



HAL
open science

La conservation des gamètes et l'insémination artificielle chez le bar et la daurade

Roland Billard

► **To cite this version:**

Roland Billard. La conservation des gamètes et l'insémination artificielle chez le bar et la daurade. L'aquaculture du Bar et des Sparidés: Actes du colloque sur l'aquaculture du Bar (loup) et des Sparidés tenu à Sète (France) les 15, 16 et 17 mars 1983, INRA Publi., 542 p., 1984, Hydrobiologie et Aquaculture, 2-85340-600-8. hal-02858433

HAL Id: hal-02858433

<https://hal.inrae.fr/hal-02858433>

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

La conservation des gamètes et l'insémination artificielle chez le bar et la daurade

R. BILLARD

*INRA, Laboratoire de Physiologie des Poissons,
Campus de Beaulieu, F35042 Rennes Cedex*

Résumé

Dans la plupart des écloséries de bar et de daurade, les géniteurs sont placés, après hypophysation, dans des bassins de ponte où la reproduction s'effectue naturellement, les œufs étant récupérés à la surverse du bassin. Cependant, dans certains cas, il peut être intéressant d'avoir recours à l'insémination artificielle (travaux de laboratoire, hybridation et autres interventions génétiques, transport de gamètes, etc.). Il est alors utile de mieux connaître la physiologie des gamètes en vue de conservation et de dilution pour en permettre une meilleure utilisation lors de l'insémination.

La survie des gamètes, dans le tractus génital, a été étudiée dans le cas du bar mâle et il apparaît que la qualité du sperme diminue durant la période de reproduction, en particulier la motilité et l'aptitude à la conservation et à la congélation. Il n'existe pas de travaux sur la durée de survie des ovules dans la cavité ovarienne après ovulation, chez le bar ou la daurade, mais des études similaires sur d'autres espèces, montrant les mêmes exigences écologiques, ont indiqué que la survie était de l'ordre d'une journée.

Il est possible de conserver le sperme de bar ou de daurade au réfrigérateur après prélèvement (plusieurs jours en début de période de spermiation mais seulement quelques heures en fin de spermiation chez le bar).

Le sperme de bar et de daurade se prête assez facilement à la congélation, à la condition qu'il soit prélevé en début de période de spermiation. Un dilueur (DCS B4), à base de NaCl (19,5 g/l), MgSO₄ 7H₂O (0,25 g/l), CaCl₂ 2H₂O (0,25 g/l), Glycocolle (6,25 g/l), Tris (2,4 g/l), pH 8,5 additionné de 10 p. 100 de DMSO s'est révélé favorable pour le bar et la daurade; le taux de dilution optimum est de un volume de sperme pour deux volumes de dilueur. Il n'y a pas lieu d'équilibrer; la vitesse de congélation doit être de l'ordre de 10 °C/mn et les paillettes peuvent être immergées dans l'azote liquide dès que la température atteint — 80 °C.

Cependant, ce dilueur entraîne une mise en mouvement des spermatozoïdes, ce qui nécessite une congélation très rapide après dilution. Il est nécessaire de rechercher un dilueur dans lequel les spermatozoïdes soient maintenus immobiles.

Une technique d'insémination artificielle a fait l'objet d'un début de mise au point chez le bar. L'eau de mer diluée, dont la salinité est ramenée à 20 p. 1 000 et tamponnée à pH 9, se révèle être un meilleur dilueur d'insémination que l'eau de mer à 37 p. 1 000. Cependant le

dilueur mis au point pour la congélation (DCS B4) apparaît sensiblement meilleur que l'eau de mer à 20 p. 1 000. Une fois dilués, les gamètes perdent très rapidement leur fertilité et, lors de l'insémination, ils doivent être mélangés très rapidement au dilueur dans la proportion de 2 l de dilueur pour 1 l d'œufs, auxquels on ajoute 2 à 6 ml de sperme selon l'avancement de la saison de reproduction.

L'insémination artificielle est pratiquée chez la plupart des espèces de poissons faisant l'objet d'un élevage intensif ou semi-intensif ou de repeuplement; elle est générale pour les Salmonidés et devient de plus en plus fréquente pour la carpe. Cependant, pour plusieurs autres espèces, on constate que les géniteurs une fois « hypophysés » sont placés en bassins de ponte où la fraie se déroule spontanément; les œufs (pélagiques ou semi-pélagiques) sont ensuite recueillis à la sortie du bassin: c'est, par exemple, le cas des cyprinidés chinois (Marcel et Lecomte, 1980), pour les espèces dulcaquicoles et du bar, de la daurade, du turbot et de la sole pour les espèces marines. Une telle technique est justifiée dans le cas des espèces chinoises par les hautes températures d'élevage (25-28 °C) responsables des processus de surmaturation des ovules, dans le tractus génital des femelles (durée de survie de l'ordre de 30-40 mn); il serait, en effet, difficile de prélever les ovules pour pratiquer l'insémination artificielle dans un délai très court après l'ovulation (cela supposerait une fréquence d'examen des femelles trop élevée). Chez le bar et la daurade, pour lesquels les températures d'élevage lors de la reproduction sont moins élevées que pour les espèces chinoises, les risques de surmaturité sont moindres et le choix de cette méthode, facilitée par l'existence d'œufs pélagiques, est lié à des raisons de simplicité. La technique d'insémination artificielle reste cependant applicable et nous en avons tenté la mise au point, en raison d'une demande qui ne manquera pas de se faire sentir dans les écloséries: meilleur rendement de l'utilisation des gamètes (sperme en particulier), possibilité de développer des travaux de sélection génétique et d'hybridation, utilisation de gamètes conservés ou prélevés à la criée (Divanach et Kentouri, 1984, ce volume), travaux en laboratoires tels que les études sur les gamètes, la fécondation et le début du développement embryonnaire.

Nous examinerons, tout d'abord, l'aptitude à la conservation *in vitro* et *in vivo* des gamètes, les possibilités de congélation puis l'insémination artificielle proprement dite.

La composition des dilueurs utilisés

La composition des différents dilueurs utilisés pour la dilution du sperme et des ovules en vue de l'insémination ou en vue de la cryoconservation est présentée dans le tableau 1. Dans tous les cas, les milieux sont tamponnés à pH 8,5 (Tris-HCl 20 mM).

Tableau 1. — Composition des différents dilueurs utilisés; les concentrations sont exprimées en mM et le pH est établi à 8,5

Composition	Intitulé du dilueur	B4	B3	B2	B1
NaCl		334	334	171	334
KCl		—	—	—	13
MgSO ₄ 7H ₂ O		7	—	—	—
NaH CO ₃		—	—	—	26
CaCl ₂ 2H ₂ O		1,7	—	—	—
Glycocolle		83	83	—	83
Tris		20	20	20	20

La survie des gamètes *in vivo* dans le tractus génital

Chez le bar, ce problème n'a été abordé que pour le mâle. Billard *et al.* (1977) ont signalé que le sperme de bar subissait des phénomènes de vieillissement au cours de la période de spermiation qui se traduisaient par une diminution de la durée de motilité (fig. 1) et de l'aptitude à la conservation (voir ci-après). En effet, la reproduction revêt, chez le bar comme chez la plupart des espèces de poissons des régions tempérées, un caractère très saisonnier et la spermatogénèse s'achève entre les mois de décembre et février, selon les régions (Barnabé, 1976, 1980; Zohar *et al.*, 1984, ce volume). Tous les spermatozoïdes sont formés avant que ne débute la spermiation et ne seront éliminés du testicule que très progressivement au cours de la période de reproduction; les derniers spermatozoïdes recueillis sont ainsi plus âgés que ceux collectés en début de spermiation et leur qualité apparaît fortement amoindrie. Un examen de la morphologie des spermatozoïdes au microscope électronique montre que de nombreux spermatozoïdes présentent des modifications de structure importantes en fin de saison de reproduction, allant jusqu'à des gonflements et des ruptures de membrane plasmique. Il faut cependant noter que seule la durée de motilité est réduite et que l'intensité de motilité instantanée, mesurée immédiatement après dilution (la motilité n'intervient qu'après dilution dans l'eau, chez les poissons) reste voisine de quatre pour les trois périodes considérées (fig. 1). Vers la fin de la saison de reproduction, nous avons pu constater que des spermatozoïdes fraîchement collectés montraient une légère motilité avant toute dilution, ce qui ne s'observe jamais en début de reproduction. Il est vraisemblable que ces activations spontanées, liées à un changement de physiologie du sperme et/ou de la composition du liquide séminal, conduisent à un « épuisement énergétique » prématuré des spermatozoïdes, ce qui contribue à la mauvaise qualité du sperme. Un examen en microscopie optique ($G \times 100$) permet aisément d'identifier de tels spermatozoïdes qu'il est alors possible de rejeter. Un tel vieillissement du sperme est signalé chez la truite et se traduit par une diminution de la quantité d'AMP cyclique dans les spermatozoïdes (Beneau et Ternier, 1980) et une altération

du pouvoir fécondant (Billard, 1982). La durée de survie des ovules dans le tractus génital, après ovulation, déjà évoquée dans l'introduction, varie selon les espèces et dépend de facteurs comme la température d'élevage lors de l'ovulation, de la qualité du liquide ovarien, de la taille des œufs, etc. Elle est de l'ordre de l'heure pour la carpe (Horvath, 1978 ; Suzuki, 1980), de la journée pour la limande japonaise (Hirose *et al.*, 1979), le brochet (Marcel *et al.*, 1983) et de une à trois semaines pour la truite (Escaffre *et al.*, 1977). La survie des gamètes dans le tractus d'animaux morts (après capture, par exemple) est traitée par ailleurs (Divanach et Kentouri, 1984, ce volume).

