



HAL
open science

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

Roland Billard

► **To cite this version:**

Roland Billard. 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. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D, Sciences naturelles, 1980, 291 (7), pp.649-652. hal-01600822

HAL Id: hal-01600822

<https://hal.science/hal-01600822>

Submitted on 2 Jun 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

PHYSIOLOGIE ANIMALE. — *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.* Note (*) de **Roland Billard**, présentée par Maurice Fontaine.

Après dilution du sperme de Truite arc-en-ciel dans des milieux contenant de la théophylline (0,01 et 0,001 M) on observe aux dilutions de 1/10 et 1/100 une prolongation de la motilité et du pouvoir fécondant par rapport aux milieux témoins sans théophylline. Cependant la motilité est plus faible et d'un type différent de la motilité normale ce qui laisse supposer qu'en plus des nucléotides cycliques, d'autres facteurs interviennent dans les processus de motilité des spermatozoïdes de Truite.

After rainbow Trout sperm were diluted in 0.01 and 0.001 M theophylline media, motility and fertilizing ability were prolonged as compared to the control media without theophylline. However, the motility observed was lower and of a different type than normal motility. This suggests that other factors besides cyclic nucleotides intervene in the motility of Trout spermatozoa.

Les spermatozoïdes de la plupart des espèces de Poissons téléostéens sont immobiles dans le testicule et dans le liquide séminal. Ils ne sont mis en mouvement qu'après dilution dans des milieux de salinité variable selon les espèces. En outre, après dilution la durée de motilité est toujours de courte durée et n'excède jamais quelques minutes. Chez les salmonidés la motilité est particulièrement brève, de l'ordre de 30 s dans l'eau douce et de une à plusieurs minutes dans diverses solutions salines [1]. Lorsque le taux de dilution est élevé — 10^{-3} — tous les spermatozoïdes sont mis en mouvement et après immobilisation les possibilités de réactivation sont limitées. Si la dilution a lieu dans de l'eau douce, le choc osmotique entraîne très rapidement un gonflement et même un éclatement de la membrane plasmique du spermatozoïde rendant l'immobilisation irréversible. Par contre la dilution dans des solutions salines ne provoque pas de modification morphologique identifiable à l'échelle ultrastructurale [1]. On est alors en droit d'invoquer une insuffisance des mécanismes impliqués dans la fourniture d'énergie d'autant plus que les spermatozoïdes de Salmonidés et de Poissons en général sont primitifs avec une pièce intermédiaire extrêmement réduite [2]. Cependant, l'addition d'ATP ou de cAMP au milieu de dilution augmente peu les durées de motilité [3]. Il est possible que ce matériel exogène ne puisse être utilisé et il reste à envisager l'augmentation de cAMP endogène en inhibant l'activité phosphodiesterase par un apport de theophylline [4].

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les gamètes utilisés dans les différentes expériences sont prélevés sur des géniteurs âgés de 3 ans (souche Vermenoux) provenant de la pisciculture du C.S.P. de Gournay sur Aronde et transportés au laboratoire juste avant la période de reproduction. Les ovules proviennent de femelles ayant ovulé depuis moins de 1 semaine et le sperme de mâles entrés en pleine spermiation depuis moins de 1 mois. Les ovules et les spermatozoïdes prélevés séparément sur au moins cinq individus sont poolés et soigneusement homogénéisés. Les fécondations sont pratiquées avec le dilueur d'insémination (D) [5] auquel on ajoute dans certains cas de la théophylline (Prolabo) : 0,001 M (Dt) et 0,01 M (DT).

Dans une première expérience (exp. A) des lots d'environ 200 ovules sont mélangés à 10 ml de dilueur à éprouver auquel on ajoute des quantités de sperme comprises entre 1 ml et 0,1 μ l — soit des taux de dilution de 10^{-1} à 10^{-5} . Après agitation pendant quelques secondes le mélange est laissé à reposer 15 mn puis filtré; les œufs sont mis en incubation mais le filtrat qui comporte des spermatozoïdes (immobiles) est à nouveau mélangé à un autre lot de 200 ovules préalablement dilué avec 10 ml de D ou DT. On pratique ainsi une nouvelle insémination avec un taux de dilution augmenté de moitié.

