



**HAL**  
open science

## Qualité des semences en 2017 (Action 23) : chapitre III

Stéphane Bons, Patrick Chèvre, Philippe Jatteau

### ► To cite this version:

Stéphane Bons, Patrick Chèvre, Philippe Jatteau. Qualité des semences en 2017 (Action 23) : chapitre III. Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio*: bilan scientifique et technique 2017, 2018, pp.18. hal-02610126

**HAL Id: hal-02610126**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02610126>**

Submitted on 16 May 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.

# Chapitre III : Qualité des semences en 2017 (Action 23)

Bons S., Chèvre P.

## III.1 Introduction

### Objectifs

La vérification de la qualité des semences fraîches pour tous les mâles d'esturgeon européen a pour objectif de sélectionner les mâles qui participeront à la fécondation des femelles. Il s'agit également de déterminer les critères pour sélectionner une semence de bonne qualité dans le but de constituer une banque de sperme.

### Intérêts

Il s'agit d'optimiser la survie des croisements en utilisant une bonne qualité de semences pour produire des œufs et des larves destinés au repeuplement et à la conservation d'un stock captif.

## III.2 Matériels et méthodes

La pré-sélection des géniteurs a été réalisée le 03 et 04 mai 2017, environ un mois avant la période de reproduction, généralement de fin mai à juillet (Williot *et al.*, 1997). Le choix des mâles se fait par échographie. L'échographie permet de déterminer le stade de maturation. Les échographies ont permis de sélectionner 17 mâles, répartis de la manière suivante :

- 4 issus des cohortes 84 à 95
- 8 issus des juvéniles « 4 ans eau saumâtre »
- 4 issus des juvéniles « 6 mois eau saumâtre »
- 1 juvénile eau douce

Pour les vieux géniteurs, seuls les mâles jugés « bon » à l'échographie et dont le poids était supérieur ou égal à celui de mai 2016, ont été sélectionnés. Sur les 4 sélectionnés, 2 n'ont pas été retenus car nous disposons d'une grande quantité de leur sperme dans la banque de sperme cryoconservé.

Quinze mâles ont donc été présélectionnés. Ils ont été répartis le 18 mai dans le bâtiment Sturio 1, pour la préparation à la phase finale de maturation (montée en température, passage en eau douce).

La veille du prélèvement, les poissons reçoivent une injection d'hormone, la LHRH éthylamide acétate hydrate (Luteinising Hormone-Releasing Hormone), à une dose de 30 µg/kg, dans le but de déclencher la spermiation. L'injection est faite dorsalement juste en arrière de la tête dans les muscles pour que l'hormone agisse plus rapidement au niveau du cerveau. Cette hormone stimule l'activité de frai chez les poissons.

Vingt-quatre heures après l'injection, la semence est collectée à l'aide d'un tube en silicone (5 mm de diamètre) désinfecté et sec pour éviter d'activer la semence, que l'on a inséré dans l'orifice urogénital (**Figure 1**). La semence est récoltée par gravité ou par un léger massage abdominal dans un bécher gradué, sec et propre pour les mêmes raisons que précédemment.



**Figure 1** : Prélèvement de sperme chez *A. sturio* (© Ph Jatteau - ML. Acolas, Irstea)

Une fois la semence prélevée, il faut juger de sa qualité selon deux critères : la motilité selon l'échelle de motilité de Sanchez-Rodriguez et Billard (1977) établie pour la truite arc-en-ciel (**Tableau 1**) et la survie en pourcentage pendant 3 minutes 30. Pour cela, la semence a été activée avec un activateur permettant d'optimiser la motilité en gardant une méthode simple, rapide et peu coûteuse et présentant un risque d'erreur la plus faible. C'est pour ces raisons que l'eau a été utilisée.

**Tableau 1** : Echelle de motilité d'après Sanchez-Rodriguez & Billard (1977)

<b>0</b>	Spermatozoïdes tous immobiles
<b>1</b>	Agitation sur place de nombreux spermatozoïdes
<b>1+</b>	Agitation sur place de nombreux spermatozoïdes. Quelques-uns se déplacent rapidement
<b>2</b>	Quelques-uns se déplacent rapidement (20%). La plupart présentent soit des mouvements progressifs lents soit une agitation sur place.
<b>2+</b>	Plus de 20% des spermatozoïdes se déplacent activement
<b>3</b>	Spermatozoïdes à mouvements progressifs rapides ou lents (50%) et des mouvements oscillatoires sans déplacement (50%)
<b>3+</b>	Spermatozoïdes à mouvements progressifs rapides ou lents supérieurs à 50%
<b>4</b>	Déplacements progressifs de la plupart des spermatozoïdes (80%). Certains restent visibles car déplacements lents
<b>4+</b>	Seuls quelques spermatozoïdes présentent des déplacements lents
<b>5</b>	Tous les spermatozoïdes se déplacent vigoureusement. Impossible de fixer la vue sur aucun d'entre eux



**Figure 12** : observation de la qualité des semences chez *A. sturio* (© Ph Jatteau, Irstea)

Matériel nécessaire à l'observation de la semence fraîche :

- pipette 0-10 $\mu$ L + embouts
- pipette 20-200 $\mu$ L + embouts
- Lames
- Lamelles
- Microscope optique

Méthode d'observation :

- Mélanger la semence et prélever 1  $\mu$ L. Déposer sur une lamelle et vérifier la motilité spontanée.
- Ajouter 50 $\mu$ L eau de forage (activateur) en déclenchant le chronomètre (homogénéiser avec l'embout de la pipette. Mettre une lamelle et observer à un grossissement X400.
- Relever la survie et la motilité toutes les 30 secondes et pendant 4 min.
- Ajuster s'il le faut les quantités et l'objectif pour observer environ 100 spermatozoïdes (si trop concentré utiliser 0,5 $\mu$ L de semence, si pas assez concentré regarder avec un objectif plus petit). Ne pas diminuer la quantité d'activateur pour ne pas sous-estimer la motilité.

Changer les embouts des pipettes entre chaque prélèvement

Les paramètres de motilité et de survie permettent de classer les semences fraîches en 4 catégories (**Tableau 2**).

**Tableau 2** : Critères pour le classement des semences en 4 catégories

Motilité initiale	Taux de Survie initial (%)	Motilité 60s	Taux de Survie 60s (%)	Temps survie 5% (s)	Qualité de la semence
5	95-100	5	80	> 210	Très Bonne
5	90-100	3-4	≤80	≥ 150	Bonne
4-5	90-100	3-4	50-60	150-180	Moyenne
≤ 5	≤95-100	≤ 3	≤ 60	≤ 150	Mauvaise à très Mauvaise

### III.3 Résultats et Discussion

Pour l'année 2017, aucune série de reproduction assistée n'a eu lieu sur la station d'expérimentation de Saint Seurin sur l'Isle en raison de l'absence de maturation des femelles.

