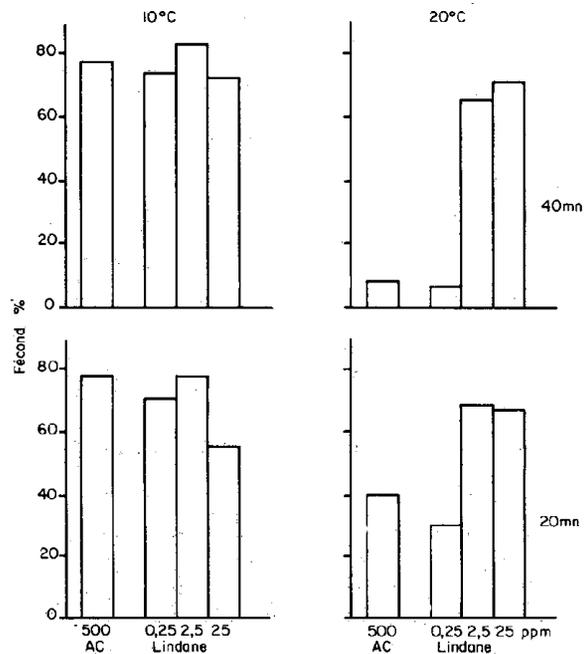


Figure 7 - Evolution du pouvoir fécondant des spermatozoïdes de truite arc-en-ciel maintenus immobilisés après mise en présence de doses croissantes de lindane incorporé dans le MMLS.

— Truite fario : Les tests effectués sur des gamètes de Truite fario (Fig. 8) font apparaître des résultats similaires avec cependant des chutes de fertilité qui interviennent après 40 mn d'exposition. A 10°C le traitement au Lindane n'affecte pas significativement la survie des ovules et du sperme. A 20°C le traitement au Lindane diminue significativement la fertilité des ovules ( $P < 0,05$ ), alors que le traitement témoin n'a pas d'effet.

*b) Effets du Pyralène sur les gamètes de Truite arc-en-ciel.*

A 10°C, le pouvoir fécondant du sperme ne varie pas significativement quelle que soit la dose après 20 mn d'exposition et à la dilution au 1/1000 (Fig. 9). Par contre, à 20°C la diminution est importante même sur les lots témoins. Après 40 mn de contact avec le Pyralène, la diminution du pouvoir fécondant reste très importante à 20°C pour toutes les doses, y compris les témoins, et devient significative à 10°C pour la plus forte concentration (400 ppb). Aux dilutions plus élevées (1/10000) les résultats sont similaires.

Dans une autre expérience (Fig. 10) où la durée d'exposition a porté sur 60 mn, le pouvoir fécondant n'est bien conservé qu'à 10°C, et ne diminue ( $P < 0,01$ ) qu'à la dose de 400 ppb et pour la plus forte dilution ( $10^{-4}$ ).

Lorsque du sperme est mis en mouvement est exposé au Pyralène, on constate qu'à 10°C le pouvoir fécondant est significativement diminué après 3 mn de contact par rapport aux témoins ( $P < 0,05$ ). A 20°C la diminution est significative ( $P < 0,05$ ) mais, seulement pour les doses de 4 et 40 ppb. (Fig. 11).

Les effets sur les ovules sont rapportés dans la figure 12. A 10°C, l'aptitude à la fécondation des ovules n'est pas modifiée après 20 mn d'exposition, mais elle est significativement réduite ( $P < 0,05$ ) à 400 ppb; après 40 mn. Pour les 2 durées, la chute de la fécondabilité en fonction de la dose est significativement plus forte à 20 qu'à 10°C.

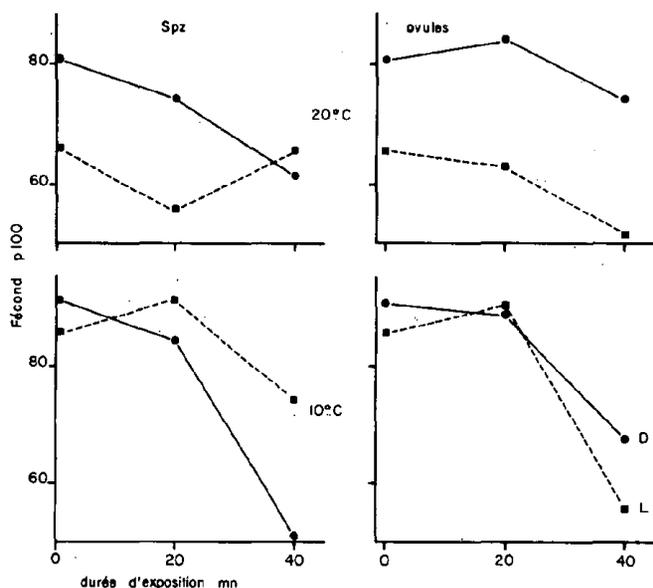


Figure 8 — Effet du lindane L (dose 25 ppm) sur la survie des spermatozoïdes immobilisés et des ovules de truite fario après les durées croissantes d'exposition à 10 et 20°C (D : Dilueur témoin ne contenant que le solvant acétone 500 ppm).

