HAL open science

Stimulation de la spermiation chez le brochet (Esox lucius)

Roland Billard, Jacqueline Marcel, G. de Montalembert

To cite this version:

Roland Billard, Jacqueline Marcel, G. de Montalembert. Stimulation de la spermiation chez le 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-01600685

HAL Id: hal-01600685

https://hal.science/hal-01600685v1

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

R. Billard, Ed. *Le Brochet : gestion dans le milieu naturel et élevage,* INRA Publ., Paris, 1983, 109-132.

Stimulation de la spermiation chez le brochet *(Esox lucius)*

R. BILLARD, Jacqueline MARCEL * et G. DE MONTALEMBERT

I.N.R.A., Laboratoire de Physiologie des Poissons, F 78350 Jouy-en-Josas

Résumé

La quantité de spermatozoïdes produits au cours d'un cycle reproducteur annuel (production spermatogénétique) est mesurée sur de jeunes brochets mâles de 1 an effectuant leur première reproduction. Les valeurs trouvées varient entre 400 et 800 milliards de spermatozoïdes par kg de poids corporel. Lorsque des mâles sont confinés en bassin en écloserie, la quantité de spermatozoïdes récoltés (spermiation normale) est faible — de l'ordre de 1 p. 100 de la production spermatogénétique —. Lorsque les mâles sont placés en petits étangs enherbés de 400 m² les quantités récoltées sont plus importantes mais varient fortement suivant les individus — entre 27 et 710 milliards de spermatozoïdes/kg —. L'administration de divers extraits gonadotropes hypophysaires (extraits hypophysaires bruts de carpes (EHB_c), gonadotropine de saumon partiellement purifiée (GSPP) et hypophyses fraîches de brochet (HFP), augmente sérieusement la quantité de spermatozoïdes émis — jusqu'à 10 p. 100 de la production spermatogénétique — après une seule injection. La durée de la réponse est proportionnelle à la dose et varie entre 8 et 24 jours. Une seconde injection est pratiquée sur un groupe et entraîne une réponse plus importante que la première suggérant un effet de sensibilisation du testicule à une première injection ; l'injection de LH-RHa (D Try^6 des gly^{10}) n'est pas suivie d'effet.

Les spermatozoïdes résultant d'une spermiation stimulée présentent un pouvoir fécondant comparable à celui d'une spermiation normale. Le dosage des quantités de s-GTH reprises dans la circulation a été réalisé par RIA et montre que la reprise est plus rapide et plus forte dans le cas de GSPP que d'extraits hypophysaires bruts de saumon administrés à quantité égale de s-GTH.

Le sperme subsistant dans les testicules montre un pouvoir fécondant comparable à celui du sperme « éjaculé ».

Les conclusions pratiques de ce travail montrent que la technique de stockage de mâles en petits étangs enherbés de 400 m² permet, avec des prélèvements hebdomadaires, de collecter des quantités de sperme non négligeables (1,3 ml par kg de mâle et par semaine), et qu'elle est utilisable par l'ésociculteur qui dispose d'étangs de stockage.

Cependant cette technique peut ne pas être suffisante pour couvrir les besoins en sperme à la fin de la période de reproduction. L'ésociculteur peut avoir recours à une stimulation gonadotrope à l'aide de préparations hypophysaires de truite ou de carpe ou même de broyats hypophysaires de brochet (l'injection de 1 mg de poudre hypophysaire de carpe permet une production quotidienne moyenne de près de 100 µl/j et par kg de poids pendant 2 semaines ; après quoi l'injection peut être réitérée. Du fait que les spermatozoïdes intratesticulaires sont fécondants il est possible de sacrifier des mâles et de procéder à l'insémination avec des broyats testiculaires.

---

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

Summary. *Stimulation of spermiation in pike* (Esox lucius *L.*)

The number of spermatozoa produced during one annual reproductive cycle (spermatogenetic production) was measured on young, 1-year old male pike in their first reproduction. The values obtained varied between 400 and 800.10^9 spermatozoa per kg of body weight. When the males were confined to the hatchery tank, the number of spermatozoa recovered (normal spermiation) was low : about 1 % of the spermatogenetic production. When the males were put in small, grassy ponds 400 m^2, the number of spermatozoa recovered was high but varied greatly, depending on the individual (between 27 and 710.10^9 spermatozoa/kg). The administration of various pituitary gonadotropin extracts (carp crude pituitary extracts : EHB_c), partially purified salmon gonadotropin (GSPP) and fresh pituitary of pike (HFP) considerably increased the number of spermatozoa emitted (up to 10 % of spermatogenetic production) after a single injection. The duration of response was proportional to the dose and varied between 8 and 24 days. A second injection carried out on one group caused a higher response, suggesting that the first injection had sensitized the testis ; the injection of LH-RHa (D Try^6 des Gly^{10}) had no effect.

The fertilizing ability of the spermatozoa produced during stimulated spermiation was comparable to that of spermatozoa produced by normal spermiation. The amount of plasma s-GTH determined by RIA showed that GSPP acted more strongly and rapidly on spermiation than salmon crude pituitary extracts administered in the same quantity.

The fertilizing ability of spermatozoa remaining in the testis was comparable to that of ejaculated sperm.

The practical conclusion of this study is that the technique of stocking males in small, grassy ponds 400 m^2 permits the collection of rather large amouns of sperm (1.3 ml per kg of male/week), which can be used by the pike culturist who has stocking ponds.

However, this technique cannot cover the need for sperm at the end of the reproductive period. The pike culturist can use gonadotropic stimulation by trout or carp pituitary preparations or even ground pike pituitary ; the injection of 1 mg of carp pituitary powder gives a daily mean production of about 100 µl/day/kg of weight for two weeks, after which the injection must be renewed. Since intratesticular spermatozoa can fertilize, some males can be killed and their ground testes used to inseminate.

La quantité de sperme de brochet disponible en écloserie pour la pratique de l'insémination artificielle est souvent limitée. Diverses solutions s'offrent au pisciculteur : augmentation du nombre de mâles, économie de sperme en utilisant un dilueur d'insémination (Billard *et al.*, 1976 ; Marcel *et al.*, 1983, ce volume) ou stimulation du processus de spermiation par administration d'hormones. C'est ce dernier point qui sera examiné dans ce travail. On sait que chez le brochet les quantités de sperme émises naturellement sont faibles et que le rendement de la spermiation (p. 100 de spermatozoïdes récoltés par rapport à la quantité totale de spermatozoïdes dans le testicule) est mauvais. Les raisons de ce mauvais rendement de la spermiation sont mal connues. A cela s'ajoute le fait que le poids testiculaire (et par conséquent la quantité de spermatozoïdes disponibles) est faible. On s'attachera dans le présent travail à définir la quantité totale de spermatozoïdes présents dans les testicules et les possibilités de les utiliser directement après sacrifice des mâles (après vérification du pouvoir fécondant) ou de les extraire en plus grand nombre par supplémentations hormonales.

Matériel et méthodes

1. *Analyse histologique des testicules en période de préspermiation et de spermiation*

L'étude a été réalisée entre la fin de la spermatogenèse et la fin de la spermiation et a porté sur des brochets originaires du lac de Grand-Lieu (Loire-Atlantique, France) prélevés chaque mois entre décembre et avril. Les brochets sont capturés au filet par des pêcheurs professionnels et sont transportés au laboratoire à Jouy-en-Josas dans les deux jours. Ils sont stockés au laboratoire en eau recyclée (Petit, 1974) en attendant d'être sacrifiés. L'état de spermiation (quantité de sperme émis après pression abdominale) est vérifié. Un fragment de gonade est fixé dans le Bouin Hollande-acide acétique pendant 24 h. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline de Regaud-Orange G et bleu d'aniline.

2. *Evolution de la quantité de sperme recueilli au cours de la spermiation*

Cette partie résume une expérience conduite au Paraclet antérieurement publiée (Montalembert *et al.*, 1980).

L'objectif est d'obtenir une indication sur les quantités de sperme libérées spontanément en conditions de semi-captivité analogues à celles que pourrait présenter un stockage de mâles soumis à des prélèvements périodiques en écloserie. Tous les mâles mis en expérience sont en début de spermiation (apparition de sperme à l'orifice génital après pression abdominale). Entre le 10 février et le 31 mars, un étang de 400 m^2 dans lequel sont stockés 14 brochets mâles pesant entre 100 et 1 225 g est vidangé chaque semaine et les animaux sont capturés. Après anesthésie, tout le sperme susceptible d'être prélevé est recueilli à l'aide d'une pipette appliquée sur le pore génital, lors du massage abdominal. La pipette est d'une contenance de 0,5 ml et le volume du sperme est évalué à 10 µl près. La concentration en spermatozoïdes est mesurée à chaque prélèvement et pour chaque mâle par établissement du spermatocrite (Montalembert *et al.*, 1980). On mesure également des paramètres plus qualitatifs comme la durée et l'intensité de la motilité des spermatozoïdes émis. Une échelle arbitraire de motilité a été établie pour le brochet, allant de 0 (aucun spermatozoïde en mouvement) à 5 (forte activité de tous les spermatozoïdes), comme dans le cas de la truite (Sanchez-Rodriguez et Billard, 1977 ; Legendre et Billard, 1980). La durée de motilité correspond au temps pendant lequel on observe une activité égale ou supérieure à 1. La motilité est évaluée sous microscope (X 100) après dilution du sperme au 1/100 dans le dilueur d'insémination (Billard, 1977).

3. *Stimulation de la spermiation par supplémentation hormonale*

Il s'agit, dans cette série d'expériences, d'augmenter les disponibilités de sperme en utilisant diverses sources d'hormones : une gonadotropine partiellement purifiée de saumon disponible au laboratoire (GSPP), et des préparations

hypophysaires de carpe (EHC) classiquement employées pour l'hypophysation et disponibles sur le marché. Les potentialités des hypophyses fraîches de brochets (HFB) et d'un LH-RHa (D-Try^{6}-des Gly^{10}) — Clin-Midy — sont en outre évaluées. Les possibilités de stimuler la spermiation sont testées sur des mâles d'âges différents :

— des mâles âgés d'environ 1 an et effectuant leur premier cycle reproducteur et originaires de La Dombes (Ain). Le poids moyen est d'environ 270 g ;

— des mâles âgés de 2-3 ans ayant déjà effectué au moins un cycle reproducteur et originaires du domaine du Lindre (Moselle).

