

Note

Amélioration de la motilité des spermatozoïdes testiculaires de néomâles de truite commune (*Salmo trutta*) au début de la période de reproduction

Gérard Maisse ⁽¹⁾, Roland Billard ⁽²⁾, Françoise André ⁽²⁾,
Jacky Cosson ⁽³⁾ et Florence Le Gac ⁽¹⁾

⁽¹⁾ INRA, Laboratoire de Physiologie des Poissons, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France.

⁽²⁾ Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire d'Ichtyologie générale et appliquée,
43, rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 03, France.

⁽³⁾ CNRS-Université Pierre-et-Marie-Curie, URA 671, Station zoologique, 06230 Villefranche-sur-Mer, France.

Reçu le 20 février 1995 ; accepté le 22 mars 1995.

*Improvement of the motility of testicular spermatozoa of sex inverted brown trout females (*Salmo trutta*) at the beginning of the spawning season.*

Maisse G., R. Billard, F. André, J. Cosson, F. Le Gac. *Aquat. Living Resour.*, 1995, 8, 191-194.

INTRODUCTION

Les études menées dans les installations de la *Salmoniculture expérimentale marine Ifremer-Inra* (SEMII), ont permis la mise au point d'une filière truite « fario » (truite commune, *Salmo trutta*) prometteuse pour la salmoniculture marine française (Fauré, 1991). Comme pour les filières truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et saumon atlantique (*Salmo salar*) la production de populations composées exclusivement de femelles triploïdes est potentiellement intéressante (Quillet *et al.*, 1991). Dans le but de produire ces populations il est indispensable d'obtenir des néomâles génétiquement femelles à l'aide d'un traitement masculinisant. Un tel traitement a été mis au point par Chevassus et Krieg (1992) qui obtiennent un taux élevé de masculinisation (94 %) avec de la méthyltestostérone (3 mg/kg d'aliment) administrée pendant les 80 premiers jours d'alimentation. La plupart des néomâles ainsi produits

ne possède pas de spermiducte fonctionnel. Une dose plus faible (0,5 mg/kg d'aliment pendant 60 jours), efficace chez la truite arc-en-ciel avec l'avantage de produire des individus possédant un spermiducte normal (Cousin-Gerber *et al.*, 1989), s'est révélée peu masculinisante (29 %) chez la truite commune, sans que soit évitée l'induction de spermiductes non fonctionnels (Chevassus et Krieg, 1992). Dans ces conditions le prélèvement du sperme des néomâles de truite commune nécessite le sacrifice systématique des géniteurs sans que l'on connaisse l'état de maturité des spermatozoïdes. Dans la pratique, cette contrainte entraîne fréquemment des mauvais taux de fécondation, plus particulièrement au début de la saison de reproduction, période à laquelle le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est en moyenne 10 % contre 60 % par la suite (Maisse, données non publiées).

Le contrôle endocrinien de la spermiation chez les poissons téléostéens est un processus à plusieurs

étapes impliquant la sécrétion par le cerveau de gonadolibérine (GnRH), qui induit la production hypophysaire de gonadostimuline (GTH), qui elle-même stimule la sécrétion gonadique de stéroïdes sexuels (Billard *et al.*, 1982). Par ailleurs, Miura *et al.* (1992) ont montré chez le saumon masou (*Oncorhynchus masou*) le rôle de la gonadostimuline et de la $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one dans l'acquisition par les spermatozoïdes du potentiel à être activés. Ces données nous ont amenés à envisager le traitement des néomâles par une injection soit de gonadostimuline (GTH) soit de gonadolibérine (GnRH) afin d'améliorer la qualité des spermatozoïdes au début de la période de reproduction.

Par ailleurs, depuis les travaux de Baynes *et al.* (1981) il a été confirmé que l'ion calcium joue un rôle dans l'activation des spermatozoïdes de truite arc-en-ciel. En particulier, Billard et Cosson (1992) ont montré que l'activation des spermatozoïdes testiculaires de truite arc-en-ciel était possible lorsque le milieu d'activation contenait 10 mM de Ca^{++} . Nous avons donc testé l'effet du calcium en l'incorporant au milieu d'activation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les poissons étaient des néomâles de truite commune élevés en eau douce dans les installations expérimentales de la SEMII (site du Drennec en Bretagne, température de l'eau variable 9 à 13°C au moment de l'expérience). Le traitement masculinisant était celui décrit par Chevassus et Krieg (1992). Le sperme a été prélevé après dissection des testicules et passage sur une gaze (150 μm).