**Discussion**

Les études sur le vieillissement comparé des ovules *in vivo* et *in vitro* montrent que dans le cas de la Truite arc-en-ciel la conservation des ovules dans la cavité générale prolonge la durée de survie aux températures testées. En conditions normales de températures des travaux an-

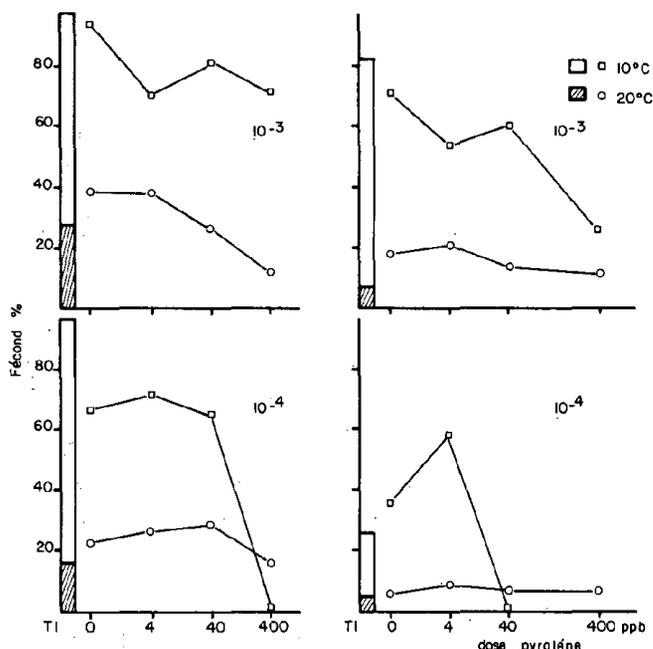


Figure 9 — Evolution du pouvoir fécondant des spermatozoïdes de truite arc-en-ciel maintenus immobilisés dans le MMLS (dilution  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ) et exposés à des doses croissantes de pyralène à 10 et 20°C pendant 20 et 40 mn. T<sub>1</sub> correspond au mmls ne contenant que le solvant (éthanol 20%).

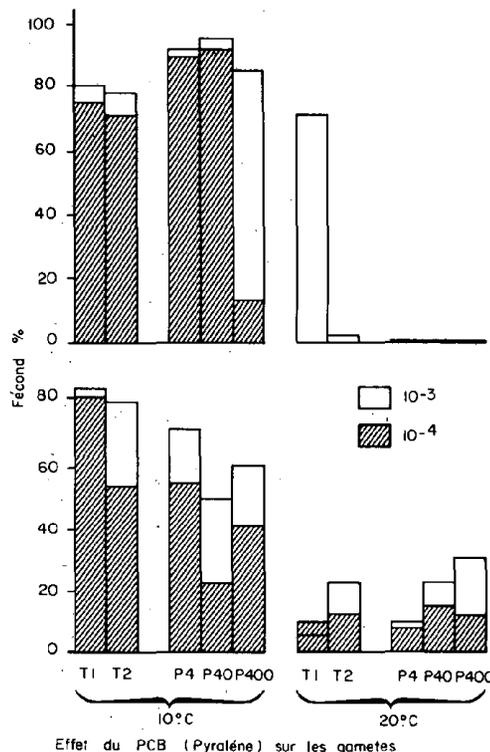


Figure 10 — Effets du pyralène sur les gamètes de truite arc-en-ciel (spermatozoïdes en haut, ovules en bas), après exposition 60 mn. T<sub>2</sub> : milieu de dilution ne contenant que le solvant.

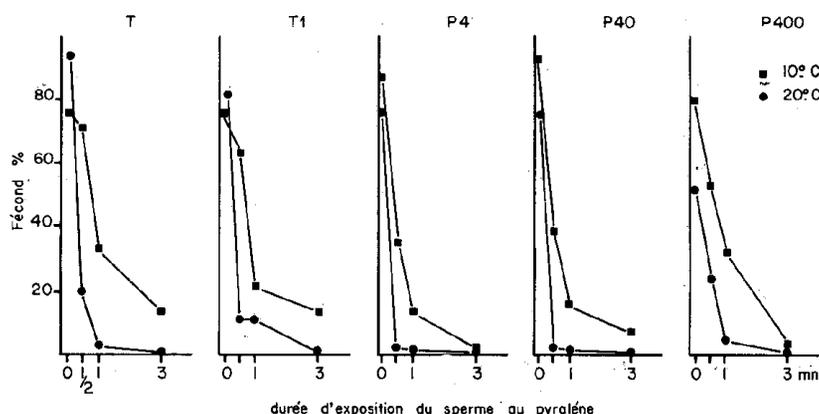


Figure 11 – Evolution du pouvoir fécondant du sperme de truite arc-en-ciel exposé à des doses croissantes de PCB (pyralène) à 10 et 20°C (spermatozoïdes mis en mouvement dans : T témoin (dilution dans dilueur); T<sub>1</sub> dilueur + éthanol).

