



**HAL**  
open science

## Données expérimentales sur la gestion et l'insémination artificielle des gamètes de brochet (*Esox lucius*)

Jacqueline Marcel, G. de Montalembert, Roland Billard

### ► To cite this version:

Jacqueline Marcel, G. de Montalembert, Roland Billard. Données expérimentales sur la gestion et l'insémination artificielle des gamètes de brochet (*Esox lucius*). Le brochet : Gestion dans le milieu naturel et élevage, INRA Publi., 317 p., 1983, Hydrobiologie et Aquaculture, 2-85340-528-1. hal-01600608

**HAL Id: hal-01600608**

**<https://hal.science/hal-01600608>**

Submitted on 8 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

## Données expérimentales sur la gestion et l'insémination artificielle des gamètes de brochet (*Esox lucius*)

Jacqueline MARCEL \*, G. DE MONTALEMBERT et R. BILLARD  
I.N.R.A., Laboratoire de Physiologie des Poissons, F 78350 Jouy-en-Josas

### Résumé

Dans le but d'optimiser les opérations d'insémination artificielle du brochet, nous avons d'une part étudié la durée de vie des gamètes (sperme et ovules) sous différentes conditions de conservation, et d'autre part recherché un dilueur d'insémination qui conduise à des pourcentages de fécondation satisfaisants.

Le sperme de brochet peut être conservé pendant 22 h au réfrigérateur à 4°C et même 27 h lorsqu'il est dilué dans un milieu de conservation enrichi en potassium. Par contre le sperme prélevé sur des animaux sacrifiés ne présente plus de pouvoir fécondant 8 h après la mort des mâles. Les ovules laissés dans le tractus génital conservent leur fécondabilité pendant 48 h après l'ovulation induite par traitement hormonal. Des suppléments hormonaux gonadotropes ne modifient pas la durée de fécondabilité. Lorsque les ovules sont conservés *in vitro* au réfrigérateur pendant 30 h (4°C), la fécondabilité se maintient lorsqu'ils sont placés dans un dilueur d'insémination (DIA) (1 vol/1 vol) alors qu'elle diminue significativement ( $P < 0,01$ ) en cas de conservation à sec. En condition *post-mortem* (ovules prélevés sur des animaux sacrifiés) les ovules ne sont plus fécondables 6 h après la mort des femelles.

Un dilueur d'insémination a été défini pour le brochet ; il présente un pH de 9 et une pression osmotique de 250-300 milliosmoles. Les spermatozoïdes présentent un pouvoir fécondant satisfaisant pendant 6 minutes lorsqu'ils sont placés dans ce dilueur, alors qu'il est nul après 2 minutes d'exposition dans l'eau douce. Les ovules restent fécondables après 32 minutes de séjour dans le dilueur, alors qu'il y a perte de la fécondabilité après 2 à 4 minutes dans l'eau douce. Le volume de dilueur à mettre en œuvre au cours de l'insémination artificielle est de 0,5 ou 1 litre pour 1 litre d'œufs et le taux de dilution du sperme de  $10^{-3}$ . Le temps pendant lequel les gamètes peuvent rester en présence du dilueur avant d'être transférés en eau douce ne doit pas excéder 8 à 10 minutes. Les œufs fécondés de brochet peuvent être manipulés et transportés aussitôt après le durcissement sans perte du pourcentage de fécondation.

### Summary. Experimental data on the management and artificial insemination of pike gametes

To optimize the artificial insemination operations of pike, we studied the life-span of the gametes (spermatozoa and ova) under different storage conditions and tried to find an insemination diluent that would give satisfactory fertilization rates.

Pike spermatozoa could be stored for 22 h in a refrigerator at 4°C and even for 27 h when diluted in a holding medium rich in potassium. On the contrary, spermatozoa taken

\* Elève-stagiaire de l'EPHE, laboratoire d'étude du développement post-embryonnaire des vertébrés inférieurs, 25, rue du Plat, 69288 Lyon Cedex 1.

from sacrificed animals had no fertilizability after 8 *post-mortem* hours. The ova remaining in the genital tract were fertilizable for 48 h after hormonally induced ovulation. Gonadotropic hormone supplements did not change the duration of fertilizability. When the ova were held *in vitro* in a refrigerator at 4°C for 30 h, fertilizability was maintained when they were put into an insemination diluent (DIA) (v/v), while it decreased significantly ( $P < 0.01$ ) when they were dry-stored. *Post-mortem* ova (those taken from sacrificed fish) were not fertilizable 6 h after the females were killed.

We developed an insemination diluent for pike having a pH of 9 and an osmotic pressure of 250-300 mOsmol. Sperm fertilizing ability was satisfactory for 6 min when the spermatozoa were put into this diluent, while it was zero after 2 min in fresh water. The ova were fertilized after 32 min in the diluent, while fertilizability decreased after 2 to 4 min in fresh water. The volume of the diluent to use during artificial insemination is 0.5 l for 1 l of eggs, and sperm dilution rate is  $10^{-3}$ . The gametes should not stay in the diluent for more than 8 to 10 min before they are transferred to fresh water. The fertilized eggs of pike can be handled and transported, without causing any decline in fertilization rate, as soon as they have hardened.

L'induction de la phase finale du cycle reproducteur (maturation ovocytaire-ovulation, spermiation) est possible pour certaines espèces de poissons dont le brochet, et permet d'obtenir des gamètes de qualité satisfaisante (cf. Pouvreau *et al.*, 1983 ce volume). Cependant, la maîtrise de cette phase ne suffit pas dans un élevage rationnel et il est nécessaire de savoir gérer au mieux les gamètes obtenus, de façon à valoriser la forte prolificité des poissons (20 000 à 25 000 œufs par kg de femelle brochet). La connaissance, au moins sommaire, de la physiologie des gamètes et de leur durée de vie autorise une meilleure organisation des opérations d'insémination artificielle (prélèvement préalable du gamète qui présente la meilleure survie, connaissance du temps imparti pour le déroulement des opérations, etc.), ou la possibilité de conserver le sperme ou les ovules pendant des périodes courtes (jusqu'à 24 heures) lorsque le gamète partenaire n'est pas immédiatement disponible. D'autre part, une bonne gestion des gamètes implique aussi une amélioration des conditions d'insémination artificielle avec l'utilisation du milieu de dilution le plus approprié. Les problèmes qui se posent dans la pratique actuelle de l'insémination artificielle du brochet (méthode sèche) sont de deux ordres : utilisation d'une quantité importante de sperme, alors que chez cette espèce, la spermiation en captivité est peu importante (Billard *et al.*, 1983 ce volume), et agglutination des œufs après fécondation et hydratation. Des essais d'insémination artificielle réalisés dans le dilueur mis au point pour la truite se sont révélés satisfaisants et ont conduit à une augmentation des pourcentages de fécondation tout en abaissant la quantité de sperme nécessaire, et à une disparition de l'aspect collant des œufs (Billard *et al.*, 1976). Mais aucune étude n'a cherché à vérifier si ce dilueur était le mieux approprié pour le brochet.

Le travail rapporté ici comporte deux parties :

1) étude de la durée de vie du sperme et des ovules de brochet conservés en conditions *in vitro* et *post-mortem*. Essais de prolongation de la survie par utilisation de milieux de conservation ;

2) définition d'un dilueur d'insémination artificielle spécifiquement adapté aux gamètes de brochet en faisant varier des paramètres comme le pH et la pression osmotique. Elaboration d'une technique d'insémination artificielle qui

tienne compte d'une série de facteurs tels que : durée de vie des gamètes dans le dilueur, rapport volume de dilueur/volume d'ovules à mettre en œuvre, et taux optimal de dilution du sperme.

## Matériel et méthodes

### 1. Matériel animal

Les géniteurs brochets utilisés sont originaires de la Dombes (01). Ils effectuent leur premier cycle reproducteur et pèsent environ 250 g. Les conditions de capture, transport et stockage sont décrites par ailleurs (Billard *et al.*, 1983 ce volume). L'obtention des gamètes est réalisée, chez les deux sexes, par traitement d'hypophysation. Les femelles reçoivent une injection de gonadotropine de saumon partiellement purifiée (GSPP) à la dose de 0,05 mg/kg de poids corporel sur les lieux même de la capture, tandis que le traitement est administré aux mâles à leur arrivée au laboratoire (0,05 mg de GSPP/kg de poids corporel ; équivalent s-GTH 0,40 mg/mg de GSPP). L'ovulation intervient 45 à 50 jours après le traitement et la stimulation de la spermiation est observée 3 à 4 jours après l'injection.