Dans l'expérience B le sperme (200 μ l) est d'abord dilué pendant 1 mn dans 20 ml de D et DT puis mélangé à des ovules frais. Le mélange est laissé 10 mn puis filtré; les œufs sont mis en incubation et les filtrats sont divisés en deux pour chacun des deux dilueurs et reversés sur des lots d'ovules dilués dans 10 ml de D et DT.

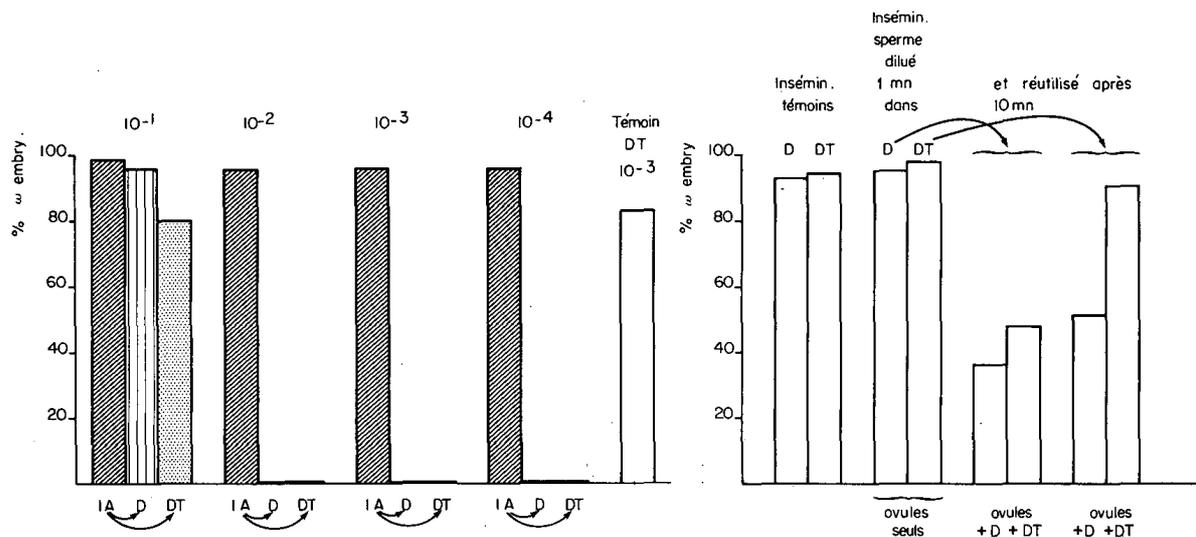


Fig. 1. — Conservation du pouvoir fécondant du sperme de Truite arc-en-ciel à différents taux de dilution (10^{-1} à 10^{-4}) après insémination et redilution. 15 mn après insémination le mélange dilueur-spermatozoïdes est séparé des œufs et réutilisé pour inséminer des ovules frais en présence de dilueur normal D et enrichi en théophylline (0,01 M : DT et 0,001 M : Dt) (concentration du sperme : $11 \cdot 10^9$ spermatozoïdes/ml).

Fig. 2. — Pouvoir fécondant du sperme de Truite arc-en-ciel dilué pendant 1 mn (10^{-2}) dans D et DT. Les spermatozoïdes dilués sont laissés en présence des œufs pendant 10 mn, retirés et réutilisés pour inséminer de nouveau des ovules en présence de D ou DT (concentration du sperme : $10,5 \cdot 10^9$ spermatozoïdes/ml).

Une troisième expérience (exp. C) consiste à exposer le sperme dilué à 10^{-2} dans les trois milieux D, Dt, DT pendant 30 ou 60 mn avant de procéder à l'insémination qui est pratiquée avec 10 ml de mélange sperme-dilueur sur des lots de 200 ovules seuls ou déjà dilués dans D, Dt ou DT.

Comme dans les cas précédents les œufs sont laissés 15 mn dans le dilueur et sont mis en incubation en eau recyclée, épurée et thermorégulée ($10 \pm 1^\circ\text{C}$). 10 jours plus tard, les œufs sont fixés et le pourcentage d'œufs embryonnés (qui approche le pourcentage de fécondation) est établi.

