



**HAL**  
open science

## Les effets du lavage des gamètes sur leur aptitude à la fécondation chez la truite arc-en-ciel

Roland Billard

► **To cite this version:**

Roland Billard. Les effets du lavage des gamètes sur leur aptitude à la fécondation chez la truite arc-en-ciel. *Revue Canadienne de Biologie*, 1981, 40 (4), pp.317-321. hal-01607807

**HAL Id: hal-01607807**

**<https://hal.science/hal-01607807>**

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

## LES EFFETS DU LAVAGE DES GAMÈTES SUR LEUR APTITUDE À LA FÉCONDATION CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL

R. BILLARD

*Laboratoire de physiologie des poissons  
I.N.R.A., 78350 Jouy en Josas, France*

**ABRÉGÉ** — Dans le but de tester l'influence respective du liquide cœlomique et du liquide séminal sur l'aptitude des gamètes à la fécondation, des expériences d'isolement et de lavage ont été pratiquées. Les résultats montrent que l'isolement ou le lavage de l'un des gamètes dans des solutions salines voisines du milieu d'accompagnement n'altère pas sa fertilité. Par contre lorsque les deux gamètes subissent un lavage on observe une diminution du pourcentage de fécondation. On observe d'autre part une très forte diminution de l'aptitude à la fécondation des ovules lavés dans des milieux exclusivement constitués de NaCl ou de faible pression osmotique. La présence de facteurs (protéiques en particulier) dans les liquides cœlomique et séminal susceptibles d'exercer des effets protecteurs sur les gamètes (spermatozoïdes en particulier) est discutée.

Chez les salmonidés on a rapporté l'existence, dans le liquide cœlomique de substances organiques susceptibles d'interagir avec le spermatozoïde (voir Ginsburg, 1968 pour revue) et même d'en augmenter la motilité (Yoshida et Nomura, 1972). La réalité de telles substances a pu être mise en doute car après dilution des gamètes dans des solutions exclusivement salines lors de l'insémination artificielle on obtient des taux de fécondation aussi élevés qu'après dilution dans le liquide cœlomique même lorsque les taux de dilution sont élevés (Billard et Jalabert, 1974; Billard, 1981). Cependant la plupart des expériences ont fait appel à la méthode d'insémination dite sèche, c'est-à-dire utilisation du sperme complet et d'ovules débarrassés du liquide cœlomique qui les accompagne par simple égouttage. Il s'ensuit que du liquide cœlomique subsiste autour des ovules et que du liquide séminal est aussi présent, le tout en quantité faible mais suffisante pour intervenir sur la survie des gamètes.

Dans la présente étude, diverses combinaisons d'insémination sont pratiquées avec des gamètes accompagnés ou non de leur liquide biologique et ayant subi ou non un lavage. Parallèlement le degré d'élimi-

nation du liquide cœlomique et du plasma séminal est évalué par mesure de la concentration finale en protéine dans le milieu où l'insémination est pratiquée.

### MATÉRIEL ET MÉTHODE

Des géniteurs en provenance de diverses piscicultures privées du bassin parisien sont introduits au laboratoire avant ovulation ou entrée en spermiation et stockés en eau recyclée-épurée (Petit, 1974) à des températures comprises entre 8 et 10°C. L'expérimentation conduite en janvier fait appel à des mâles entrés en spermiation depuis deux mois. Il s'agit de mâles adultes âgés de 3 à 4 ans (soit à leur 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> cycle reproducteur), dont le sperme est prélevé individuellement et examiné au microscope ( $\times 100$ ). Seuls sont retenus les spermatozoïdes dont la motilité est égale ou supérieure à 4 (Sanchez-Rodriguez et Billard, 1977). Les spermatozoïdes sont mis en pool et la concentration du mélange est mesurée sur cellule de Thoma.