Dès le 18 mai un groupe de 15 mâles a été placé en eau douce, en prévision de prélèvement de semences pour réaliser d'éventuelles cryoconservations.

Les 15 mâles ont été transférés dans Sturio 1 le 18 mai, et répartis en 4 lots.

Deux lots sont composés d'un « vieux mâle » et de 4 juvéniles 2007 en eau saumâtre depuis 4 ans. Un 3<sup>ème</sup> lot est composé de 2 juvéniles 2007 et 2 de 2008 en eau saumâtre depuis 6 mois.

Le dernier lot correspond au juvénile « eau douce ».

Les poissons ont été injectés le 5 juillet au matin, avec une montée en température de 14,5 à 17,6°C sur 36 heures.

**Tableau 3** : Sélection des différents mâles en 2017

Date	Nom des mâles
13 juin	Martinien, 3220207, 3220132, 3219601, 88087
20 juin	32599890, 63917, 3255270, 3219650
29 juin	3219872, 3220233, Bleu, 3207482, 3219689, 3220003



**Figure 13** : Mesure du pH du sperme chez *A. sturio* (© Ph Jatteau, Irstea)

### III.3.1 Prélèvement du 13 juin 2017

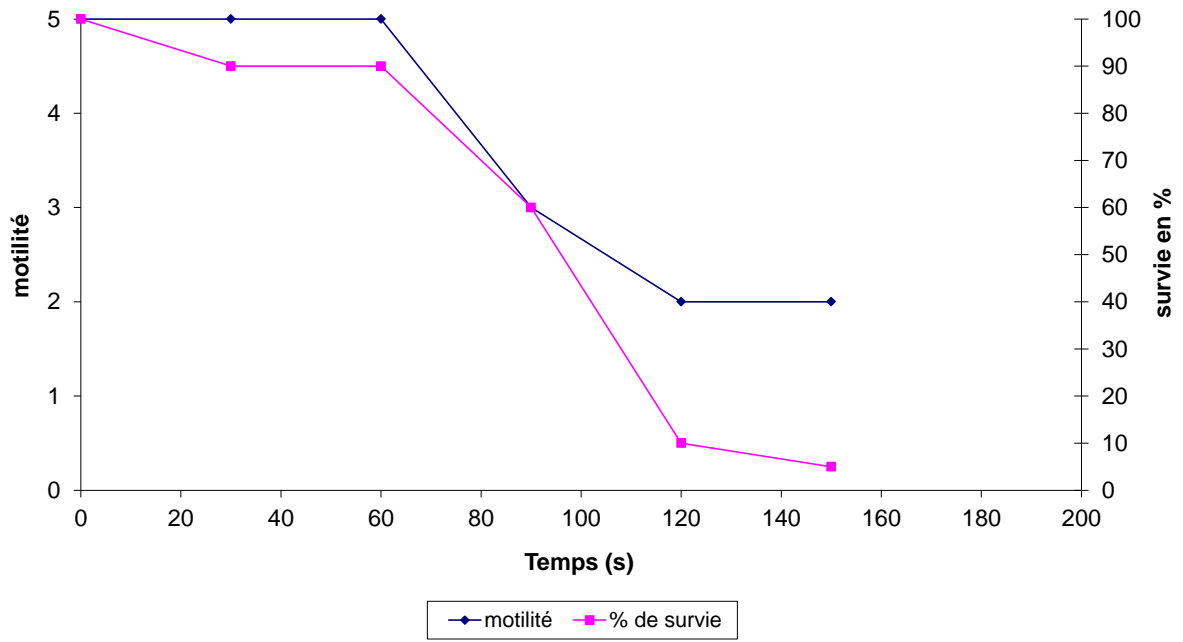
Cinq mâles (Martinien, 3220207, 3220132, 3219601, 88087) ont été injectés le 12 juin 2017 au matin. Au cours de la matinée du 13/06/17, ces 5 mâles ont été prélevés (**Tableau 4**).

**Tableau 4** : Données du sperme collecté pour chaque mâle le 12/06/17

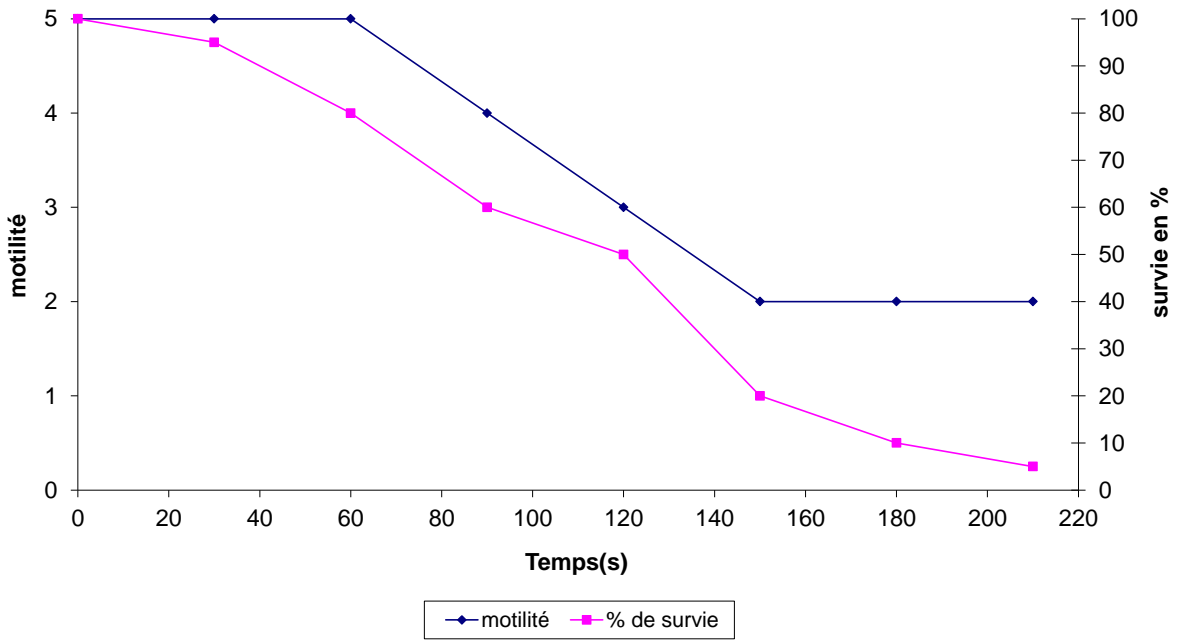
Nom mâle	Volume de sperme collecté	Aspect	pH Sperme	Motilité spontanée
Martinien	130	normal	7,68	0
3220207	100	normal	8,22	0
3220132	200	normal	7,95	0
3219601	150	clair	7,74	0
88087	120	normal	7,95	0