Un examen microscopique des spermatozoïdes dilués est systématiquement pratiqué ($G \times 100$).

La comparaison des pourcentages est faite par test χ^2 , après transformation angulaire des pourcentages.

RÉSULTATS. — *Expér. A (fig. 1).* — 15 mn après insémination et dilution dans D, les spermatozoïdes ne sont réactifs et capables de féconder d'autres ovules qu'à la plus forte concentration (dilution 10^{-1}) et cela quel que soit le nouveau milieu de dilution utilisé (D ou DT). Après insémination témoin pratiquée avec DT on obtient les mêmes résultats qu'avec D (à la dilution 10^{-3}).

Expér. B (fig. 2). — Après 1 mn d'exposition dans D et DT à la dilution 10^{-2} les spermatozoïdes restent féconds dans les deux cas mais 10 mn plus tard seuls ceux dilués dans DT et réactivés dans le même dilueur retrouvent leur pouvoir fécondant initial. Pour les autres combinaisons, le pouvoir fécondant est significativement plus faible ($P < 0,001$).

Expér. C (fig. 3). — En général le sperme dilué pendant 60 mn avant insémination ne conserve un pouvoir fécondant comparable aux témoins de départ que lorsque la dilution est pratiquée dans DT. Le fait que les spermatozoïdes restent, après dilution, capables de féconder des ovules « à sec » montre qu'ils ont conservé leur motilité, ce que confirme un

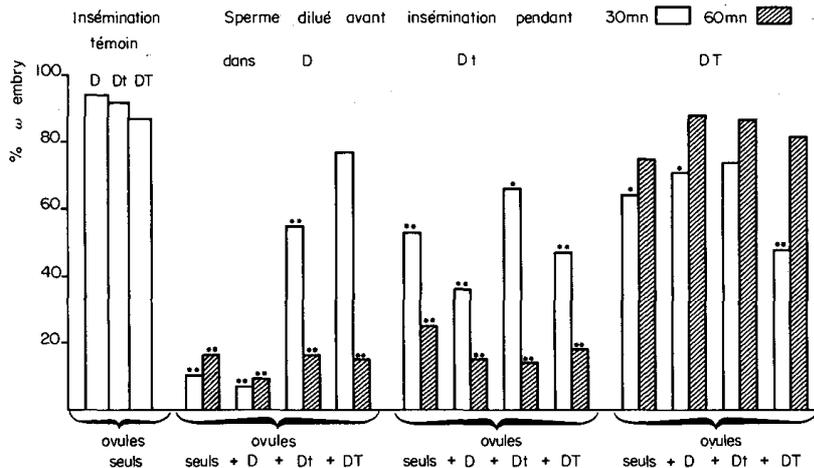


Fig. 3. — Pouvoir fécondant du sperme de Truite arc-en-ciel après dilution à 10^{-2} dans D, et Dt, ou DT. Après 30 et 60 mn d'exposition aux dilueurs les spermatozoïdes servent à inséminer des ovules additionnés ou non des mêmes dilueurs (concentration du sperme : $9,5 \cdot 10^9$ spermatozoïdes par ml) (* $P < 0,01$, ** $P < 0,001$: comparaison par rapport aux inséminations témoins).

examen microscopique; après 60 mn la motilité reste cependant plus faible qu'au départ. Pour les autres cas (dilution dans D ou Dt) le pourcentage de fécondation est significativement diminué ($P < 0,001$). Après 30 mn de dilution le pouvoir fécondant est le plus souvent diminué de façon significative par rapport aux trois inséminations témoins ($P < 0,01$ ou $P < 0,001$, voir la figure 3).

Même dans le cas de dilution ou de redilution dans D le pouvoir fécondant n'est pas nul.

Dans tous les cas de conservation du pouvoir fécondant après dilution, les spermatozoïdes présentent une motilité fortement réduite par rapport à la motilité initiale.