Un lot témoin de 10 individus est constitué dans chacun de ces deux groupes et ne reçoit que l'injection de solvant (solution de NaCl à 7 p. 1 000).

a) *Conditions de stockage*

Les conditions de stockage hivernal avant transport au laboratoire et mise en expérience sont les suivantes : stockage en bassin cimenté de 120 m^2 au domaine du Lindre, après la pêche d'étangs en novembre. La densité dans ce bassin est de 100 kg de géniteurs brochet, 100 kg de perches et 150 kg de carpes adultes environ. Du poisson fourrage a été distribué pendant la période de captivité. En Dombes, les géniteurs brochets sont élevés en permanence en étangs de production en association avec des carpes et gardons. Ils sont transportés au laboratoire dès leur capture (durée du transport environ 6 h). Dès leur arrivée au laboratoire, les animaux sont traités par balnéation au Neguvon (20 g/l) ou aux ammoniums quaternaires (4 mg/l) et stockés en bacs plastique de 120 l sexes séparés (à raison de 5 à 6 géniteurs par bassin) ou dans un « raceway » bétonné contenant 10 m^3 d'eau et cloisonné en plusieurs compartiments. Les bassins d'expérimentation sont alimentés en eau recyclée (Petit, 1974), et recouverts d'un couvercle ou film de plastique noir afin de placer les animaux à l'obscurité. Chaque manipulation est effectuée après anesthésie de l'animal (Phénoxy-Ethanol Merck, 0,5 ml/l d'eau), et suivie d'un traitement au vert de Malachite (1 mg/l pendant 30 secondes). La température de l'eau d'élevage au laboratoire oscille entre 8 et 13°C durant les expériences.

b) *Stimulation de la spermiation de jeunes mâles de* 1 *an*

Des lots de 9 à 11 mâles reçoivent les traitements suivants (voir tabl. 1) :

— *GSPP* : 4 lots (n° 1 à 4) sont constitués et reçoivent en une seule injection des doses de GSPP allant de 0,1 à 0,005 mg/kg de poids corporel. Cette préparation due à B. Breton est obtenue par extraction saline d'hypophyses lyophylisées de saumon (*Oncorhynchus tschawytscha*) dans un tampon Tris 0,05M NaCl, suivie d'une étape de chromatographie d'affinité sur colonne Concanavaline A Sépharose. L'activité biologique de GSPP est déterminée par le test biologique de maturation ovocytaire chez la truite (Jalabert *et al.*, 1974) et correspond à un équivalent s-GTH de 0,4 mg/mg de GSPP. Cette

Tableau 1. — Effets de la gonadotropine de saumon partiellement purifiée (GSPP), d'extraits hypophysaires bruts de carpe, d'hypophyses fraîches de brochet et d'un analogue du LH-RH sur la stimulation de la spermiation du brochet (mâles d'un an).

N° du lot	Traitement et dose (/kg de poids vif)	Poids moyen (g)	n	Vol. de sperme ($\bar{X} \pm$ DS) total	(µl) /kg/j	Spermatocrite ($\bar{X} \pm$ DS)	Durée de la réponse (jours)
A	Témoin	270	10	65 ± 55	12	36 ± 18	20
	GSPP						
1	0,1 mg	212	10	972 ± 341 **	218	25 ± 9 *	21
2	0,02 mg	229	10	368 ± 177 **	115	25 ± 7 *	14
3	0,01 mg	211	10	306 ± 099 **	145	27 ± 7 *	10
4	0,005 mg	228	10	325 ± 195 **	142	24 ± 10 *	10
	Extraits hypo. bruts de carpe						
5	3 mg	252	9	422 ± 277 **	120	30 ± 9	14
6	1 mg	276	10	339 ± 139 **	88	31 ± 7	14
7	0,5 mg	255	10	242 ± 091 **	68	30 ± 8	14
	Hypophyses fraîches de brochet						
8	14 mg	207	11	540 ± 393 **	186	32 ± 13	14
	LH-RHa						
9	10 µg × 3 injections	233	9	30 ± 25	19	26 ± 14	7
10	1 µg × 3 injections	203	10	49 ± 25	35	29 ± 13	7
11	0,1 µg × 3 injections	247	10	41 ± 20	24	29 ± 9	7

Signification statistique des différences par rapport au lot témoin A :
* $P < 0,05$; ** $< 0,001$.

préparation hormonale hypophysaire est, comme les suivantes, injectée par voie intrapéritonéale après mise en suspension dans une solution saline (NaCl 7 p. 1000).

— *EHC* : 3 lots (n° 5-6-7) sont constitués et reçoivent en une seule injection des doses de 3, 1 et 0,5 mg par kg de poids vif. Equivalent s-GTH : 17 µg/mg de poudre hypophysaire.

— *HFB* : un lot (n° 8) reçoit une injection d'une hypophyse broyée par mâle soit 14 mg de glande fraîche par kg de poids corporel. Les hypophyses administrées ont été prélevées au cours des différentes expérimentations sur des géniteurs mâles approximativement de même poids que les receveurs. Le prélèvement a lieu immédiatement après sacrifice de l'animal et l'hypophyse est congelée à — 20°C pour une conservation de quelques jours. Au moment de l'injection, l'hypophyse est décongelée et broyée.

— *LH-RHa :* 3 lots de 10 mâles reçoivent par voie intracardiaque 3 injections successives en 24 h à 12 h d'intervalle de 10 (n° 9), 1 (n° 10), 0,1 (n° 11) µg de LHRHa/kg de poids vif.

c) *Stimulation de la spermiation de mâles adultes* (cf. tabl. 2)

Un lot de 9 mâles (n° 12) reçoit une injection de 0,05 mg de GSPP/kg de poids vif par voie intrapéritonéale. Un autre lot (n° 13) reçoit une injection d'une hypophyse de brochet broyée pour 10 mâles soit 1,3 mg de glande fraîche par kg de poids corporel. Quatorze jours plus tard lorsque la production de sperme est revenue au niveau initial, une injection similaire est à nouveau pratiquée. Les hypophyses sont prélevées, stockées et préparées dans les mêmes conditions que pour le lot n° 8. Un lot témoin (B) ne reçoit que la solution saline.

d) *Evaluation de l'effet des traitements*

Dans tous les cas, le volume de sperme est mesuré périodiquement après l'injection avec, simultanément, établissement du spermatocrite afin de calculer le nombre de spermatozoïdes. Le volume de sperme recueilli et le nombre de spermatozoïdes sont exprimés en µl ou en milliards par kg de poids corporel. Dans la plupart des cas, les mâles sont sacrifiés en fin d'expérience et la quantité de spermatozoïdes restant dans les testicules est mesurée ce qui permet d'établir la production spermatogénétique et l'efficacité du traitement (p. 100 de spermatozoïdes extraits des testicules). La production spermatogénétique correspond à la quantité de spermatozoïdes produits dans les testicules par unité de temps. Chez les poissons comme le brochet où la spermatogenèse est très saisonnière, il est commode de l'exprimer par cycle, c'est-à-dire par an. La production spermatogénétique est établie par addition des spermatozoïdes récoltés pendant le traitement et des spermatozoïdes restant dans les testicules en fin d'expérience. Ces derniers sont dénombrés sur broyats testiculaires (passage d'un fragment de testicule de poids connu au broyeur ultraturax pendant 30 s dans une solution de NaCl à 7 p. 1000). La densité optique (DO) du broyat est ensuite mesurée au spectrophotomètre (Jouan 10 L) à $\lambda = 410$ nm et le nombre de spermatozoïdes est établi d'après une relation DO/nombre de spermatozoïdes déterminé directement par comptage à l'hématimètre. Les quantités de spermatozoïdes sont, ici aussi, exprimées par kg de poids corporel pour permettre une comparaison entre mâles de poids différents.

e) *Evaluation du pouvoir fécondant du sperme*

Le pouvoir fécondant du sperme ainsi obtenu après stimulation hormonale a été établi en procédant à l'insémination de lots de 200 ovules environ avec du sperme dilué au 1/1000 (10^{-3}) dans le dilueur précédemment décrit (Billard *et al.*, 1976 ; Billard, 1977) : solution de NaCl, Po 250 milliosmoles/kg, pH 9, (Tris 0,02 M, glycine 0,05 M). Le pourcentage de fécondation est estimé d'après le taux d'œufs embryonnés dénombrés après 5 jours d'incubation à 10°C. En raison des difficultés d'obtenir régulièrement des ovules de bonne qualité, le testage du pouvoir fécondant a souvent dû être répété, de sorte que les pourcentages de fécondation rapportés ne correspondent pas nécessairement

aux mâles sur lesquels les données quantitatives (volume de sperme, production spermatogénétique) ont été recueillies. La comparaison des pouvoirs fécondants est faite entre sperme obtenu après stimulation hormonale et sperme de mâles n'ayant reçu que la solution saline (témoins) ; en ce cas le volume de sperme est insuffisant pour pratiquer des tests individuels et les spermes des mâles témoins sont poolés et une seule insémination est pratiquée. Le test statistique utilisé est alors le χ^2.

Dans une expérience complémentaire, nous avons cherché à voir comment s'effectue la reprise de l'hormone gonadotrope de truite injectée par la circulation générale ; deux lots de mâles en fin de spermiation et originaires de Dombes sont injectés d'une quantité d'hormone GTH identique (25 µg/kg) présentée sous deux formes (GSPP et extraits hypophysaires bruts de saumon dont l'activité biologique est de 10 µg d'équivalent s-GTH/mg ; B. Jalabert, comm. pers.) :

— 7 mâles d'un poids moyen de 272 g reçoivent 0,05 mg de GSPP/kg de poids vif ;

— 8 mâles d'un poids moyen de 223 g reçoivent 2,5 mg d'extraits hypophysaires bruts de saumon/kg de poids vif.

Des prélèvements sanguins sont effectués au moment de l'injection, 4, 12, 24 heures, et 5 jours plus tard sur seringue héparinée (héparinate de sodium, 700 unités/ml). Après centrifugation, le plasma est congelé à — 20°C en vue du dosage radioimmunologique de la s-GTH, réalisé par B. Breton selon la méthode décrite pour la carpe (Breton *et al.*, 1971).

D'autre part, un prélèvement sanguin a porté sur le lot n° 12 dont la spermiation a été stimulée à l'aide de GSPP (dose 0,05 mg/kg de poids vif), 17 jours après l'application du traitement, afin de vérifier si les quantités de sperme encore élevées obtenues à cette époque pouvaient encore être dues à la présence de s-GTH (immunoréactive) dans la circulation.

4. *Sur les possibilités d'utiliser des spermatozoïdes intratesticulaires pour la fécondation d'ovules*

L'emploi de spermatozoïdes intratesticulaires après sacrifice des mâles constitue une ultime possibilité pour disposer de sperme pour l'insémination. Cette expérience a pour but de tester le pouvoir fécondant des spermatozoïdes intratesticulaires et de le comparer avec celui du sperme « éjaculé ». Le protocole comporte deux lots de mâles recevant ou non le traitement d'hypophysation (1 lot de 6 mâles reçoit 0,05 mg/kg de poids vif de GSPP et 1 lot de 5 mâles reçoit de la solution saline -témoin-). Deux jours après le traitement, les animaux sont sacrifiés et du sperme intratesticulaire est prélevé à 3 niveaux différents des testicules : la partie postérieure (directement au-dessus de l'orifice génital), la partie médiane et la partie antérieure. Un prélèvement de sperme par massage abdominal est en outre réalisé avant sacrifice des mâles et correspond au sperme accumulé dans le spermiducte. L'insémination est réalisée à la dilution de 1/1000 avec un « sperme intratesticulaire standardisé » ramené à la concentration de 17.10^9 spermatozoïdes par ml (DO = 0.30 ; fig. 1).