Les ovules sont prélevés dans la semaine qui suit l'ovulation. Les femelles sont âgées de 3 ans et achèvent leur 1<sup>er</sup> cycle reproducteur; celles produisant des ovules de petites tailles ou paraissant surmatures ne sont pas retenues. Après mise en pool les ovules sont séparés du liquide cœlomique.

Les opérations de collecte et l'expérimentation se déroulent à la température ambiante de la pisciculture soit 10°C. L'expérimentation

consiste à procéder à des inséminations avec des gamètes intacts ou lavés dans divers milieux, biologiques ou exclusivement minéraux.

#### TRAITEMENT DU SPERME:

- Sperme complet (témoin).
- Spermatozoïdes isolés, séparés du liquide cœlomique par centrifugation 30 mn à 1800 g, à 4°C et resuspendus dans une reconstitution minérale du liquide séminal (MMLS)-en millimoles/l: NaCl 110, KCl 28,3, Mg SO<sub>4</sub> 1,1, CaCl<sub>2</sub> 1,8, pH 9,0 tampon Tris HCl 0,02 M, (concentration osmotique finale -CO- 300 mosm/kg) d'après Billard et Jalabert (1974). Ce milieu, par sa richesse en potassium, a la propriété d'inhiber la motilité des spermatozoïdes (Schlenk et Kahmann, 1937; Billard, 1975).

- Spermatozoïdes lavés.

Après centrifugation comme ci-dessus et élimination du liquide séminal le culot de spermatozoïdes est dilué 10 fois dans MMLS. Le mélange subit une agitation ménagée pendant 1 mn puis est centrifugé comme précédemment. Le surnageant est éliminé et la concentration initiale du sperme est rétablie par addition du même milieu (MMLS).

#### MILIEUX D'INSÉMINATION

Ces trois catégories de sperme sont utilisées pour féconder des ovules placés dans les milieux suivants:

- Liquide cœlomique (témoin) pH 8.0 (LC).
- Liquide cœlomique porté à ébullition pendant 5 mn. L'objectif est de détruire d'éventuels facteurs thermolabiles spécifiques intervenant dans le processus de motilité ou favorisant la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule.

- Liquide cœlomique reconstitué quant à ses composants minéraux: milieu minéral de liquide cœlomique (MMLC)-en millimoles/l; NaCl: 155-KCl: 3,1-Mg SO<sub>4</sub>: 3,4-Co finale 270 mosm/kg pH 8,0 tampon Tris/HCl 0,02 M(d'après Billard et Jalabert, 1974).

- Solution à base de NaCl.

Co finale: 270 mosm./kg pH 8,0 tampon Tris-HCl 0,02 M. Chaque insémination est pratiquée en double et porte sur des lots d'environ 200 ovules dilués dans 10 ml des différents milieux et auxquels on ajoute 10 µl de sperme soit une dilution de 1/1000.

#### LAVAGE DES OVULES

Les ovules débarrassés du liquide cœlomique sont lavés c'est-à-dire immergés dans différents milieux (environ 200 ovules dans 50 ml) pendant une ou dix minutes avec agitation périodique. Les milieux de lavage sont ensuite éliminés et remplacés par 10 ml du dilueur à base de NaCl décrit ci-dessus puis inséminés avec les mêmes catégories de sperme que précédemment (dilution 1/1 000).

Les lavages sont pratiqués dans le MMLC et la solution à base de NaCl déjà définis (voir ci-dessus), et une autre solution à base de NaCl ayant les mêmes caractéristiques de pH mais ne développant que 150 mosm; l'objectif est de procéder au lavage dans un milieu légèrement hypotonique par rapport au liquide cœlomique naturel.