Les résultats des observations microscopiques sont les suivants (**Figure 214**)

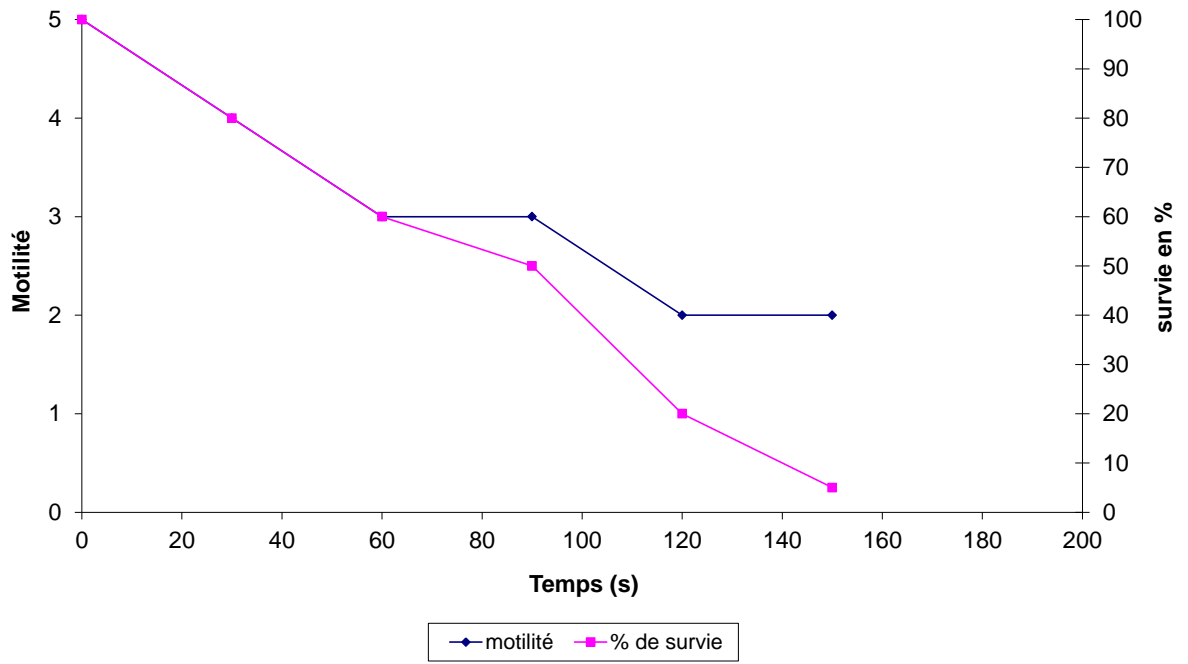
### Martinien



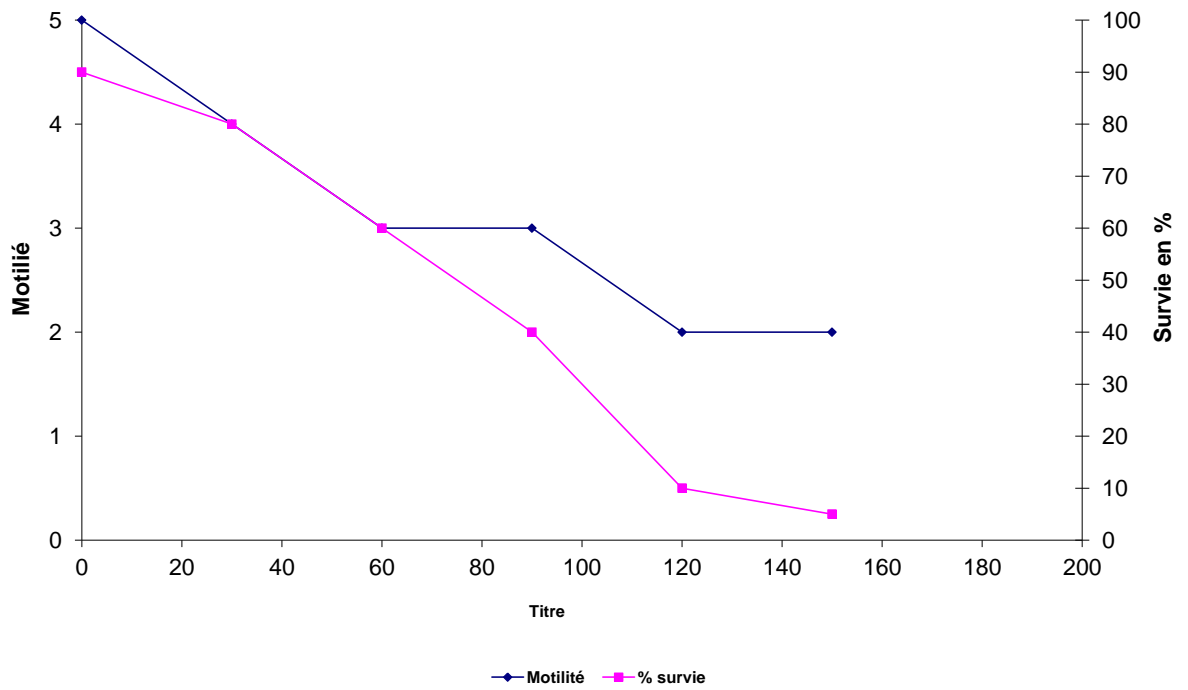
### 3220207



### 3220132

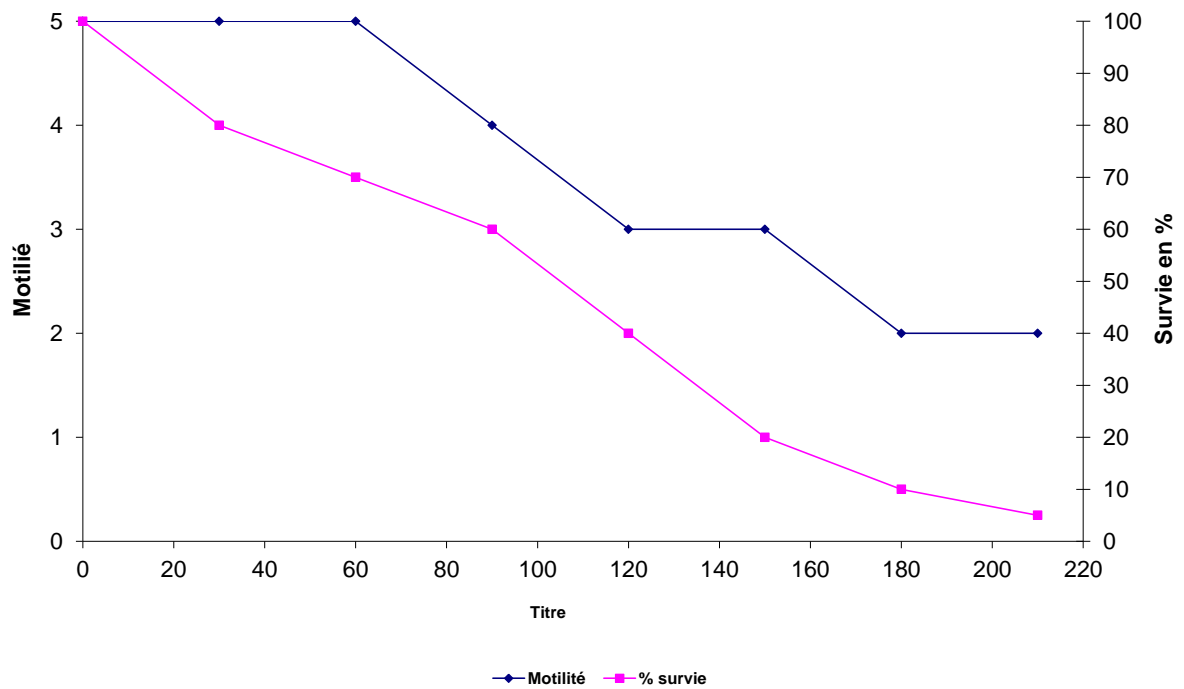


### 3219601





### 88087



**Figure 24 :** Résultats des motilités et des taux de survie des spermatozoïdes des mâles Martinien, 3220207, 3220132, 3219601, 88087 le 13 juin 2017. La motilité est indiquée en bleu et la survie en rose.

Les résultats d'évaluation de la qualité des semences de ces 4 mâles sont synthétisés dans le (Tableau 5).

**Tableau 5 :** Evaluation de la qualité des semences du 13 juin 2017

Nom	A T <sub>0</sub>		A 60 s		Final			Qualité
	Motilité	Survie	Motilité	Survie	Motilité	Survie	Temps	