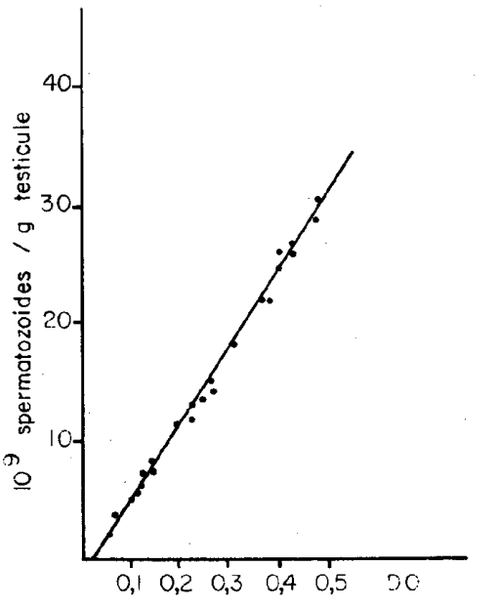


Figure 1. — Relation entre la densité optique du broyat testiculaire (X) et la concentration en spermatozoïdes (Y). Y = 65,28 × — 1,46.

5. *Analyse statistique des résultats*

Les valeurs moyennes rapportées dans les tableaux sont affectées de la déviation standard (DS). Les comparaisons sont faites par test t ou analyse de variance (quantités de sperme récolté, spermatocrite) et analyse de variance après transformation angulaire des données (pourcentages de fécondation) ou test X^2.

Résultats

1. *Analyse histologique des testicules en période de préspermiaton et de spermiation*

L'examen histologique des testicules de décembre montre que la spermatogenèse est achevée (Pl. I.1). Il n'existe que des spermatogonies de type A au repos localisées dans les cellules de Sertoli qui tapissent les lobules. Dans

⟶

Planche I. — Spermiation du brochet

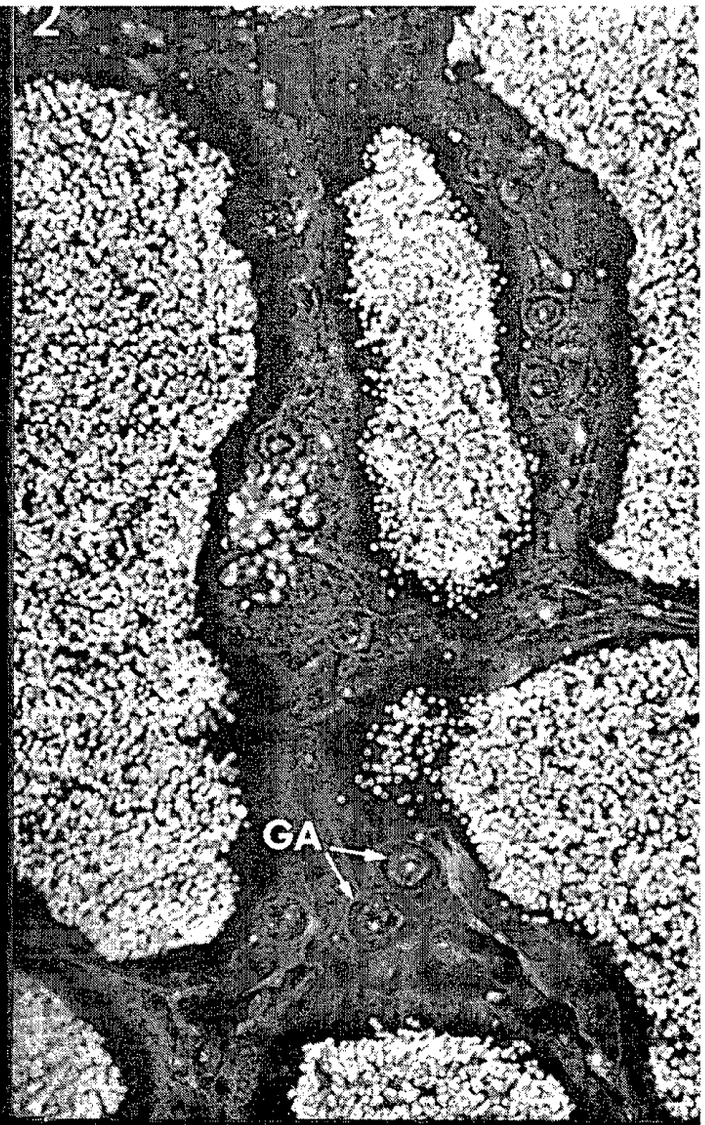
1 Brochet mâle (2 décembre), RGS : 2,8 p. 100 ; poids 131 g. Spermatogenèse achevée. Tout début de la spermiation. Des spermatozoïdes (Spz) sont en contact direct avec les cellules de Sertoli (sauf en quelques points — flèches —). GA spermatogonies A ; S couche de cellules de Sertoli (× 450).

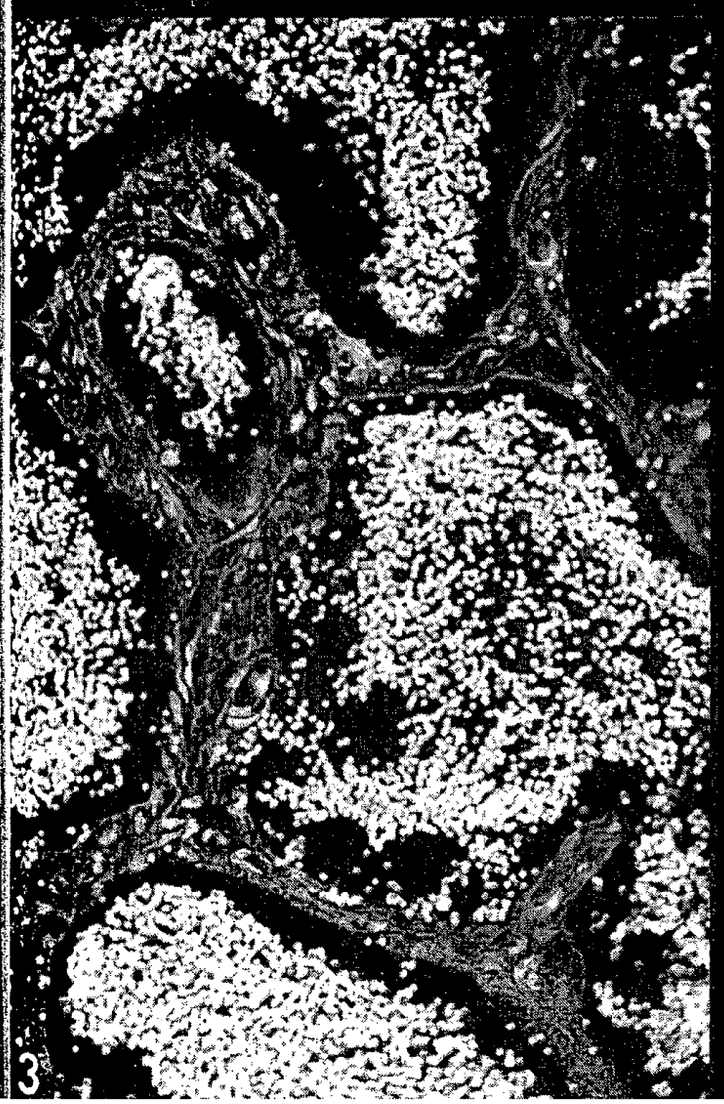
2 Brochet mâle (26 février), RGS : 1,64 p. 100. Les spermatozoïdes ne sont pas en contact avec la couche de cellules de Sertoli suggérant une sécrétion de matériel par ces dernières. GA spermatogonies A (× 450).

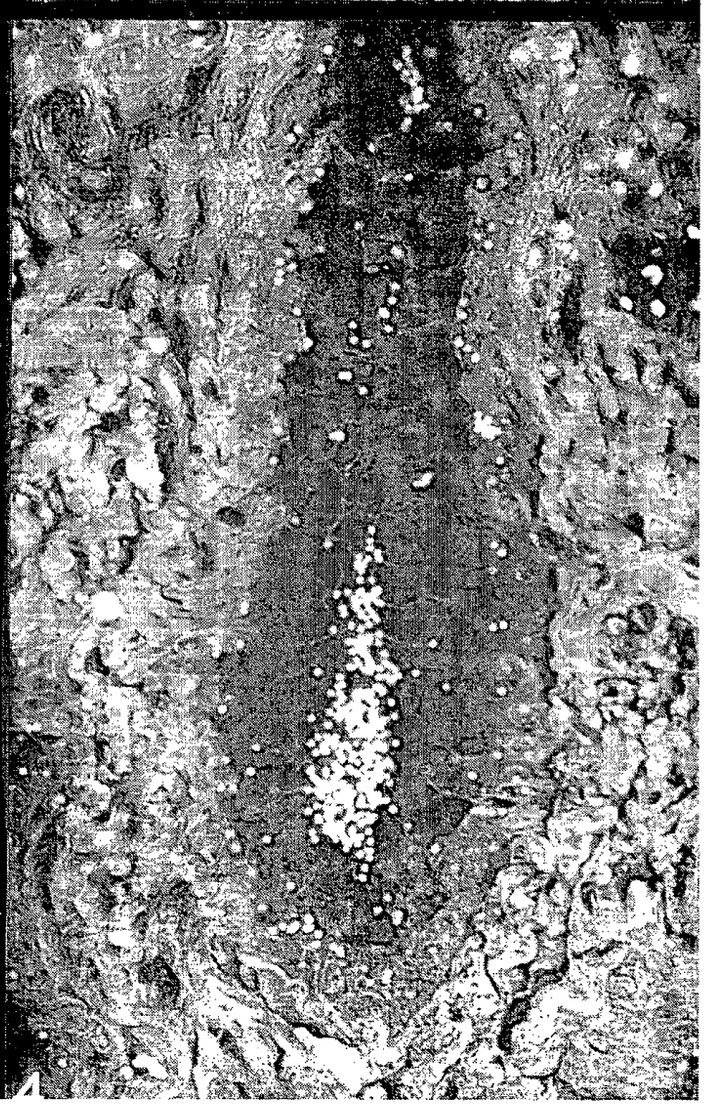
3 Brochet vers la fin de la période de spermiation (2 avril), RGS : 2,22 p. 100. La lumière des lobules est moins densement occupée par les spermatozoïdes (× 450).