Après insémination, la teneur en protéines dans le liquide du mélange est établie à l'aide du réactif de Folin. Les œufs sont laissés à reposer pendant 15 mn puis sont transférés en incubateurs en eau douce recyclée et thermorégulée à 10 ± 1°C (Marie, 1979). Après 10 jours

TABLEAU I

*Pourcentages de fécondation après insémination d'ovules dans différents milieux avec du sperme complet (témoin), des spermatozoïdes séparés du liquide séminal par centrifugation et resuspendus dans MMLS, des spermatozoïdes lavés et resuspendus dans MMLS\**

Milieux d'insémination	Sperme complet	Spermatozoïdes isolés par centrifugation	
		resuspendus dans MMLS	lavés et resuspendus dans MMLS
Liquide cœlomique	54 ± 4	58 ± 8	50 ± 11
Liquide cœlomique porté à ébullition	18 ± 7	34 ± 1	48 ± 11
Solution NaCl	48 ± 16	47 ± 1,3	53 ± 10
MMLS	43 ± 2	41 ± 2,7	17 ± 0,3

\* Le % de fécondation est estimé d'après le % d'œufs embryonnés à 100° jours de développement embryonnaire. Chaque test porte sur 200 ovules environ et est pratiqué en double.

TABLEAU II

Pourcentage de fécondation après insémination d'œufs ayant reçu un lavage de 1 ou 10 mn dans trois milieux différents avec les mêmes spermatozoïdes — intacts, isolés ou lavés — que dans le Tableau I

Milieux de lavage des ovules	Durée du lavage (mn) des ovules	Sperme complet	Spermatozoïdes isolés par centrifugation	
			resuspendus dans MMLS	lavés et resuspendus dans MMLS
MMLC	1	56 ± 5	38 ± 17	31 ± 14
NaCl po 270	1	24 ± 8	9,1 ± 3,9	18 ± 9
NaCl po 150	1	19 ± 4	7,5 ± 2,7	11 ± 6
MMLC	10	51 ± 6	42 ± 11	41 ± 12
NaCl po 270	10	21 ± 8	1,2 ± 0,01	19 ± 14
NaCl po 150	10	7,1 ± 1,5	1,0 ± 0,1	10 ± 9

L'insémination est pratiquée dans la solution de NaCl po 270 mosm. Le taux de fécondation témoin (sperme complet × ovules intacts) est donné dans le Tableau I.

d'incubation les œufs sont fixés dans le liquide de Stockard et les œufs embryonnés sont dénombrés. Les pourcentages moyens de fécondation sont accompagnés dans les tableaux de l'écart type et les comparaisons statistiques sont faites par analyse de variance après transformation angulaire des données.

## RÉSULTATS

### EFFETS DU LAVAGE DES SPERMATOZOÏDES (Tableau I)

Le pouvoir fécondant du sperme n'est pas notablement affecté par la suppression du liquide séminal et son remplacement par un milieu exclusivement minéral, ni par le lavage des spermatozoïdes lorsque l'insémination est pratiquée dans le liquide coelomique ou la solution de NaCl (DI). Curieusement, les performances sont moins bonnes après insémination dans MMLC.

On observe par contre une diminution significative ( $P < 0,01$ ) de la fertilité dans le cas où les ovules placés dans du liquide coelomique soumis à ébullition sont inséminés avec du sperme complet mais pas avec du sperme lavé, ce qui suggère une interaction entre les deux liquides biologiques (coelomique et séminal).

### EFFET DU LAVAGE DES OVULES (Tableau II)

Le lavage des ovules n'entraîne pas de modifications notables de leur aptitude à la

fécondation s'il est pratiqué dans le MMLC mais une diminution significative ( $P < 0,001$ ) du pourcentage de fécondation intervient lorsque la diversité des minéraux (lavage dans la solution de NaCl à 270 mosm.) et la concentration osmotique (lavage dans la solution de NaCl à 150 mosm.) sont réduites. La durée du lavage n'a pas d'effet, les chutes de fertilité s'observent dès la première minute de lavage.