### 2. Mode de collecte et critères d'appréciation de la qualité des gamètes

La collecte des gamètes se fait par massage abdominal après anesthésie des animaux (Phénoxy-éthanol, 0,5 ml/l d'eau). Chez le mâle, le sperme est recueilli à l'aide d'une pipette graduée, appliquée sur le pore génital, ce qui permet d'en connaître le volume ( $\pm 10 \mu\text{l}$ ). Pour chaque sperme, la concentration en spermatozoïdes est mesurée par établissement du spermocrite selon la technique rapportée par De Montalembert *et al.* (1980). Chez les femelles, le prélèvement des ovules est effectué dans les quelques heures qui suivent l'ovulation (1 à 2 heures). Ils sont recueillis dans une cuvette placée sous l'abdomen de la femelle. Lorsque leur utilisation n'est pas immédiate, les gamètes sont placés au réfrigérateur à 4°C. Ils sont collectés individuellement, mais peuvent être ultérieurement mélangés par lot, en fonction des expérimentations.

La fertilité des gamètes, c'est-à-dire le pouvoir fécondant des spermatozoïdes et la fécondabilité des ovules, est testée par insémination de lots de 200 ovules environ avec le DIA 532 (Billard, 1977) ou le dilueur brochet, et un volume de sperme et si possible un nombre de spermatozoïdes connus. Le volume de dilueur utilisé est de 5 ml et les taux de dilution du sperme  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  ou  $10^{-4}$ . La procédure standardisée d'insémination comporte d'abord le mélange des ovules avec le dilueur, puis l'addition du sperme et le mélange du tout par 2 à 3 transvasements. Les œufs sont ensuite laissés en présence du dilueur pendant 15 minutes, puis transférés dans des incubateurs placés en eau courante recyclée et thermostatée à  $10^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$  (Marie, 1979). La fertilité des gamètes est estimée par dénombrement du nombre d'œufs embryonnés à 50 jours, après fixation dans le liquide de Stockard.

### 3. Description des expériences

#### a) Conservation du pouvoir fécondant du sperme de brochet en condition *in vitro* et post-mortem

Quatre mâles sont anesthésiés et assommés après avoir recueilli une fraction du sperme aux fins de stockage *in vitro* et d'insémination artificielle témoin (sperme non conservé, H<sub>0</sub>). Le sperme est stocké individuellement en piluliers à large fond (hauteur du sperme, 0,5 cm), bouchés à l'aide de coton hydrophile humide. Ces piluliers et les mâles sacrifiés sont stockés à 4°C. 8 et 28 heures plus tard, des inséminations artificielles sont réalisées sur des lots de 200 ovules environ avec d'une part les spermés conservés au réfrigérateur à 4°C, et d'autre part avec une aliquote de sperme prélevé sur chacun des mâles morts conservés à 4°C. Le taux de dilution du sperme utilisé est de 10<sup>-3</sup>. Les ovules utilisés pour les fécondations des différents points de conservation testés : H<sub>0</sub>, H<sub>8</sub> et H<sub>28</sub> proviennent de femelles différentes qui ont reçu des traitements d'hypophysation différés en conséquence.

#### b) Conservation du sperme dilué dans des milieux de conservation

Le sperme de 5 mâles est prélevé 27, 22 et 13 heures avant le moment présumé de l'ovulation de femelles hypophysées de façon à obtenir du sperme conservé pendant 13, 22 et 27 heures et dont le pouvoir fécondant sera testé avec un même lot d'ovules. Après prélèvement, le sperme est mélangé et réparti dans 3 piluliers à large fond (diamètre : 25 mm) de la façon suivante : sperme 1 : 100 µl de sperme non dilué, sperme 2 : 100 µl de sperme + 100 µl de milieu minéral de liquide séminal de truite reconstitué (composition en mmol/l : NaCl 110 ; KCl 28,3 ; MgSO<sub>4</sub> (7 H<sub>2</sub>O) 1,1 ; CaCl<sub>2</sub> (2 H<sub>2</sub>O) 1,8 ; pression osmotique 306 milliosmoles, pH 9,21, Billard et Jalabert, 1974), et sperme 3 : 100 µl de sperme + 100 µl de milieu à base de sucrose (Prolabo R.P.) ajusté à une pression osmotique de 250 milliosmoles et un pH de 9 (composition en mmol/l : 250, Legendre et Billard, 1981). Les flacons sont bouchés avec du coton hydrophile et placés au réfrigérateur à 4°C. Les inséminations artificielles sont réalisées aux taux de dilution de sperme de 10<sup>-3</sup> pour le sperme non dilué, et 2 × 10<sup>-3</sup> pour les spermés dilués. Une insémination artificielle témoin est effectuée avec du sperme fraîchement prélevé.

#### c) Conservation de la fécondabilité des ovules en conditions *in vitro* et post-mortem

Sur un lot de 8 femelles, les ovules sont prélevés partiellement puis les animaux sont sacrifiés et placés en chambre froide à 4°C, à sec dans un bac. Une aliquote de 200 ovules est inséminée immédiatement (H<sub>0</sub>) pour chaque femelle avec un pool de sperme fraîchement prélevé sur un lot de 10 mâles, et le reste est réparti par lots d'environ 200 ovules en 6 piluliers pour chaque femelle : dans 3 d'entre eux, la conservation se pratique à sec (les ovules sont disposés en monocouche), dans les 3 autres on ajoute du dilueur (DIA 532)

(1 volume de dilueur/1 volume d'ovules). Les flacons sont placés au réfrigérateur à 4° C ; 6 et 18 heures plus tard, une aliquote d'environ 200 ovules est prélevée sur chaque femelle sacrifiée et inséminée, tandis que les ovules conservés en piluliers sont inséminés après 18, 24, 30 et 42 heures de conservation. Pour chaque temps de conservation, l'insémination est pratiquée au taux de dilution de  $10^{-3}$  avec un mélange de spermatozoïdes fraîchement collectés.

d) *Temps de survie des gamètes dans le dilueur D 532 ou l'eau douce*

— *Le sperme* : du sperme fraîchement prélevé sur 10 mâles est mélangé et mis en présence de D 532 (5 ml) au taux de dilution de  $10^{-3}$  ; 200 ovules environ sont ensuite ajoutés à des temps croissants : 1, 2, 4, 8 et 10 minutes. La même opération est réalisée dans l'eau douce à la même dilution de sperme, en ajoutant les ovules après 30, 60 et 90 secondes de mise en présence spermatozoïdes-eau douce.

— *Les ovules* : 200 ovules sont mis en présence de D 532 (5 ml) puis le sperme est ajouté à des temps croissants : 2, 4, 8, 16, 32 et 60 minutes. La dilution du sperme pratiquée est  $10^{-3}$ . La même opération est réalisée en exposant les ovules dans l'eau douce avant l'insémination.

e) *Mise au point d'un dilueur d'insémination pour le brochet*

La pression osmotique et le pH sont les deux paramètres pris en considération pour définir la composition d'un dilueur d'insémination pour les gamètes de brochet. Quinze solutions à base de NaCl et tamponnées par TRIS (Tris hydroxyméthyl aminométhane) 0,02M sont constituées et caractérisées par 5 pressions osmotiques (100, 150, 200, 250 et 300 milliosmoles) et 3 pH (7, 8 et 9). Des inséminations de lots de 200 ovules environ (mélange d'ovules en provenance de plusieurs femelles) sont réalisées avec les différentes solutions et du sperme prélevé sur un lot de 10 mâles. Trois taux de dilution du sperme sont testés :  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ .

f) *Détermination du nombre optimum de spermatozoïdes nécessaires à la fécondation d'un ovule*

Dans la présente expérimentation, des lots de 300, 600, 1 000 et 2 000 ovules sont inséminés dans un volume constant de dilueur (D 532) (10 ml) et avec des quantités croissantes de sperme : 1, 10 et 100  $\mu$ l. Les ovules utilisés sont un mélange de plusieurs pontes et le sperme provient d'un lot de mâles. La concentration en spermatozoïdes du sperme utilisé est de  $19 \cdot 10^9$ /ml.

g) *Rapport optimum ovules/dilueur lors des opérations d'insémination artificielle*

Afin de déterminer le volume optimum de dilueur à mettre en œuvre lors de l'insémination artificielle des ovules de brochet, une série de fécondations est réalisée en faisant varier le volume de dilueur D 532 (2,5, 5, 10, 15 et 20 ml) pour un volume constant d'ovules (10 ml), et un nombre constant de spermatozoïdes (10  $\mu$ l, soit  $190 \cdot 10^6$  spermatozoïdes environ).