4 Brochet dont la spermiation a cessé (2 avril), RGS : 2,94 p. 100. Spermatozoïdes résiduels dans la lumière du canal déférent (× 450).

1
Spz
Spz
GA
S


2
GA


3


4

ces derniers, on ne trouve que des spermatozoïdes qui occupent densement l'ensemble de la lumière. En périphérie de la lumière, les spermatozoïdes s'appliquent d'ailleurs directement sur les cellules de Sertoli dans la plupart des lobules. A cette époque, la spermiation est extrêmement faible, et seulement des traces de sperme apparaissent à l'orifice génital après pression abdominale. A l'autopsie, la quantité de spermatozoïdes présents dans le canal déférent apparaît extrêmement réduite. Plus tard, en février, la spermiation est plus importante et le rapport gonadosomatique (RGS) reste de l'ordre de 2 p. 100 comme en décembre. L'histologie du testicule est sensiblement différente et si les spermatozoïdes occupent encore densement le centre des lobules, ils sont séparés de la couche sertolienne par une zone libre qui correspond vraisemblablement à du matériel sécrété par ces cellules (Pl. I.2). En avril, la quantité de spermatozoïdes dans les lobules paraît moins importante (Pl. I.3), mais le rapport gonadosomatique demeure relativement élevé et voisin de 2. Les mâles ne sont plus en spermiation et le canal déférent est pratiquement dépourvu de spermatozoïdes (Pl. I.4).

2. *Quantité de sperme recueilli au cours de la spermiation de mâles stockés en étang de 400 m²*

Pendant la période de collecte du 10/2 au 31/3, c'est-à-dire pendant la période où la production de sperme est maximale, la quantité moyenne de sperme recueilli par semaine est de 0,5 ml/mâle, soit 1,35 ml/kg de poids vif (extrêmes 0,34 à 3,59), le spermatocrite moyen est de 42,4 p. 100 (extrêmes 34 à 50), soit une concentration moyenne de $21{,}5.10^9$ spermatozoïdes par ml de sperme. Les performances individuelles (fig. 2) sont extrêmement variables. Près de 50 p. 100 des mâles n'émettent que quelques centaines de microlitres de sperme (quelques gouttes) alors que les quantités augmentent pour les autres mâles au cours de la période de prélèvement, les valeurs maximales étant obtenues à la 5e semaine. La motilité (intensité et motilité) est maximale au début mars et tend à diminuer ensuite (fig. 2).

3. *Stimulation de la spermiation*

a) *Stimulation de mâles de* 1 *an* (tabl. 1)

— *Lot témoin.* Les animaux du lot témoin présentent juste des traces de spermiation à leur arrivée au laboratoire. Quatre jours après l'injection saline, tous les mâles spermient faiblement (fig. 3) ; à J_7, seulement 5 mâles produisent du sperme en quantité faible, et à J_{12} et J_{16}, il ne subsiste que deux mâles spermiant. La production de sperme émis s'élève à 10 µl/kg de poids corporel et par jour. Le spermatocrite est significativement plus élevé ($P < 0{,}05$) que dans les lots dont la spermiation est stimulée par GSPP (tabl. 1).

— *GSPP.* Dans tous les lots expérimentaux, la production de sperme augmente significativement ($P < 0{,}001$) par rapport au lot témoin (tabl. 1). Le volume de sperme collecté par jour et par kg de poids corporel est de 14

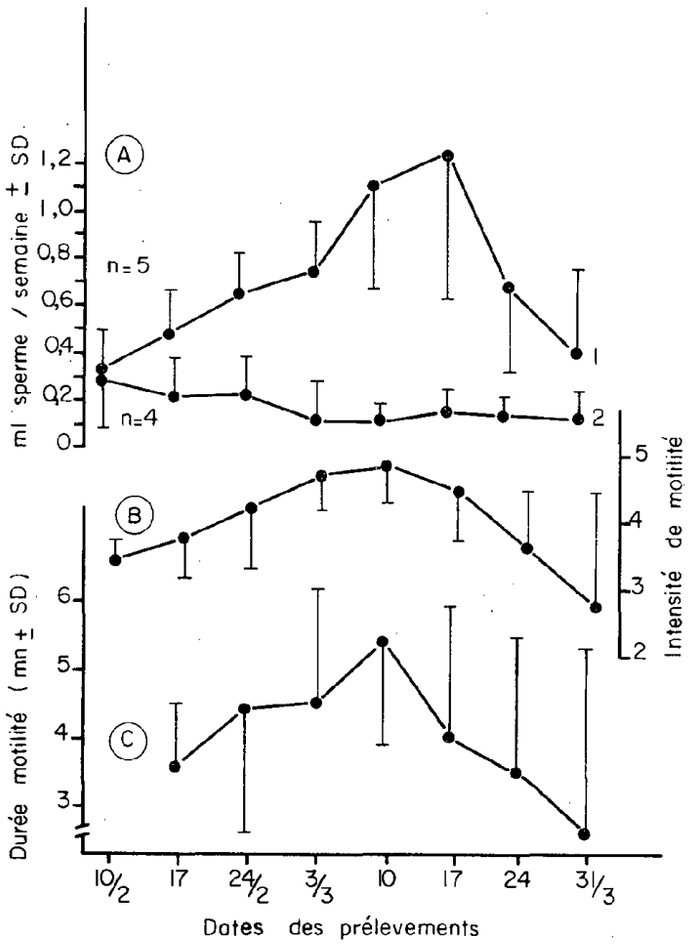


Figure 2. —Evolution quantitative et qualitative de la production de sperme de brochets stockés en étang de 400 m² et pêchés chaque semaine pendant 7 semaines. (Le poids des mâles varie entre 100 et 1 225 g).

A : volume de sperme 1) mâles montrant une élévation de la quantité récoltée ;
2) mâles dont la production reste stationnaire ou diminue.

Le volume de sperme est exprimé en ml recueilli par semaine et par mâle.

B : intensité de motilité ; échelle arbitraire de 0 à 5 (n = 5 mâles) ;

C : durée de motilité pour une intensité supérieure à 1 (n = 5 mâles).

à 28 fois plus important que dans le lot témoin et peut atteindre 218 µl/kg/jour pendant une période de prélèvement de 21 jours. Le maximum de réponse est obtenu 4 à 6 jours après injection et peut rester élevé pendant 15 à 20 jours avec de fortes variations individuelles. Les spermatocrites sont significativement plus bas que dans le lot témoin ($P < 0,05$) (tabl. 1).

— *Extraits hypophysaires bruts de carpe.* Après injection d'extraits hypophysaires bruts de carpes, la spermiation augmente significativement par rapport au lot témoin ($P < 0,001$) dans les 3 lots expérimentaux. Le volume de sperme collecté par kg de poids corporel et par jour est affecté d'un facteur 6 à 12 et atteint 120 µl/kg/jour dans le meilleur des cas (tabl. 1). La réponse au traitement est fonction de la dose injectée. Le maximum de réponse est obtenu 6 jours après l'injection et se maintient pendant 4 à 6 jours. Les spermatocrites des

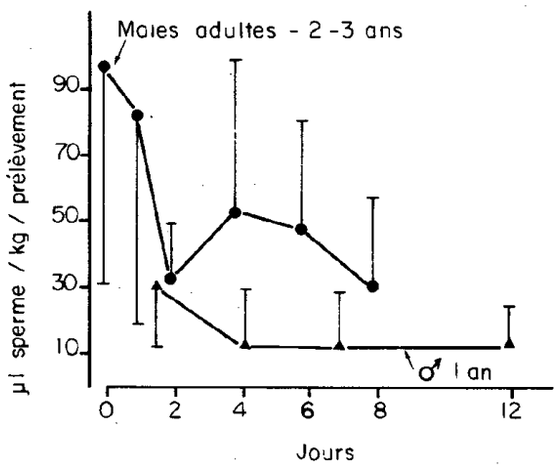


Figure 3. — Evolution de la quantité de sperme collectée sur deux lots de mâles témoins ayant reçu une injection de solution saline.
Lot A : mâles de 1 an ; lot B : mâles de 2 ans.

3 lots expérimentaux ne diffèrent pas significativement entre eux, ni avec le lot témoin (tabl. 1).

— *Hypophyses fraîches de brochet.* Après injection d'hypophyses fraîches de brochet, la production de sperme augmente significativement par rapport

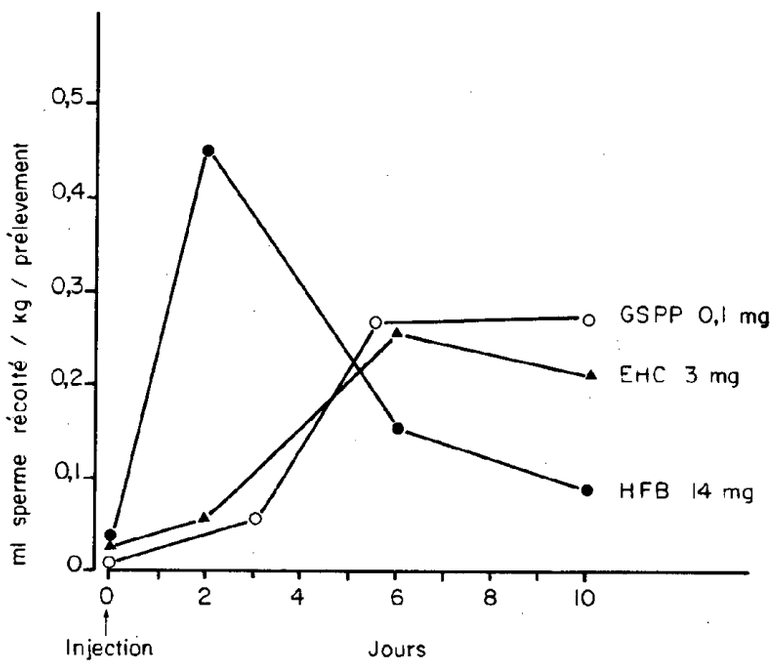


Figure 4. — Evolution de la spermiation de brochets d'un an après injection de gonadotropine de saumon partiellement purifiée (GSPP), des extraits hypophysaires bruts de carpe (EHC) et des hypophyses fraîches de brochet (HFB).

au lot témoin ($P < 0,001$). Le pic de spermiation est enregistré dès le 2e jour post-injection. La durée de réponse au traitement est de 14 jours et la production totale de sperme est 18 fois plus importante que dans le lot témoin, avec une production de sperme par jour et par kg de 186 µl. Le spermatocrite ne diffère pas significativement du groupe témoin. Une comparaison de la forme des réponses de quelques mâles pris dans les lots recevant les doses les plus élevées montre l'existence de différence entre l'hypophyse de brochet (réponse importante rapide et brève) et les autres préparations (réponse différée moins forte et plus soutenue) (fig. 4).

