PROBLEMES POSES PAR LA FECONDATION ARTIFICIELLE CHEZ LA CARPE

CONSERVATION DES SPERMATOZOIDES A TEMPERATURE AMBIANTE

par

Jacques MOREAU (*)

(*) *Ingénieur agronome (I.N.A.), Docteur en biologie, Assistant à l'I.N.R.A., Biologiste des pêches à la station de BOUAKE (Côte-d'Ivoire) du Centre Technique Forestier Tropical.*

INTRODUCTION

Si l'insémination artificielle est devenue une technique courante chez les mammifères domestiques et peut contribuer, dans une large part, à l'amélioration du cheptel, sa transposition chez les poissons est encore problématique.

Les travaux les plus importants sont ceux de BLAXTER (1953) sur le hareng, BILLARD (1966) sur *Lebistes reticulatus*, HOYLE et IDLER (1968) sur *Salmo salar*, HORTON et GRAYBILL (1969) et BILLARD (1971) sur *Salmo trutta*.

L'insémination artificielle permet de pallier à certains aléas de la reproduction naturelle des poissons. La mise en présence d'une femelle dont les œufs ovulés peuvent être expulsés par pression manuelle sur l'abdomen, et d'un à 2 mâles eux-mêmes également aptes à se reproduire, peut ne pas impliquer nécessairement une ponte ; c'est ce qui arrive dans certains cas avec *Cyprinus Carpio. L.* et le coefficient de réussite d'une telle opération varie entre 20 et 100 % avec une moyenne de 60 % à Madagascar. C'est pourquoi ont débuté les recherches exposées ci-après.

Elles ont pour but de déterminer les conditions de conservation optimale du sperme, de choisir un dilueur dans lequel les spermatozoïdes conserveront le mieux leur motilité et de déterminer les conditions d'utilisation de ce dilueur.

1. — *MATERIEL ET METHODES D'ETUDE*

Le sperme de carpe a été pipeté à la sortie de la papille génitale après pression manuelle sur l'abdomen des mâles en période de frai. Il était possible d'obtenir ainsi de la laitance débarrassée de toute espèce d'impureté (sang, excréments), qui seule a été étudiée.

La technique d'étude utilisée a été double :
— coloration vitale à l'éosine nicrosine
— examen de la motilité de la laitance.

A. — *La coloration à l'éosine nicrosine.*

Cette technique déjà utilisée par de nombreux auteurs dont ORTAVANT et PAUTHE (1947), BLOM (1960), FRIBOURGH (1966), consiste à réaliser un frottis à partir d'un mélange composé d'un volume de laitance (diluée ou non), d'un volume égal d'éosine à 5 % et de 2 volumes de nicrosine à 5 %. Entre le moment où nous commencions à mélanger la laitance et les colorants et où le frottis était sec, il ne s'écoulait jamais plus d'une minute.

En étalant une goutte de mélange pour exécuter le frottis, on provoque, selon ORTAVANT, PAUTHE (1947), un entraînement différentiel des spermatozoïdes vivants et de spermatozoïdes morts ; aussi avons-nous effectué des estimations du taux de survie des spermatozoïdes en différents points du frottis convenablement choisis pour que le phénomène n'intervienne pas dans l'exploitation des résultats.

B. — *Estimation de la motilité.*

En l'absence du matériel nécessaire pour estimer quantitativement la motilité des spermatozoïdes par la technique de diffusion inélastique de la lumière, la motilité a du être appréciée subjectivement à l'aide de l'échelle ci-dessous, sur une goutte de laitance diluée déposée entre lame et lamelle, et observée au microscope.

DEGRE	Observation
0	aucun mouvement dans la laitance
1	quelques spermatozoïdes mobiles tournent sur eux-mêmes ; on les compte facilement dans un champ de microscope.
2	motilité faible mais spermatozoïdes mobiles trop nombreux pour être comptés. Quelques-uns traversent le champ du microscope.
3	motilité moyenne.
4	grande motilité mais on peut distinguer les spermatozoïdes inactifs des autres. Beaucoup de spermatozoïdes traversent le champ de microscope.
5	très grande motilité, l'agitation est telle qu'il est impossible de savoir si un spermatozoïde est mobile par lui-même ou s'il est bousculé par les autres. Tous les spermatozoïdes mobiles se déplacent.