#### h) *Temps d'exposition des gamètes inséminés dans le dilueur D 532 avant passage dans les incubateurs*

La durée optimale de séjour des œufs dans le dilueur après insémination est recherchée en procédant à des transferts d'œufs en incubateurs à des temps croissants : 30 secondes, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 60 et 120 minutes après la mise en présence ovules-dilueur-sperme.

#### i) *Effet de l'agitation des œufs de brochet après insémination artificielle*

Deux modes d'agitation sont utilisés dans cette expérience destinée à simuler les effets d'un transport sur le développement embryonnaire des œufs de brochet : un agitateur à déplacement horizontal qui imprime aux œufs un mouvement de va-et-vient ( $V = 4$  cm/s, un déplacement/seconde), et un agitateur type « balancelle » qui effectue un mouvement d'oscillations selon un angle de  $75^\circ$  ( $V = 5$  cm/s, 30 rotations/minute). Les deux appareils sont placés en chambre froide à une température de  $4^\circ\text{C}$ . Six lots de 200 œufs inséminés sont laissés à durcir en incubateurs pendant une durée d'une heure. Quatre lots sont ensuite placés sur les agitateurs dans des boîtes plastiques de 400 ml contenant 100 ml d'eau pour des durées de 6 et 12 heures. Deux lots non agités, mais subissant le même régime thermique servent de témoins. Le régime thermique est le suivant : au moment de leur passage à  $4^\circ\text{C}$ , les œufs sont placés dans une eau à  $10^\circ\text{C}$  qui va atteindre progressivement la température ambiante de la chambre froide ; en fin d'expérience, les boîtes sont placées dans un bain-marie à  $10^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes avant passage dans les incubateurs.

### 4. *Analyse statistique des résultats*

L'analyse statistique des résultats est effectuée par analyse de variance après transformation angulaire des pourcentages de fécondation ou par test  $\chi^2$ .

## Résultats

### 1. *Conservation du pouvoir fécondant du sperme en conditions in vitro et post-mortem*

Dans la présente expérience, le pouvoir fécondant du sperme conservé dans le tractus génital de mâles morts ou *in vitro* diminue dès les 8 premières heures de conservation. Cependant cette diminution n'est pas significative et se montre relativement peu importante pour le sperme conservé *in vitro* (69 p. 100 de fécondation) alors qu'elle est très significative ( $P < 0,01$ ) pour le sperme conservé en condition *post-mortem*. Après 28 heures de conservation, la perte du pouvoir fécondant, hautement significative ( $P < 0,001$ ) par rapport à celui du sperme frais, est comparable dans les deux conditions de conservation (fig. 1).

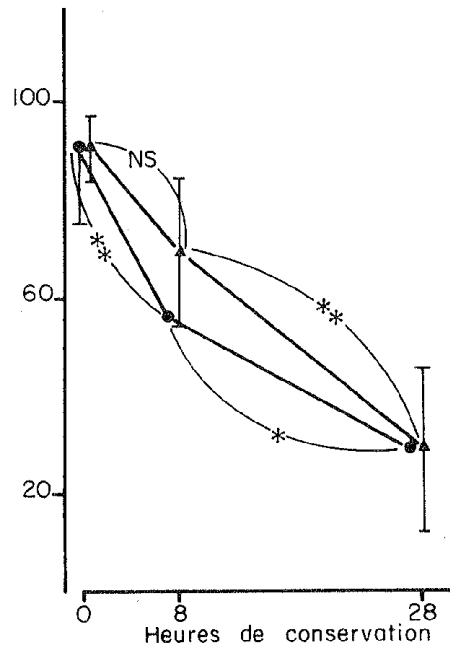


Figure 1. — Pouvoir fécondant du sperme de brochet conservé *post-mortem* (dans le tractus génital de géniteurs morts et conservés à 4° C, ●—●) et *in vitro* (en piluliers placés à 4° C, ▲—▲). Insémination artificielle réalisée avec des ovules fraîchement ovulés pour chaque temps de conservation. Taux de dilution du sperme 10<sup>-3</sup>. N.S différence non significative, \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01.

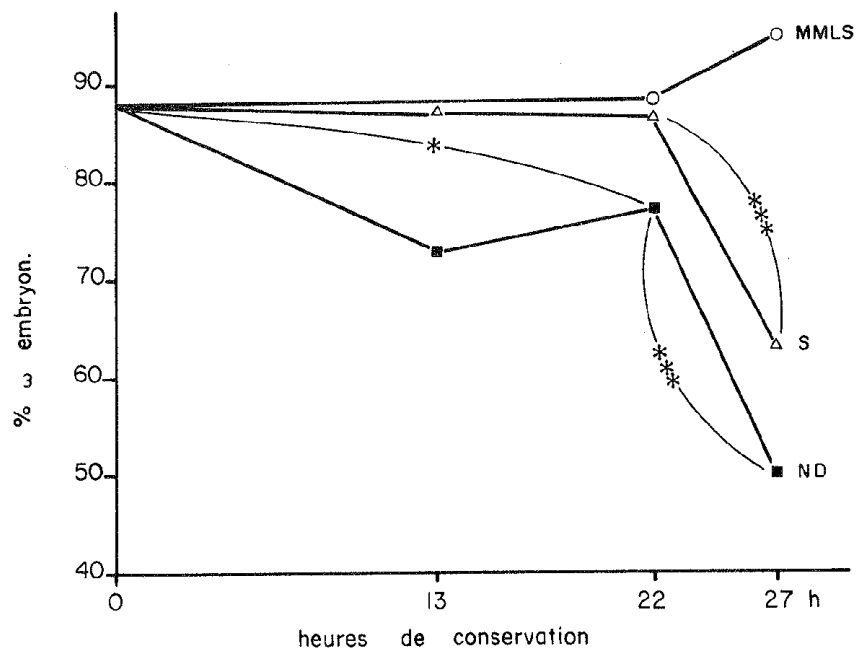


Figure 2. — Pouvoir fécondant du sperme de brochet stocké dans différents dilueurs de conservation : MMLS milieu minéral de liquide séminal de truite reconstitué ; S sucrose (dilution 1 vol/1 vol) ; ND sperme non dilué. Température de conservation 4° C. Insémination artificielle réalisée avec des ovules fraîchement ovulés pour chaque durée de conservation. Taux de dilution du sperme 10<sup>-3</sup> pour le sperme non dilué et 2 × 10<sup>-3</sup> pour le sperme dilué (signification statistique, \* P < 0,05, \*\*\* P < 0,001).

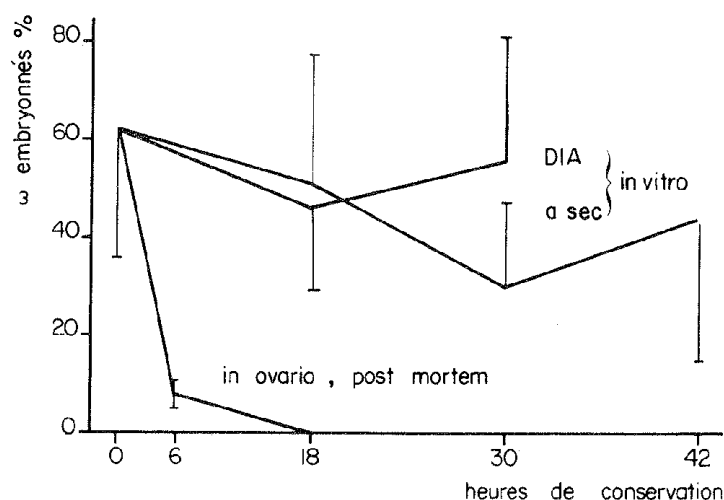


## 2. Conservation du sperme dilué dans des milieux de conservation

Les résultats rapportés dans la figure 2 montrent que le sperme conserve l'intégralité de son pouvoir fécondant pendant une durée de 22 heures lorsqu'il est dilué dans un milieu de conservation à base de potassium ou de sucrose. Le sperme non dilué présente, pour la même durée de conservation, une perte significative de ses qualités fécondantes par rapport au sperme frais ( $P < 0,05$ ), mais permet d'obtenir encore 78 p. 100 de fécondation. Après 27 heures de conservation, seul le sperme dilué dans le milieu minéral reconstitué conserve un pouvoir fécondant élevé, les deux autres lots présentant une diminution hautement significative ( $P < 0,001$ ) de leur pouvoir fécondant par rapport au temps de conservation de 22 heures.