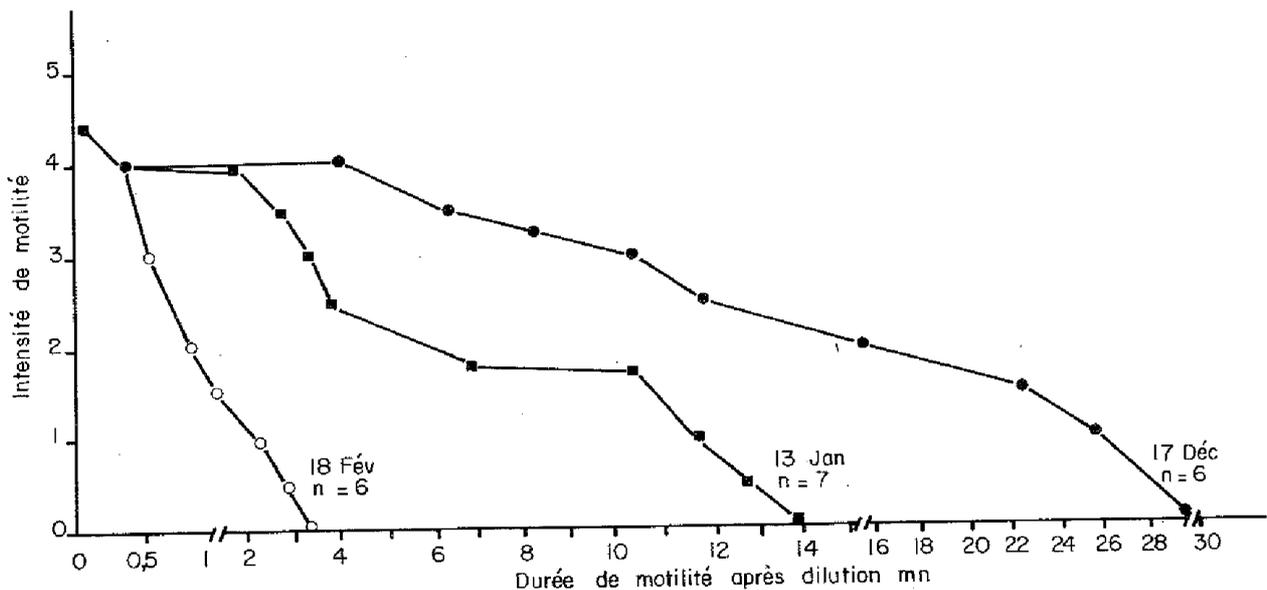


Figure 1. — Durée de motilité en minutes des spermatozoïdes du bar, après dilution dans l'eau de mer diluée (salinité à 20 p. 1000). Le sperme a été prélevé pour analyse à trois reprises au cours de la période de spermiation ; n = nombre de mâles testés (d'après Billard *et al.*, 1977). Dans cette expérience, comme dans les expériences suivantes, l'intensité de motilité est estimée d'après une échelle arbitraire allant de 0 (aucun spermatozoïde en mouvement) à 5 où la plupart des spermatozoïdes présentent une forte motilité (vagues). Après dilution 1/100 (100 μ l de sperme dans 10 ml de dilueur) dans un tube à essai, une aliquote est observée sous microscope le plus rapidement possible après dilution et ensuite à intervalles réguliers jusqu'à cessation des mouvements. Les observations sont faites à température ambiante (20°C).

Sur les possibilités de conservation du sperme *in vitro*

1. Conservation du sperme intact non dilué à + 4°C

Il est possible de conserver la laitance recueillie chez un poisson. La durée de vie va varier selon l'espèce, la température de stockage et le temps écoulé depuis le début de la spermiation. Si une dilution est pratiquée, il est impératif d'utiliser un

dilueur qui ne mette pas les spermatozoïdes en mouvement. Il est, en général, recommandé de ne pas garder le sperme dans un flacon bouché en couche épaisse ; il faut, au contraire, utiliser des flacons à large col dans lesquels la hauteur du sperme n'excède pas 0,5 cm. En cas de conservation durant plusieurs jours, on recouvre ce flacon d'ouate humide pour éviter l'évaporation (cf. revue par Scott et Baynes, 1980). Chez la truite, la conservation est améliorée en présence d'O₂ (Billard, 1981). Chez le bar et la daurade, la durée de conservation de la laitance, stockée non diluée au réfrigérateur à + 4°C, est de 70 h et 80 h respectivement en début de spermiation (fig. 2), mais au moins dans le cas du bar, cette durée de survie diminue fortement lorsque s'avance la période de reproduction. Cette observation doit être prise en compte par le pisciculteur qui, en fin de spermiation, aura intérêt à limiter la durée de conservation du sperme, à augmenter la quantité de laitance mise en œuvre lors de l'insémination (voir ci-après), voire même à augmenter le nombre de mâles lorsque la ponte a lieu naturellement en bassin. Des résultats, non publiés, obtenus par Mauviot et Billard, montrent que le sperme dilué dans un milieu à base de vitellus, qui maintient les spermatozoïdes en état d'inactivité, se conserve pendant 48 h. Si les spermatozoïdes sont mis en mouvement lors de la dilution, la conservation n'est pas possible.

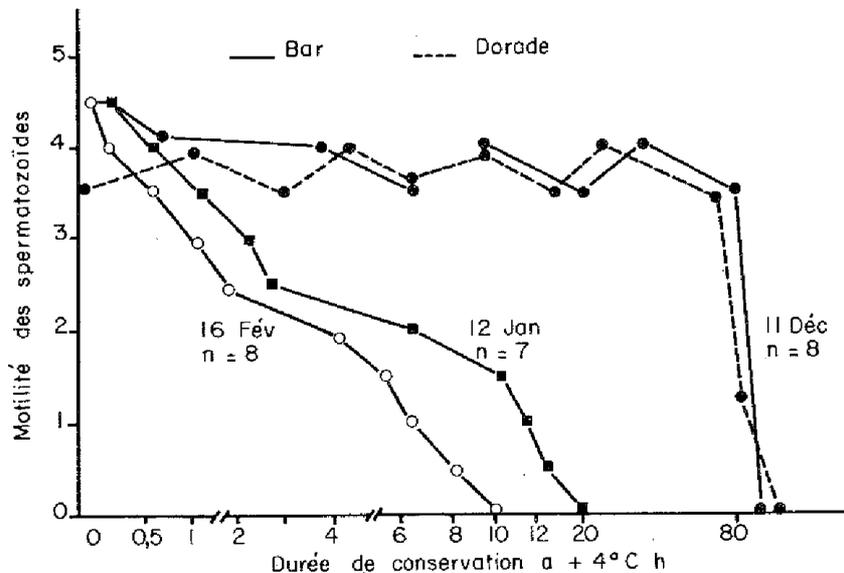


Figure 2. — Durée de survie du sperme de bar et de daurade. Le sperme de bar est prélevé à divers moments de la période de spermiation et stocké intact (non dilué) au réfrigérateur à + 4°C. La survie est appréciée par l'intensité de motilité mesurée immédiatement après dilution au 1/100 dans de l'eau de mer à 20 p. 1 000 de salinité. Même procédure de dilution que dans la figure 1, mais les observations faites toutes les 15 secondes ne portent que sur une minute et la moyenne en est établie. La survie du sperme de daurade n'a été testée qu'en début de période de spermiation.

2. La congélation du sperme

Des expériences sur la congélation du sperme de bar et de daurade ont été effectuées au laboratoire mais n'ont fait l'objet que de rapports à diffusion limitée (Billard et Dupont, 1975 ; Dupont, 1976 a). La technique de congélation employée est décrite dans les figures 3-4. Chez le bar, un premier travail a consisté à comparer quelques cryoprotecteurs introduits seuls ou en association. Le DMSO (diméthylsulfoxyde), introduit à la concentration de 10 p. 100 dans un milieu tamponné très simple (NaCl 171 mM, Tris HCl 20 mM, pH 8,5), conduit à une meilleure reprise de motilité après décongélation que le glycérol (tabl. 2). L'association de ces deux cryoprotecteurs avec le sulbtosan (polyvinylpyrrolidone = PVP) n'entraîne pas d'amélioration notable mais permet de réduire très légèrement l'activité des spermatozoïdes après décongélation (tabl. 2). Dans ces conditions, les récupérations de motilité après dilution restent satisfaisantes et cela dans une large gamme de dilutions et de vitesses de congélation (paillettes placées verticalement) (tabl. 3). Dans ce milieu hypotonique, un examen en microscopie électronique a montré qu'apparaissent des phénomènes de gonflement de membranes et qu'ils étaient d'autant plus marqués que la saison de reproduction était avancée (avec une amplification

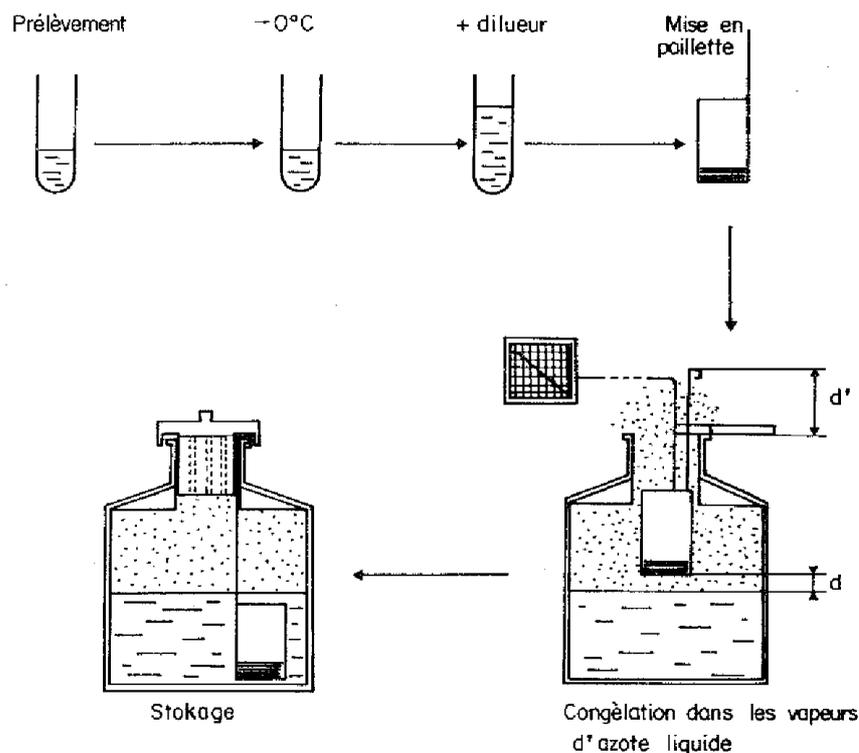


Figure 3. — Technique de congélation employée. Immédiatement après la récolte, le sperme, recueilli dans un tube à essai, est placé sur la glace fondante puis mélangé au dilueur dans des proportions allant de 1/3 à 1/10 (vol. de sperme, vol. de dilueur). Le mélange est mis en paillettes puis placé dans une nacelle qui est descendue dans les vapeurs d'azote à une distance du niveau d'azote liquide (mesurée en d') permettant d'obtenir la vitesse de congélation voulue. Lorsque les paillettes sont placées verticalement dans la nacelle, les vitesses de congélation ne sont pas homogènes (fig. 4). Il est donc préférable de les placer horizontalement.