Martinien	5	100	5	90	2	5	150	Bonne
3220207	5	100	5	80	2	5	210	Très Bonne
3220132	5	100	3	60	2	5	150	Moyenne
3219601	5	90	3	60	1	5	150	Moyenne
88087	5	100	5	70	2	5	210	Bonne

On peut donc en conclure que les meilleures semences pour ces 5 mâles sont 3220207, Martinien et 88087 avec des semences respectives de très bonne à bonne qualité.

On aurait donc pu sélectionner 3 mâles (Martinien, 3220207 et 88087) pour une reproduction et éventuellement les 2 autres mâles de qualité moyenne en cas de croisement génétique intéressant.

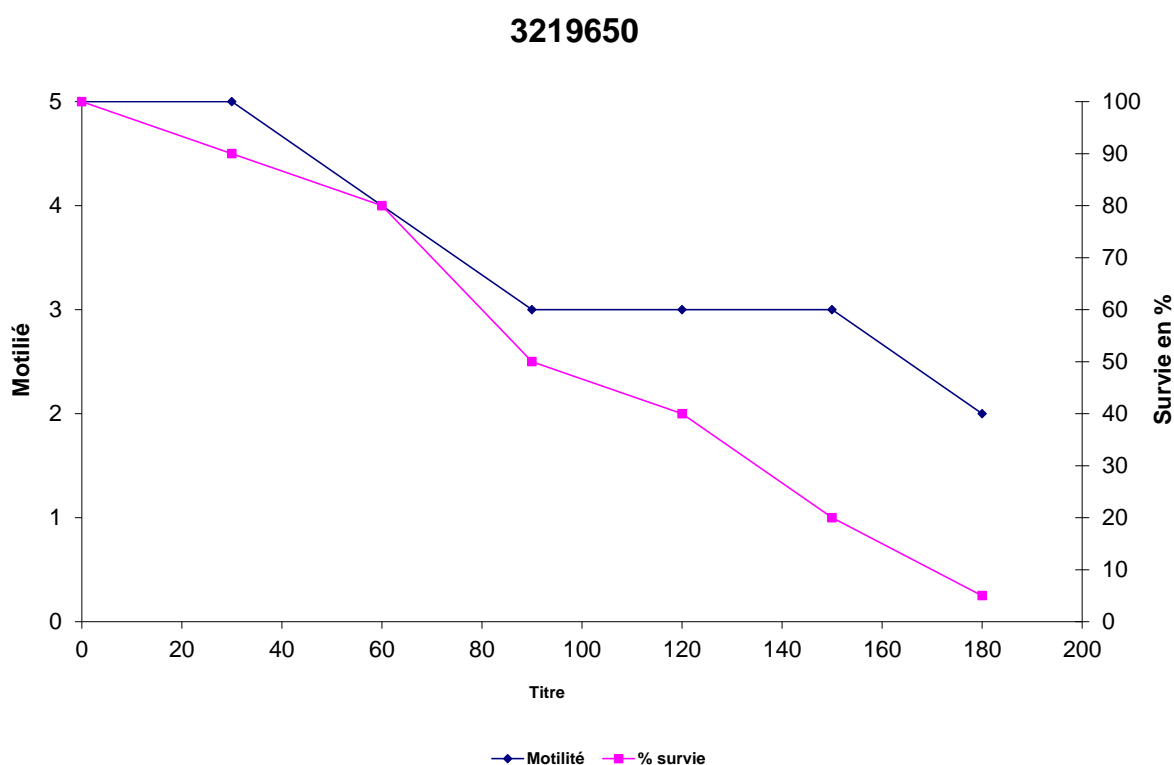
### III.3.2 Prélèvement du 20 juin 2017

Quatre mâles (32599890, 63917, 3255270, 3219650) ont été injectés le 19 juin 2017 au matin. Au cours de la matinée du 20/06/17, ces 4 mâles ont été prélevés (**Tableau 4**).

