Survie *in vitro* et *post mortem* des gamètes de truite fario (*Salmo trutta fario*)

R. BILLARD, JACQUELINE MARCEL¹ ET D. MATEI²

Laboratoire de Physiologie des Poissons, Institut National de la Recherche Agronomique, F-78350 Jouy en Josas, France

Reçu le 28 mai 1980

BILLARD, R., J. MARCEL et D. MATEI. 1981. Survie *in vitro* et *post mortem* des gamètes de truite fario (*Salmo trutta fario*). Can. J. Zool. 59: 29–33.

La conservation *post mortem* de la fertilité des gamètes de truite *Salmo trutta* Fario a été étudiée dans le but d'obtenir des informations sur les possibilités d'utiliser des ovules et du sperme de géniteurs morts accidentellement. La fertilité des gamètes laissés en condition *post mortem* dans le tractus génital d'animaux stockés à 4°C à sec ou dans l'eau après sacrifice est appréciée par le pourcentage d'oeufs embryonnés à 200 degrés-jours et comparée à celle de gamètes conservés *in vitro*, également à 4°C. Une référence témoin est constituée par des gamètes périodiquement prélevés pendant la durée de l'expérience sur des animaux vivants.

Les gamètes maintenus dans le corps des géniteurs sacrifiés ne survivent que quelques heures et montrent une chute significative après 12 h pour le sperme et entre 6 et 8 h pour les ovules sans différence notable entre le stockage à sec ou dans l'eau. Les mêmes gamètes conservés *in vitro* maintiennent leur fertilité entre 61 et 90% après 72 h (témoin 96%) pour les ovules et 80% après 14 jours (témoin = 97%) pour le sperme. Le pouvoir fécondant du sperme témoin prélevé sur des mâles vivants n'a pas varié pendant toute la durée de l'expérience.

BILLARD, R., J. MARCEL, and D. MATEI. 1981. Survie *in vitro* et *post mortem* des gamètes de truite fario (*Salmo trutta fario*). Can. J. Zool. 59: 29–33.

Post mortem continuation of fertility of the gametes in the trout *Salmo trutta fario* has been investigated in order to gather more information on the possibility of using ova and sperm from genitors killed accidentally. The percentage of eggs fertilized at 200 day-degrees was used as a measure of the fertility of the gametes left *post mortem* in the genital tracts of animals kept at 4°C after killing, in air or water; the measures were compared with those of gametes kept *in vitro*, at 4°C also. Gametes taken periodically from live fish during the experiment were used as controls.

Gametes kept in the body of killed genitors survive only a few hours and show a significant drop after 12 h and 6–8 h for sperm and ova respectively, with no detectable difference between fish kept in water or in air. Gametes kept *in vitro* maintain their fertility at 61–90% after 72 h (control = 96%) and at 80% after 14 days (control = 97%) for ova and sperm respectively. The fertilizing capacity of control sperm taken from live fish did not vary throughout the experiment.

[Journal translation]

Introduction

Les possibilités de conservation du sperme et des ovules de salmonidés ont déjà été examinées en conditions *in vitro* à court terme (voir Kuchnow et Foster (1976) pour revue). Mis à part Smith et Quirstoff (1943) qui ont montré une diminution du pouvoir fécondant du sperme après un séjour de 5 h dans des mâles morts, peu d'auteurs ont étudié la survie du sperme et d'ovules laissés dans le tractus génital ou la cavité coelomique de salmonidés après leur mort. De telles informations seraient cependant fort utiles et permettraient par exemple de connaître dans quelles conditions il est possible d'utiliser des gamètes de géniteurs morts à la suite d'accidents en pisciculture ou en rivière ou au cours de transport. Ce problème est abordé chez la truite fario dans la présente expérience où la survie de gamètes laissés dans le corps d'animaux morts est comparée à la survie d'une fraction de ces gamètes prélevés avant sacrifice et conservés *in vitro* à 4°C.

Matériel et méthode

Les géniteurs de truite fario (souche Vermenoux) âgés de 3 ans+ et pesant entre 0,5 et 1 kg ont été élevés dans la pisciculture du laboratoire à Gournay-sur-Aronde depuis plus de 1 an (température de l'eau comprise entre 6 et 16°C, alimentation à base de granulés Trouw au taux quotidien de 1% du poids vif). Les animaux sont transportés au Laboratoire après ovulation et entrée en spermiation et l'expérimentation débute le lendemain. Les femelles ont alors ovulé depuis 8 jours au plus et les mâles sont en pleine spermiation depuis 2 à 3 semaines (production de sperme à la suite d'un prélèvement hebdomadaire > 10 mL). La température de l'eau d'élevage au laboratoire est de 9–10°C pendant la durée de l'expérience.