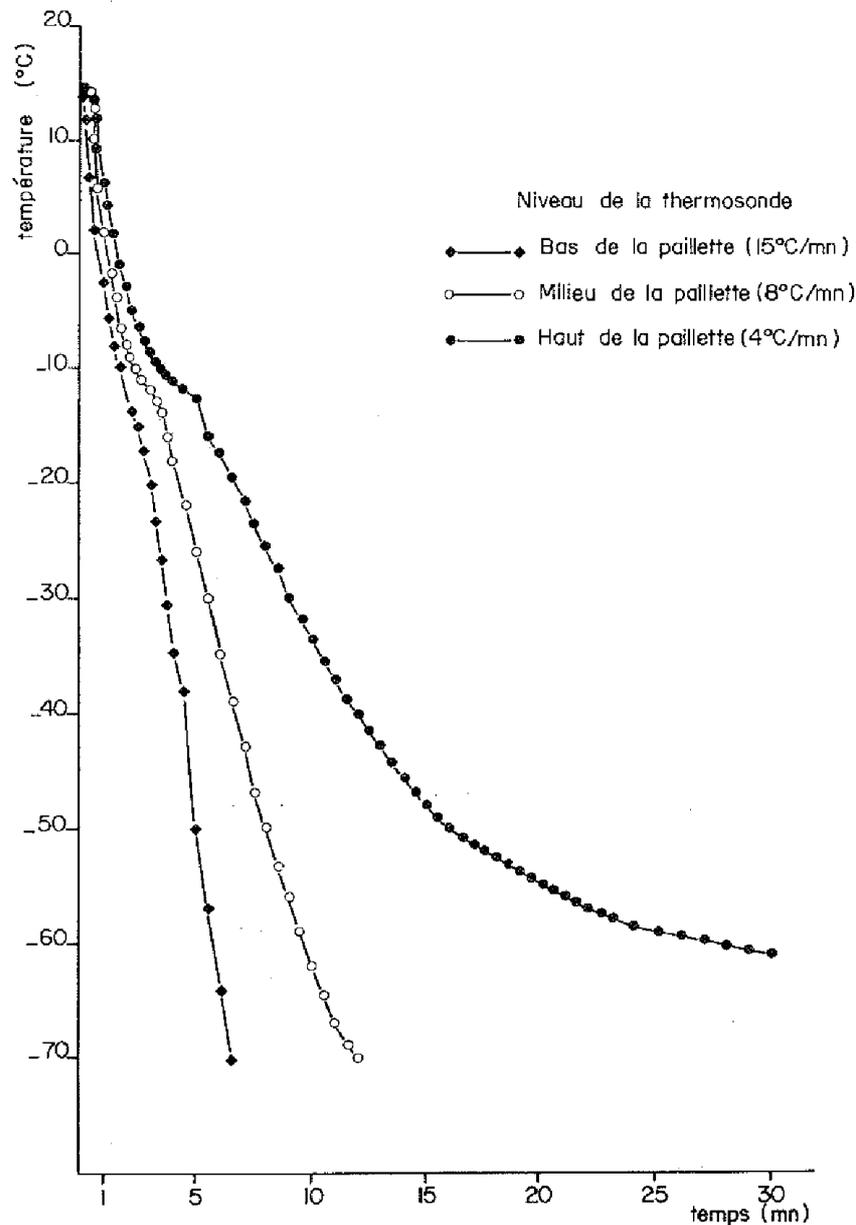


Figure 4. — Vitesse de congélation mesurée à l'aide d'un thermocouple introduit à différents niveaux à l'intérieur d'une paillette de 500 μl , placée verticalement dans la nacelle (fig. 3). La vitesse de congélation mesurée entre + 15°C et - 50°C est de 15°C/mn en bas, 8°C/mn au milieu et 4°C/mn au sommet de la paillette.

des phénomènes déjà signalés dans les spermés témoins non dilués), de sorte que nous avons recherché des dilueurs plus complexes et de molarité plus élevée (tabl. 4). Le glycérol à 20 p. 100 apparaît alors favorable, comme le DMSO à 10 p. 100, mais nécessite une plus longue durée d'équilibration (voir ci-après). La dilution 1/2 (un volume de sperme pour deux volumes de dilueur) donne de meilleurs résultats que la dilution 1/5. D'autres paramètres ont été testés en se référant, en plus, au taux de fécondation qui est estimé par dénombrement des taux d'embryonnement après 48 h d'incubation à 14°C (24 h à 12°C pour la daurade), l'insémination étant pratiquée en mélangeant le sperme (équivalent de 50 μl de sperme avant dilution)

Tableau 2. — Motilité des spermatozoïdes de bar avant et après congélation du sperme à -196°C . Taux de dilution du sperme: 1/3; vitesse de congélation: $10^{\circ}\text{C}/\text{mn}$. Vitesse de décongélation: $100^{\circ}\text{C}/\text{mn}$. Taux de dilution lors de la décongélation 1/100 dans tous les cas (dilution dans l'eau de mer à 20 p. 1 000 de salinité). Dilueur B2. La motilité des spermatozoïdes est évaluée d'après une échelle arbitraire de 0 à 5 (cf. légende fig. 1). La motilité est mesurée sur un mélange de sperme (au moins 5) immédiatement après décongélation.

Cryoprotecteurs concentration en pourcentage			Motilité des spermatozoïdes			
			Avant congélation		Après congélation	
DMSO V/V	Glycérol V/V	PVP V/V	Spontanée	Après dilution	Spontanée	Après dilution
10			2	4	3	4
	17		1	3	2	2
10		3.5	1	—	1	3
	17	3.5	2	3	1	1

Tableau 3. — Motilité des spermatozoïdes de bar avant et après congélation du sperme dans l'azote liquide (-196°C). Conditions de décongélation, cf. tabl. 2. Le dilueur B2 est additionné de DMSO (10 p. 100) et de PVP (3,5 p. 100).

Taux de dilution du sperme		Vitesse de congélation $^{\circ}\text{C}/\text{mn}$	Motilité des spermatozoïdes			
			Avant congélation		Après congélation	
			Spontanée	Après dilution	Spontanée	Après dilution
1/3		1	1	4	1	3
1/3		20	2	4	1	4
1/3		100	2	4	2	3
1/10		1	1	4	1	4
1/10		20	1	4	1	3
1/10		100	2	3	1	3

avec 300 à 400 ovules pour le bar, 200 à 300 ovules pour la daurade, puis en ajoutant 10 ml d'eau de mer, dilués à 20 p. 1 000 de salinité; le taux de dilution du sperme est alors de 5×10^{-3} . Le sperme de daurade peut aussi être congelé (tabl. 5), avec des taux de fécondation comparables aux témoins. Plusieurs étapes de la congélation ont été étudiées plus en détail. Il apparaît tout d'abord qu'une équilibration est défavorable (fig. 5-6), car les spermatozoïdes qui sont légèrement ou fortement mis en mouvement (tabl. 4-5) « s'épuisent » avant d'être immobilisés par

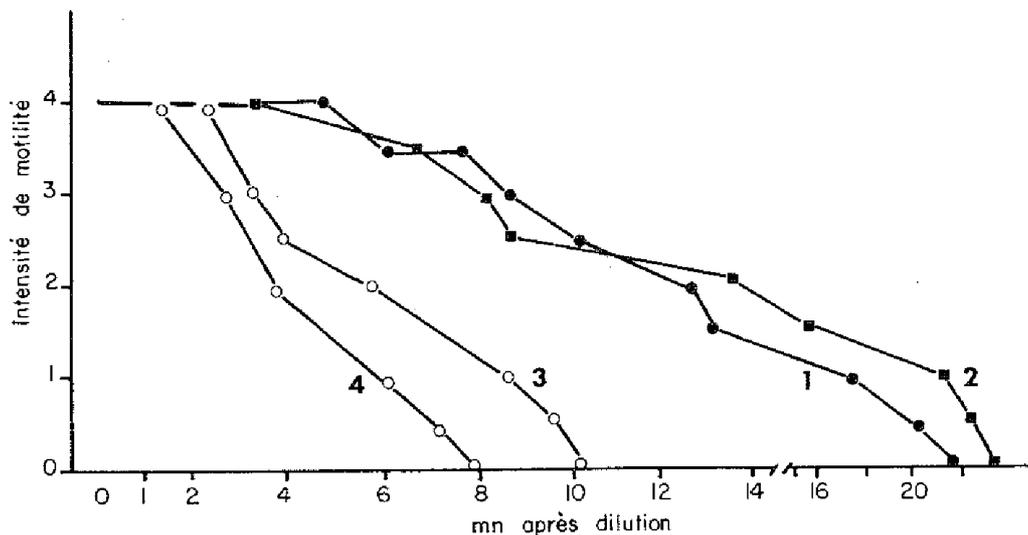


Figure 5. — Influence de la durée d'équilibration (temps écoulé entre la dilution du sperme et la congélation) sur le succès de la congélation du sperme de bar, évalué par la motilité observée après décongélation et dilution. Plusieurs taux de dilution sont utilisés: 1: 1/2; 2: 1/3; 3: 1/5; 4: 1/10, dilueur B4 + 10 % de DMSO. Exp. le 17-12 en début de période de spermiation.