— *Stimulation par le LH-RHa.* Aucune réponse au LH-RHa injecté à 3 reprises pendant 24 h par voie intracardiaque, n'est décelée sur la spermiation du brochet (tabl. 1). Dans les trois lots expérimentaux, la production de sperme reste comparable à celle du lot témoin 7 jours après injection.

b) *Stimulation de mâles adultes* (tabl. 2)

— *Lot témoin.* Dans ce lot témoin, les mâles sont « spermiants » à leur arrivée au laboratoire (fig. 3). La production de sperme chute considérablement après 2 jours de captivité. On observe une légère reprise de la spermiation pendant 2 jours, mais elle ne se maintient pas et la quantité de sperme émise est 3 fois moins importante après 8 jours de captivité qu'au début de l'expérience. Le volume de sperme récolté s'élève à 42 µg/kg de poids corporel et par jour pendant les 8 jours de prélèvement (tabl. 2).

— *GSPP.* Après injection de GSPP (50 µg/kg) la réponse est faible au début mais s'amplifie au-delà du 4e jour pour la plupart des mâles (fig. 5). La spermiation reste importante pour quelques mâles après 21 jours. La mesure de s-GTH circulante effectué à J_{17} fait apparaître un taux circulant moyen de 30 ng de s-GTH (immunoréactive) par ml de plasma. Pendant la période de 21 j qui a suivi l'injection, la quantité journalière de spermatozoïdes recueillis est de 8,5 milliards par kg de poids vif (tabl. 2). Le spermatocrite est significativement plus faible ($P < 0,05$) que dans le lot témoin.

Tableau 2. — Effets de gonadotropine partiellement purifiée (GSPP) et de broyat d'hypophyse fraîche de brochet (HFB) sur la stimulation de la spermiation du brochet (brochets mâles de 2-3 ans originaires du Lindre).

N° du lot	Traitement et dose (mg/kg de poids vif)	Poids moyen (g)	n	Volume de sperme recueilli (ml) total/mâle $\bar{X} \pm DS$	/kg/j.	Spermatocrite $\bar{X} \pm DS$	10^9 spermatozoïdes récoltés total/mâle	/kg/j.	Durée de la réponse (j.)
B	Témoin	720	10	0,25 ± 0,17	0,042	42 ± 7	5,24	0,90	8
12	GSPP 0,05	673	9	6,23 ± 2,93 xxx	0,440	33 ± 8 x	120,31	8,49	21
13	HFB 1,3	722	10	1,67 ± 0,95 xxx	0,096	36 ± 4	31,48	1,78	24

x $p < 0.05$. xxx < 0.001. Test t = comparaison avec le lot témoin

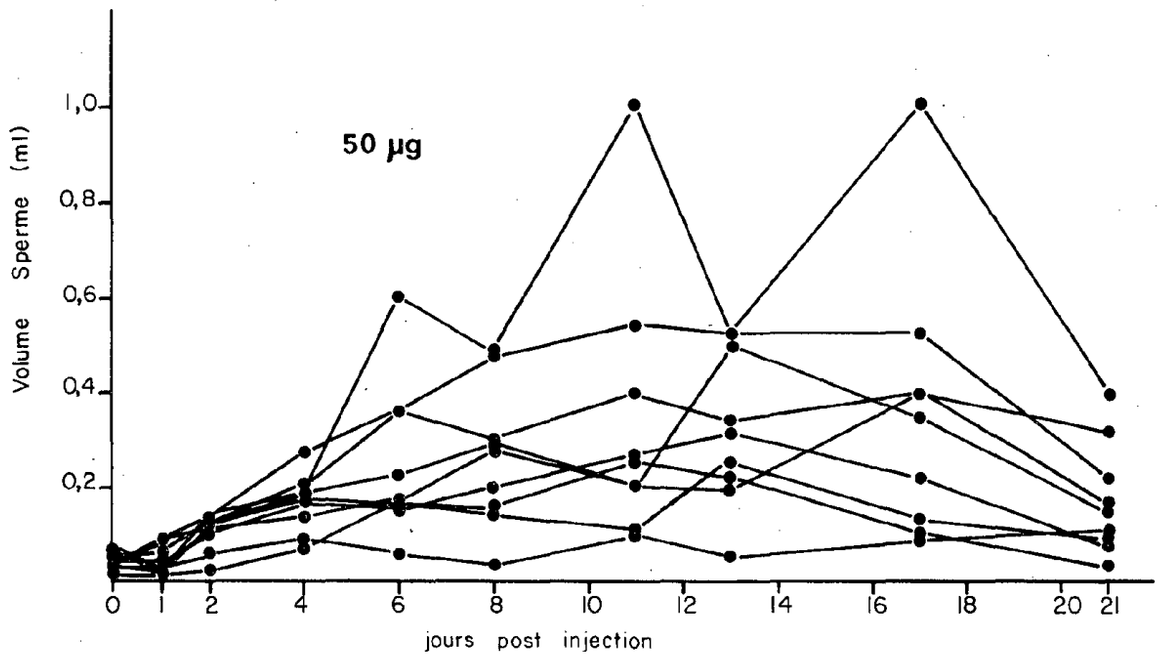


Figure 5. — Evolution de la spermiation du brochet après injection de GSPP (50 µg/kg de poids corporel). Mâles de 2 ans.

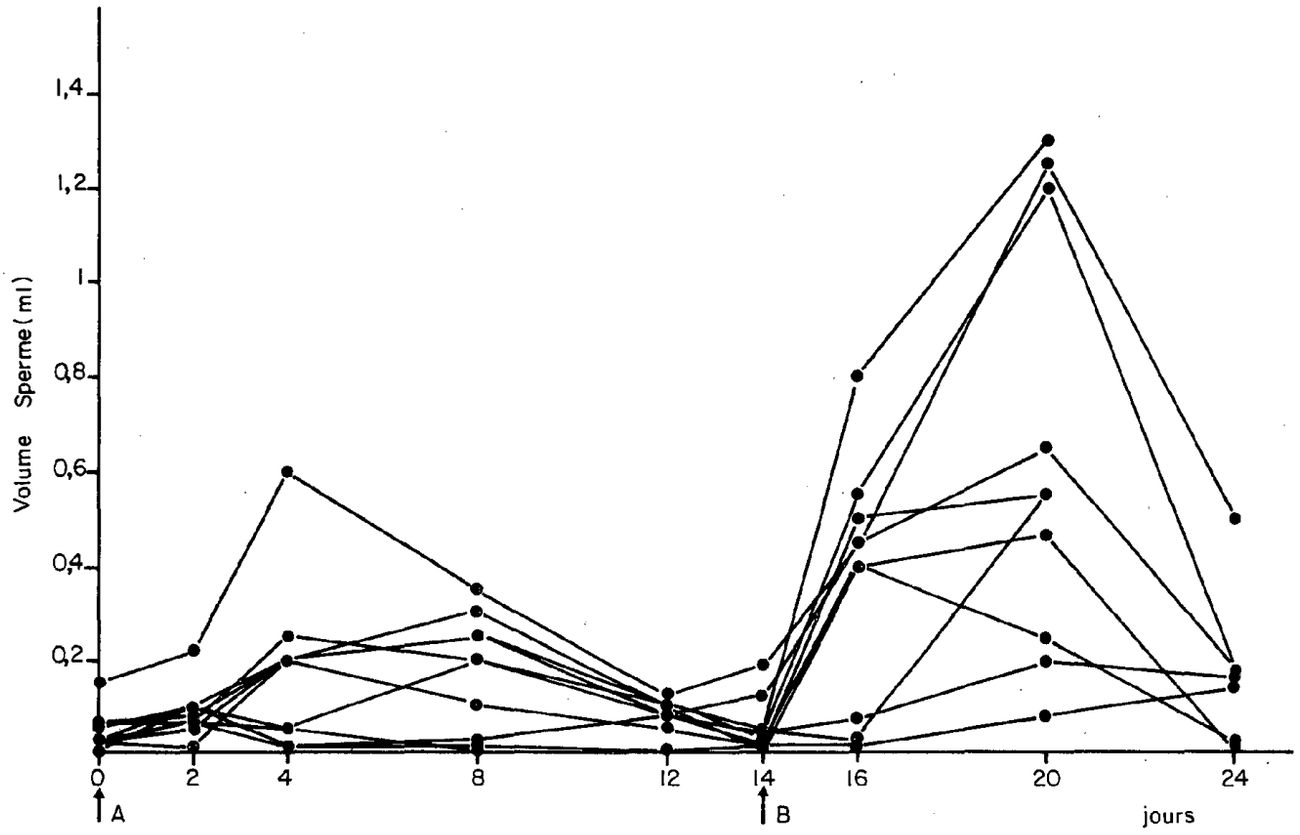


Figure 6. — Evolution de la spermiation du brochet après 2 injections d'hypophyses de brochet (↑) à la dose de 1,3 mg de glande fraîche/kg de poids corporel. Mâles de 2 ans.

— *Hypophyses fraîches de brochet.* A la dose de 1,3 mg/kg de poids corporel, une faible augmentation est observée 4 jours après la première injection (volume de sperme multiplié par 3,8 par rapport au niveau de base), puis la production diminue pour retrouver le niveau initial à J_{14}. Après administration de la seconde injection, la production de sperme augmente à nouveau, mais plus rapidement et de façon plus importante (12 jours après la 2e injection le volume de sperme est multiplié par 8) (fig. 6). Le spermatocrite n'est pas différent du lot témoin (tabl. 2).

c) *Test du pouvoir fécondant du sperme* (tabl. 3)

Les pourcentages de fécondation obtenus après insémination artificielle pratiquée avec du sperme obtenu après stimulation par des traitements hormonaux sont rapportés dans le tableau 3. Aucune différence significative n'est enregistrée entre les différents traitements de stimulation administrés, le sperme obtenu présentant les mêmes qualités fécondantes. On note cependant une forte hétérogénéité dans les écarts-types. La comparaison avec le sperme provenant de mâles non stimulés montre une différence significative ($P < 0,01$) dans un cas seulement, lorsque la spermiation est stimulée par injection de GSPP à la dose de 0,1 mg/kg, mais le test du lot témoin porte sur un pool de sperme, alors que celui du lot traité porte sur la moyenne de 9 animaux. Il faut aussi préciser que l'insémination a été pratiquée au taux de dilution de 1/1000 sans correction pour le nombre de spermatozoïdes, lequel est en général plus élevé dans le sperme d'animaux témoins que dans celui d'animaux stimulés. De la sorte, l'insémination a été pratiquée avec un nombre de spermatozoïdes plus élevés chez les témoins que chez les expérimentaux.

Tableau 3. — Pouvoir fécondant du sperme obtenu après stimulation de la spermiation par supplémentation hormonale : gonadotropine de saumon partiellement purifiée (GSPP) et hypophyses fraîches de brochet (HFB).