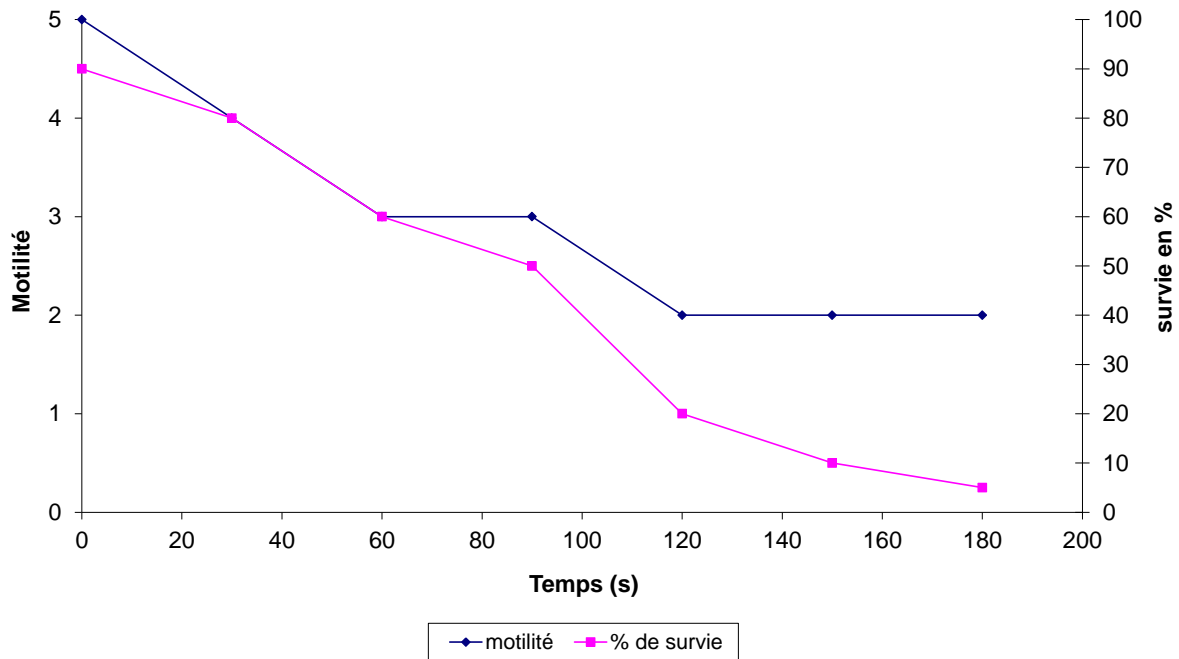
**Tableau 20** : Données du sperme collecté pour chaque mâle le 20/06/17

Nom mâle	Volume de sperme collecté	Aspect	pH Sperme	Motilité spontanée
32599890	50	Très clair, limpide	5,89	0
63917	50	clair	6,72	0
3255270	200	normal	7,31	0
3219650	150	Très concentré	7,35	0

Les résultats des observations microscopiques sont les suivants (**Figure 25**)



### 3255270



**Figure 35 :** Résultats des motilités et des taux de survie des spermatozoïdes des mâles 3255270 et 32119650 le 20 juin 2017. La motilité est indiquée en bleu et la survie en rose.

Les résultats d'évaluation de la qualité des semences de ces 4 mâles sont synthétisés dans le (Tableau 5).

**Tableau 21 :** Evaluation de la qualité des semences du 06 juillet 2016

Nom	A T <sub>0</sub>		A 60 s		Final			Qualité
	Motilité	Survie	Motilité	Survie	Motilité	Survie	Temps	
32599890	0	0	0	0	0	0	0	
63917	0	0	0	0	0	0	0	
3255270	5	90	3	60	2	5	180	Moyenne
3219650	5	100	4	80	1	5	180	Bonne

On peut donc en conclure que pour ces 4 mâles nous avons seulement une semence de bonne qualité (3219650) et une semence qualité moyenne (3255270).

Pour les autres mâles (32599890 et 63917) nous avons une semence qui était inactive dès le début.

On aurait donc pu sélectionner le mâle 3219650 pour une reproduction et éventuellement le mâle 3255270 de qualité moyenne en cas de croisement génétique intéressant.