2. — *CONSERVATION DU SPERME PUR*

Les observations à l'éosine nicrosine (figure 1) montrent qu'au bout de 4 heures dans un cas et 1 h 1/2 dans l'autre, 80 % des spermatozoïdes sont vivants ; il est plus facile de conserver une quantité importante de laitance qu'une faible quantité.

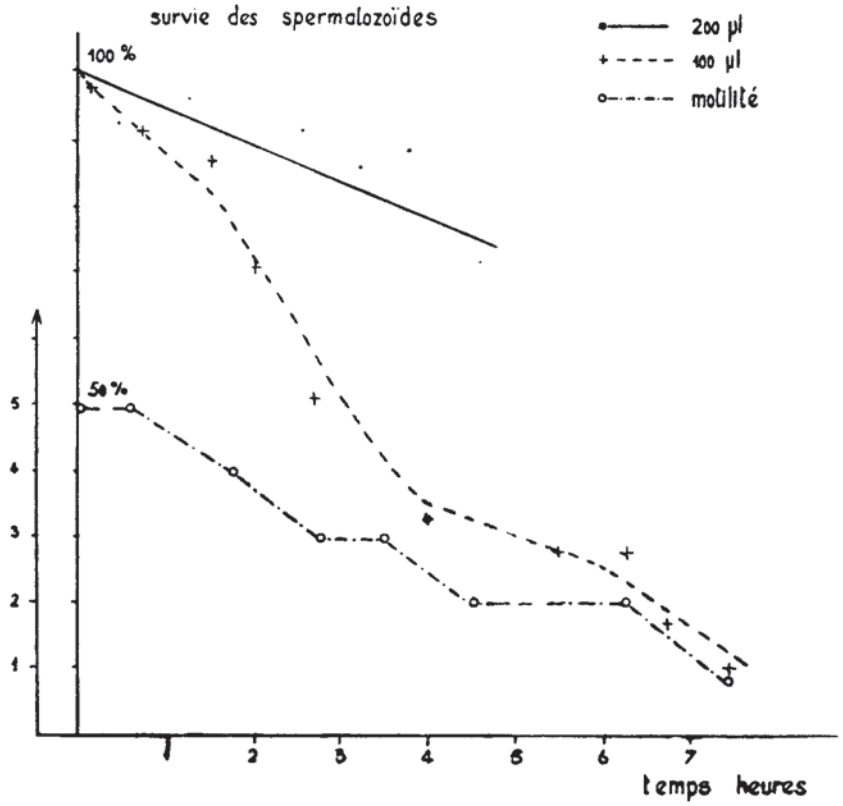
Le test de motilité a été pratiqué en mélangeant un volume de laitance et un volume d'eau contenant 1 ‰ de sel marin (voir § 3) le résultat est également porté sur la figure 1 (ligne brisée) ; il confirme à peu près celui obtenu par la méthode de l'éosine nicrosine.

Il ne semble pas souhaitable de conserver le sperme pur à température ambiante plus d'une journée, l'évaporation de l'eau du liquide séminal et les développements bactériens, même dans un récipient bouché, constituant le principal obstacle.

3. — *LA MOTILITE DES SPERMATOZOIDES DANS DIFFERENTS DILUEURS*

En raison des facilités de préparation de ces liquides, nous avons étudié la motilité des spermatozoïdes dans des sérums physiologiques titrant 1, 5, 10, 20, 20 ‰ de sel marin et pour chacun de ces liquides nous avons déterminé les proportions optimales de liquide physiologique et de sperme à mélanger.