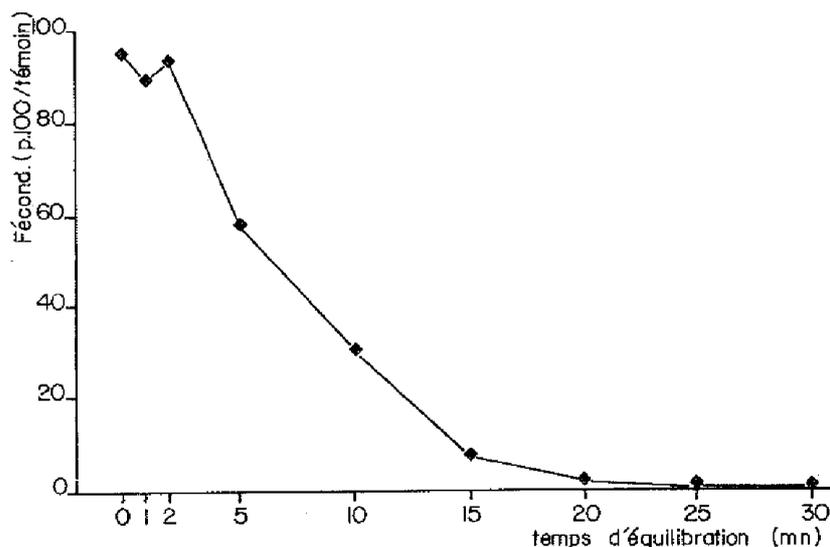


Figure 6. — Influence de la durée d'équilibration sur le succès de la congélation de sperme de la daurade. Le critère retenu ici est le taux de fécondation.

le froid. Il faut, au contraire, procéder à la congélation le plus rapidement possible après dilution. Cela est plus crucial encore pour la daurade (fig. 6). La congélation doit être maintenue à la vitesse définie jusqu'à atteindre la température de -80°C ; après quoi, les paillettes peuvent être immergées dans l'azote liquide (fig. 7). La vitesse optimale de congélation, qui varie légèrement selon la concentration de

Tableau 4. — Motilité des spermatozoïdes de bar avant et après congélation dans l'azote liquide à -196°C . Vitesse de congélation: $10^{\circ}\text{C}/\text{mn}$. Conditions de décongélation, cf. tabl. 2.

Dilueurs	Cryoprotecteurs			Motilité des spermatozoïdes			
	Nature	Concentration en p. 100 v/v	Taux de dilution du sperme	Avant congélation		Après congélation	
				Spontanée	Après dilution	Spontanée	Après dilution
B ₃	DMSO	5	1/2	1	3	3	2
		10		1	3	3	3
		20		1	2	2	2
	DMSO	5	1/5	1	2	3	3
		10		1	2	3	3
		20		1	2	2	1
	Glycérol	5	1/2	1	2	2	2
		10		1	2	2	2
		20		1	3	3	3
	Glycérol	5	1/5	1	2	0	0
		10		1	1	0	0
		20		1	3	3	3
B ₂	DMSO	10	1/2	1	4	3	3
	Glycérol	20	1/2	1	4	3	4

DMSO, a été définie à $10-20^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ pour le bar (fig. 8) et $10^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ pour la daurade (fig. 9). La concentration de DMSO est optimale à 10 p. 100 et le taux de dilution du sperme est très favorable à 1/2. D'autres dilueurs ont été testés et des résultats préliminaires de Mauviot et Billard, non publiés, ont montré que des améliorations pouvaient être apportées en introduisant du jaune d'œuf, des protéines de type albumine (albumine sérique bovine) ou des milieux de culture plus complexes (INRA Menezo B2, Eagle). Des analyses complémentaires du sperme ont montré que des enzymes (deshydrogénases, phosphatases, glycosidases), mesurées par le test qualitatif APIZYM, n'étaient pas modifiées après congélation-décongélation. Les juvéniles, issus de fécondations pratiquées avec du sperme congelé, n'ont pas montré de différences par rapport aux larves témoins issues de sperme frais, à la fois dans les taux de survie et la morphologie, après huit à dix jours d'élevage post-éclosion.

Tableau 5. — Motilité des spermatozoïdes de daurade et pourcentages de fécondations obtenus après insémination d'ovules avec du sperme conservé deux jours à -196°C dans l'azote liquide (comptage sur des œufs embryonnés, 24 h après insémination). Le sperme ayant été congelé provient des mêmes mâles que celui ayant servi de témoin lors de la décongélation. Les spermatozoïdes de cinq mâles sont mélangés dans chaque cas. L'insémination témoin a été faite avec du sperme frais (test de la fécondabilité des ovules). Dans chaque lot, l'équivalent non dilué de $50\ \mu\text{l}$ de sperme frais est utilisé pour l'insémination. Vitesse de congélation $1^{\circ}\text{C}/\text{mn}$; vitesse de décongélation $100^{\circ}\text{C}/\text{mn}$. (Dilueur B1, cf. tabl. 1.)

Cryoprotecteur			Motilité des spermatozoïdes				Nombre total d'œufs	p. 100 de fécondation	
Nature	Concentration en p. 100 v/v	Taux de dilution du sperme	Vitesse de congélation $^{\circ}\text{C}/\text{mn}$	Avant congélation		Après congélation			
				Spontanée	Après dilution	Spontanée			Après dilution
DMSO	5	1/10	1	4	3	3	3	300	28
	10			3	3	3	3	240	37
	15			0	2	3	3	245	16
	20			0	2	0	1	360	24
Glycérol	5	1/10	1	3	2	3	2	240	26
	10			1	2	2	2	788	32
	15			1	4	3	3	—	—
	20			1	4	2	2	300	8
DMSO	5	1/2	1	4	3	2	0	260	15
	10			3	3	3	1	330	34
Glycérol	5	1/2	1	3	3	3	1	330	28
	10			0	2	2	2	385	17
DMSO	5	1/2	100	4	3	0+	0		
	10			3	3	0+	0		
Glycérol	5	1/2	100	3	3—	0	0		
	10			0	2	0+	0		
Témoins :									
Sperme non congelé								200	34
Insémination sans sperme								250	0,4

Cette technique de congélation permet d'obtenir des taux de fécondation assez proches des témoins frais ou dilués, mais non congelés. Cependant, les quantités de sperme ($50\ \mu\text{l}$ pour 200-400 ovules) sont très élevées. Il faudrait vérifier si, chez le bar et la daurade, on retrouve le phénomène observé chez la truite où la quantité de sperme congelé doit être plus élevée (au moins dix fois plus) qu'avec du sperme frais (Legendre et Billard, 1980). Il existe chez le bar, comme chez les Salmonidés (Legendre et Billard, 1980) ou le *Brachydanio* (Harvey *et al.*, 1982) une grande

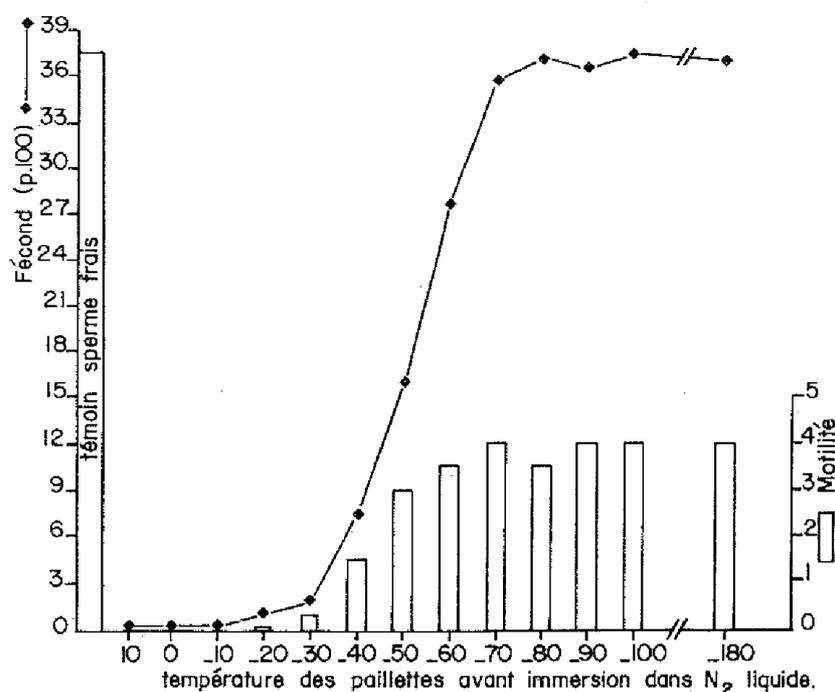


Figure 7. — Définition de la température à laquelle les paillettes contenant du sperme de daurade peuvent être immergées dans l'azote liquide. Les paillettes sont congelées à la vitesse de 10°C/mn, dilueur B4 + 10 % DMSO, dilution du sperme 1/2. Les résultats de la congélation sont appréciés par les taux de fécondation obtenus avec le sperme décongelé.