## 3. Conservation de la fécondabilité des ovules en conditions *in vitro* et post-mortem

L'aptitude à la fécondation d'ovules de brochet conservés *in vitro* à 4°C se maintient à un niveau légèrement inférieur au niveau initial pendant les 18 premières heures de conservation (p. 100 de fécondation voisins de 50 p. 100), qu'ils soient placés à sec dans un pilulier ou dans le dilueur D 532 (fig. 3). Après 30 heures de conservation la fécondabilité reste élevée dans le cas de stockage des ovules dans le dilueur D 532, tandis qu'elle diminue significativement ( $P < 0,01$ ) lorsque les ovules sont laissés à sec, bien que 12 heures plus tard (42 heures de conservation), on enregistre encore 50 p. 100 de fécondation sur un lot d'ovules conservés à sec (fig. 3).



**Figure 3.** — Fécondabilité des ovules de brochet conservés *post-mortem* (dans la cavité ovarienne de femelles sacrifiées et conservées à 4°C) et *in vitro* à 4°C, soit à sec soit dans du dilueur D 532 (1 vol/1 vol). Insémination artificielle réalisée pour chaque durée de conservation avec du sperme fraîchement prélevé sur un lot de 5 mâles. Taux de dilution du sperme 10<sup>-3</sup>. Moyennes de plusieurs femelles avec écarts-type.

En condition *post-mortem*, les ovules perdent leur fécondabilité très rapidement, et la perte est significative dès les 6 premières heures de conservation dans le tractus génital des femelles sacrifiées (fig. 3).

#### 4. Temps de survie des gamètes dans le dilueur D 532 ou l'eau douce

— *Le sperme* : les résultats rapportés dans la figure 4 montrent que le sperme conserve un pouvoir fécondant élevé après 2 et même 4 minutes de mise en présence dans le D 532, au taux de dilution de  $10^{-3}$  (60 p. 100 de fécondation après 4 minutes d'exposition). Par contre, après 8 et 10 minutes de mise en présence dans le D 532, les spermatozoïdes ont perdu leur pouvoir fécondant. Dans l'eau douce, le pouvoir fécondant du sperme chute rapidement dès la première minute d'exposition (23 p. 100 de fécondation, diminution très significative  $P < 0,01$ ) et après 2 minutes de mise en présence d'eau douce, le pouvoir fécondant du sperme est nul.

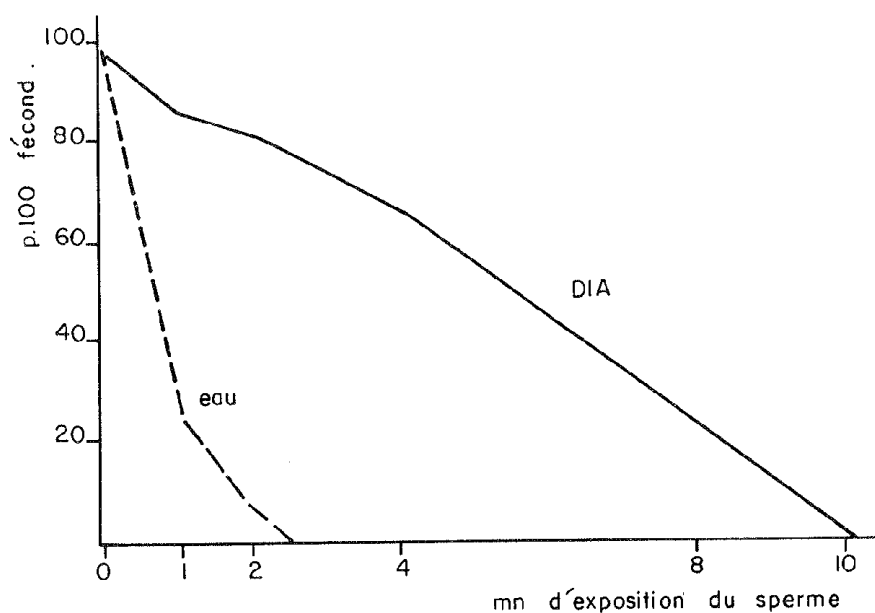


Figure 4. — Evolution du pouvoir fécondant du sperme mis en présence de dilueur ou d'eau douce pendant des temps croissants avant insémination artificielle (5 ml de dilueur + 5  $\mu$ l de sperme).

— *Les ovules* : les ovules conservent leur aptitude à la fécondation après 32 minutes d'exposition dans le dilueur D 532, puis la fécondabilité devient nulle après 60 minutes d'exposition (fig. 5). Par contre, dans l'eau douce, la fécondabilité des ovules est très brève : après 1 minute d'exposition, elle diminue de moitié et devient nulle après 4 minutes.

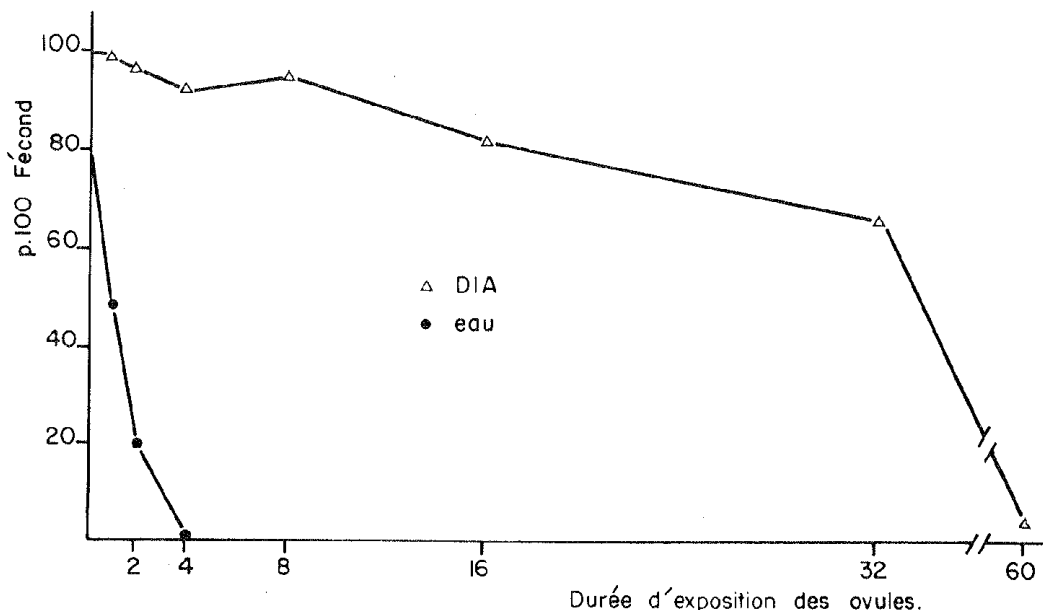


Figure 5. — Evolution de la fécondabilité des ovules mis en présence de dilueur ou d'eau douce pendant des temps croissants avant insémination artificielle (5 ml de dilueur + 200 ovules environ).

### 5. Mise au point d'un dilueur d'insémination : effet de la pression osmotique et du pH sur la fertilité des gamètes

Les résultats rapportés dans la figure 6 montrent une augmentation des pourcentages de fécondation qui va de pair avec une élévation de la pression osmotique et du pH. Aux pressions osmotiques 100 et 150, les pourcentages de fécondation sont faibles, quels que soient le pH et le taux de dilution du sperme. Aux pressions osmotiques supérieures (200, 250 et 300) les pourcentages de fécondation s'élèvent ; les pH 8 et 9 se montrent les plus favorables à la survie des gamètes. L'analyse statistique des résultats par analyse de variance montre une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les différents pH aux taux de dilutions  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ . Une augmentation du taux de dilution du sperme entraîne une nette diminution des pourcentages de fécondation.

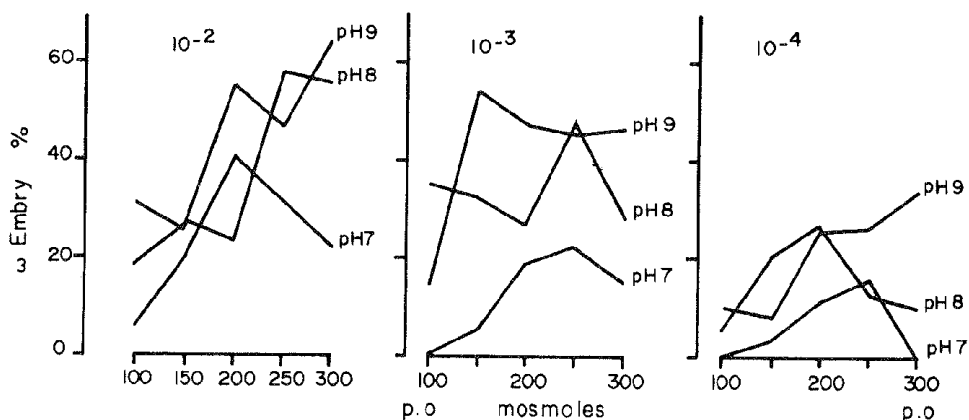


Figure 6. — Effets de la pression osmotique et du pH du dilueur sur le succès de l'insémination artificielle du brochet réalisée à trois dilutions de sperme différentes ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ).