Fig n°1 Conservation du sperme pur



A. — *Sérum physiologique à 1 ‰ de Na Cl*

Une goutte de sperme frais a été diluée dans 1, 2, 3, 4 et 5 gouttes d'eau à 1 ‰ et observée dans chaque cas au microscope ; la motilité a été appréciée comme expliqué plus haut. Elle est optimale lorsqu'on mélange 2 volumes égaux d'eau à 1 ‰ et de sperme ; les trop grandes dilutions amènent une cessation beaucoup plus rapide de la motilité (figure 2).

Si on utilise une grande quantité de sperme (100 microlitres) à laquelle on ajoute un égal volume de sérum physiologique à 1 ‰, la motilité persiste pendant environ 2 heures.

Evolution de la motilité
dans des petits volumes de sperme dilué

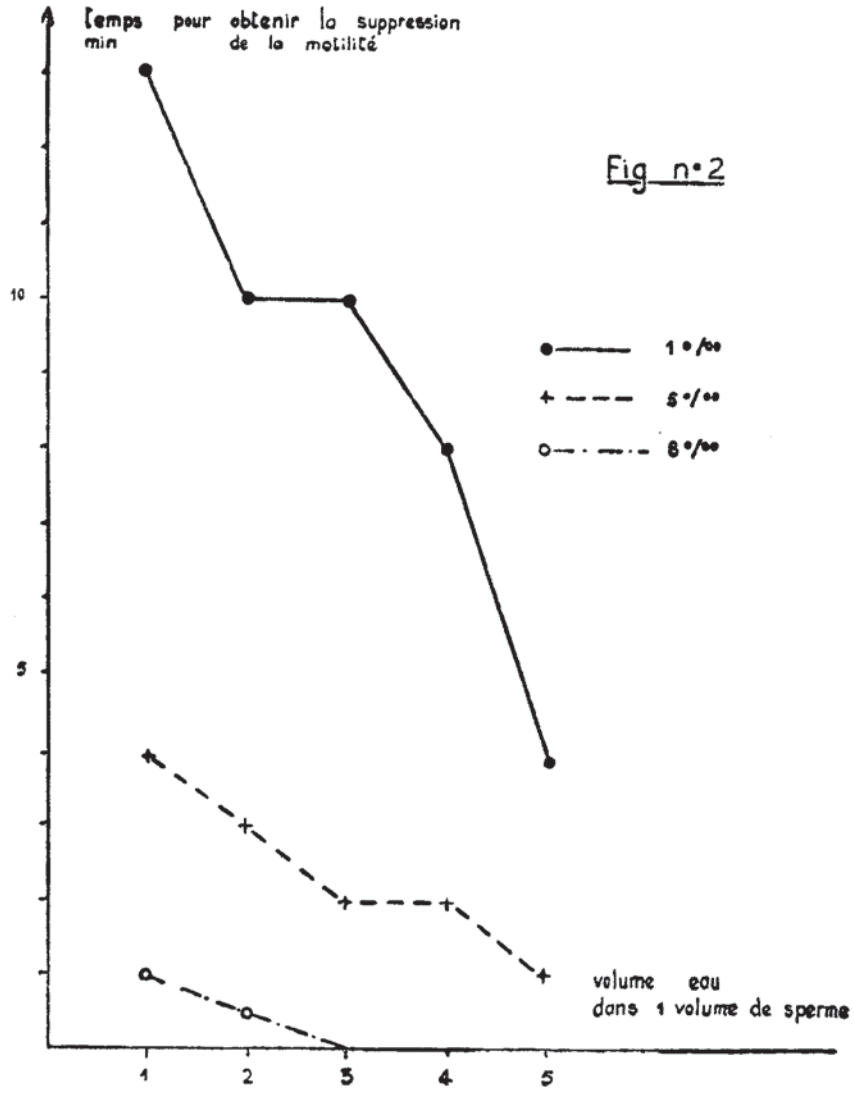


Fig n°2

TABLEAU N° 1

TEMPS ECOULE APRES LA DILUTION	5 ‰		8 ‰		10 ‰		15 ‰	
	DOUBLE COLOR.	MOTILITE	DOUBLE COLOR.	MOTILITE	DOUBLE COLOR.	MOTILITE	DOUBLE COLOR.	MOTILITE
5 mn	80	4	70	5	90	5	70	2
30 mn	27	2	43	—	50	—	33	—
45 mn	30	—	23,5	2	40	—	—	—
1 h.	27	1	40	—	2	4	25	0
1 h. 45	30	—	—	1	7	+	—	—
2 h.	—	1	—	—	—	—	0	—
2 h. 1/2	29	—	43	1	—	3	—	1
3 h.	0	2	—	—	25	—	—	—
4 h.	1	—	—	1	—	—	5	0
4 h. 1/2	10	2	12	0	10	2	—	1
5 h.		—		—		—	5	—
5 h. 30		1		0		—	0	—
7 h.		0		+		1	0	—

B. — *Sérum à 5 ‰ de Na Cl*

Des essais analogues aux précédents ont montré que le sérum physiologique à 5 ‰ est un moins bon dilueur que celui à 1 ‰ et que les conditions optimales sont réalisées en mélangeant l'eau et le sperme dans les proportions de 50 % — 50 % (graphique n° 2).

Dans un volume important de sperme (70 microlitres) dilué dans un volume égal de sérum à 5 ‰, la motilité n'est totalement perdue qu'au bout d'une heure.

L'absence de motilité pour un spermatozoïde n'implique pas nécessairement sa mort ; en effet, si on mélange un volume de sperme dilué dans du sérum à 5 ‰ avec un volume égal de sérum à 1 ‰ une partie des spermatozoïdes sont réactivés.