### EFFETS COMBINÉS DU LAVAGE DES OVULES ET DES SPERMATOZOÏDES (Tableau II)

La combinaison du lavage des ovules et des spermatozoïdes se traduit par une diminution légère mais significative ( $P < 0,05$ ) du pourcentage de fécondation dans le cas du lavage des ovules dans MMLS. Dans le cas des lavages des ovules dans les autres milieux on retrouve la diminution due à la réduction de la teneur en minéraux et à l'abaissement de concentration osmotique décrit ci-dessous, mais les résultats ne sont pas influencés par le lavage des spermatozoïdes.

### TENEURS EN PROTÉINES DES MILIEUX APRÈS INSÉMINATION

La quantité de protéines (Folin-référence albumine) identifiée dans les milieux d'insémination est de 1,96 mg/ml dans le cas des fécondations témoins (ovules laissés

sés dans le liquide cœlomique et sperme témoin) et de 0,06 mg/ml après insémination dans MMLC; les protéines ne sont plus détectables ( $< 0,050$  mg/ml) après lavage des ovules.

### DISCUSSION

Le lavage des gamètes dans des solutions minérales reproduisant la composition des liquides cœlomique et séminal ne provoque pas de diminution notable du taux de fécondation lorsqu'un seul des gamètes est soumis au lavage mais c'est seulement lorsque les deux gamètes mis en présence sont lavés que la diminution devient significative.

De même les spermatozoïdes simplement séparés de leur liquide séminal voient leur fécondance diminuée mais seulement lorsqu'ils servent à inséminer des ovules lavés. L'évolution de la teneur en protéines renseigne sur le degré d'élimination des liquides d'accompagnement au cours des opérations d'isolement et de lavage. Après élimination du liquide cœlomique par égouttage des ovules, on constate que les quantités de protéines dans le milieu minéral employé pour l'insémination sont fortement diminuées mais restent détectables. Or, dans ces conditions, qui sont celles de la technique d'insémination avec dilueur (Billard, 1977) le pourcentage de fécondation reste comparable aux témoins (insémination directement dans le liquide cœlomique). Après lavage des ovules la teneur protéique n'est plus détectable dans le mélange final, même dans le cas d'insémination avec du sperme complet où le taux de fécondation n'est pas diminué. L'apport protéique dû à l'insémination avec du sperme complet est négligeable quantitativement (mais les effets qualitatifs sont déterminants).

Cette disparition des protéines dans le milieu d'insémination indique aussi que les autres composantes des liquides d'accompagnement se trouvent éliminées. Parmi celles-ci, il y a les minéraux dont on sait que certains d'entre eux comme  $Ca^{++}$  sont indispensables à la fécondation (Ya-

mamoto, 1961). Le facteur composition minérale expérimenté ici seulement dans le cas des ovules se révèle important puisqu'après lavage dans une solution de NaCl (DI) la fécondabilité est plus fortement réduite que dans un milieu mieux équilibré (MMLC). Cependant dans une autre expérience le taux de fécondation est réduit de façon identique après un lavage bref des ovules dans MMLC et dans l'eau distillée (Billard, non publié). Le facteur concentration osmotique est aussi essentiel à la survie des ovules de salmonidés. Après dilution dans l'eau douce, les ovules perdent leur fécondabilité en moins de 30 secondes (Buss et Corl, 1966). Dans les solutions salines la survie est de l'ordre de deux minutes aux concentrations osmotiques égales ou inférieures à 150 mosm. (Billard *et al.*, 1974) mais dans la présente expérience on constate que cette durée est fortement réduite par la conjonction du lavage et de la dilution. Les éléments minéraux restent cependant essentiels car si la même concentration osmotique est due à des éléments organiques comme le sucrose, la durée de survie des ovules est très brève (Billard, 1980). Dans le cas du sperme les performances de fécondation qui sont meilleures dans le liquide cœlomique que dans MMLC peuvent être due à un effet protecteur des protéines sur les spermatozoïdes comme chez les mammifères (Harrison *et al.*, 1978) et se retrouverait dans le cas de la truite. La dilution du sperme à un taux élevé (1/1 000) dans MMLS réduit le taux de fécondation. L'élimination du liquide séminal et le lavage des spermatozoïdes diminuent fortement le pouvoir fécondant même si l'insémination est pratiquée dans le liquide cœlomique. Dans ce cas, les dommages subis par les spermatozoïdes lors du lavage n'ont pu être compensés par la présence de liquide cœlomique avec les ovules. L'hypothèse d'un effet de protection des protéines contre l'effet de dilution peut s'appuyer sur le fait que l'albumine sérique bovine se révèle favorable à la congélation du sperme de truite arc-en-ciel (Legendre et Billard, 1980).