### 6. Détermination du nombre optimum de spermatozoïdes nécessaires pour féconder un ovule

Les pourcentages de fécondation obtenus après variation du nombre de spermatozoïdes par ovule sont rapportés dans le tableau 1. 387 000 à 719 000 spermatozoïdes sont nécessaires et suffisants pour féconder un ovule pour des pourcentages de fécondation de 83 et 88 p. 100. Un nombre de spermatozoïdes 10 fois plus important ne conduit pas à des fécondations supérieures, ce qui indique que tous les ovules fécondables ont été fécondés.

**Tableau 1.** — Détermination du nombre de spermatozoïdes nécessaires pour féconder un ovule de brochet.

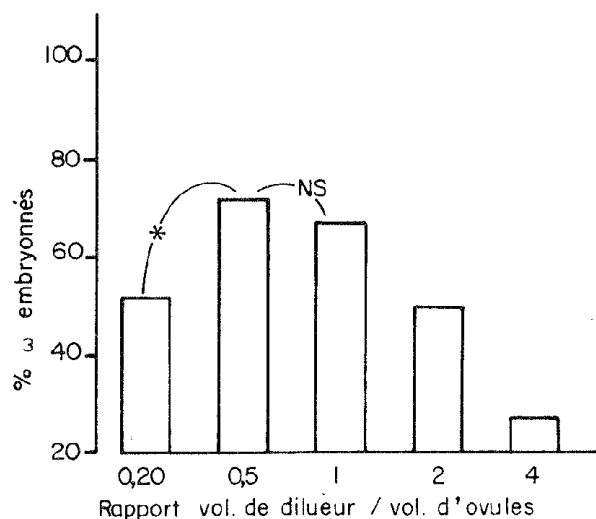
Sperme	Vol.	0,1 ml ( $10^{-2}$ )		0,01 ml ( $10^{-3}$ )		0,001 ml ( $10^{-4}$ )	
	Nbr.	1 900 $10^6$		190 $10^6$		19 $10^6$	
Nbr. ovules	Nbr. spermato/œufs fécondés	% fécond.	Nbr. spermato/œufs fécondés	% fécond.	Nbr. spermato/œufs fécondés	% fécond.	
300	7279 $10^3$	87	719 $10^3$	88	191 $10^3$	33	] NS
600	3598 $10^3$	88	387 $10^3$	83	158 $10^3$	20	
1 000	2261 $10^3$	84	344 $10^3$	55	158 $10^3$	12	
2 000	1117 $10^3$	85	210 $10^3$	45	237 $10^3$	4	

Volume de dilueur utilisé : 10 ml.

NS différence non significative (test  $\chi^2$ )

### 7. Rapport optimum ovules/dilueur lors des opérations d'insémination artificielle

Les pourcentages de fécondation obtenus avec les différents rapports volume de dilueur/volume d'ovules sont rapportés dans la figure 7. Le rapport optimum



**Figure 7.** — Rapport optimum volume de dilueur/volume d'ovules à mettre en œuvre au cours de l'insémination artificielle. Rapport 1 : 5 ml de dilueur et 5 ml d'ovules, soit 250 environ. Taux de dilueur du sperme  $10^{-3}$  (signification statistique, cf. légende fig. 1).

se situe à 0,5 ou 1 volume de dilueur pour un volume d'ovules. Les différences ne sont pas significatives entre ces deux valeurs ; par contre lorsque le volume de dilueur ne représente plus que le 1/5 du volume des ovules, les taux de fécondation sont significativement plus bas ( $P < 0,05$ ).

#### 8. Temps d'exposition des gamètes inséminés dans le dilueur D 532 avant passage en incubateurs

Les résultats rapportés dans la figure 8 et portant sur deux répétitions montrent qu'après 30 secondes de mise en présence des deux gamètes et du dilueur, la fécondation de la majeure partie des ovules fécondables est obtenue dans un cas, alors que dans l'autre cas, 1/3 des ovules sont fécondés en 30 secondes et le reste dans les 4 minutes qui suivent la mise en présence. La durée d'exposition des œufs au dilueur après fécondation n'a pas d'effets néfastes si elle n'excède pas 10 minutes. Par contre, pour des durées plus longues, les pourcentages de fécondation diminuent.

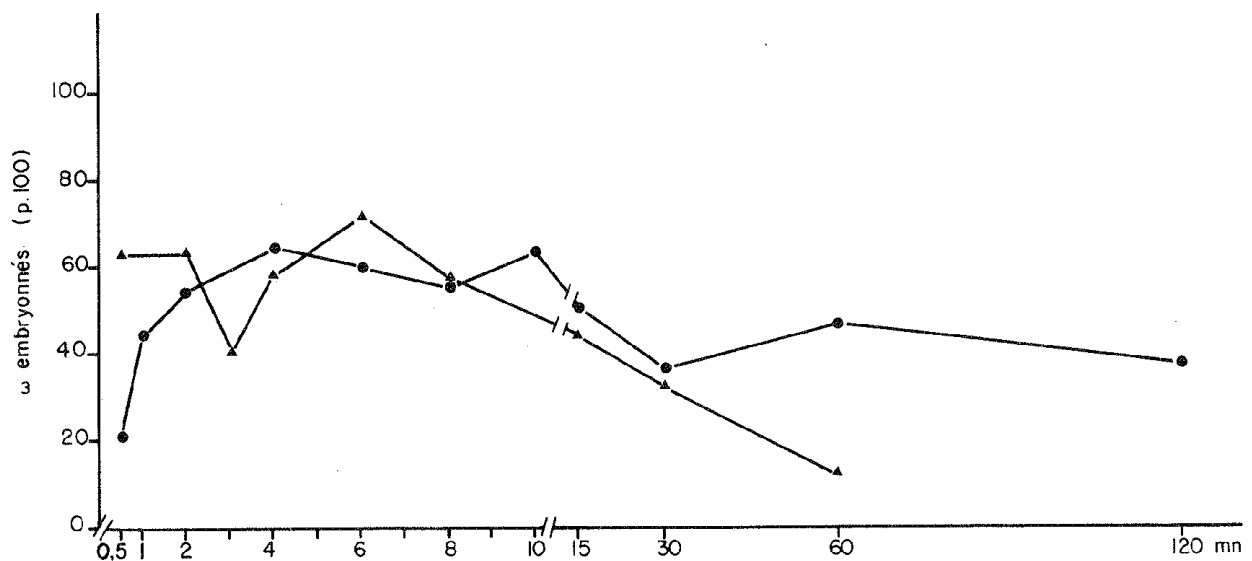


Figure 8. — Evolution des pourcentages de fécondation d'œufs laissés dans le dilueur après insémination pendant des temps croissants ▲ et ● 2 répétitions.

#### 9. Effet de l'agitation des œufs après l'insémination

Une agitation appliquée sur des œufs de brochet après durcissement (une heure après insémination artificielle) ne provoque aucune modification du développement embryonnaire, quels que soient le mode et la durée de l'agitation. Les pourcentages d'œufs embryonnés à 50° jours sont identiques et même supérieurs à ceux des œufs non agités (fig. 9) (différence très significative  $P < 0,01$ ).

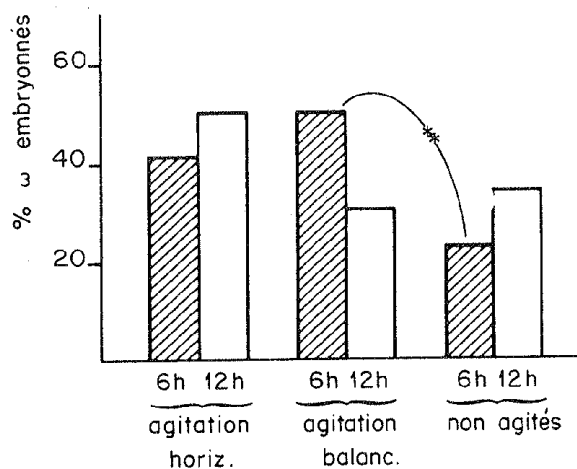


Figure 9. — Effet d'une agitation mécanique sur le développement embryonnaire d'œufs de brochet appliquée après la période de durcissement. Temps d'agitation 6 et 12 heures (signification statistique, cf. légende fig. 1).