térieurs (Escaffre et al. 1976, 1977 et Escaffre et Billard, 1979) avaient montré que la survie des ovules laissés dans la cavité générale après ovulation pouvait dépasser plusieurs semaines (voir aussi Sakai *et al.*, 1974) alors que les données de la littérature montrent qu'*in vitro* la fécondabilité se maintient à son niveau initial pendant quelques jours seulement (cf. Carpentier et Billard, 1978).

En cas de dilution dans le D. 532 la survie est encore plus brève (Billard et Gillet, 1975). A 10°C *in vitro* l'évolution de la fertilité est très comparable à celle observée *in vivo* à 10°C.

Dans tous les cas, la température la plus élevée réduit la durée de survie et ce phénomène a été retrouvé chez le Saumon salar (Peterson *et al.*, 1977). Chez la Truite arc-en-ciel, lorsque la fécondabilité est exprimée en nombre de degrés-jours, on constate que l'évolution est similaire à 10 et à 20°C, ce qui montre que la température ne fait qu'accélérer les processus de vieillissement. Au contraire, chez la Truite fario l'évolution de la survie des ovules est différente et pour un même nombre de degrés-jours la fertilité chute beaucoup plus vite à 15 qu'à 10°C, ce qui tendrait à montrer, comme l'a déjà signalé Kaya (1977), que les ovules de Truite fario seraient plus sensibles à l'élévation de température que ceux de la Truite arc-en-ciel. Le dernier auteur a en effet observé qu'une élévation de la température de 10°C de l'eau d'élevage compromet la reproduction de la Truite fario, mais pas celle de la Truite arc-en-ciel. D'autre part, il est à noter que chez la Truite fario les processus de vieillissement sont aussi rapides *in vivo* qu'*in vitro* à 15°C. Il faut cependant rappeler que la date d'ovulation exacte n'est pas connue avec précision, et que des processus de vieillissement pouvaient s'être déjà manifestés en début d'expérience rendant les ovules plus sensibles aux effets de traitements, mais les niveaux de fertilité approchant 100% à J<sub>0</sub> et un maintien convenable pendant 3 jours *in vivo* à 10°C laissent supposer que la qualité des ovules était satisfaisante.

Les facteurs susceptibles de rendre compte de la meilleure survie des ovules en condition *in vivo* sont nombreux et ne peuvent être discriminés au vu de la présente expérience. Dans les deux cas les ovules baignent dans le liquide coelomique, mais de nombreux facteurs sont modifiés *in vitro*. Il est vraisemblable que

des facteurs liés à l'environnement intraabdominal soient à prendre en considération : p O<sub>2</sub>, p CO<sub>2</sub>. Il faut ajouter, que les niveaux plasmatiques circulants en gonadotrophine (t-GTH) apparaissent très élevés chez les individus ovulés et non oviposés (Billard et al., 1978). Par ailleurs, la lumière dont les effets néfastes sur les gamètes et les embryons de salmonidés sont connus (Kwain, 1974) est aussi susceptible d'interférer dans les expériences *in vitro*.

La méthodologie mise en œuvre pour tester les effets de micropolluants sur les gamètes à différentes températures a permis de tester la synergie, entre un micropolluant, comme le Lindane (Fig. 7-8) ou le PCB (Fig. 12) et un facteur de l'environnement, comme la température. L'effet toxique des micropolluants se manifeste davantage à 20 qu'à 10°C. Cette sensibilité des ovules à hautes températures ne peut pas s'expliquer simplement par une action plus rapide du pesticide à 20°C.