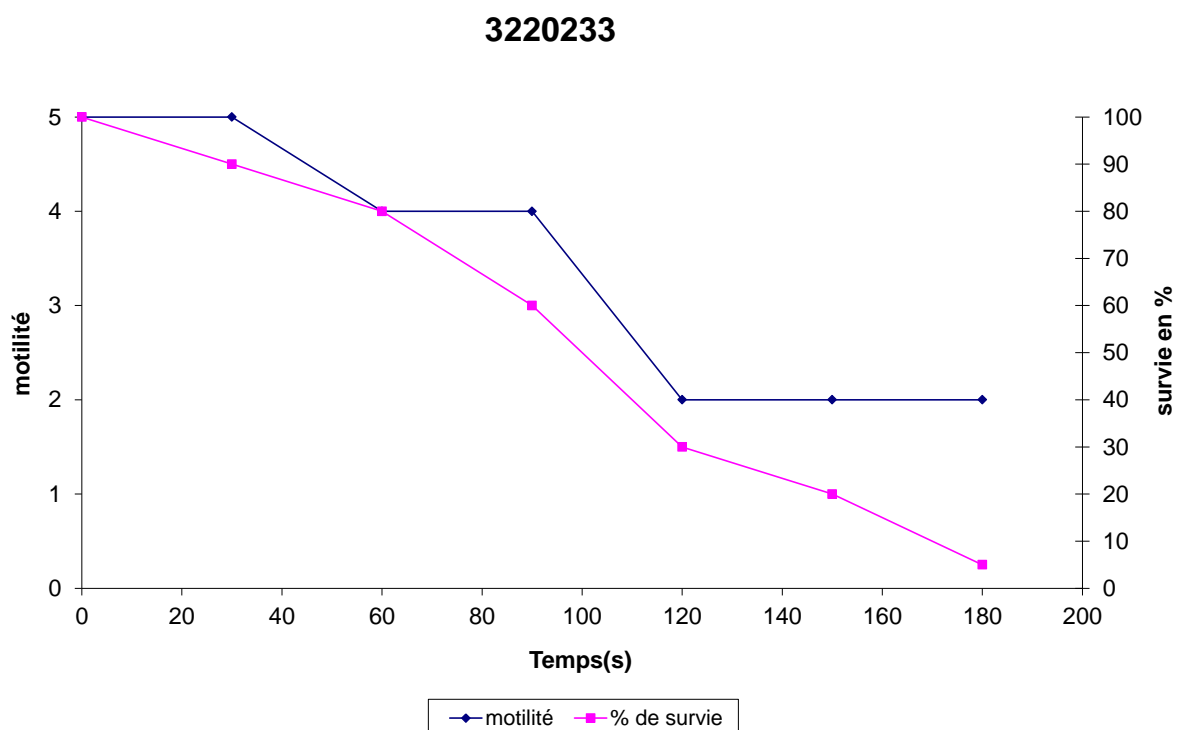
### III.3.3 Prélèvement du 29 juin 2017

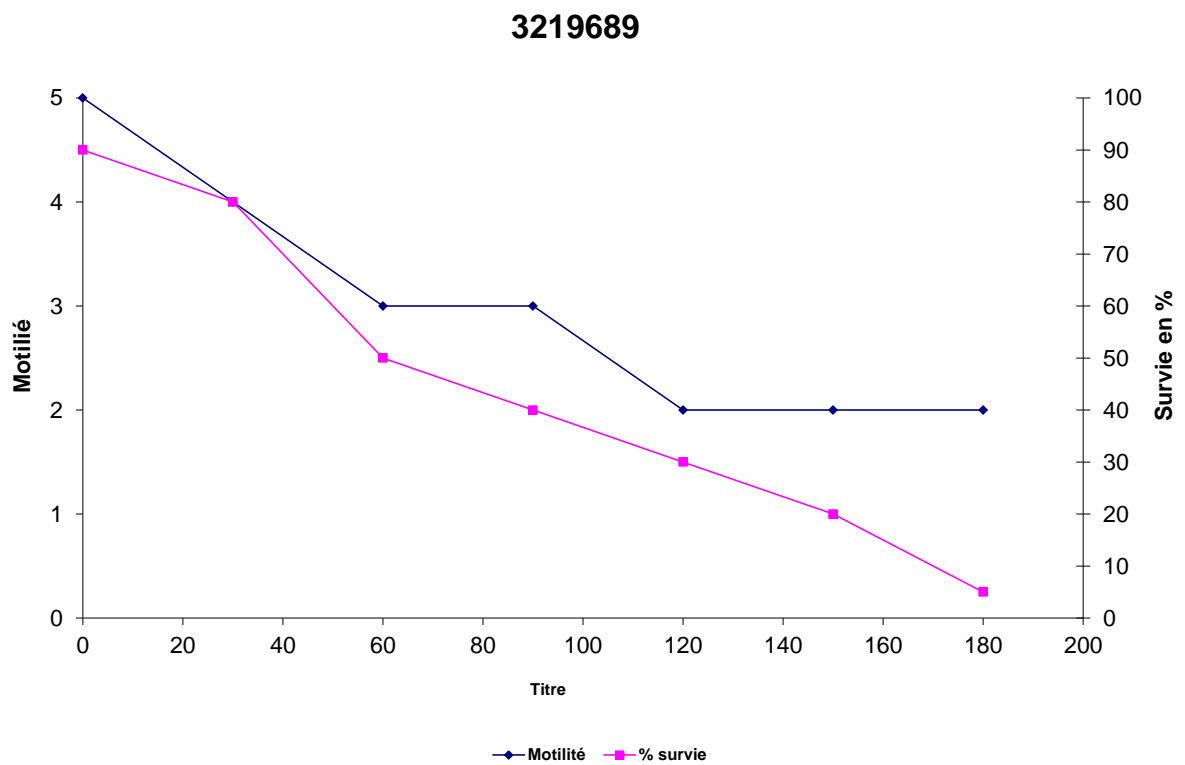
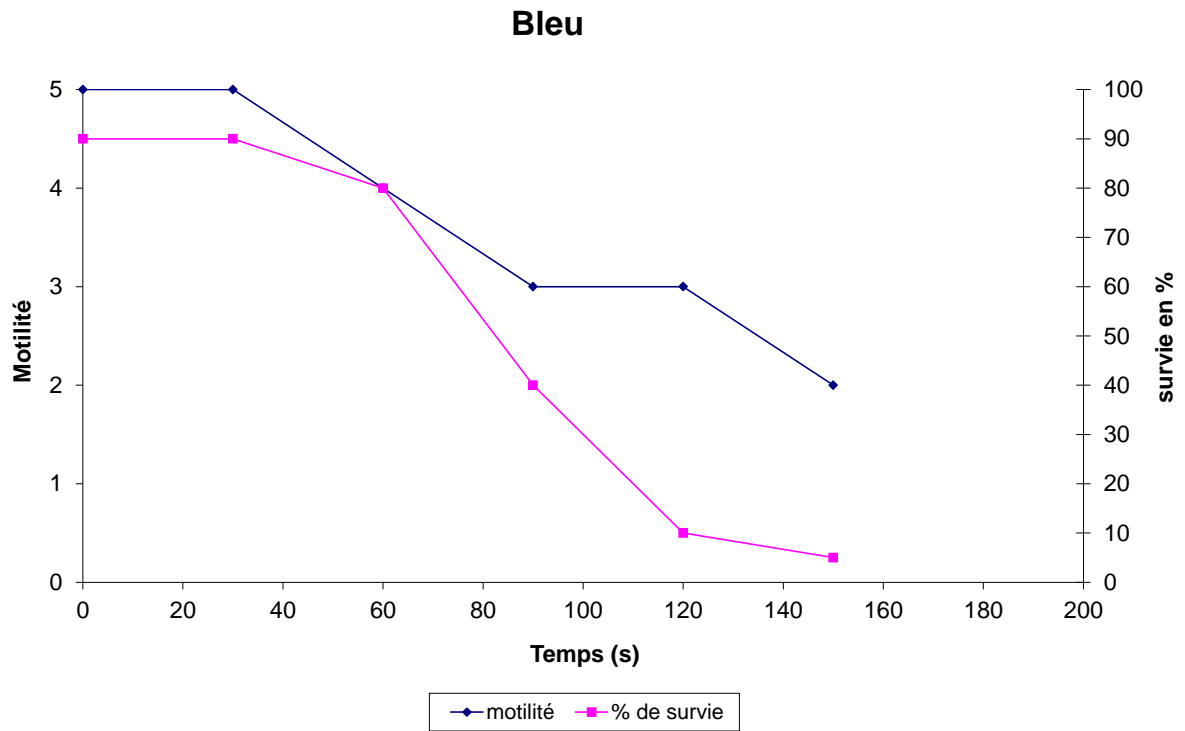
Six mâles (3219872, 3220233, Bleu, 3207482, 3219689, 3220003) ont été injectés le 28 juin 2017 au matin. Au cours de la matinée du 29/06/17, ces 6 mâles ont été prélevés (**Tableau 4**).

**Tableau 22** : Données du sperme collecté pour chaque mâle le 29/06/17

Nom mâle	Volume de sperme collecté	Aspect	pH Sperme	Motilité spontanée
3219872	30	limpide	6,86	0
3220233	200	concentré	7,87	0
Bleu	300	normal jaunâtre	7,84	0
3207482	20	limpide	5,72	0
3219689	200	normal	8,25	0
3220003	5	limpide	7,58	0

Les résultats des observations microscopiques sont les suivants (**Figure 26**)





**Figure 16 :** Résultats des motilités et des taux de survie des spermatozoïdes des mâles 3220233, Bleu et 3219689 le 29 juin 2017. La motilité est indiquée en bleu et la survie en rose.

Les résultats d'évaluation de la qualité des semences de ces 4 mâles sont synthétisés dans le (Tableau 5).