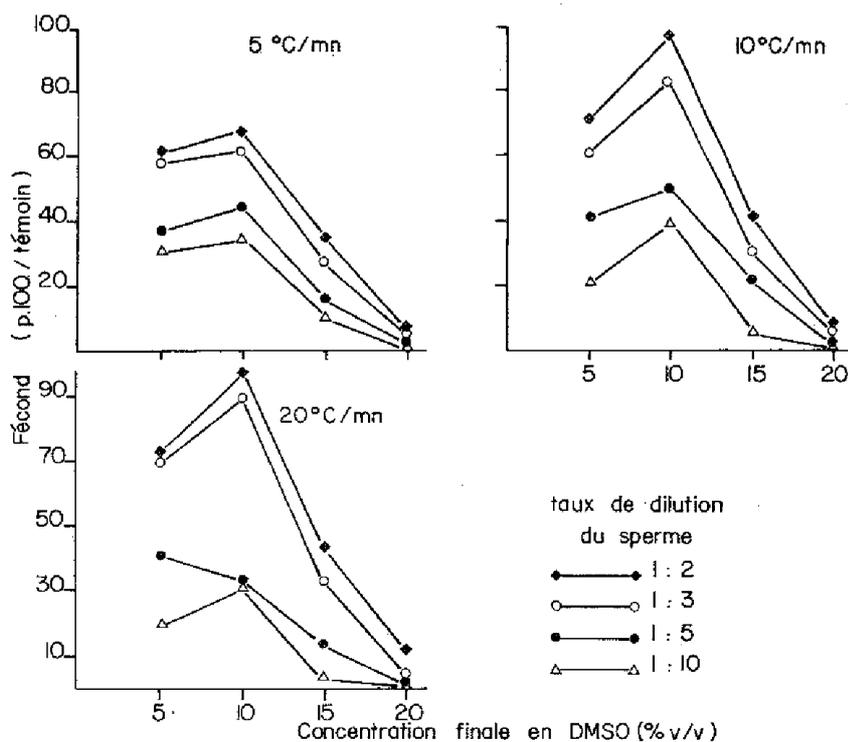


Figure 8. — Définition des conditions de congélation les plus favorables pour le sperme de bar en considérant la vitesse de congélation (5-10-20°C/mn), la concentration du dilueur en DMSO et le taux de dilution du sperme. Dilueur B4.

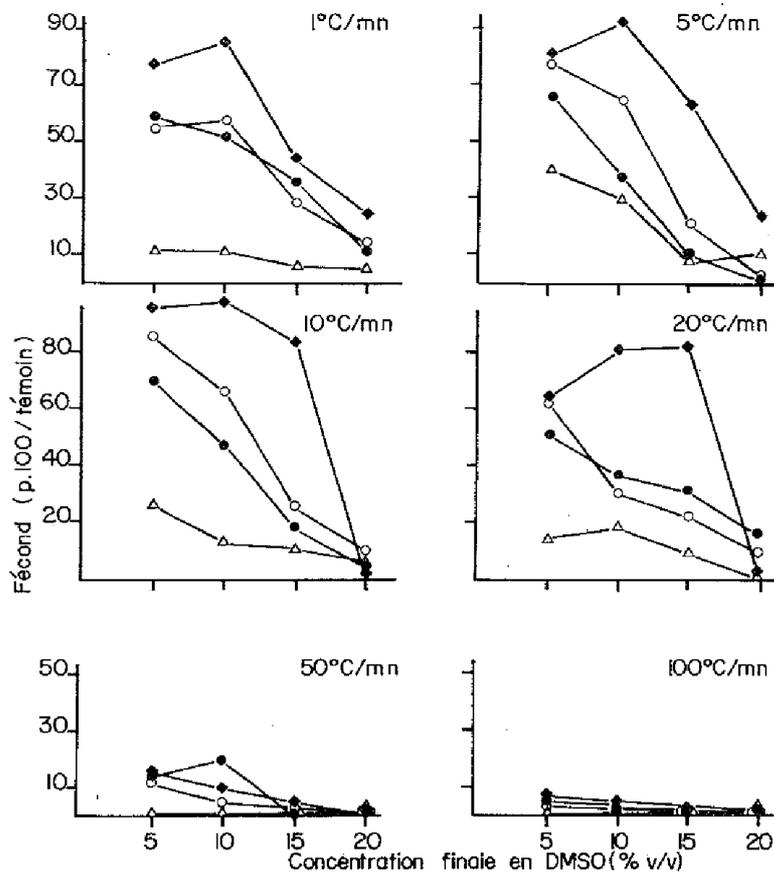


Figure 9. — Même expérience que dans la figure 8, mais concernant la daurade; dilueur B2.

variabilité inter-mâles dans l'aptitude du sperme à la congélation. Cela est sans doute lié à des différences dans la composition du liquide séminal et dans la physiologie des spermatozoïdes, différences que nous ne sommes pas encore en mesure d'apprécier. D'une façon plus générale, une meilleure connaissance de la physiologie du sperme est nécessaire pour comprendre, par exemple, les mécanismes d'inhibition de la motilité; cela permettrait la mise au point d'un dilueur dans lequel les spermatozoïdes seraient maintenus en immobilité totale.

3. Conservation des ovules

La conservation à sec *in vitro* des ovules n'a pas été testée chez le bar et la daurade, alors que des durées de survie de quelques heures, à des températures de l'ordre de 4°C, ont été rapportées pour d'autres espèces: 18 h pour le brochet (Marcel *et al.*, 1983), 6 h pour la carpe (Marcel, 1981). Après dilution, les survies sont très brèves dans l'eau de mer ou le B4 — quelques minutes, voir ci-après (fig. 15) —, ce qui est comparable aux données de Middaugh et Takita (1983) chez *Menidia menidia* qui observent des survies de 5 mn. Ces durées sont particulièrement faibles au regard des résultats rapportés pour d'autres espèces comme le hareng ou la

morue, où les ovules dilués dans l'eau de mer conservent intégralement leur fécondabilité pendant 6 h (Davenport *et al.*, 1981) et 30 mn (Dushkina, 1975), respectivement.

L'insémination artificielle du bar

L'un des objectifs majeurs de l'insémination artificielle est d'offrir aux gamètes le milieu le plus favorable possible afin d'obtenir la fécondation de tous les ovules fécondables et leur développement ultérieur avec le minimum de spermatozoïdes. Chez le bar et la daurade, un certain nombre d'expériences ont porté sur la définition d'un dilueur (cf. aussi Dupont, 1976 b). L'eau de mer à différents taux de dilution et ajustée à une gamme de pH allant de 5 à 10 a été testée et les combinaisons de pH élevé (8-9) et de salinité voisine de 20 p. 1 000 sont les meilleures, en se référant à l'intensité de motilité mesurée dans la minute qui suit la dilution (fig. 10). Les résultats sont alors comparables à ceux obtenus avec le dilueur B4. Des performances similaires sont relevées en faisant appel à un dilueur fait de NaCl seul; les pH élevés (8-9) et la salinité de 20 p. 1 000 entraînent les intensités de motilité les plus élevées, mais ces dernières sont légèrement inférieures à celles obtenues

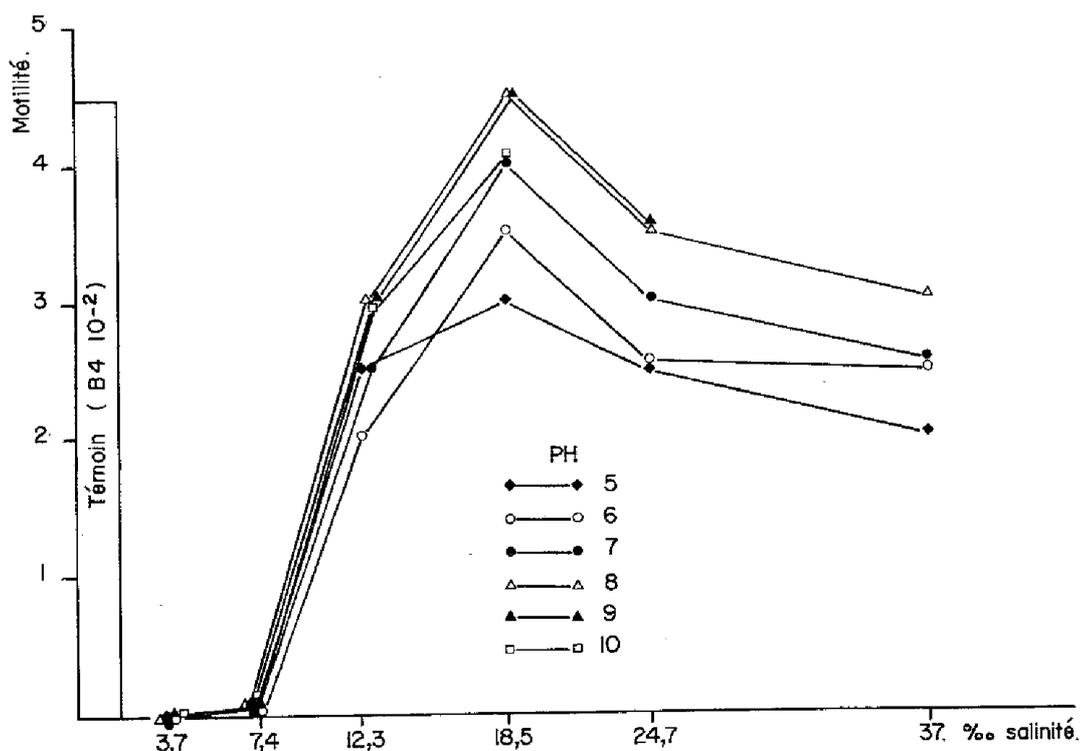


Figure 10. — Intensité de motilité du sperme de bar dilué au 1/100 dans des solutions d'eau de mer de salinité et de pH variables. Les conditions de mesures sont celles décrites dans les légendes des figures 1 et 2. Le témoin correspond à une mesure de motilité faite dans le dilueur de congélation B4 à une dilution au 1/100.