Le principe de l'expérimentation consiste à sacrifier deux groupes de 10 géniteurs de chaque sexe après avoir prélevé une fraction des gamètes qui sera conservée à 4°C.

Les animaux sont d'abord anesthésiés au Phenoxy-éthanol (0,5 mL/L d'eau) puis assommés. Les géniteurs morts sont identifiés par diverses combinaisons de sections de nageoires et sont stockés à 4°C, un lot "à sec," l'autre immergé dans un aquarium de 60 L dont l'eau est renouvelée toutes les 12 h. Des prélèvements sont effectués périodiquement: sur les gamètes stockés à 4°C, sur ceux prélevés sur les géniteurs morts et sur des géniteurs vivants servant de témoins. La région anogénitale est soigneusement essuyée avant prélèvement des gamètes plus particulièrement sur les animaux immergés. Pour les mâles, la quantité de sperme prélevé en vue du stockage est d'environ 5 mL, la conservation s'effectue en flacons bouchés avec un tampon d'ouate humide et dans lesquels la hauteur de sperme ne dépasse pas 0,5 cm. Avant chaque prélèvement de sperme, le flacon est agité. Une quantité de sperme de l'ordre de 0,5 mL est d'abord éliminée puis le prélèvement destiné à l'insémination

¹Élève de l'École pratique des hautes études, Laboratoire d'étude du développement post-embryonnaire des vertébrés inférieurs, 25, rue du Plat, F-69288, Lyon, France.

²Adresse actuelle: Statiunea de cercetari piscicole, Podu Iloaiei Podu Iloaiei, R-6623 Iasi, Roumanie.

est pratiqué et porte sur environ 100 μ L. Deux catégories de témoins sont constituées sur les mâles en raison des risques d'épuisement prématuré des réserves de sperme, un premier lot constitué de cinq mâles est prélevé aux mêmes temps que sur les lots expérimentaux et sert à tester l'évolution du pouvoir fécondant du sperme sur des mâles vivants, pris individuellement. Un autre groupe de 10 mâles est également prélevé aux mêmes temps, les aliquotes de sperme sont poolées et servent à contrôler le niveau de fécondabilité des ovules utilisé pour tester le pouvoir fécondant des lots précédents. Ces ovules mis en pool proviennent d'un groupe de 15 femelles sur lesquelles on prélève chaque fois une fraction de leurs gamètes. Le sperme sert en outre à féconder les ovules de l'expérience réciproque.

Pour chaque femelle, environ 1000 ovules sont prélevés avant sacrifice et stockés par lots de 200 environ à 4°C au réfrigérateur en atmosphère saturée d'humidité. Ils sont placés en monocouche dans des récipients faits de matière plastique (PVC) 6 cm $\times$ 5 cm ouverts; le liquide coelomique est laissé avec les ovules mais ne les recouvre pas entièrement de sorte que leur partie supérieure se trouve exposée à l'air. Les prélèvements pratiqués sur les femelles vivantes ou mortes portent également sur 200 ovules à chaque échantillonnage. La quantité de liquide coelomique recueilli avec les ovules est faible, même dans le groupe immergé, ce qui tend à montrer qu'il n'y a pas de pénétration d'eau par le pore génital de sorte que tous les ovules sont prélevés, y compris les premiers, tous étant retenus pour les tests de fécondation. Le lot témoin est constitué par un groupe de 10 femelles dont les ovules sont, sur chaque individu prélevés par aliquotes de 200 aux mêmes moments que les expérimentaux et, comme eux, inséminés avec le pool de sperme du groupe de 10 mâles (voir ci-dessus).

L'insémination est pratiquée selon Billard (1977), à la température ambiante (environ 10°C) à la dilution de 1/1000 (10^{-3}), soit 200 ovules environ, 10 mL de dilueur et 10 μ L de sperme. Les oeufs après insémination sont mis à incuber en eau douce, recyclée, épurée et thermorégulée à $10 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 20 jours environ. Ils sont alors fixés au liquide de stockard modifié (formol 5%, acide acétique 5%, glycerol 5%, eau 85%), et le dénombrement porte sur des œufs embryonnés représente une valeur approchée du pouvoir fécondant du sperme et de la fécondabilité des ovules.