DISCUSSION. — La théophylline incorporée au dilueur se révèle donc capable de prolonger le pouvoir fécondant du sperme de Salmonidés dilué. Les meilleures conservations sont obtenues lorsque la dilution est pratiquée dans les dilueurs où la concentration en théophylline est la plus élevée (0,01 M : DT). Il est cependant nécessaire que la concentration de spermatozoïdes dans le dilueur soit forte (dilution 10^{-1} , expérience A, figure 1). Dans les expériences B et C des dilutions plus fortes ont été pratiquées (10^{-2}) avec des conservations partielles ou totales du pouvoir fécondant dans D et DT. Les pools de sperme étaient différents dans chacune de ces expériences et les différences observées peuvent être dues aux fortes variabilités de qualité des gamètes [6]. La figure 1 montre d'autre part que lorsque le taux de dilution du sperme est faible, des spermatozoïdes sont activés après redilution et se révèlent féconds. Il se peut alors que ces spermatozoïdes n'aient pas été mis en mouvement lors de la première dilution.

Après dilution des spermatozoïdes dans DT la motilité examinée au microscope se conserve de même que le pouvoir fécondant [les spermatozoïdes dilués dans DT restent capables après 60 mn de féconder des ovules frais non dilués (fig. 3)]. Cependant la motilité est diminuée et la conservation à peu près intégrale du pouvoir fécondant peut être due au nombre élevé de spermatozoïdes (de l'ordre de 500 000 par ovule). On sait en effet qu'une

diminution d'activité des spermatozoïdes peut être compensée par une augmentation numérique de ceux-ci [7]. Il se peut aussi que certains des spermatozoïdes mis en pool soient moins réceptifs que d'autres à la théophylline car il existe une grande variabilité inter-mâle dans la réponse des spermatozoïdes à la théophylline.

Quelques minutes après dilutions dans D, les spermatozoïdes ne sont plus mobiles mais on voit (fig. 3) que les spermatozoïdes dilués depuis 30 et 60 mn n'ont pas entièrement perdu leur pouvoir fécondant ce qui suggère des phénomènes de réactivation différée déjà signalés [8]. Il est possible que ce phénomène de récupération tardive interfère avec les quantités de théophylline disponibles dans le milieu. Cela semble particulièrement vrai lors de la première dilution où, pour les expositions de 60 mn, les fortes doses de théophylline sont toujours plus efficaces en première qu'en seconde dilution. Par contre dans le cas de dilution initiale dans Dt, les spermatozoïdes semblent plus réceptifs à la théophylline à 30 qu'à 60 mn (fig. 3). Il en est de même dans le cas de dilution dans D et redilution dans Dt ou DT.

Il est donc vraisemblable que, comme chez les Mammifères [9], l'AMP cyclique soit impliquée dans les processus de motilité des spermatozoïdes de Truite. Cependant l'addition de théophylline ne permet pas de reconstituer le type normal de motilité ce qui suggère l'intervention d'autres facteurs.

(*) Remise le 15 septembre 1980, acceptée après révision le 6 octobre 1980.

- [1] R. BILLARD, *Aquaculture*, 14, 1978, p. 187-198.
- [2] R. BILLARD, *Quaderno*, 137, 1970, p. 71-79.
- [3] R. BILLARD, non publié.
- [4] D. L. GARBERS, W. D. LUST, N. L. FIRST et H. A. LARDY, *Biochemistry*, 10, 1971, p. 1825-1831; D. D. HOSKINS, M. L. HALL et D. MUNSTERMAN, *Biol. Reprod.*, 13, 1975, p. 168-176.
- [5] R. BILLARD, *Bull. Fr. Pisc.*, 264, 1977, p. 102-112.
- [6] R. BILLARD, J. MARCEL et D. MATEI, *Can. J. Zool.*, 1980, 58 (sous presse).
- [7] M. LEGENDRE et R. BILLARD, *Reprod. Nutr. Devel.*, 20, 1980 (sous presse).
- [8] A. S. GINSBURG, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, II, 1963, p. 13-33.
- [9] D. D. HOSKINS et E. R. CASILLAS in *Handbook of Physiology*, Sect. 7, V, 1975, p. 435-460.
- [10] Ce travail a été pris en charge par le conseil supérieur de la pêche.

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