Traitement de stimulation	Dose (mg/kg)	% de fécondation ($\bar{X} \pm DS$) spermiation stimulée	spermiation non stimulée (1)	Test statistique (2)
GSPP	0.1	88 ± 5 (9)	100 *	P < 0.01
	0.05	79 ± 15 (8)	100 *	NS
	0.01	83 *	84 *	NS
HFB	14	71 ± 17 (10)	84 *	NS
	1.3	81 ± 4 (7)	76 *	NS

() Nombre de mâles dans chaque lot.

* En raison de la faible quantité de sperme émis, des tests individuels n'ont pu être pratiqués et ont porté sur un pool des spermes de tous les mâles de chaque lot.

(1) Sperme de mâles témoins n'ayant reçu qu'une injection de solution saline.

(2) Comparaison entre spermiation stimulée et non stimulée par test x^2.

d) *Production spermatogénétique du brochet et rendement de la spermiation en fonction des traitements hypophysation* (tabl. 4)

La production spermatogénétique a été établie pour certains lots expérimentaux. Elle varie entre 441 et 791.10^6 spermatozoïdes/gramme de poids corporel. Le rendement de la spermiation qui est extrêmement faible chez le lot témoin (moins de 1 p. 100 de spermatozoïdes émis) s'accroît après administration des différents traitements de stimulation administrés, et également en fonction de la dose administrée. Le meilleur rendement de spermiation est obtenu par le lot 8, stimulé par administration du broyat hypophysaire homologue : 10 p. 100 des spermatozoïdes sont émis, soit 9,2.10^9 pendant une période de 14 jours.

Sur les lots 12 et 13, le dénombrement des spermatozoïdes restant dans les testicules n'a pas été effectué. Seule la quantité de spermatozoïdes émis est connue ; elle est élevée : 31,5.10^9 sur une période de 24 jours de prélèvements après injection d'hypophyse fraîche de brochet et 120.10^9 sur une période de 21 jours, soit 8,49.10^9 par kg de poids corporel et par jour, après injection de GSPP à la dose de 0,05 mg/kg de poids vif (cf. tabl. 2). Il s'agit là du plus grand nombre de spermatozoïdes collectés parmi tous les lots expérimentaux ; ces mâles plus âgés et d'un poids corporel plus élevé semblent donc mieux répondre à la stimulation que les mâles plus jeunes.

Tableau 4. — Production spermatogénétique du brochet et rendement de la spermiation en fonction des différents traitements de stimulation.

N° du lot	Traitement et dose (kg de poids vif)	Nombre de spermatozoïdes collectés/mâle (10^9) Total	/j/kg p.v.	Nombre de spermatozoïdes restant dans le testicule (/mâle) (10^9) Total	/g de test.	Production spermatogénétique ($\bar{X}$/mâle, 10^9) Total	/kg p.v.	% spermato. prélevés
				—	—	—	—	
A	Témoin	1,220	0,225	131,10	23,49	132,32	444,40	0,92
1	GSPP 0,1 mg	13,720	3,080	128,67	25,25	142,39	671,65	9,66
2	GSPP 0,02 mg	5,160	1,610	153,46	34,33	158,62	695,70	3,26
3	GSPP 0,01 mg	4,580	2,170	133,42	31,54	138,00	570,24	3,31
4	GSPP 0,005 mg	4,390	1,925	155,70	34,29	160,09	744,60	2,74
5	EHBc (1) 3 mg	6,870	1,947	133,06	27,27	139,93	557,49	4,94
6	EHBc 1 mg	5,620	1,454	212,81	36,52	218,43	791,41	2,57
7	EHBc 0,5 mg	3,950	1,106	153,48	27,03	157,43	617,37	2,51
8	HFB (2) 14 mg	9,200	3,173	82,27	22,08	91,47	441	10,10

(1) Extraits hypophysaires bruts de carpe
(2) Hypophyses fraîches de brochet

e) *Evolution de la teneur plasmatique en s-GTH après injection de GSPP ou d'extraits hypophysaires bruts de saumon*

Les résultats rapportés dans la figure 7 montrent que la reprise de la s-GTH immunoréactive varie selon la forme sous laquelle elle est injectée. Il semble cependant que le dosage ait permis de mesurer un autre composé que la s-GTH puisque au moment de l'injection, on enregistre une valeur de 33 ± 10 ng/ml de plasma. En outre, les valeurs des standards internes étant élevées, les résultats des dosages doivent être considérés comme étant légèrement surestimés en valeur absolue. La reprise de la s-GTH par la circulation sanguine s'effectue très rapidement et 4 heures après l'injection on note la valeur maximale de reprise, soit 874 ± 306 ng/ml de plasma. La valeur de base enregistrée au moment de l'injection est retrouvée 5 jours après le traitement. La reprise par la circulation de la s-GTH injectée est plus importante lorsque la supplémentation est réalisée avec des extraits hypophysaires bruts (874 ng/ml) que lorsqu'elle comporte une injection de GSPP (280 ng/ml). Cet écart est hautement significatif ($P < 0,001$) 4 heures après l'injection et reste significatif ($P < 0,05$) 12 heures plus tard.

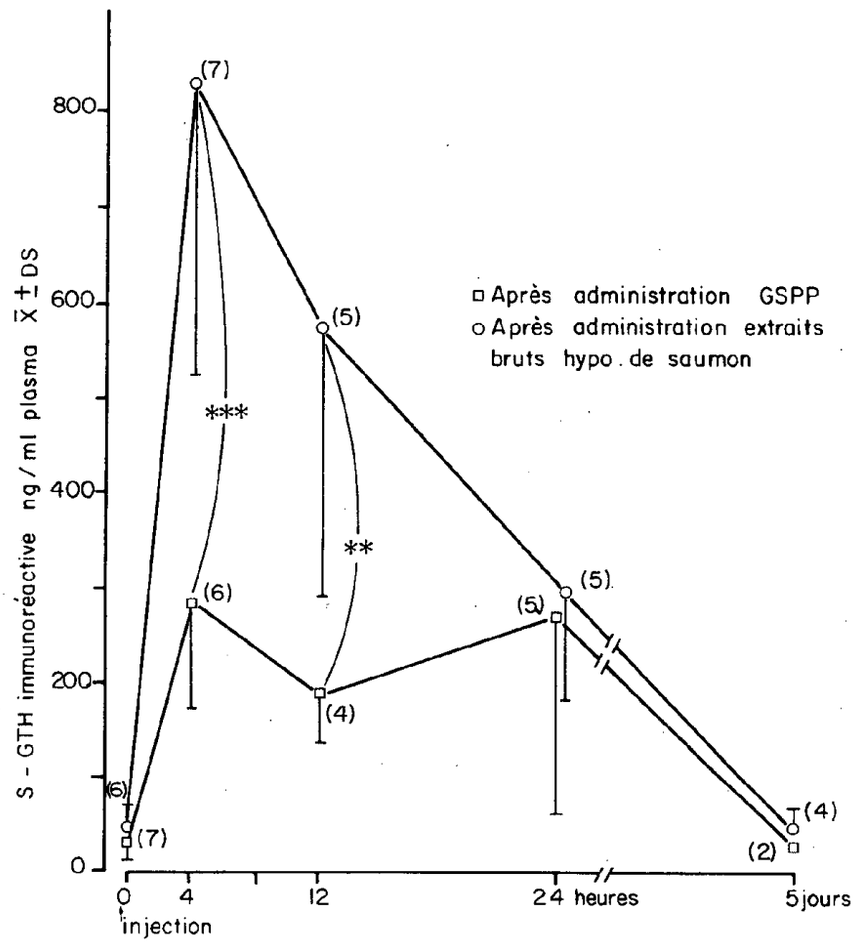


Figure 7. — Evolution de la teneur plasmatique en s-GTH immunoréactive dans le plasma de mâles brochet après injection de s-GTH. Dose de s-GTH injectée : 25 μg/kg de poids vifs, sous forme de GSPP (□—□) ou d'extraits hypophysaires bruts de saumon (o—o). ( ) nombre d'animaux. Mâles d'un an.

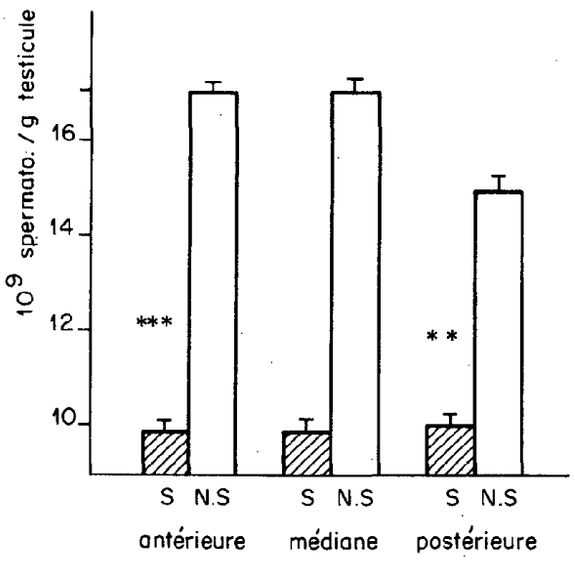


Figure 8. — Concentration intra-testiculaire en spermatozoïdes à trois parties différentes du testicule, chez les mâles dont la spermiation est stimulée (S) ou non (NS) par traitement hormonal. Mâles d'un an (*** $P < 0{,}001$; ** $P < 0{,}01$).

4. *Possibilité d'utilisation de spermatozoïdes intratesticulaires pour l'insémination*

La mesure de la concentration en spermatozoïdes dans le testicule fait apparaître une forte diminution du nombre de spermatozoïdes par g de testicule après stimulation hormonale, et cela aux 3 niveaux considérés (fig. 8). Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes intratesticulaires ne varie pas dans le lot témoin, quel que soit le niveau de prélèvement (antérieur, médian ou postérieur), alors qu'il tend à diminuer dans un sens postéro-antérieur dans le lot ayant reçu 50 µg de GSPP/kg de poids vif (fig. 8). Les différences ne sont cependant pas significatives et la fertilité des œufs était médiocre (maximum 40 p. 100). Une répétition de cette expérience (fig. 9) montre que le pouvoir fécondant des

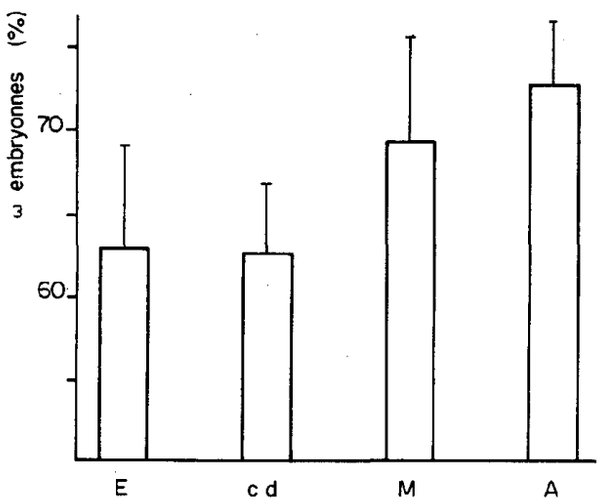


Figure 9. — Pouvoir fécondant des spermatozoïdes « éjaculés » ou intra-testiculaires pris à trois niveaux du testicule. E : éjaculés, cd : canal déférent, M : médian et A : antérieur. Mâles d'un an.

spermatozoïdes intratesticulaires ne diffère pas significativement de celui des spermatozoïdes « éjaculés » ou présents dans le spermiducte.