Plus généralement, lorsqu'on ajoute du sérum à 1 ‰ dans le sperme dilué dans des sérums à 5 ‰ — 8 — 10 ou 15 ‰ une certaine proportion de spermatozoïdes retrouve sa motilité, une quantité déterminée de sérum à 1 ‰ redonne la motilité à un nombre maximum de spermatozoïdes. Ayant déterminé cette dose optimale de sérum à 1 ‰ pour chaque liquide physiologique étudié (lui-même mélangé dans des proportions bien connues avec le sperme) nous avons été en mesure d'étudier la survie des spermatozoïdes dans des eaux ayant plus de 5 ‰ de Nacl par des tests de motilité et par la coloration à l'éosine nicrosine, chacune des 2 méthodes permettant de contrôler les résultats obtenus avec l'autre ; les tests de motilité ont été réalisés en appliquant les remarques précédentes.

C) *La motilité dans des liquides physiologiques de concentration égale ou supérieure à 5 ‰*

Même en ne mélangeant qu'un volume de sérum physiologique à un volume de sperme, si le sérum est plus concentré que 5 ‰, on observe pratiquement pas de motilité (toujours moins d'une minute, figure 2). C'est pourquoi nous avons en recours à la méthode évoquée à la fin du paragraphe précédent.

Les tests de motilité ont été réalisés sur des mélanges contenant un volume de laitance (50 microlitres) et 5 volumes de sérum physiologique.

La coloration à l'éosine nicrosine a été pratiquée sur du sperme dilué au 1/10° dans le liquide physiologique.

Les résultats sont consignés sur le tableau ci-dessous.

Les résultats de la méthode à l'éosine nicrosine et des tests de motilité concordent bien au sujet des eaux physiologiques à 5 ‰ et 15 ‰ et déconseillent pratiquement l'utilisation de cette dernière.

Pour les eaux à 8 ‰ et 10 ‰ la motilité semble mieux conservée dans la seconde.

4. — *AUTRES ESSAIS DE DILUTIONS*

Dilution dans le liquide de NOMURA

50 microlitres de sperme ont été dilués dans 50 microlitres de liquide de NOMURA. Au bout de 40 mn, il y avait 50 % de survie ainsi qu'en témoigne le tableau n° 2 — (utilisation de la technique de l'éosine-nicrosine).