Dans tous les cas le taux d'embryons anormaux est resté faible et comparable dans tous les groupes.

Les résultats moyens sont présentés sur les graphiques avec les valeurs extrêmes enregistrées. Les comparaisons statistiques sont faites par test *t* et par analyse de variance après transformation angulaire des données.

Résultats

Le pouvoir fécondant du sperme des lots témoins (fig. 1A, 1B) se maintient sans changement pendant une période expérimentale de 14 jours $\bar{X} = 80 \pm 12\%$ (SD) valeurs extrêmes 96 et 56% (fig. 1B). Les mâles morts stockés à sec ou immergés dans l'eau voient le pouvoir fécondant de leur sperme diminuer rapidement pour devenir nul à 24 et 18 h. (fig. 1C, 1D). Il n'y a pas de différence significative (analyse de variance) entre les deux lots mais par rapport aux témoins *in vitro* les différences deviennent significatives ($P < 0,001$) dès la 12^{ème} heure.

Par contre, les mêmes spermes conservés *in vitro* maintiennent leur pouvoir fécondant à un niveau élevé pendant au moins 14 jours avec des variations

plus marquées avec l'avancement de la période de conservation. Il en est de même pour le lot témoin (fig. 1B).

L'aptitude à la fécondation des ovules se maintient à son niveau initial dans le groupe témoin *in vivo* (fig. 2B, ovules fraîchement prélevés). Par contre une diminution intervient dans le cas de conservation dans des femelles mortes stockées à sec où la fertilité initiale se maintient pendant 12 h (fig. 2A) ou immergées (fig. 2B); en ce cas la chute de fertilité est très rapide et devient sensible dès la 3^{ème} heure et significative à partir de la 6^{ème} heure ($P < 0,001$) par rapport au point de départ. En condition de conservation *in vitro* les ovules maintiennent mieux leur aptitude à la fécondation surtout dans le lot de la figure 2A où le taux de fécondation reste élevé après 72 h ($90 \pm 12\%$) et non significativement différent du point de départ ($96 \pm 3,3\%$). Dans l'autre cas (fig. 2B) la chute de fertilité est beaucoup plus rapide du fait de la très mauvaise qualité de la ponte de quelques femelles: passage de $96 \pm 2,6\%$ à t_0 (temps 0 h = t_0) à $61 \pm 27\%$ à t_{72h} .

Discussion

Plusieurs conclusions dérivent de la présente étude: (1) Les gamètes laissés *in mortem* dans le corps de géniteurs ne survivent que quelques heures. (2) Une partie de ces mêmes gamètes stockés *in vitro* à la même température (4°C) conservent leur fertilité pendant au moins 14 jours pour les mâles et 72 h pour un groupe de femelles (fig. 2A). (3) Les gamètes prélevés périodiquement sur des géniteurs vivants n'ont pas variés quant à leur fertilité au cours de la période expérimentale. (4) Dans un groupe de femelles (fig. 2B), on note en condition de conservation *in vitro* un vieillissement accéléré des ovules de plusieurs femelles, ce qui traduit une grande variabilité dans la qualité des gamètes et leur aptitude à la conservation.

In mortem la chute très rapide de fertilité des gamètes observée ici chez la truite fario a également été trouvée chez le saumon chinook (Smith et Quistorff 1943), la truite arc-en-ciel (Matei et al. 1980) et dans d'autres espèces comme le hareng (Blaxter 1955) et un maquereau indo-pacifique (Boonprakob et Dhebtaranon 1974). Cette diminution de fertilité semble au moins en partie pouvoir être mise en relation avec une diminution de la teneur en oxygène du sperme. Une telle observation a déjà été faite dans le cas de la truite arc-en-ciel (Billard et Legendre 1980). Il a été d'autre part montré que la durée de survie des gamètes était améliorée lorsque la conservation était pratiquée sous oxygène (Stoss et al 1978; Billard et Legendre 1980). Il est donc vraisemblable que les sper-

FIG. 1. Evolution du pouvoir fécondant du sperme de truite fario (*Salmo trutta fario*) conservé pendant une période de 14 jours dans diverses conditions: (A) Sperme fraîchement prélevé sur un groupe de 10 mâles et poolé; (B) sperme fraîchement prélevé sur un groupe de 5 mâles suivis pendant la période expérimentale; (C) sperme conservé dans le tractus génital de 10 mâles sacrifiés et stockés à sec à 4°C (une aliquote de sperme prélevé sur chacun des mâles est conservée *in vitro*); (D) idem C mais avec des mâles laissés dans de l'eau à 4°C après sacrifice. Les limites indiquent les valeurs extrêmes enregistrées.

matozoïdes conservés *in mortem* se soient trouvés en condition d'anoxie d'autant plus que leur concentration est élevée 5×10^9 à 10×10^9 /mL de sperme (Ginsburg 1968; Billard et al. 1971).