Discussion

Cette étude montre que la production spermatogénétique du brochet est relativement importante (de l'ordre de 400 à 800 milliards de spermatozoïdes par kg de poids vif chez des mâles de 1 an) ; une très faible partie de ces spermatozoïdes est normalement libérée du testicule mais les quantités émises peuvent être augmentées après une stimulation hormonale gonadotrope qui semble pouvoir être réitérée. Le sperme ainsi obtenu après stimulation hormonale conserve un pouvoir fécondant comparable à celui d'animaux intacts. Les spermatozoïdes intratesticulaires présentent aussi un pouvoir fécondant comparable à celui du sperme « éjaculé » et peuvent être utilisés pour la fécondation en cas de nécessité. Nous discuterons ci-après quelques problèmes soulevés par ces résultats sur le processus de spermiation : évolution histologique des testicules et performances de la spermiation en conditions normales ou stimulées.

1. *Sur le processus normal de spermiation*

Les quantités de sperme récolté sur les mâles intacts non stimulés sont particulièrement faibles. En cas de stockage en étang de 400 m^2, les quantités moyennes récoltées par prélèvements hebdomadaires sont de l'ordre de 30.10^9 spermatozoïdes/kg et cela pendant 7 semaines. En condition de confinement en bassins en écloserie, les performances sont encore plus réduites et la spermiation cesse après 1 à 3 semaines. Il est possible que les conditions de captivité et les manipulations répétées contribuent à inhiber le processus de spermiation dans cette espèce où on sait par ailleurs que des événements de la phase finale de l'ovogenèse (maturation ovocytaire et ovulation) sont particulièrement sensibles aux manipulations (Montalembert *et al.*, 1978a-b). Cependant l'étude histologique de la spermiation établie sur une population de mâles en milieu naturel (lac de Grand-Lieu) nous montre une vidange incomplète des lobules après la période de fraie ; le rapport gonadosomatique reste élevé et équivalent à celui relevé avant que ne débute la spermiation. Les spermatozoïdes non émis subsistent dans les testicules jusqu'en avril-mai, période pendant laquelle il semble qu'ils soient résorbés par des macrophages et les cellules de Sertoli comme chez la truite (Billard *et al.*, 1972 ; Hoffmann *et al.*, 1980 ; Shikhshabekov, 1978). Le fait que le RGS reste élevé après la période de reproduction montre qu'une grande partie des spermatozoïdes subsiste dans les testicules et n'est pas émise : la spermiation ne serait donc pas plus active dans le milieu naturel qu'en semi-captivité en étang de stockage. On ne connaît cependant pas les quantités de sperme émis en condition de reproduction naturelle ; quelques auteurs ont décrit le comportement reproducteur du brochet mâle dans la nature. Les géniteurs émettent ensemble leurs produits sexuels par intermittence (1,5 à 2,6 émissions par minute) (Clark, 1950 ; Buss, 1961) et un mâle peut participer à

la fécondation de plusieurs femelles (Sukhanova, 1979), mais les volumes de sperme mis en œuvre restent inconnus. Même si les performances enregistrées dans nos expériences ne correspondent pas à celles existant réellement dans les conditions naturelles, elles reflètent cependant bien les performances que le pisciculteur est en droit d'attendre d'un stock de géniteurs mâles maintenu en petits étangs ou en bassins en vue de couvrir les besoins en sperme d'une écloserie pour la reproduction artificielle. Dans l'expérience de stockage des mâles en petits étangs, on note une évolution parallèle de la quantité et de la qualité du sperme collecté, les valeurs maximales dans l'intensité et la durée de motilité du sperme s'observent lorsque le volume recueilli est le plus élevé (fig. 2). Il faut préciser que la notion de qualité ne se réfère ici qu'à la motilité et que les relations entre ce paramètre et le pouvoir fécondant restent à établir chez le brochet. Ces variations quantitatives et qualitatives du sperme au cours de la spermiation sont retrouvées chez d'autres espèces comme les salmonidés où la quantité et la qualité du sperme s'améliorent incontestablement quelques semaines après le début de la spermiation (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 1978 ; Billard, données non publiées). Les données quantitatives font aussi apparaître d'importantes fluctuations dans les productions totales individuelles : de 27 à 712.10^9 spermatozoïdes/kg de poids vif. Les données de Roth (1960) qui conclut à une plus forte spermiation des mâles de petite taille par rapport aux gros animaux ne sont pas retrouvées nettement ici, excepté peut-être pour un mâle de 200 g qui produit le volume de sperme le plus important par kg de poids corporel (3,58 ml) et le plus grand nombre de spermatozoïdes (712.10^9/kg de poids du corps). En ce cas la quantité récoltée approche la production spermatogénétique.

Ces valeurs sont légèrement plus faibles que chez les salmonidés. Le nombre total de spermatozoïdes récoltés est de 430.10^9 par kg de poids corporel chez le jeune mâle truite arc-en-ciel (Billard, 1974), et 500.10^9 chez des mâles plus âgés (Billard *et al.*, 1971). Turdakov (1968) rapporte des valeurs plus élevées pour la truite sauvage (906 à $1\,424.10^9$). Chez les corégones où les quantités récoltées sont réputées plus faibles (Prokes, 1975), les données de Hochman *et al.* (1974) font état de 40 à 70.10^9 spermatozoïdes par kg de poids corporel, ce qui reste inférieur aux performances enregistrées ici chez le brochet.

La concentration du sperme en spermatozoïdes est relativement élevée comme chez les téléostéens en général. La concentration moyenne sur les mâles non stimulés, suivis en petits étangs, est de $21,5.10^9$/ml (extrêmes individuels 12 et 27.10^9/ml). Par contre, la concentration est plus faible (de l'ordre de 14.10^9/ml) chez les mâles stimulés même si les quantités récoltées sont faibles (cas du LH-RHa). La stimulation hormonale se traduit aussi par une diminution importante de la concentration testiculaire en spermatozoïdes qui passe de $15\text{-}17.10^9$ à 10.10^9 quelle que soit la partie testiculaire (fig. 8). Cela résulte vraisemblablement d'une amplification du processus d'hydratation qui caractérise le phénomène de spermiation et qui est sans doute lié aux fortes doses d'hormones administrées (voir les quantités reprises dans la circulation ; fig. 7). Le fait que la concentration intratesticulaire soit voisine de celle du sperme « éjaculé » tend à indiquer que le liquide séminal est surtout originaire du testicule (cellules de Sertoli) et que la contribution du spermiducte (lequel est très réduit chez le

brochet) est limitée. Cette situation est différente de celle rencontrée chez les salmonidés où le spermiducte participe à la production du liquide séminal (Takashima et Billard, non publié). L'hypothèse d'un apport par les cellules de Sertoli pourrait être appuyée par les images suggérant une sécrétion de matériel lorsque les mâles entrent en spermiation. Une telle activité sécrétoire des cellules de Sertoli a déjà été mentionnée chez le poisson rouge (Yamazaki et Donaldson, 1968). En ce qui concerne la concentration du sperme en spermatozoïdes, la littérature fait état de valeurs voisines : de 10 à 20.10^9 spermatozoïdes/ml pour diverses espèces de saumon pacifique (Smirnov, 1963), de 10 à 30.10^9 pour le saumon atlantique (Truscott et Idler, 1969) et de 8 à 15.10^9 pour la truite (Schlenck et Kahmann, 1937 ; Bratanov et Dikov, 1961 ; Ginsburg, 1963 ; Hamor, 1966 ; Turdakov, 1968 ; Billard *et al.*, 1971 ; Billard, 1974). Chez le corégone, Hochman *et al.* (1974) rapportent des concentrations de 7.10^9 spermatozoïdes/ml et chez le hotu, Prokes et Penay (1974) dénombrent $10{,}4.10^9$ spermatozoïdes/ml.

2. *Sur les possibilités de stimuler la spermiation*

On sait qu'un apport exogène de stéroïdes sexuels stimule la spermiation du brochet (de Montalembert *et al.*, 1978a) et les résultats rapportés ici démontrent que la spermiation du brochet peut être fortement stimulée par injections de préparations hypophysaires, qu'elles soient partiellement purifiées ou brutes, homologues ou en provenance d'espèces différentes. Cependant la forme de la réponse varie selon les préparations (fig. 4), la quantité de spermatozoïdes récoltés augmentant plus rapidement après injection d'hypophyses de brochet que de GSPP ou extraits bruts d'hypophyses de carpe ; mais les comparaisons restent difficiles car l'activité biologique des hypophyses de brochet utilisées n'est pas connue. La quantité de GTH administrée peut avoir son importance car la réponse est très différente lorsque des doses plus faibles sont administrées (lot 13, fig. 6). Dans ce cas la première supplémentation relativement faible semble avoir sensibilisé les gonades, car la seconde provoque une libération importante de sperme. A teneur en équivalent GTH similaire (d'après le test de maturation ovocytaire de truite), la GSPP se montre plus efficace que les extraits bruts hypophysaires de carpe pour stimuler la spermiation. Il semble que l'hormone gonadotrope des salmonidés soit plus performante sur les mâles brochet que celle des cyprinidés, comme Pouvreau (1980) l'a déjà observé chez la femelle. Cependant la présence d'éventuels facteurs inhibiteurs dans les extraits bruts peuvent aussi expliquer la différence de réponse.