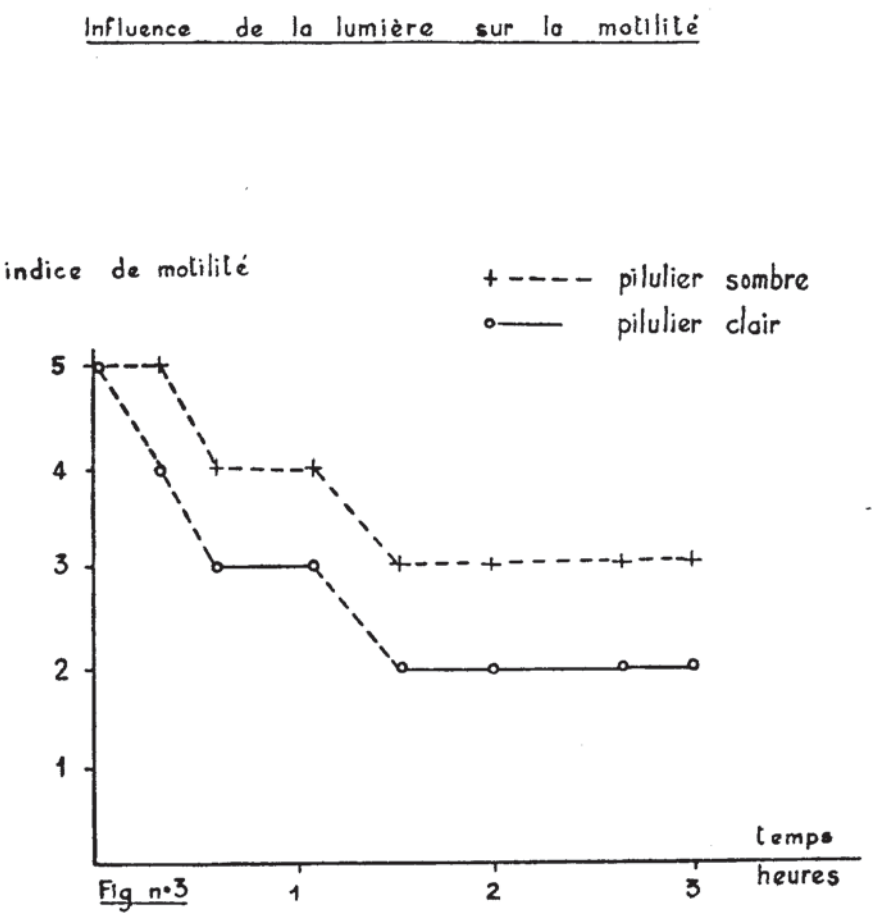


Fig n°3

Dilution dans l'eau naturelle.

L'essai a été réalisé sur une quantité de 50 microlitres de sperme dilué dans un même volume d'une part et dans 2 volumes d'autre part d'eau naturelle de l'étang filtrée (2 passages sur papier-filtre). Les résultats obtenus avec les 2 dilutions sont consignés sur le tableau n° 3.

TABLEAU N° 2

TEMPS ECOULE APRES DILUTION	15 mn	20 mn	40 mn	1 heure	1,5 heure	3 heures	3,5 heures	4 H. 20 mn.	5 heures
TAUX DE SURVIE	76	68	50	53	50	55	43	31	26

Dans le cas d'une dilution à 1/2, 50 % de spermatozoïdes environ ne supportent pas, semble-t-il, le choc osmotique ; les autres, par contre, sont mobiles pendant plus d'une heure ; le résultat est voisin de celui qu'on obtient avec de l'eau à 1 ‰ Nacl.

TABLEAU N° 3 A et B

	DILUTION DANS 1 VOLUME D'EAU		DILUTION DANS 2 VOLUMES D'EAU
TEMPS APRES LA DILUTION	INDICE DE MOTILITE	TEMPS APRES LA DILUTION	INDICE DE MOTILITE
1 mn	5	1'	5
10 mn	3	2'	3
20 mn	3	4'	2
1 h.	3	7'	1
1,5 h.	3	8'	0
2 h.	2		
2 h. 1/2	2		

5. — *INFLUENCE DE LA LUMIERE*

L'étude a eu pour but de voir si la conservation à l'abri de la lumière pouvait augmenter la durée de motilité des spermatozoïdes.