Dans les conditions de conservation *in vitro* de la présente expérience, la faible hauteur de sperme dans les piluliers et l'agitation périodique préalable à chaque prélèvement ont vraisemblablement contribué à maintenir un taux d'oxygène dissous élevé dans le milieu. Un rapport gamètes par air élevé est favorable à la survie du sperme selon Truscott et al.

(1968), mais a été considéré comme sans importance pour les ovules (Poon et Johnson 1970), voire même défavorable pour le sperme au delà d'une période de conservation de 25 h (Foerster 1965). Dans ce dernier cas, il n'est pas exclu que des phénomènes de desiccation se soient produits. Les durées de conservation enregistrées *in vitro* sont très variables comme le sont de nombreuses données de la littérature.

Pour les mâles, certains spermes voient leur pouvoir fécondant chuter de façon importante dès

FIG. 2. Evolution de l'aptitude à la fécondation d'ovules de truite fario (*Salmo trutta fario*) conservées pendant une période de 72 h dans diverses conditions: (A) ovules laissés dans la cavité générale de 10 femelles sacrifiées et stockées à sec à 4°C (une aliquote (*in vitro*) est prélevée avant sacrifice et conservée à 4°C); (B) idem mais dans ce cas les femelles sont laissées immergées dans l'eau après sacrifice. Δ , fertilité des ovules fraîchement prélevés sur un groupe de femelles témoins.

les 4 et 7^{ème} jours alors que d'autres le conservent intégralement après 14 jours (fig. 1). Chez d'autres salmonidés les durées de survie rapportées vont de quelques heures (Billard et Legendre 1980) à 1 jour, (Carpentier et Billard 1978) ou plus (Dorier 1951; Withler et Morley 1968) et même quelques semaines (Truscott et al. 1968; Sanchez-Rodriguez et Billard 1977; Stoss et al. 1978) mais dans ce cas, le sperme est dilué, additionné de diméthyl sulfoxyde ou placé sous O₂ et stocké à des températures voisines de 0°C, voire même légèrement inférieures.

Des chutes de fertilité des ovules s'observent après quelques heures de conservation *in vitro* pour certaines femelles (fig. 2B), mais pour d'autre, l'aptitude à la fécondation se maintient intégralement pendant 72 h. Les durées de conservation des ovules *in vitro* publiées vont de quelques heures (Barrett 1951; Ginsburg 1968; Withler et Humphreys 1967; Withler et Morley 1968; Hiroi 1978). Il existe donc de très grandes variations dans les durées de survie des spermatozoïdes et des ovules conservés *in vitro*. Les raisons en sont encore mal connues mais il faut préciser que les conditions expérimentales ne sont pas toujours comparables et que de nombreux facteurs sont susceptibles d'affecter la qualité des gamètes et leur aptitude à la conservation: souche et histoire des géniteurs (niveaux thermiques et alimentaires pendant la gamétogénèse), vieillissement des gamètes

avant le début de l'expérience (temps écoulé depuis l'ovulation ou l'entrée en spermiation), condition d'insémination (nombre de spermatozoïdes par ovule, milieu de dilution) etc.

Le problème de l'homogénéité des prélèvements successifs de gamètes reste à examiner. Il n'est pas exclu que des variations de fertilité soient dues à des changements de qualité liés à la position des gamètes dans le tractus génital. Cependant dans ce travail, les ovules prélevés par fractions sur des femelles vivantes n'ont pas montré de variation de fertilité pendant la durée de l'expérience. Chez la truite arc-en-ciel mâle, des travaux antérieurs ont montré que la fécondance du sperme prélevé par collectes successives ne variait pas de façon notable (Billard 1976; Matei et al. 1980).

En conclusion, il apparaît que les possibilités de récupérer des gamètes sur des animaux morts, soit dans la nature, soit en pisciculture en cas d'accident par exemple, sont limitées à quelques heures. Les possibilités plus longues de conservation *in vitro* révélées par ces expériences sont plus intéressantes mais la variabilité des données limite la portée pratique de ces résultats. Des recherches complémentaires sont encore nécessaires afin de mieux connaître la physiologie des gamètes de poisson et de proposer des techniques de conservation fiables.