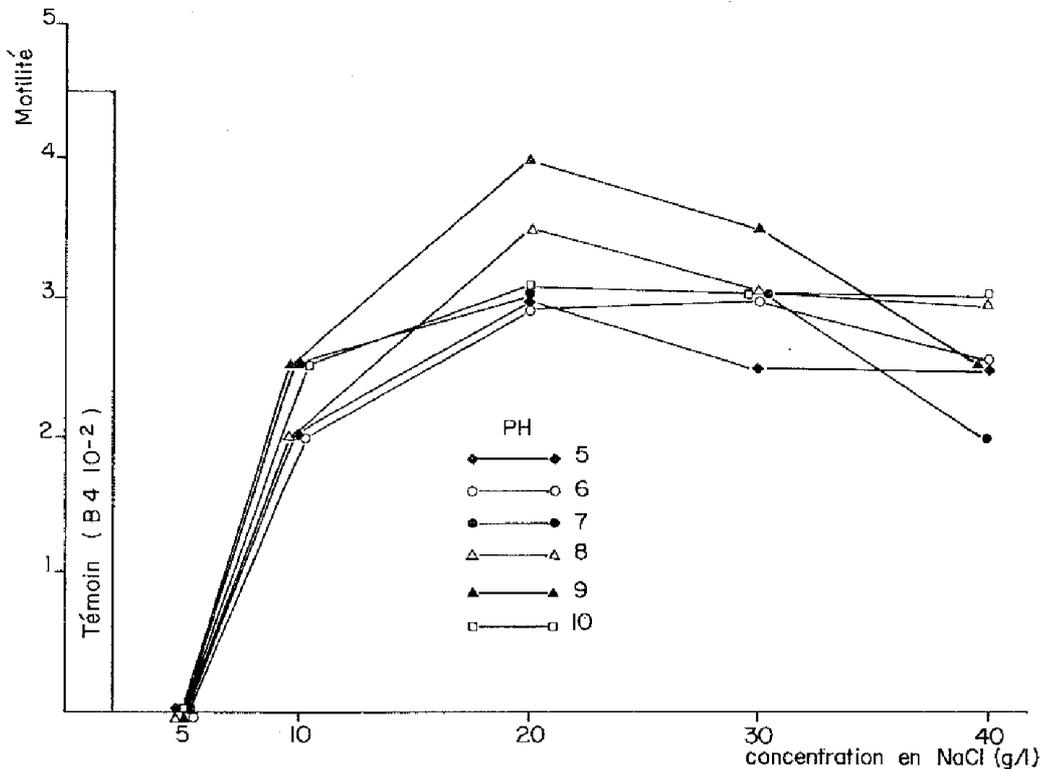


Figure 11. — Même expérience que celle de la figure 10, mais avec un dilueur composé seulement de NaCl tamponné avec Tris-HCl 20 mM (B2) (du glycolcolle 50 mM est substitué au Tris aux pH 9 et 10.

avec B4 (fig. 11). Ces effets favorables des pH élevés, qui peuvent correspondre à une élévation du pH intracellulaire (Shapiro *et al.*, 1983), ont déjà été signalés chez les Salmonidés (Billard, 1978) et chez le brochet (Duplinsky, 1982). Une comparaison eau de mer à 20 p. 1 000 de salinité et dilueur B4 est présentée dans les figures 12 et 13, en se référant à la motilité et au pourcentage de fécondation. Dans tous les cas, le dilueur B4 apparaît légèrement supérieur à l'eau de mer à 20 p. 1 000. Les fortes dilutions (en particulier celles avec 20 ml de dilueur) sont défavorables, même si le volume de sperme augmente. Le rapport optimum entre les composants (ovules, sperme, dilueur) est aussi étudié dans l'expérience de la figure 14. Les taux de fécondation sont comparables pour les lots de 100 à 600 ovules, quel que soit le taux de dilution, ce qui confirme que l'augmentation de la quantité de spermatozoïdes disponibles par ovule ne se traduit pas par une augmentation du taux de fécondation. Sachant qu'il y a environ 600 à 1 000 ovules/ml, on voit qu'il faut, au minimum 2 l de dilueur et 2 ml de sperme pour 1 l d'ovules. Cependant, il s'agit de sperme prélevé au début de la période de spermiation et compte tenu des phénomènes de diminution de la qualité du sperme, il convient d'en augmenter le volume mis en œuvre. Une situation similaire a été rapportée chez les Salmonidés où la qualité du sperme diminue aussi durant la période de spermiation et où les quantités utilisées au début sont triplées vers la fin (Billard, 1978). Il reste à vérifier la durée de survie des gamètes (spermatozoïdes et ovules) pris séparément après dilu-

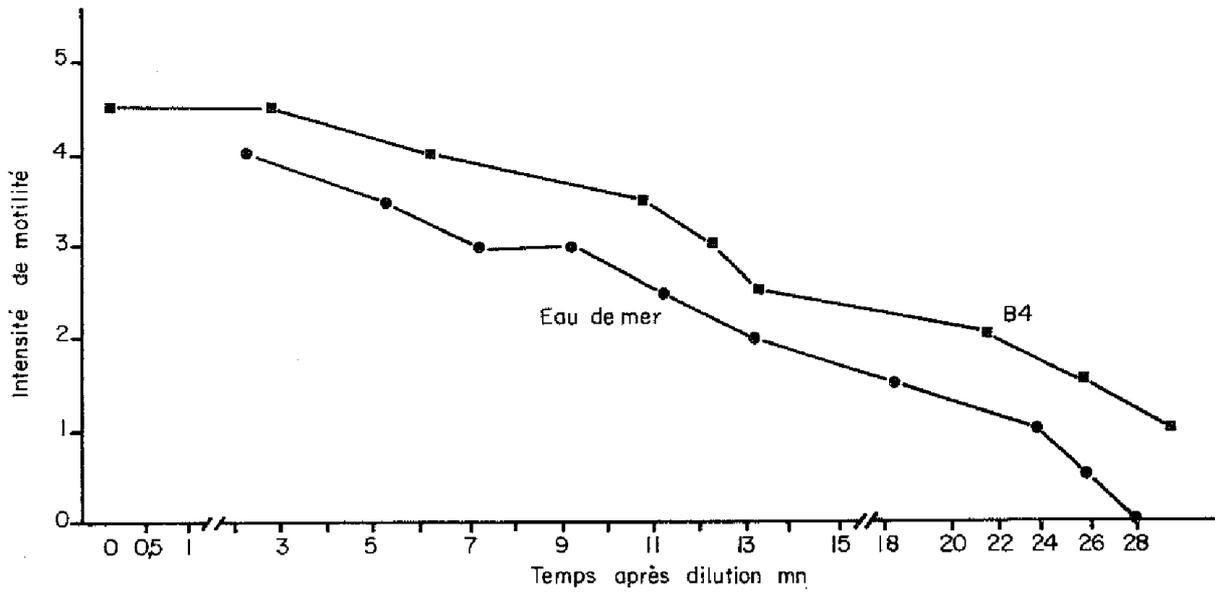


Figure 12. — Évolution de l'intensité de motilité après dilution du sperme de bar (10^{-2}) dans B4 et eau de mer à 20 p. 1 000; mesures faites sur les spermés de cinq mâles.

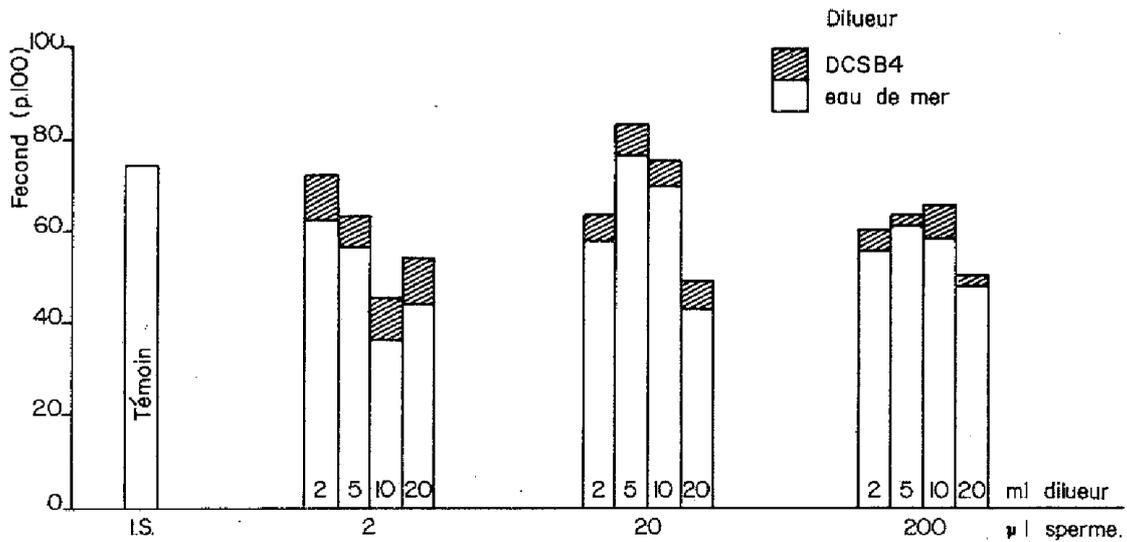


Figure 13. — Taux de fécondation obtenus chez le bar après insémination de lots de 500 à 600 ovules avec des quantités croissantes de sperme (2 à 200 μ l) et de dilueur: B4 ou eau de mer à 20 p. 1 000 de salinité (2 à 20 ml). Le témoin correspond à une insémination selon la méthode sèche (mélange des ovules avec 50 μ l de sperme et addition d'eau de mer complète ensuite).