50 microlitres de sperme ont été dilués dans 50 microlitres d'eau 1 ‰ et déposés dans un pilulier à paroi claire.

50 microlitres de sperme ont été testés de la même façon et déposés dans un pilulier en verre fumé si bien que le sperme y était conservé dans une demi-obscurité.

Une petite quantité de sperme dilué prélevé dans chaque pilulier était observé à intervalle régulier au microscope (figure 3).

Il est donc probable qu'on a intérêt à conserver le sperme à l'abri de la lumière.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans les conditions où nous nous sommes trouvés, les carpes donnaient peu de sperme (au plus 0,5 cm3 par individu), celui-ci semble aussi concentré que celui des autres poissons. En effet il contient environ 18 x 10^9 spermatozoïdes par cm3. Les écarts d'un prélèvement à l'autre sont assez importants (11 à 23). Chez la truite le sperme contient 25 x 10^9 spermatozoïdes par cm3 et chez le Tilapia : 11 x 10^9 environ (très fortes variations individuelles).

Un travail semblable au nôtre est celui de ELLIS et JONES (1939) qui utilisèrent le spermatozoïde de *Salmo salar*. BILLARD (1966 et 1971) a travaillé sur le sperme de *Lebiste reticulatus* et celui de truite. L'utilisation de plusieurs liquides physiologiques (RINGER, LOCKE, NOMURA, eau physiologique à 8 ‰) a abouti à des résultats intéressants. La proportion de 1/10° de laitance et 9/10° de liquide physiologique semble optimale surtout chez la truite. Ces résultats sont à comparer avec les nôtres ; il est étonnant que chez la carpe le sperme ne puisse être mobile pendant plusieurs minutes dès qu'il est dilué à plus de 1/2 ou à la limite 1/3.

Ces expériences ont permis de voir qu'il est possible d'assurer une bonne préservation des qualités du sperme de carpe à température ambiante (20° C) en conservant à l'abri de la lumière une grande quantité de sperme pur ; la motilité optimale sera obtenue en diluant un gros volume de laitance dans un égal volume d'eau distillée avec 1 ‰ de Nacl ou, à la rigueur, 5 ‰ ou avec de l'eau douce.

BIBLIOGRAPHIE

BILLARD R., 1966 : Thèse 3e cycle, Fac. Sci. Lyon
Contribution à l'étude de la reproduction de *Lebistes Reticulatus* en vue de l'insémination artificielle.

BILLARD R., BRETON B., JALABERT B., 1971 : La production spermatogénétique de la truite ; Ann. Bioph., Biol., Biochimie, (à paraître).

BLAXTER J.H.S., 1953 : Spenme storage and cross fertilization of spring and autum spawning herring. Nature 172, 1189-1190.

BLOM E. 1950. A one minute live dead sperme stain by meam of eosine-nicrosine. Fert. Ster. 1 (2) p. 176.

ELLIS W.G., JONES J.W., 1939 : The activity of the spermatozoa of *Salmo salar* in relation to osmotic pressure. J. Exp. Biol., 16, 530-534.

FRIBOURG G.M., 1966 : The application of a differential staining method to Studies of gold fish spermatozoa. Prog. fish. cult. 28 (4) p. 227-231).

GRAYBILL J.R., HORTON H.F., 1969 : Limited fertilization of Steelhead trout eggs with crayo-preserved spenm. J. fis. res. Board. Canada 26, 1400-1404.

HOYLE S.J., IDLER D.R., 1968 : Preliminary results in the fertilization of eggs with frozen sperm of atlantic Salmon. J. Fis. res., 25, 1295-1297.

ORTAVANT R., PAUTHE P., 1947 : Etude du spenme de bélier par la double coloration à l'éosine nicrosine. Ann. Zoot. 1.