## Discussion

### 1. Conservation des gamètes de brochet

La fertilité des gamètes de brochet laissés dans le tractus génital ou la cavité ovarienne de géniteurs morts est brève et n'excède pas 6 à 8 heures (fig. 1 et 3). Par contre, *in vitro*, les durées de survie sont plus longues : plus de 20 heures pour le sperme (fig. 2), 18 heures à sec et 30 heures dans une solution saline pour les ovules (fig. 3). Les durées de survie des gamètes de brochet sont donc extrêmement courtes en condition *post-mortem* et sensiblement plus courtes *in vitro* qu'*in vivo*. En effet De Montalembert *et al.* (1978) rapportent des durées de fécondabilité post-ovulation de 48 heures pour des ovules laissés à l'intérieur de la cavité ovarienne des femelles.

L'emploi de dilueur de conservation contenant du potassium améliore la durée de survie du sperme de brochet qui conserve son pouvoir fécondant pendant 27 heures (fig. 2). Ces durées de survie du sperme de brochet en condition *in vitro* sont comparables à celles obtenues chez la carpe (36 et 48 heures, Marcel non publié), mais inférieures à celles obtenues avec le sperme de truite (3 à 4 jours, Marcel *et al.*, 1982). Les ovules de brochet montrent une aptitude à la conservation identique à celle du sperme, alors que la survie du sperme est en général plus longue que celle des ovules chez les autres espèces : 6 heures pour les ovules de carpe (Marcel, non publié), 24 heures pour les ovules de truite arc-en-ciel avec de fortes variabilités individuelles (Marcel *et al.*, 1982), 4 heures pour le sperme et 2 heures pour les ovules chez le hareng (Alderdice et Velsen, 1978), 97 heures et 48 heures respectivement pour le sperme et les ovules de saumon *Oncorhynchus masou* (Nakano et Nazawa, 1925).

Ces observations peuvent être reliées aux importants besoins en oxygène des gamètes et principalement du sperme, tant pendant leur transit dans le tractus génital que lors de leur conservation après prélèvement. La consommation en

oxygène est estimée à 21 mm<sup>3</sup> d'O<sub>2</sub>/heure/ml de sperme à une température de 10° C chez la truite, alors que la consommation des ovules à la même température est de 2 mm<sup>3</sup> d'O<sub>2</sub>/heure/ml d'ovules (Okada *et al.*, 1956). Cette différence peut être reliée à la concentration élevée du sperme en spermatozoïdes (19.10<sup>9</sup>/ml de sperme chez le brochet). Très rapidement après la mort des géniteurs, les spermatozoïdes se trouvent en anoxie ce qui entraîne une chute du pouvoir fécondant (Truscott *et al.*, 1968 ; Stoss *et al.*, 1978 ; Billard, 1980). Par contre nos conditions de stockage des gamètes *in vitro* (récipients à large fond permettant une faible épaisseur de gamètes) sont favorables à l'oxygénation du sperme. Il semble que ce dernier paramètre soit cependant moins important pour la survie des ovules puisque Morley et Withler (1969) conservent des ovules sur une épaisseur de 53 cm pendant 30 minutes et obtiennent 93 p. 100 de fécondation.

Parmi les autres facteurs susceptibles d'intervenir dans la survie des gamètes, les milieux d'accompagnement se montrent d'une extrême importance. Les gamètes conservés à sec sont en réalité en présence de leur liquide séminal ou coelomique et dans le cas de la conservation des ovules de brochet en milieu salin, le liquide coelomique a conservé son rôle protecteur puisque lorsque la dilution est 5 fois plus forte, la survie des ovules ne dépasse pas 30 minutes (cf. fig. 3 et 5). Par contre, les ovules de morue perdent leur fécondabilité après une durée d'exposition de 6 heures dans l'eau de mer (Davenport *et al.*, 1981). D'autre part, la mise au point de milieux faisant intervenir du potassium (Billard, 1975a ; Baynes *et al.*, 1981) et du sucrose (Billard, 1980), permet d'inhiber la motilité des spermatozoïdes.

## 2. Essais d'amélioration de la technique d'insémination artificielle du brochet

L'emploi de dilueurs d'insémination à base de NaCl pour les gamètes de brochet augmente les durées de fécondabilité qui deviennent très supérieures à celles enregistrées après mélange des gamètes dans l'eau douce. Dans le dilueur, les spermatozoïdes de brochet conservent leur pouvoir fécondant pendant 2 à 4 minutes (fig. 4) et l'aptitude à la fécondation des ovules est maintenue pendant 30 minutes (fig. 5). Mis à part cette conservation particulièrement longue des ovules de brochet confirmée par ailleurs par l'expérience conservation des ovules (fig. 3), les durées de survie sont sensiblement identiques entre les deux gamètes, avec un léger avantage pour les ovules. Au cours de l'insémination, la pression osmotique compatible avec un taux de fécondation satisfaisant se situe entre 150 et 250 milliosmoles (fig. 6), et cette pression osmotique optimale est proche de celle du liquide séminal.

Les propriétés des solutions salines se manifestent par une prolongation de la motilité des spermatozoïdes et par un retard de l'activation de l'œuf qui se produit immédiatement au contact de l'eau douce en réponse au choc osmotique. Dans les expériences rapportées ici, la prolongation de survie des ovules placés dans un dilueur développant une pression osmotique de 250 milliosmoles laisse supposer que l'activation de l'œuf ne s'est produite qu'au

contact du spermatozoïde et que le processus de réaction corticale est différé dans les solutions salines comme l'avaient signalé Szöllösi et Billard (1974). La durée de motilité du sperme n'a pas été contrôlée ici, mais on sait par ailleurs qu'elle peut atteindre 3 à 5 minutes après dilution dans des solutions salines (Billard, 1978 ; de Montalembert *et al.*, 1978). La durée de motilité des spermatozoïdes est extrêmement brève lorsqu'ils sont placés dans l'eau douce ou l'eau de mer : 1 minute chez le brochet, 1,5 minute chez la carpe, 30 secondes chez la truite après dilution dans l'eau douce, 2 minutes chez la daurade et le bar, après dilution dans l'eau de mer (Ginsburg, 1968 ; Billard, 1978). Les limites de l'osmolalité d'un dilueur permettant soit l'inhibition, soit une augmentation de la motilité du sperme sont strictes et différent selon les espèces (Morizawa et Suzuki, 1980). Ces auteurs rapportent des pressions osmotiques de 100 milliosmoles pour le sperme de poisson rouge, et 0 à 500 milliosmoles pour celui des salmonidés. Une prolongation de la durée de motilité des spermatozoïdes en présence de solutions salines est rapportée chez les salmonidés (Ellis et Jones, 1939 ; Nomura, 1964 ; Petit *et al.*, 1973 ; Billard *et al.*, 1974), le brochet (De Montalembert *et al.*, 1978 ; Billard 1978), les poissons marins : la morue *Gadus morhua macrocephalus* et la limande *Limanda yokohamae* (Morizawa et Suzuki, 1980), ainsi que le hareng (Dushkina, 1973). Mais dans ces derniers cas, l'osmolalité permettant une prolongation de la durée de la motilité doit être supérieure à celle des liquides séminaux, contrairement aux poissons d'eau douce. Cette dernière observation peut être étendue aux gamètes de hareng qui montrent des pourcentages de fécondation élevés aux fortes salinités (Holliday et Blaxter, 1960). Selon Ginsburg (1968), le fait que la motilité soit plus brève et plus intense dans l'eau douce serait dû au choc osmotique et la motilité plus longue dans les solutions salines résulterait d'une moindre dépense énergétique pour la régulation osmotique. Le caractère bref de la motilité des spermatozoïdes reste cependant un phénomène général chez les poissons, même dans des solutions salines sensiblement isotoniques. Cela peut être dû au caractère primitif du spermatozoïde et à une pièce intermédiaire particulièrement réduite (Billard, 1970 ; Mattéi, 1970), mais il faut signaler des augmentations importantes de durées de motilité obtenues avec addition de théophylline au sperme de truite (Billard, 1981) ou d'AMP cyclique à des flagelles dépourvues de membrane plasmique chez la truite et le carassin (Morizawa et Okuno, 1981).