En effet, pour un nombre égal de degrés-heures, c'est-à-dire, après 40 mn d'exposition à 10°C et après 40 mn d'exposition à 10°C et après 20 mn à 20°C, les résultats ne sont absolument pas comparables. Il s'agit donc bien d'une toxicité des polluants qui n'apparaît qu'au dessus d'un certain seuil thermique. Il n'est pas exclu que la température puisse agir sur l'incorporation et la vitesse d'incorporation des polluants dans les réserves vitellines de l'ovule ce qui peut entraîner des avortements précoces (assimilés ici à une non fécondation) ou plus tardifs, ce qui impliquerait de tester les effets

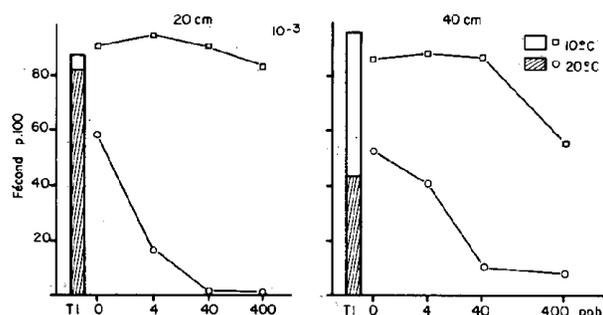


Figure 12 – Evolution de la fécondabilité des ovules de truite arc-en-ciel après exposition à des doses croissantes de pyralène à 10 et 20°C pendant 20 et 40 mn (taux de dilution du sperme lors de l'insémination : 10<sup>-3</sup>).

sur le développement embryonnaire et post embryonnaire.

Les résultats du test effectué sur les spermatozoïdes apparaissent plus complexes. Le lindane n'a pas d'effet à 10°C ; par contre, le Pyralène entraîne une réduction notable du pouvoir fécondant aux plus fortes doses, surtout aux dilutions élevées. A 20°C, le solvant lui-même a une importance considérable qui ne permet pas de déceler un effet des micropolluants. Curieusement, le Lindane à forte dose semble compenser les effets défavorables du solvant. En définitive, de très nombreux paramètres doivent être pris en considération, pour pouvoir raisonnablement analyser les effets de micropolluants sur les gamètes, et leur interaction avec la température ; les niveaux thermiques eux-mêmes (des températures intermédiaires doivent être testées), le taux de dilution la durée d'exposition et la nature du solvant.

### Remerciements

Ce travail a été réalisé avec le concours de EDF. Le lindane nous a été fourni par le laboratoire de Phytopharmacie I.N.R.A. L'expérimentation portant sur les effets de Pyralène a été réalisé en collaboration avec les laboratoires de Pharmacodynamie, Toxicologie et Hydrologie (Pr. Cazini), Faculté de Pharmacie Lille.

### Bibliographie

- 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., GILLET C., 1975. — Effets de la température sur la fécondation et la survie des gamètes chez la Truite arc-en-ciel. *Bull. Fr. Pisc.*, 264, 102-112.
- BILLARD R., 1977. — Utilisation d'un système tris-glycocolle pour tamponner le dilueur d'insémination pour Truite. *Bull. Fr. Pisc.*, 264, 102-112.
- BILLARD *et al.*, 1978. — Endocrine control of the teleost reproductive cycle and its relation to external factors. Salmonid and Cyprinid models. *8<sup>th</sup> International Symposium on Comparative Endocrinology*, Amsterdam ; Edt. P.J. Gaillard et H. H. Boer.
- BILLARD R., CAZIN J.C., DEQUIDT J., ERB F. et COLEIN P., 1978. — Toxicité du Pyralène 3010 sur les ovules et les spermatozoïdes de Truite arc-en-ciel avant et pendant l'insémination. *Bull. Fr. Pisc.*, 270, 238-249.
- 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., 1976. — Evolution de la fécondabilité des ovules de Truite arc-en-ciel laissés dans la cavité coelomique après ovulation. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 40, 561-562.
- 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-ovulaire chez la Truite arc-en-ciel. *Bull. Fr. Piscic.*, 265, 134-142.
- ESCAFFRE A.M., BILLARD R., 1979. — Evolution de la fécondabilité des ovules de Truite-arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.) laissés dans la cavité abdominale au cours de la période post-ovulatoire. Soumis pour publication. *Bull. Fr. Piscic.*
- KAYA C.M., 1977. — Reproductive Biology of Rainbow Trout in a Geothermally Heated Stream : The Firehole River of Yellowstone National Park. *Trans. Am. Fish Soc.*, 106, 354-361.
- KWAIN W.H., 1974. — Embryonic development, early growth and meristic variation in rainbow trout exposed to combinations of light intensity and temperature. *J. Fish Res. Bd. Canada*, 32, 397-402.
- PETERSON R.H., SPINNEY H.C.E. and SREEDHARAN A., 1977. — Development of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) eggs and alevins under varied temperature regimes. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 34, 31-43.
- SAKAI K., NOMURA M., TAKASHIMA F., OTO H., 1975. — The over-ripening phenomenon of rainbow trout. II — Changes in the percentage of eyed eggs, hatching rate and incidence of abnormal alevins during the process of over-ripening. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 41, 855-860.
- SANCHEZ-RODRIGUEZ, 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. Piscic.*, 265, 144-152.