La mesure de la reprise de l'hormone s-GTH par dosage radioimmunologique spécifique de la s-GTH montre qu'immédiatement avant l'injection de GSPP, le système croise avec un composé plasmatique qui peut être de l'hormone gonadotrope de brochet ou un autre composé aspécifique. Le niveau de s-GTH dans la circulation générale est plus important lorsque l'hormone est injectée sous forme d'extraits hypophysaires bruts que sous forme partiellement purifiée (fig. 7). Cette différence peut être liée à une reprise et (ou) une dégradation plus rapides de la GSPP. Il est à noter qu'après injection de GSPP la réponse biologique (volume de sperme émis) est maximale à 4-6 jours (fig. 4) et qu'elle peut se

prolonger pendant plusieurs jours (la durée variant selon la dose administrée ; tabl. 1). Dans le cas du lot n° 12, alors que la production de sperme reste élevée à J_{17} (fig. 5), les niveaux en s-GTH immunoréactive sont relativement faibles (30 ng/ml de plasma) et comparables à ceux mesurés en début d'expérience avant l'injection de GSPP, ce qui indique que cette réponse prolongée n'est pas due à une subsistance de s-GTH dans le plasma. Il faut dès lors admettre que la latence de la réponse se double d'une certaine inertie qui conduit à une libération de sperme plus ou moins prolongée ; il peut s'agir d'un problème de physiologie testiculaire puisque les réponses sont plus soutenues sur les mâles plus gros. Il se peut aussi que l'adminitration de gonadotropine exogène ait modifié l'équilibre endocrinien et les relations testicules-hypophyse-hypothalamus, entraînant une sécrétion de GTH endogène, sécrétion que la technique de dosage radioimmunologique ne détecterait pas. La comparaison avec les données de la littérature concernant la reprise de GTH exogène montre des différences sensibles avec la carpe où Bieniarz *et al.* (1980) observent que des niveaux circulants de c-GTH (variations de 50 à 150 ng/ml de plasma) subsistent pendant 3 jours, mais il s'agit d'animaux intacts et une contribution de l'hypophyse n'est pas à exclure. Par contre, Cook et Peter (1980) sur le carassin placé à une température de 20° C, observent une disparition de la GTH plasmatique dans les 24 heures qui suivent l'injection, mais cette dernière ne comportait que de la c-GTH purifiée. De même Zohar (1982) observe chez la truite femelle que la s-GTH exogène marquée est en grande partie éliminée en quelques heures.

Le fait qu'une injection ponctuelle de gonadotropine exogène provoque une réponse prolongée (qui persiste bien au delà de la présence de la gonadotropine dans le plasma) est comparable à celui rapporté par Zohar et Gordin (1979) chez la daurade où une seule injection hormonale (HCG) entraîne un cycle prolongé d'ovulation qui persiste pendant 2 mois. Il se peut que dans le cas du brochet, un bon fonctionnement du système gonadotrope hypothalamo-hypophysaire exige des conditions d'environnement très strictes qui ne sont plus offertes dans nos conditions expérimentales de captivité ou semi-captivité, et même dans le milieu naturel lui-même — par exemple en ne permettant pas la levée d'un système inhibiteur de la sécrétion gonadotrope hypophysaire démontré dans d'autres espèces (Chang et Peter, 1982). Il conviendrait de rechercher des conditions d'environnement plus favorables aux animaux mis en reproduction en même temps que l'acquisition d'une meilleure connaissance de la régulation de la fonction gonadotrope, afin de mieux asseoir les interventions de stimulation et éventuellement, de levée d'inhibition.

Conclusion

L'ésociculteur qui est appelé à gérer un stock de géniteurs en captivité est confronté, dans le cas du mâle, au problème de la spermiation qui est faible et qui peut, en condition de confinement, être très brève et même pratiquement achevée lorsqu'intervient l'ovulation. Une stimulation de la spermiation est alors possible du fait que la quantité de spermatozoïdes restant dans le testicule est

importante et que ces spermatozoïdes sont fécondants. Les traitements à base d'extraits hypophysaires bruts peuvent être préconisés en raison de la relative facilité d'obtention de ce matériel. Par contre, ceux faisant intervenir la progestérone doivent être considérés avec la réserve inhérente aux injections massives de stéroïdes sexuels aux animaux.

Il n'en demeure pas moins que les performances, après stimulation, restent limitées et que les quantités quotidiennes collectées sont de l'ordre de 0,2 ml et n'excèdent pas 0,5 ml/kg de poids vif. Ce sont d'ailleurs des valeurs qui se retrouvent dans l'expérience où les mâles prélevés sont stockés en étang de 400 m^2 sans stimulation. Cela montre que le stockage en petit étang et capture périodique des mâles reste une technique compétitive par rapport à la stimulation, à condition de disposer d'étangs de stockage.

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'une aide du Conseil Supérieur de la Pêche. Nous remercions la délégation régionale du CSP à Poitiers et l'établissement du Lindre pour la fourniture des brochets, ainsi que Monsieur le Professeur Delsol pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à cette étude. Le LHRH-a nous a aimablement été fourni par CLIN-MIDY.

Références bibliographiques

BIENIARZ K., EPLER P., THUY L.N., BRETON B., 1980. Changes in blood gonadotropin level in mature female carp following hypophysial homogenate injections. *Aquaculture,* **20**, 65-69.

BILLARD R., 1974. La production spermatogénétique de la truite arc-en-ciel au cours du premier cycle reproducteur. *Bull. fr. Piscic.,* **253**, 140-149.

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., BRETON B., JALABERT B., 1971. La production spermatogénétique chez la truite. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.,* **11**, 190-212.

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., BRETON B., 1972. Les cellules de Sertoli des poissons téléostéens. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.,* **12**, 19-32.

BRATANOV C., DIKOV V., 1961. Sur certaines particularités du sperme chez les poissons. *Proc. IVth int. Congr. Anim. Reprod.,* The Hague, 895-897.

BRETON B., KANN G., BURZAMA-GERARD E., 1971. Dosage radioimmunologique d'une hormone gonadotrope de carpe *Cyprinus carpio. C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D.* **272**, 1515-1517.

BUSS K, 1961. The northern pike. A literature survey of the life history and culture of the northern pike. Special purpose report Pennsylvania Fisheries commission, Bonner Spring fish research station.

CHANG J.P., PETER R.E., 1982. Actions of dopamine on gonadotropin release in goldfish, *Carassius auratus.* 51, in C.J.J. Richter and H.J.Th. Goos (comp.), *Reproductive Physiology of Fish,* PUDOC Wageningen.

CLARK C.F., 1950. Observations on the spawning habits of the northern pike *Esox lucius,* in north western Ohio. *Copeia,* 1950, **4**, 285-288.

COOK A.F., PETER R.E., 1980. The effect of temperature on the clearance of intraperitoneally injected gonadotropin in the goldfish *Carassius auratus. Aquaculture,* **19**, 275-285.

GINSBURG A.S., 1963. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes. *J. Embryol. exp. Morph.,* **11**, 13-33.

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. Magyar,* **43**, 63-68.

HOCHMAN L., PENAZ M., PROKES M., 1974. The volume of milt, quantity and quality of sperm in *Coregonus peled* (Gmelin, 1788), from pond culture. *Zool. Listy,* **23**, 367-380.

HOFFMANN R., WONDRAK P., GROTH W., 1980. Seasonal anatomical variations in the testes of European pike, *Esox lucius* L. *J. Fish Biol.,* **16**, 475-482.

JALABERT B., BRETON B., BILLARD R., 1974. Dosage biologique des hormones gonadotropes de poissons par le test de maturation *in vitro* des ovocytes de truite. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.,* **14**, 217-228.

LEGENDRE M., BILLARD R., 1980. Cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri R. Bull. fr. Piscic.,* **278**, 11-33.

MARCEL J., DE MONTALEMBERT G., BILLARD R., 1983. La gestion et l'insémination artificielle des gamètes de brochet *(Esax lucius).* 133-151, in R. Billard, *Le Brochet : gestion dans le milieu naturel et élevage,* INRA Publ., Paris.

DE MONTALEMBERT G., BRY C., BILLARD R., 1978a. Control of reproduction in northern pike (*Esox lucius*). *Am. Fish. Soc., Spec. Publ.,* **11**, 217-225.

DE MONTALEMBERT G., JALABERT B., BRY C., 1978b. Precocious induction of maturation and ovulation in northern pike (*Esox lucius*). *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.,* **18**, 969-975.

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.

PETIT J., 1974. Recyclage et épuration en pisciculture. Etude théorique et bibliographique. Coll. Aqua. CNEXO, 445-470.

POUVREAU M., 1980. Etude du cycle sexuel femelle du brochet (*Esox lucius* L.) et de quelques problèmes liés à l'induction de la ponte. Dipl. Etudes Approf., Univ. Poitiers, 29 p.

PROKES M., 1975. Hand-stripping and embryonic development of *Coregonus peled* (Gmelin 1788). *Zool. Listy,* **24**, 185-196.

PROKES M., PENAZ M., 1974. Characteristics of male sexual products in *Chondrostoma nasus* (Linnaeus, 1758) from the Oslava river. *Zool. Listy,* **23**, 175-183.

ROTH H., 1960. Die Fortpflanzung des Hechtes und die Entwicklung der Brut. *Schweiz. Fisch.-Zeitung,* **68**, 214-216, 239-243.

SANCHEZ-RODRIGUEZ M., BILLARD R., 1977. Conservation de la motilité et du pouvoir fécondant du sperme de la truite arc-en-ciel maintenu à des températures voisines de 0° C. *Bull. fr. Piscic.,* **265**, 144-152.

SANCHEZ-RODRIGUEZ M., ESCAFFRE A.M., MARLOT S., REINAUD P., 1978. The spermiation period in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Plasma gonadotropin and androgen levels, sperm production and biochemical changes in the seminal fluid. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.,* **18**, 943-948.

SCHLENK W., KAHMANN H., 1937. Die chemische Zusammensetzung des spermaliquors und ihre physiologische Pedeutung. Untersuchung am Forellensperma. *Biochem. Z.,* **295**. 283-301.

SHIKHSHABEKSV M.M., 1978. The sexual cycles of the catfish *Silurus glanis,* the pike *Esox lucius,* the perch *Perca fluviatilis,* and the pike-perch *Lucioperca lucioperca. J. Ichthyol.,* **18**, 457-468.

SMIRNOV A.J., 1963. Production de sperme dans le genre *Oncorhynchus* (en russe). *Vopr. Ichtyol.,* **3**, 84-98.

SUKHANOVA G.I., 1979. The spawing and recundity of the pike *Esox lucius,* in Vilyuy reservoir. *J. Ichthyol.,* **19**, 74-79.

TRUSCOTT B., IDLER D.R., 1969. An improved extender for freezing atlantic salmon spermatozoa. *J. Fish. Res. Board Can.,* **26**, 3254-3258.

TURDAKOV A.F., 1968. Production of sperm by the males of Issyk Kuli trout. *Vopr. Ichtyol.,* **8**, 253-265.

YAMAZAKI F., DONALDSON E.M., 1968. The spermiation of goldfish as a bioassay for salmon (*Oncorhynchus tschawytscha*) gonadotropin. *Gen. Comp. Endocrinol.* **10**, 383-391.

ZOHAR Y., 1982. *L'évolution de la pulsatilité et des cycles nychtémèraux de la sécrétion gonadotrope chez la truite arc-en-ciel femelle, en relation avec le cycle sexuel annuel et par rapport à l'activité stéroïdogène de l'ovaire.* Thèse Doct. es Sci. Nat., Univ. Paris VI, 273 p.

ZOHAR Y., GORDIN H., 1979. Spawning kinetics in the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. after low doses of human chorionic gonadotropin. *J. Fish Biol.* **15**, 665-670.