Remerciements

Le travail a été supporté par le Conseil Supérieur

de la Pêche. La visite du Dr. D. Matei en France s'inscrivait dans le cadre de la coopération scientifique Franco-Roumaine.

- BILLARD, R. 1976. Variation de la qualité des gamètes à différents niveaux du tractus génital chez la truite arc-en-ciel. *Ann. Hydrobiol.* 7: 97-104.
- 1977. A new technique of artificial insemination for salmonids using a sperm diluent. *Fish. Bull. Am. Fish. Soc.* 2: 24-25.
- BILLARD, R., B. BRETON et B. JALABERT. 1971. La production spermatogénétique chez la truite. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 11: 190-212.
- BILLARD, R., et M. LEGENDRE. 1980. Conservation *in vitro* à court terme des gamètes de truite arc-en-ciel. *Bull. Fr. Piscic.* 278. Sous presse.
- BARRETT, I. 1951. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. *J. Fish. Res. Board Can.* 8: 125-133.
- BLAXTER, J. H. S. 1955. Herring rearing. I. The storage of herring gametes. *Mar. Res. Dep. Agric. Fish. Scot.* N° 3.
- BOONPRAKOB, U., et Y. DHEBTARANON. 1974. Experiments on artificial fertilization and descriptive studies of eggs and larvae of the Indo-Pacific mackerel, *Rastrelliger neglectus* (Van Kampen). *IPFS Proc.* 15: 144-158.
- CARPENTIER, P., et R. BILLARD. 1978. Conservation à court terme des gamètes de salmonidés à des températures voisines de 0°C. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 18: 1083-1088.
- CYKOWSKA, C., A. SOBOCINSKY, L. TOMASIK et A. WINNICKI. 1973. Studies on the salmonid eggs fertilization delayed in relation to the spawning. *Zesz. Nauk. Wyzsz. Szk. Roln. Wroclawiu Szczecinie, Sect. Acta Ichtyol. Pesci.* 40: 179-184.
- DORIER, A. 1951. Sur la conservation de la laitance de quelques salmonidés. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 232: 1144.
- FOERSTER, R. E. 1965. Effect of retention of spermatozoa and ova of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in water and without addition of water, on fertility. *J. Fish. Res. Board Can.* 22: 1503-1521.
- GINSBURG, A. S. 1968. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Nauka Publishing House, Natl. Sci. Found. Transl.
- HIROI, O. 1978. Studies on the retention of gametes of salmonids. III. Change in fry liberation rate of stored chum salmon eggs inseminated with sperm preserved in the same conditions. *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery*, 32: 19-26.
- KUCHNOW, K. P., et O. O. FOSTER. 1976. Thermal tolerance of stored *Fundulus heteroclitus* gametes: fertilizability and survival of embryos. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 676-680.
- MATEI, D., J. MARCEL et R. BILLARD. 1980. Survie des gamètes en conditions *in vitro* et *post mortem* chez la truite arc-en-ciel. *Rev. Roum. Biol. Ser. Zool.* 25. Sous presse.
- POON, D. C., et A. K. JOHNSON. 1970. The effect of delayed fertilization on transported salmon eggs. *Prog. Fish Cult.* 32: 81-84.
- SANCHEZ-RODRIGUEZ, M., et R. BILLARD. 1977. Conservation de la motilité et du pouvoir fécondant du sperme de truite arc-en-ciel maintenu à des températures voisines de 0°C. *Bull. Fr. Piscic.* 265: 144-152.
- SMITH, R. T., et E. QUISTORFF. 1943. Experiments with the spermatozoa of the steelhead trout, *Salmo gairdneri*, and the chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Copeia*, 3: 164-167.
- STOSS, J., S. BÜYÜKHATİPOĞLU et W. HOLTZ. 1978. Short term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 18: 1077-1082.
- TRUSCOTT, B., D. R. IDLER, R. J. HOYLE et H. C. FREEMAN. 1968. Sub-zero preservation of atlantic salmon sperm. *J. Fish. Res. Board Can.* 25: 363-372.
- WITHLER, F. C., et R. M. HUMPHREYS. 1967. Duration of fertility of ova and sperm of sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and pink (*O. gorbuscha*) salmon. *J. Fish. Res. Board Can.* 24: 1573-1578.
- WITHLER, F. C., et R. B. MORLEY. 1968. Effects of chilled storage on viability of stored ova and sperm of sockeye and pink salmon. *J. Fish. Res. Board Can.* 25: 2695-2699.