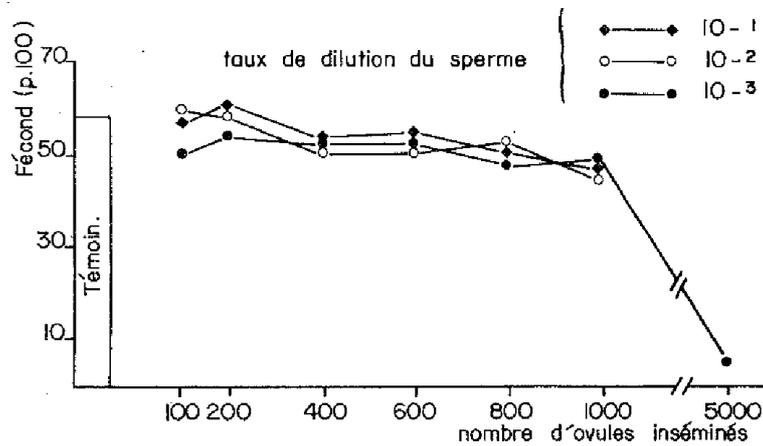


Figure 14. — Évolution du taux de fécondation obtenu chez le bar après insémination avec des quantités d'ovules croissantes et à différents taux de dilution. Chaque lot d'ovules (de 100 à 5000) est mélangé à 5 ml de dilueur B4, mélange auquel on ajoute 5, 50 ou 500 μ l de sperme soit des taux de 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , respectivement. Mêmes conditions que pour l'expérience de la figure 13.

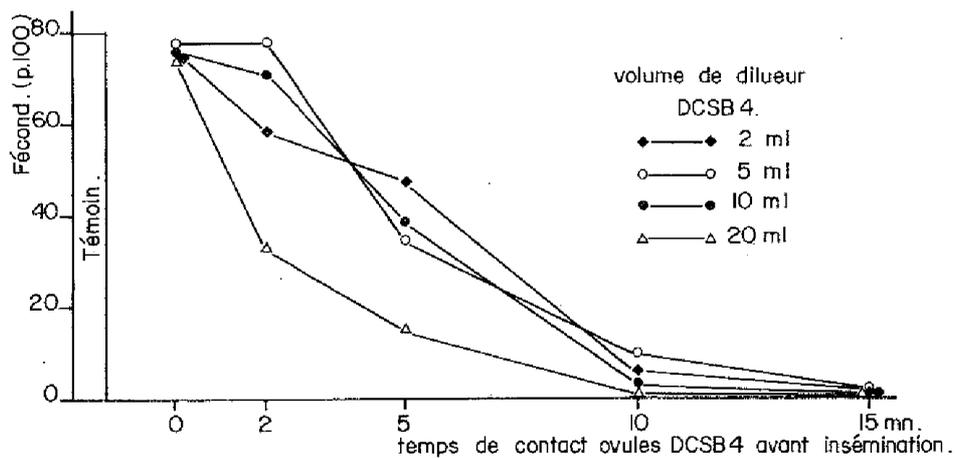


Figure 15. — Évolution de la fécondabilité des ovules de bar dilués dans différents volumes (2 à 20 ml) de B4 et pendant des temps croissants (0 à 15 mn) avant l'insémination. Témoins: mêmes conditions que pour l'expérience de la figure 13.

tion dans le B4. La figure 15 montre que la motilité du sperme diminue très rapidement après dilution et cela d'autant plus rapidement que le taux de dilution est élevé. Le même phénomène s'observe pour les ovules (fig. 16).

Nous devons donc retenir que les gamètes doivent être dilués simultanément. La procédure résumée dans la figure 17 est proposée pour l'insémination des gamètes de bar. Le sperme est d'abord prélevé, il tolère d'être conservé pendant quelques heures. Les femelles sont ensuite prélevées; le dilueur est ajouté (2 l de dilueur pour 1 l d'ovules) auquel on ajoute immédiatement 2 à 6 ml de sperme, selon l'avancement de la saison de reproduction; le mélange de l'ensemble étant

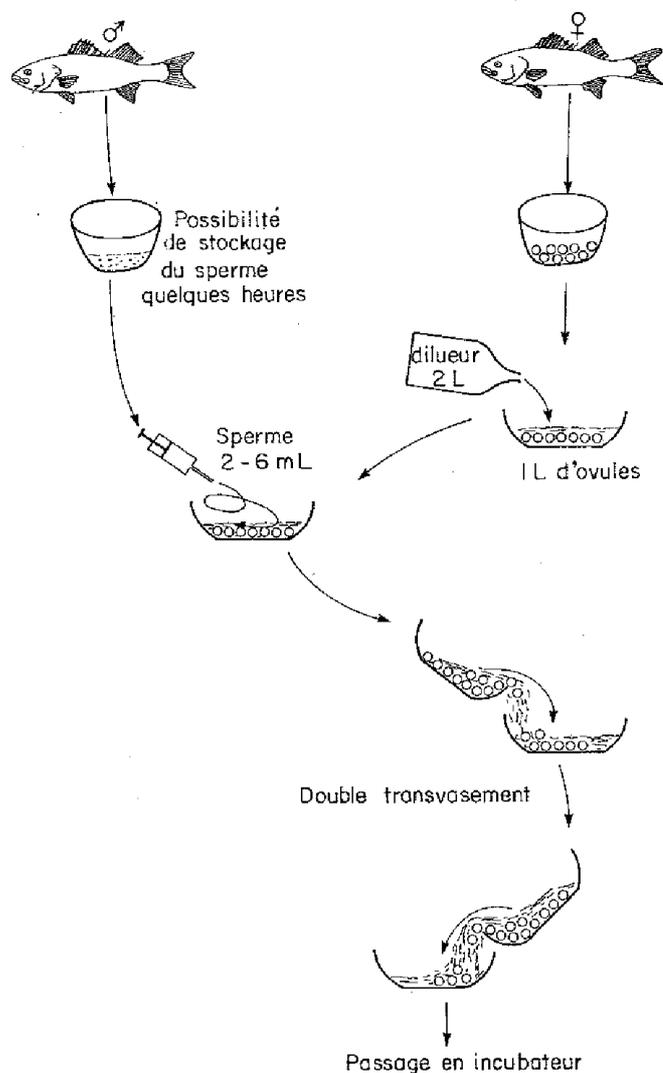


Figure 16. — Schéma résumant les opérations d'insémination artificielle chez le bar.

réalisé le plus rapidement possible par un double transvasement. Il s'agit là d'une première approche susceptible d'améliorations qui devront immanquablement être apportées dès que cette technique sera appliquée à l'échelle d'une éclosérie.

Remerciements

Ce travail a été pris en charge par le CNEXO (contrats 74/1001, 75/1221; 76/1484) et a bénéficié de la collaboration de J. Dupont, G. Barnabé et M. Girin. A. Fostier a procédé à la lecture critique du manuscrit.

Summary: Gamete storage and artificial insemination of sea bass and sea bream.

In most sea bass and sea bream hatcheries, the brood fish, after hypophysation, are put into laying tanks where they reproduce naturally, the eggs being recovered at the tank outlet. However, sometimes it is advantageous to use artificial insemination (laboratory work, hybrid-

zation and other genetic manipulations, gamete transport, etc.) and, therefore, it is useful to better understand gamete physiology so that the gametes can be stored and diluted to permit better utilization during insemination.

Studies on the survival of gametes in the genital tract of male sea bass have shown that sperm quality decreases during the reproductive period, particularly in reference to motility and fitness for storage and deep-freezing. No work has been done on the survival of ova in the ovarian cavity after ovulation in sea bass or sea bream, but similar studies on other species showing the same ecological requirements have indicated that the survival of ova is limited to about 1 day.

After sampling, the sperm of sea bass and sea bream can be stored in the refrigerator for several days at the onset for spermiation but for only several hours at the end of spermiation in sea bass.

The sperm of sea bass and sea bream can be deep-frozen easily if it is sampled at the onset of spermiation. A diluent (DCS B4) with a base of NaCl (19.5 g/l), Mg SO₄ 7H₂O (0.25 g/l), CaCl₂ 2H₂O (0.25 g/l), glycine (6.25 g/l), Tris (2.4 g/l), pH 8.5 with 10 % DMSO added has proved favorable for sea bass and sea bream; the optimal rate of dilution is 1 volume of sperm to 2 volumes of diluent. The diluent does not have to be equilibrated; the rate of deep-freezing is about 10 °C/min and the straws can be plunged into liquid nitrogen as soon as the temperature reaches — 80 °C.

However, since this diluent causes the spermatozoa to become motile, the mixture must be frozen very quickly after dilution. Therefore, a diluent must be found in which the spermatozoa will remain immotile.

A technique of artificial insemination has begun to be studied in sea bass. It has been shown that diluted sea water with a corrected salinity of 20 ‰ and buffered at pH 9 is a better insemination diluent than seawater at 37 ‰. However, the diluent used for deep-freezing (DCS B4) appears to be slightly better than sea water at 20 ‰. Once diluted, the gametes lose their fertility rapidly and during insemination they must be mixed quickly with the diluent (2 l of diluent to 1 l of eggs), after which 2 to 6 ml of sperm are added, depending on how advanced the reproductive season is.

Resumen: *La conservación de los gametos y la inseminación artificial de la lubina y la dorada.*

En la mayoría de las plantas de producción de larvas de lubina y de dorada, los reproductores son colocados, después de la hipofisación, en estanques de puesta donde la reproducción se efectúa naturalmente, siendo recuperados los huevos por el rebosadero del tanque. Sin embargo, en ciertos casos, puede ser interesante tener acceso a la inseminación artificial (trabajos de laboratorio, hibridación y otras intervenciones genéticas, transporte de gametos, etc.). Por ello, es útil conocer mejor la fisiología de los gametos con miras a su conservación y dilución para lograr una mejor utilización en la inseminación.

La supervivencia de los gametos, en el conducto genital, ha sido estudiada en el caso de los machos de lubina, y parece ser que la calidad del esperma disminuye durante el período de reproducción, en particular la motilidad y la capacidad para su conservación en congelación. No existen trabajos sobre la duración de la supervivencia de los óvulos en la cavidad ovárica después de la ovulación en la lubina y la dorada, pero estudios similares en otras especies que muestran las mismas exigencias ecológicas, indican que la supervivencia es del orden de 24 horas.

Es posible conservar el esperma de lubina y de dorada en el frigorífico después de su extracción (varios días al comienzo del período de espermiación, pero solamente algunas horas al final del mismo, en la lubina).