**Tableau 23** : Evaluation de la qualité des semences du 29 juin 2017

Nom	A T <sub>0</sub>		A 60 s		Final			Qualité
	Motilité	Survie	Motilité	Survie	Motilité	Survie	Temps	
3219872	0	0	0	0	0	0	0	
3220233	5	100	4	80	2	5	180	Bonne
Bleu	5	90	4	80	2	5	150	Bonne
3207482	0	0	0	0	0	0	0	
3219689	5	90	3	50	2	5	180	Moyenne
3220003	0	0	0	0	0	0	0	

On peut donc en conclure que pour ces 6 mâles nous avons seulement deux semences de bonne qualité (3220233 et Bleu) et une semence qualité moyenne (3219689).

Pour les autres mâles (3219872, 3207482 et 3220003) nous avons une semence qui était inactive dès le début. Le mâle 322003 était conservé en eau douce, contrairement aux autres qui étaient stabulés en eau saumâtre.

On aurait donc pu sélectionner les mâles 3220233 et Bleu pour une reproduction et éventuellement le mâle 3219689 de qualité moyenne en cas de croisement génétique intéressant.

### III.4 Conclusions

Le récapitulatif de la qualité des semences de la saison 2017 est synthétisé dans le tableau (**Tableau** ).

Contrairement à 2015 voire 2016 (année non significative étant donné le faible nombre de mâles prélevés) où une seule semence de bonne qualité avait été observée sur 13 prélèvements réalisés (7,7% de semence de bonne qualité), nous avons eu en 2017 1 semence de très bonne qualité (3220207) et 5 semences de bonne qualité (Martinien, 88087, 3219650, 3220233 et Bleu) sur 15 semences prélevées, ce qui correspond à 40% de semence de bonne qualité (très bonne semence comprise).

Nous avons eu 26,7 % de semences de moyenne qualité (soit 4 semences) potentiellement utilisable en vue d'une reproduction.

Et contrairement aux années précédentes nous n'avons pas eu de semences de « mauvaise qualité » en tant que telle. En effet nous avons récolté 5 semences qui étaient inactives dès le début (33,3%) donc des semences sans jugement.

La méthode maturation des mâles en eau douce a été conservée à l'identique depuis 2013.

En 2017, on aurait donc pu utiliser 6 semences de bonne qualité pour la fécondation des ovocytes des femelles voire même les 4 semences de qualité moyenne mais l'absence d'ovocytes n'a pas permis de réaliser de tentative de reproduction artificielle. Avec le grand nombre de mâles prélevés et de semences de bonne qualité

ainsi que moyenne, le choix dans les croisements pour garantir la diversité génétique aurait été potentiellement très important.

On peut noter aussi que le mâle ayant une semence de très bonne qualité (3220207) fait partie des 2 mâles ayant le pH du sperme le plus élevé (pH=8,22). Cependant un mâle de moyenne qualité (3219689) a également un sperme avec une valeur de pH élevée (8,25).

Tous les mâles ayant une semence de bonne qualité ont un pH compris entre 7,35 et 7,95.

Tous les mâles ayant une semence de qualité moyenne ont un pH compris entre 7,31 et 8,25.

Tous les mâles ayant une semence inactive dès le début ont un pH compris entre 5,89 et 7,58.

Il paraît difficile d'établir une corrélation entre pH du sperme et qualité de la semence. Cependant on peut dégager une légère tendance (mais qui reste à vérifier), à savoir qu'un pH de sperme se rapprochant de pH=8 donnera une semence majoritairement de bonne qualité.

Fin 2017, nous avons fait l'acquisition d'un logiciel (CASA) permettant de caractériser une semence d'un point de vue motilité et concentration. Il est prévu pour 2018 de tester ce nouveau matériel en parallèle des mesures réalisées au microscope actuellement.

En résumé on peut donc dire que nous avons eu 6 bonnes semences (très bonne comprise) sur 15 prélèvements soit 40% de bonnes semences ce qui est supérieur à 2014 et 2015 avec respectivement 41 et 7,7% de bonnes semences et inférieur à 2013 avec 61% de bonnes semences.

**Tableau 24** : Tableau récapitulatif du classement des semences au cours de la saison 2017 et valeurs de pH correspondant.

	13 juin	20 juin	29 juin
<b>Très Bonne Semence</b>	3220207 (pH=8,22)		
<b>Bonne semence</b>	Martinien (pH=7,68), 88087 (pH=7,95)	3219650 (pH=7,35)	3220233 (pH=7,87), Bleu (pH=7,84)
<b>Semence Moyenne</b>	3220132 (pH=7,95), 3219601 (pH=7,74)	3255270 (pH=7,31)	3219689 (pH=8,25)
<b>Semence Inactive</b>		32599890 (pH=5,89), 63917 (pH=6,72)	3219872 (pH=6,86), 3207482 (pH=5,72), 3220003 (pH=7,58)

### III.5 Congélation de semences

La cryoconservation permet la sauvegarde du patrimoine génétique des mâles à long terme. Elle facilite également la diffusion de la génétique et l'optimisation des plans de fécondation. A partir de 2008, une banque de semences a été constituée. Les protocoles utilisés sont ceux élaborés pour l'esturgeon (Horvath *et al.*, 2005; Horvath *et al.*, 2011) et adaptés au plan opérationnel.

Cette année 11 congélations de sperme ont été réalisées les 13, 20 et 29 juin 2017, il s'agit de la semence de 88087, 3219601, Martinien, 3220207 et 3220132 (le 13 juin) mais aussi de la semence de 3255270, 3219650 (le 20 juin) et enfin de la semence de 3220233 et 3219689 (le 29 juin) (**Tableau** ).

Toutes ces semences ont été congelées le jour même de leur prélèvement.

Le dilueur utilisé pour cette cryoconservation est le dilueur Tsvetkova ((dilution Modified Tsvetkova's (Horvath *et al.*, 2005; Dorsey *et al.*, 2011) dont la composition est la suivante :

Pour 1L de dilueur :

- 8,00982 g sucrose 23,4 mM
- 0,01864 g KCL 0,25mM
- 3,633 g Tris 30mM

Les paillettes utilisées ont une contenance de 0,5ml. Après avoir rempli individuellement les paillettes de semences avec une pipette l'excédent de semences est évacué grâce à un peigne (**Figure 17**).

Ensuite la paillette est rebouchée grâce à une poudre de rebouchage (**Figure18**) avant d'être congelé dans l'azote liquide (**Figure 19**).