Il est possible que l'effet protecteur des liquides biologiques s'exerce par leur composante protéique sur les spermatozoïdes et par leur composante minérale sur les ovules. Cette observation est importante et conduirait, si elle était confirmée, à baser très différemment les compositions des milieux de conservation pour les ovules et les spermatozoïdes.

**ABSTRACT — Effects of washing the Gametes on their fertilization in the Rainbow Trout.** Isolation and washing experiments were carried out to test the respective influences of coelomic and seminal fluids on gamete fertilizing ability. Isolating or washing gametes in salt solutions similar to the accompanying medium did not alter their fertility. On the contrary, the fertilization rate was lower when ova and spermatozoa were washed before insemination. Fertilizability was considerably lower for ova washed exclusively in media with NaCl or low osmotic pressure. The paper discusses some protein factors in the coelomic and seminal fluids which may have a protector effect on gametes, especially spermatozoa.

#### BIBLIOGRAPHIE

- Billard, R. (1975) L'insémination artificielle de la truite *Salmo gairdneri* Richardson. IV-Effets des ions  $K^+$  et  $Na^+$  sur la conservation du pouvoir fécondant des gamètes. Bull. Fr. Pisc. 256, 88-100.
- Billard, R. (1977) A new technique of artificial insemination for salmonids using a sperm diluent. Fisheries 1, 24-25.
- Billard, R. (1980) Survie des gamètes de truite arc-en-ciel après dilution dans des solutions salines ou de sucrose. Nutr. Repr. Develop. 20, 1899-1905.
- Billard, R. et B. Jalabert (1974) L'insémination artificielle de la truite *Salmo gairdneri* Richardson. II-Comparaison des effets de différents dilueurs sur la conservation de la fertilité des gamètes avant et après insémination. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 14, 601-610.
- Billard, R., J. Petit, B. Jalabert et D. Szöllösi (1974) Artificial insemination in trout using a sperm diluant. 715-723, In *Early Life History of Fish*, (J.M.S. Blaxter, édit.), pp. 715-723. Springer Verlag, Heidelberg, New York.
- Buss K. et K. G. Corl (1966) The viability of trout germ cells immersed in water. Prog. Fish Cult. 28, 152-153.
- Ginsburg A. S. (1968) Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Publishing House «Nauka», Moscou.
- Harrison R.A.P., H. M. Dott et G. C. Foster (1978) Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. J. Reprod. Fert. 52, 65-73.
- Legendre, M. et R. Billard (1980) Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. Repro. Nutr. Develop. 20, 1859-1868.
- Marie D. (1979) *Conception, réalisation et gestion d'un recyclage d'eau en pisciculture*. Mémoire DES, Univ. Paris VI, 26 p.
- Petit, J. (1974) Recyclage et épuration en pisciculture. Étude théorique et bibliographique. Actes du colloque CNEXO, n° 1 445-470.
- Sanchez-Rodriguez M. et R. Billard (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. Pisc. 265, 144-152.
- Schlenk W. et H. Kahmann (1937) Die chemische Zusammensetzung des spermaliquors und ihre physiologische bedeutung. Biochem. Z. 295, 283-301.
- Yamamoto, T. (1961) Physiology of fertilization in fish eggs. Int. Rev. Cytol. 12, 361-405.
- Yoshida, T. et M. Nomura (1972) A substance enhancing sperm motility in the ovarian fluid of rainbow trout. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 38, 1073.