El esperma de la lubina y de la dorada se presta bastante fácilmente a la congelación, con la condición de que sea extraído al comienzo del período de espermiación. Un diluyente (DCS B4), a base de NaCl (19,5 g/l), MgSO₄ 7H₂O (0,25 g/l), CaCl₂ 2H₂O (0,25 g/l), glicocola (6,25 g/l), Tris (2,4 g/l), pH 8,5, más la adición de un 10 p. 100 de DMSO, es adecuado para la lubina y la dorada; la tasa de dilución óptima es un volumen de esperma en dos volúmenes de diluyente. La velocidad de congelación debe ser del orden de 10 °C/min. y los gránulos congelados se introducen en nitrógeno líquido cuando la temperatura alcanza los — 80 °C.

Sin embargo, este diluyente produce una puesta en movimiento de los espermatozoides, por lo que la congelación debe ser muy rápida después de la dilución. Es necesario buscar un diluyente en el que los espermatozoides permanezcan inmóviles.

En la lubina se está poniendo a punto una técnica de inseminación artificial. El agua de mar diluida, con una salinidad de 20 p. 1000 y tamponada a pH 9, es un mejor diluyente de inseminación que el agua de mar a 37 p. 1000. Sin embargo, el diluyente puesto a punto para la congelación (DCS B4) parece sensiblemente mejor que el agua de mar a 20 p. 1000. Una vez diluidos, los gametos pierden muy rápidamente su fertilidad y en el momento de la inseminación deben ser mezclados enseguida con el diluyente, en la proporción de dos litros de diluyente por un litro de huevos, a los cuales se les añade de 2 a 6 ml de esperma, según lo avanzado de la época de reproducción.

Riassunto: *La conservazione dei gameti e l'inseminazione artificiale della spigola e dell'orata.*

In gran parte degli impianti di riproduzione della spigola e dell'orata i genitori sono posti, dopo trattamenti con estratti ipofisari, in bacini di emissione dove la riproduzione avviene naturalmente e le uova vengono recuperate dallo scarico dei bacini. Tuttavia può essere interessante, in certi casi, ricorrere all'inseminazione artificiale (prove di laboratorio, ibridazione ed altri interventi genetici, trasporto di gameti, etc.); appare quindi utile conoscere maggiormente la fisiologia dei gameti, nell'ottica della loro conservazione e della diluizione, per consentirne un migliore utilizzo al momento dell'inseminazione.

La sopravvivenza dei gameti, nel tratto genitale, è stata studiata per il maschio della spigola; la qualità dello sperma risulta diminuire durante il periodo riproduttivo, soprattutto per quanto riguarda la motilità e l'attitudine alla conservazione ed alla congelazione. Non esistono lavori sulla durata e la sopravvivenza degli ovuli nella cavità ovarica dopo l'ovulazione, sia nella spigola che nell'orata, ma studi simili effettuati su altre specie che presentano le stesse esigenze ecologiche hanno mostrato che la sopravvivenza era dell'ordine di una giornata.

È possibile conservare lo sperma della spigola e dell'orata in frigorifero dopo il prelievo (qualche giorno all'inizio del periodo di spermiazione, ma solo qualche ora a fine spermiazione per la spigola).

Lo sperma della spigola e dell'orata si presta assai bene alla congelazione, a condizione che sia prelevato all'inizio del periodo di spermiazione. Un diluente (DCB B4), a base di NaCl (19,6 g/l), Mg SO₄ 7H₂O (0,25 g/l), CaCl₂ 2H₂O (0,25 g/l), Glicocola (6,25 g/l), Tris (2,4 g/l), pH 8,5 addizionato con 10 p. 100 di DMSO si è rivelato favorevole per ambedue le specie; il tasso di diluizione ottimale è di 1 volume di sperma per 2 volumi di diluente. Non è necessario stabilizzare; la velocità di congelazione deve essere dell'ordine di 10 °C/mn. e le scaglie possono essere immerse nell'azoto liquido non appena la temperatura raggiunge i - 80 °C.

Tuttavia, tale diluente provoca una messa in movimento degli spermatozoi e ciò necessita una congelazione molto rapida dopo la diluizione. È necessario ricercare un diluente nel quale gli spermatozoi siano mantenuti immobili.

Una tecnica di inseminazione artificiale è stata oggetto di un inizio di messa a punto, per la spigola. L'acqua di mare diluita, la cui salinità è portata a 20 p. 1000 e tamponata a pH 9 si rivela essere un migliore diluente rispetto all'acqua a 37 p. 1000. Tuttavia, il diluente messo a punto per la congelazione (DCB B4) appare sensibilmente migliore dell'acqua di mare a 20 p. 1000. Una volta diluiti, i gameti perdono molto rapidamente la loro fertilità e, al momento dell'inseminazione devono essere mescolati molto rapidamente con il diluente nella proporzione di 2 l di diluente per 1 l di uova, alle quali si aggiungono da 2 a 6 ml di sperma a seconda dell'avanzamento della stagione riproduttiva.

Références bibliographiques

- BARNABÉ G., 1976. *Biologie du loup Dicentrarchus labrax (L.)*. Thèse Univ. Sci. Tech. Languedoc, Montpellier, 426 p.
- BARNABÉ G., 1980. Exposé synoptique des données biologiques sur le loup ou le bar *Dicentrarchus labrax*, Synop. FAO Pêches, 126, 70 p.
- BENEAU D., TERNER C., 1980. Initiation, prolongation and reactivation of salmonid spermatozoa. *Gamete Res.*, 3, 247-257.
- BILLARD R., 1978. Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. Actes de Colloques du CNEXO, 8, 59-73.
- BILLARD R., 1981. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 23, 287-293.
- BILLARD R., 1982. Sur quelques possibilités de maîtriser la reproduction chez les poissons téléostéens. *Piscic. fr.*, 67, 15-33.
- BILLARD R., DUPONT J., 1975. Études sur la congélation du sperme de poissons marins (bar, daurade, turbot). Rapport Sci. Contrat CNEXO, Ronéo, 15 p.
- BILLARD R., DUPONT J., BARNABÉ G., 1977. Diminution de la motilité et de la durée de conservation du sperme de *Dicentrarchus labrax* L. (poisson téléostéen) pendant la période de spermiation. *Aquaculture*, 11, 363-367.
- DAVENPORT J., LÖNNING S., KJORSVIK E., 1981. Osmotic and structural changes during early development of eggs and larvae of the cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish Biol.*, 19, 317-331.
- DIVANACH P., KENTOURI M., 1984. Sur les possibilités d'obtention de gamètes viables à la criée. 175-184, in Barnabé G. et Billard R., *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés*, INRA Publ., Paris.
- DUPLINSKY P. D., 1982. Sperm motility of northern pike and chain pike at various pH values. *Trans. am. Fish. Soc.*, 111, 768-771.
- DUPONT J., 1976 a. Étude sur la congélation du sperme de poissons marins (bar, daurade). Rapport Sci. Contrat CNEXO, Ronéo, 10 p.
- DUPONT J., 1976 b. L'insémination artificielle du bar *Dicentrarchus labrax*. Rapport Sci. Contrat CNEXO, Ronéo, 5 p.
- DUSHKINA L. A., 1975. Viability of herring (*clupea*) eggs and fertilizing capacity of herring sperm stored under various conditions. *J. Ichthyol.*, 15, 423-429.
- ESCAFFRE A. M., PETIT J., BILLARD R., 1977. Évolution de la quantité d'ovules récoltés et conservation de leur aptitude à être fécondés au cours de la période postovulaire chez la truite arc-en-ciel. *Bull. fr. Piscic.*, 265, 134-142.
- HARVEY B., KELLEY N. R., ASHWOOD-SMITH M. J., 1982. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. *Can. J. Zool.*, 60, 1867-1870.
- HIROSE K., MACHIDA Y., DONALDSON E. M., 1979. Induced ovulation of japanese flounder (*Limanda yokohamae*) with human chorionic gonadotropin and salmon gonadotropin, with special reference to changes in quality of eggs retained in the ovarian cavity after ovulation. *Bull. jpn. Soc. sci. Fish.*, 45, 31-36.
- HORVATH L., 1978. Relation between ovulation and water temperature by farmed cyprinids. *Aquac. Hung. (Szarvas)*, 1, 58-65.
- LEGENDRE M., BILLARD R., 1980. Cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel. *Bull. fr. Piscic.*, 278, 11-33.
- MARCEL J., 1981. Contrôle de la reproduction et gestion des gamètes de quelques espèces de poissons téléostéens. Diplôme EPHE, 133 p.
- MARCEL J., LECOMTE J., 1980. Les techniques de production de poissons phytophages en Chine. 287-302, in Billard R., *La Pisciculture en Étang*, INRA Publ., Paris.
- MARCEL J., BILLARD R., DE MONTALEMBERT G., 1983. Données expérimentales sur la gestion et l'insémination artificielle des gamètes de brochet (*Esox lucius*). 133-151, in Billard R., *Le Brochet: gestion dans le milieu naturel et élevage*, INRA Publ., Paris.
- MIDDAUGH D. P., TAKITA T., 1983. Tidal and diurnal spawning cues in the atlantic silverside,

- Menidia menidia*. *Env. Biol. Fish.* **8**, 97-104.
- SCOTT A. P., BAYNES S. M., 1980. A review of the biology handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.*, **17**, 707-739.
- SHAPIRO B. J., SCHACKMANN R. W., CHRISTEN R., 1983. Surface properties of sperm cells. 70-76, in André J., *The Sperm cell*, Nijhoff M. Publ.
- SUZUKI R., 1980. Duration of developmental capability of carp eggs in the ovarian cavity after ovulation. *Bull. natl. Res. Aquaculture*, **1**, 1-6.
- ZOHAR Y., BILLARD R., WEIL Cl., 1984. La reproduction de la daurade et du bar : le cycle sexuel et l'induction de la ponte. 3-24, in Barnabé G. et Billard R., *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés*, INRA Publ., Paris.