Les gamètes de brochet se montrent également sensibles aux variations de pH du milieu dans lequel ils sont placés, et le dilueur tamponné à pH 9 se montre le plus favorable (fig. 6). La valeur de ce paramètre est supérieure à celle enregistrée après mesure du pH du liquide séminal. Les variations de pH semblent intervenir, comme la pression osmotique, sur le temps de motilité du sperme, lequel est prolongé dans une solution à haut pH (Duplinsky, 1982). Chez la truite, un pH du dilueur supérieur à celui du liquide séminal entraîne des pourcentages de fécondation élevés et une prolongation de la motilité des spermatozoïdes (Baynes *et al.*, 1981), alors qu'un pH plus bas a un effet défavorable (Inaba *et al.*, 1958 ; Petit *et al.*, 1973). De même Kamaldeep et Toor (1980) retrouvent sur les œufs de carpe les effets défavorables des pH limites (5,8 — 10,8) et en particulier, les pH acides. Ce phénomène peut en partie



être relié aux propriétés très générales de la fécondation qui s'effectue avec une élévation du pH interne de l'œuf (Epel, 1980) mais qui peut concerner le pH interne du spermatozoïde. Par contre, nous ne retrouvons pas au niveau du dilueur l'effet inhibiteur d'un pH proche de celui du liquide séminal rapporté chez la truite par Schlenck (1933), Schlenck et Kahmann (1937) et Hamor (1966).

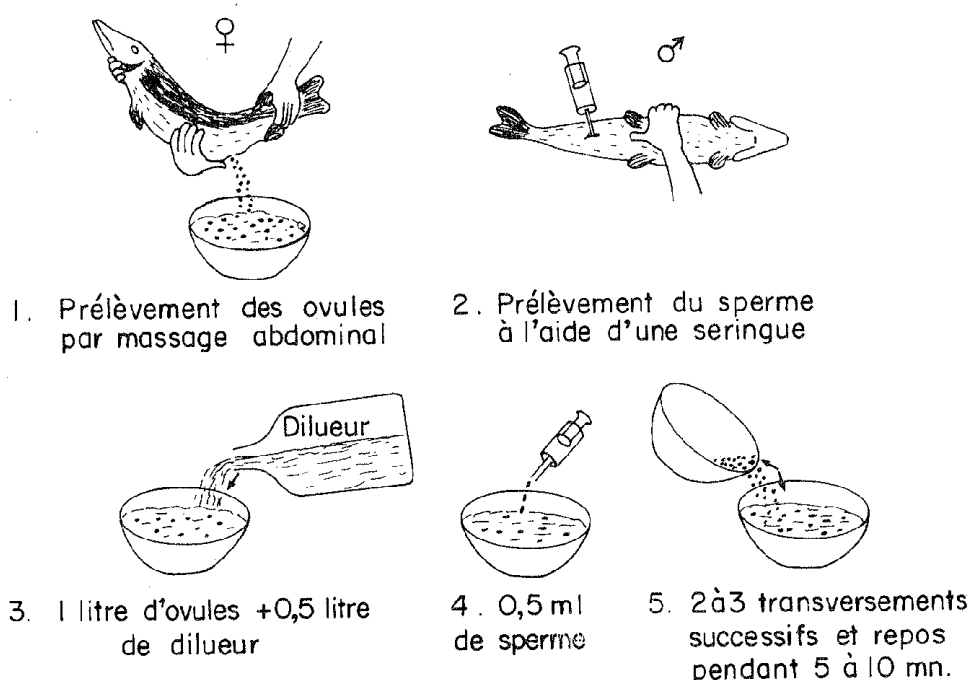
L'emploi de dilueurs d'insémination permet des taux de dilution du sperme élevés et des pourcentages de fécondation satisfaisants sont obtenus après insémination aux taux de dilution de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , les dilutions limites se situant à  $10^{-3}$ . Les faibles taux de dilution n'améliorent pas les pourcentages de fécondation, sauf lorsque les gamètes sont de qualité médiocre. Le rapport optimum volume de dilueur/volume d'ovules est de 0,5 ou 1 (fig. 7) et autorise des économies importantes de sperme (1 l d'ovules, 0,5 l de dilueur et 0,5 ml de sperme). Des valeurs comparables ont été trouvées chez la carpe (Marcel, non publié). L'emploi d'aussi faibles quantités de sperme n'est pas retrouvé dans la littérature et Bakos *et al.* (1976) préconisent 10 ml de sperme pour féconder un litre d'ovules de carpe sans utilisation de dilueur. Une dilution des ovules importante (1/5) conduit à une diminution de la survie des ovules (cf. fig. 2 et 5). Au taux de dilution de  $10^{-3}$ , le nombre de spermatozoïdes nécessaires pour féconder un ovule de brochet est de 300 à 700 000 (cf. tabl. 1), ce qui est du même ordre de grandeur que chez la truite (Billard *et al.*, 1974; Billard et Carpentier 1974; Billard, 1975b). Par contre, ce nombre est plus faible chez la carpe (30 000, Marcel, non publié). Il semble aussi que le nombre de spermatozoïdes diminue avec la taille des œufs. Ce nombre ne présente pas un intérêt majeur dans la pratique piscicole, et on se réfère plus souvent au volume de sperme à mettre en œuvre lors de l'insémination artificielle. Il est cependant intéressant de le mentionner car ces chiffres sont très élevés si l'on considère le mode de fécondation des gamètes, placés en contact direct. Il faut noter que la pénétration du spermatozoïde ne peut se faire qu'à un point précis de l'ovule, le micropyle. Or durant sa vie active, le spermatozoïde de truite ne parcourt que 2,5 mm (Schlenck et Kahmann, 1937) et la distance la plus éloignée du micropyle se trouve à 8 mm. Chez le brochet, cette distance est de 5 mm et chez la carpe de 2,5 mm. A supposer que les spermatozoïdes de brochet et de carpe parcourent des distances comparables à ceux de la truite, on peut penser que la probabilité pour un spermatozoïde d'atteindre le micropyle dépend de la taille de l'œuf.

## Conclusion

Les durées de conservation *in vitro* des gamètes mâles et femelles de brochet sont sensiblement identiques, de sorte que le premier gamète prélevé au cours des opérations d'insémination artificielle peut être indifféremment le sperme ou les ovules. Ils seront conservés à une température de l'ordre de 4°C dans l'attente de l'insémination artificielle, à l'intérieur de récipients permettant

une bonne oxygénation. Le prélèvement de gamètes sur des géniteurs morts ne peut être réalisé que pendant les quelques heures qui suivent la mort des animaux.

Le dilueur d'insémination mis au point pour le brochet présente un pH de 9 et une pression osmotique de 250 milliosmoles/kg. L'utilisation de ce dilueur est compatible avec un certain nombre d'exigences de la physiologie des gamètes et des processus de fécondation. La prolongation de la survie des ovules et de la durée de la motilité du sperme autorise la mise en œuvre d'un nombre réduit de spermatozoïdes. L'opération qui consiste à mélanger d'abord les ovules et le dilueur permet une répartition plus homogène des spermatozoïdes lorsque ceux-ci sont ajoutés au mélange (fig. 10). D'autre part, ce dilueur d'insémination a la propriété d'inhiber ou de limiter la formation de la couche collante des œufs lors de leur contact avec l'eau douce.



**Figure 10.** — Schéma du déroulement des opérations d'insémination artificielle du brochet :

1. les ovules sont d'abord prélevés (durée de vie légèrement supérieure à celle des spermatozoïdes) dans des cuvettes. La femelle est placée très près du récipient afin d'éviter une chute des ovules dans ce dernier ;
2. le sperme est ensuite prélevé à l'aide d'une seringue ou d'une pipette si la quantité de sperme est très faible ;
3. le dilueur d'insémination est ajouté aux ovules dans une proportion de 0,5 l de dilueur pour 1 litre d'ovules ;
4. aussitôt le sperme est ajouté en quantité connue : dilution de  $10^{-3}$ , soit 0,5 ml de sperme pour 0,5 l de dilueur ;
5. simultanément, le mélange est transvasé délicatement 2 à 3 fois pour permettre une bonne répartition des spermatozoïdes dans le mélange dilueur-ovules ; puis les œufs sont laissés en présence du dilueur et du sperme pendant 5 à 10 minutes, temps pendant lequel la fécondation peut encore avoir lieu.