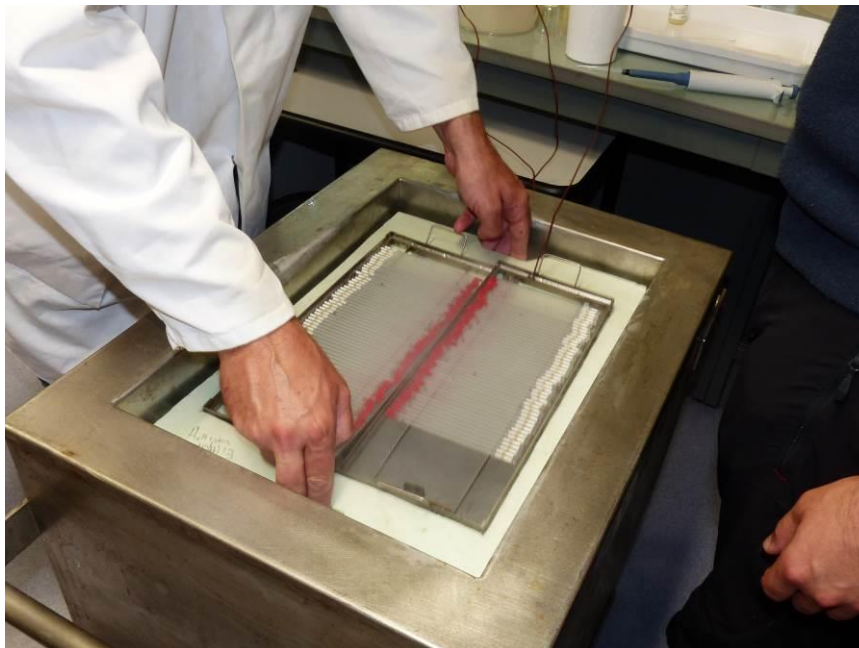


**Figure 17** : Mise en paillettes de la semence de *A. sturio* (© Ph Jatteau, Irstea)



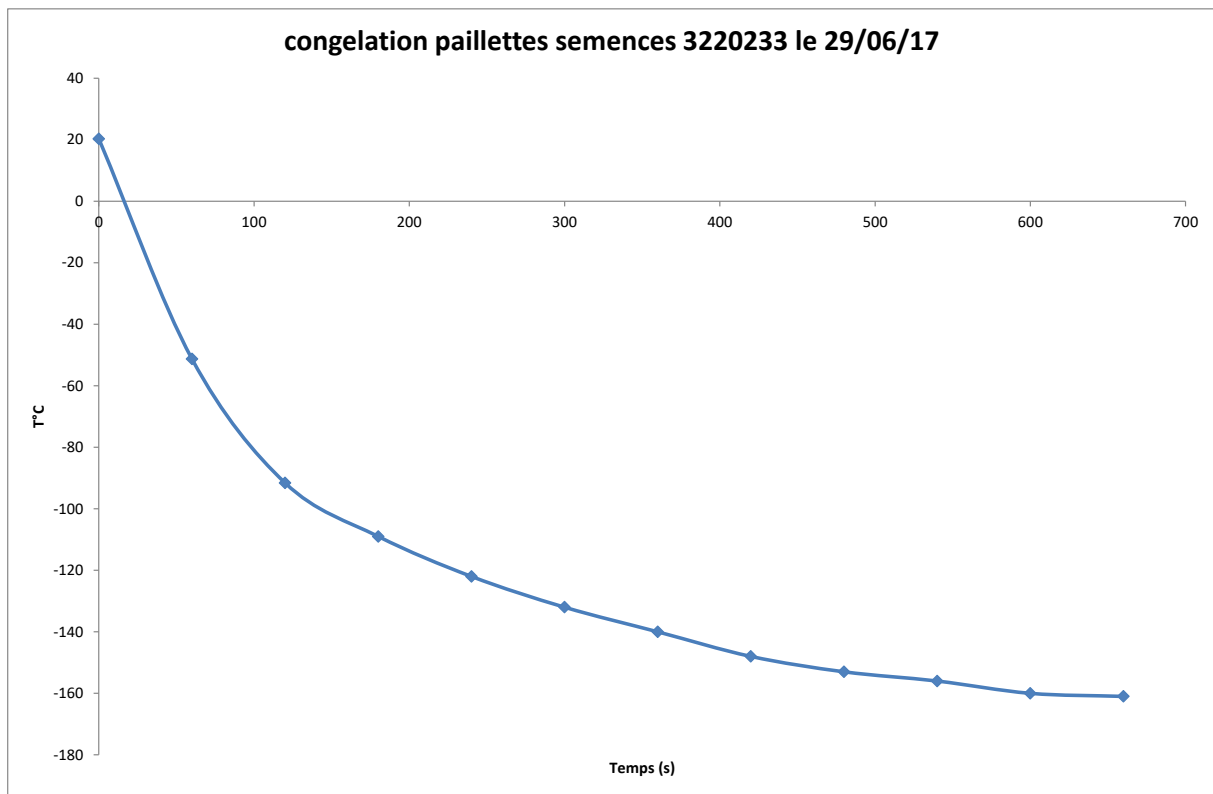


**Figure 18** : Mise en place de la poudre de rebouchage (© Ph Jatteau, Irstea)



**Figure 19** : Congélation de la semence de *A. sturio* (© Ph Jatteau, Irstea)

Le support à paillettes doit être plongé dans l'azote liquide et la température mesurée en temps réel afin qu'elle atteigne  $-150^{\circ}\text{C}$  en moins de 10 minutes (**Figure 20**).



**Figure 20** : exemple de descente en température lors la congélation des paillettes d' *A. sturio*

**Tableau 25 : Tableau récapitulatif des congélations de semences 2017**

Date	Nom	DILUTION			Nombre de Paillettes (0,5mL)	Nb de Visos	N° Canister	Localisation
		Semence	dilueur	méthanol				
13 juin	88087	33	26,4	6,6	110	4	1	Haut cuve n°3
	3219601	33	26,4	6,6	110	4	1	Haut cuve n°3
	Martinien	33	26,4	6,6	107	4	1(2 visos)	Haut cuve N°3
							2(2 visos)	Haut cuve N°3
	3220207	33	26,4	6,6	120	4	1	bas cuve n°2
	3220132	33	26.4	6.6	109	4	1(3 visos)	Bas cuve N°3
1(1 viso)							Haut cuve N°3	
20 juin	3255270	33	26.4	6.6	112	4	3	Bas cuve N°3
	3255270	33	26.4	6.6	109	4	3	Haut cuve N°3
	3219650	33	26.4	6.6	100	4	3	Bas cuve N°3
							3	Haut Cuve N°3
29 juin	3220233	33	26.4	6.6	103	4	3(2 visos)	Haut cuve N°3
							4(2 visos)	Bas cuve N°3
	3219689	33	26.4	6.6	124	4	4	Bas Cuve N°3
	Bleu	33	26.4	6.6	105	4	4	Haut Cuve N°3