## Remerciements

*Ce travail a bénéficié d'une aide du Conseil Supérieur de la Pêche et du Club Halieutique Interdépartemental. Nous remercions d'autre part Monsieur le Professeur Delsol pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail.*

## Références bibliographiques

- ALDERDICE D.F., VELSEN F.P.J., 1978. Effects of short-term storage of gametes on fertilization of pacific herring eggs. *Helg. wiss. Meer.*, **31**, 485-498.
- BAKOS J., HORVATH L., JACZO I., SZALAY M., TAMAS G., 1976. Comportement lors de la reproduction des principaux poissons d'élevage de la zone de la CECPI et problèmes de maturation sexuelle en captivité. EIFAC, Tech. Pap. N° 25, 25-42.
- BAYNES S.M., SCOTT A.P., DAWSON A.P., 1981. Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, spermatozoa : effects of cations and pH on motility. *J. Fish Biol.*, **19**, 259-267.
- BILLARD R., 1970. Ultrastructure comparée de spermatozoïdes de quelques poissons téléostéens. *Quaterdo*, **137**, 71-79, Baccetti Edt.
- BILLARD R., 1975a. L'insémination artificielle de la truite arc-en-ciel. IV. Effets des ions K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> sur la conservation du pouvoir fécondant des gamètes. *Bull. fr. Piscic.*, **256**, 88-100.
- BILLARD R., 1975b. L'insémination artificielle de la truite arc-en-ciel. V. Effets de la dilution et définition du rapport optimum gamètes/dilueur. *Bull. fr. piscic.*, **257**, 121-135.
- BILLARD R., 1977. Utilisation d'un système TRIS-Glycocolle pour tamponner le dilueur d'insémination de truite. *Bull. fr. Piscic.*, **264**, 102-112.
- BILLARD R., 1978. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture*, **14**, 187-198.
- BILLARD R., 1980. Survie des gamètes de truite arc-en-ciel après dilution dans des solutions salines ou de sucrose. *Nutr. Reprod. Dev.*, **20**, 1899-1905.
- BILLARD R., 1981. Prolongation de la durée de motilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes de truite arc-en-ciel par addition de théophylline au milieu de dilution. *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, **291**, 649-652.
- BILLARD R., CARPENTIER, 1974. Détermination du nombre optimum de spermatozoïdes nécessaires à la fécondation d'un ovule au cours de l'insémination artificielle de la truite. *Bull. fr. Piscic.*, **251**, 73-76.
- BILLARD R., DEBRUILLE M., GERARD J.P., DE MONTALEMBERT G., 1976. L'insémination artificielle du brochet. *Bull. fr. Piscic.*, **262**, 30-34.
- BILLARD R., JALABERT B., 1974. L'insémination artificielle de la truite arc-en-ciel. II. Comparaison des effets de différents dilueurs sur la conservation de la fertilité des gamètes avant et après insémination. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **14**, 601-610.
- BILLARD R., MARCEL J., DE MONTALEMBERT G., 1983. Stimulation de la spermiation chez le brochet (*Esox lucius*). 109-132, in R. Billard, *Le Brochet : gestion dans le milieu naturel et élevage*, INRA Publ. Paris.
- BILLARD R., PETIT J., JALABERT B., SZÖLLÖSI D., 1974. Artificial insemination in trout using a sperm diluent. Symposium on the early life history of fish. OBAN, Blaxter Edt., 715-723.
- DAVENPORT J., LONNING S., KJORSVIK E., 1981. Osmotic and structural changes during early development of eggs and larvae of the cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish Biol.*, **19**, 317-331.
- DUPLINSKY P.D., 1982. Sperm motility of northern pike and chain pickerel at various pH values. *Trans. am. Fish. Soc.*, **111**, 768-771.
- DUSHKINA L.A., 1973. Influence of salinity on eggs, sperm and larvae of low-vertebral herring reproducing in the coastal waters of the Soviet Union. *Mar. Biol.*, **19**, 210-223.
- ELLIS W.G., JONES J.W., 1939. The activity of the spermatozoa of *Salmo salar* in relation to osmotic pressure. *J. exp. Biol.*, **16**, 530-534.
- EPEL D., 1980. Fertilisation. Dans : *Endeavour*, New Series, **4**, 26-31.
- GINSBURG A.S., 1968. Differences in morphology and properties of gametes in fishes and their importance for the elaboration of adequate methods of artificial insemination. VI<sup>e</sup> Congr. Intern. Repro. Artif., Paris, 1037-1040.
- HAMOR T., 1966. A study of the genital product of the brown trout (*Salmo trutta* L.) and the rainbow trout (*Salmo irideus* Gibbons) (en hongrois). *Allatt. Kozl. Magy.*, **43**, 63-68.
- HOLLIDAY F.G.T., BLAXTER J.H.S., 1960. The effects of salinity on the developing eggs and larvae of the herring. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **39**, 591-603.
- INABA D., NOMURA M., SUYAMA M., 1958. Studies on the improvement of artificial propagation in trout culture. II. On the pH value of eggs, milt, coelomic fluid and others. *Bull. jpn. Soc. sci. Fish.*, **23**, 762-765.

- KAMALDEEP K., TOOR H.S., 1980. Role of abiotic factors in the embryonic development of scale carp. *Proc. Indian natl. Sci. Acad.*, **46**, 136-148.
- LEGENDRE M., BILLARD R., 1980. Cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.). *Bull. fr. Piscic.*, **278**, 11-33.
- MARCEL J., BILLARD R., MATEI D., 1982. Conservation des gamètes de truite arc-en-ciel et fario en conditions *in vitro* et *post mortem*. *Bull. fr. Piscic.*, **284**, 155-161.
- MARIE D., 1979. Conception, réalisation et gestion d'un circuit fermé en pisciculture. Mémoire D.E.S., Univ. Paris VI, 14 p.
- MATTEI X., 1970. Spermiogénèse comparée des poissons. Comparative spermatology, *Quarterno*, **137**, 57-70, Baccetti Edt.
- DE MONTALEMBERT G., BRY C., BILLARD R., 1978. Control of reproduction in northern pike (*Esox lucius*). *Am. Fish. Soc., Spec. Publ.*, **11**, 217-225.
- DE MONTALEMBERT G., MARCEL J., BILLARD R., 1980. La spermiation chez le brochet. I. Evolution de la quantité de sperme récolté au cours de la saison de reproduction. *Bull. fr. Piscic.*, **276**, 90-103.
- MORIZAWA M., OKUNO M., 1981. Cyclic AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiate motility. *Nature*, **296**, 703-704.
- MORISAWA M., SUZUKI K., 1980. Osmolality and potassium ion :their role in initiation of sperm motility in teleosts. *Sciences*, **210**, 1145-1147.
- MORLEY R.B., WITHLER F.C., 1969. Observations on sockeye and pink salmon ova and milt relative to spawn collection. *Fish. Res. Board Can.*, **111**, 1-11.
- NAKANO S., NOZAWA A., 1925. On the vitality of the eggs and sperm on *Oncorhynchus masou* (land-locked). *J. Imp. Fish. Inst.*, **XXI**, 17.
- NOMURA M., 1964. Studies on reproduction of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, with special reference to egg taking. VI. The activities of spermatozoa in different diluents, and preservation of semen. *Bull. jpn. Soc. sci. Fish.*, **30**, 723-733.
- OKADA S., ISHIKAWA Y., KIMURA G., 1956. On the viability of the sperm and the egg left in the dead body of Dog-salmon *Oncorhynchus keta*. *W. Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatch.*, **11**, 7-18.
- PETIT J., JALABERT B., CHEVASSUS B., BILLARD R., 1973. L'insémination artificielle de la truite arc-en-ciel. I. Effets du taux de dilution, du pH et de la pression osmotique du dilueur sur la fécondation. *Ann. Hydrobiol.*, **4**, 201-210.
- POUVREAU M., MAISSE G., JALABERT B., BRETON B., 1983. Relation entre la position du noyau ovocytaire au moment de l'hypophysation et le succès du traitement chez le brochet (*Esox lucius*). 85-95, in R. Billard, *Le Brochet : gestion dans le milieu naturel et élevage*, INRA Publ., Paris.
- SCHLENK W., 1933. Spermatozoenbevegung und Wasserstoffionenkonzentration Versuche mit dem Sperma der Regenforellen. *Biochem. Z.*, **265-266**, 29-35.
- SCHLENK W., KAHMANN H., 1937. Die chemische Zusammensetzung des spermaliquors und ihre physiologische Bedeutung. Untersuchung am Forellensperma. *Biochem. Z.*, **295**, 283-301.
- STOSS J., BÜYÜKHATIPOGLU S., HOLTZ W., 1978. Short term and cyropreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **18**, 1077-1082.
- SZÖLLÖSI D., BILLARD R., 1974. The micropyle of trout eggs and its reaction to different incubation media. *J. Microsc.*, **21**, 55-62.
- 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.