Au début de la période de reproduction, 3 lots de 8 géniteurs ont été constitués. L'administration du traitement a été réalisée par injection intrapéritonéale à la fin du mois d'octobre, à une période où les femelles de la même souche n'étaient pas encore matures. Le lot traité GTH a reçu une dose de 250 $\mu\text{g/kg}$ de poids vif de GTH de saumon partiellement purifiée (Breton *et al.*, 1978). Le lot traité GnRH a reçu 0,5 ml d'Ovaprim (Syndel laboratories Ltd, Vancouver, Canada) par kg de poids vif. Le lot témoin a reçu une injection d'une solution saline (9 g NaCl/l). Les animaux ont été sacrifiés après anesthésie (2-phénoxyéthanol) 2 jours après le traitement et le sperme a été prélevé.

Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles a été estimé suivant la méthode décrite par Cosson *et al.* (1985) utilisant un microscope équipé d'un éclairage stroboscopique, après activation dans un milieu d'activation à base de NaCl (Billard, 1977), avec ou sans addition de 10 mM de CaCl_2 . Le rôle du Ca^{++} a été testé dans une expérience où la motilité a été notée pour des doses croissantes (de 0 à 10 mM).

Le rendement d'extraction du sperme a été estimé, en mesurant le volume de sperme recueilli à partir d'un morceau de testicule d'environ 25 g.

Le pH du sperme a été mesuré directement, par introduction de l'électrode d'un pH-mètre dans un morceau de testicule immédiatement après le sacrifice du géniteur.

Le dosage de l'ATP intracellulaire a été réalisé après extraction dans un tampon HEPES 25 mM, contenant 10 mM d'acétate de magnésium, 2 mM d'EDTA et 3 mM d'azide de sodium (Fiorelli *et al.*, 1982), pH 7,75; 5 ml de tampon sont portés à une température proche de l'ébullition juste avant l'introduction de 50 μl de sperme. L'ATP a été dosé par mesure de la bioluminescence induite par le mélange luciférine-luciférase (kit de dosage Perstorp S.A., Division Lumac, France) à l'aide d'un Biocounter M 2010A lumac/3M (sensibilité=0,2 pg d'ATP). La quantité d'ATP ainsi mesurée a été rapportée à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon, dosées par la méthode de Smith *et al.* (1985) (kit de dosage Pierce « BCA protein assay reagent »).

La signification des différences observées entre les lots a été analysée à l'aide du test de Mann-Whitney-Wilcoxon.

RÉSULTATS

Le pourcentage de spermatozoïdes intratesticulaires mobiles après dilution dans une solution saline dépourvue de Ca^{++} était faible dans le lot témoin (2 %) et s'élevait à 80 % après traitement hormonal des géniteurs (tabl. 1). L'activation des spermatozoïdes du lot témoin a été possible en présence de 10 mM de CaCl_2 et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles n'était significativement pas différent de celui observé

Tableau 1. – Motilité, rendement en sperme, pH intratesticulaire et niveau d'ATP des spermatozoïdes testiculaires (moyenne $\pm$ écart type) chez des néomâles de truite commune, pour les lots témoins, traités GnRHa et traités GTH ($n=8$) au début de la période de reproduction. Au niveau d'une même ligne des exposants lettres différents indiquent une différence significative (test Mann-Whitney-Wilcoxon, $p=0,05$).

Motility, yield of milt, intratesticular pH and ATP level of testicular spermatozoa (mean $\pm$ SD) in sex inverted brown trout females, for control, GnRHa and GTH groups ($n=8$) at the beginning of the spawning season. Means with the same letter in superscript are not significantly different from each other (test Mann-Whitney-Wilcoxon, $p=0.05$).

	Témoin	GnRHa	GTH
Motilité (%) dans un milieu sans calcium	2 ^a ± 2	82 ^b ± 24	81 ^b ± 24
Motilité (%) dans un milieu avec calcium	86 ± 20	—	—
Rendement en sperme (ml/g de testicule)	52 ^a ± 11	74 ^b ± 3	69 ^b ± 8
pH intratesticulaire	7,6 ^a $\pm 0,1$	7,7 ^a $\pm 0,1$	7,7 ^a $\pm 0,1$
Niveau d'ATP (ng ATP/ μg protéines)	1,72 ^a $\pm 0,57$	1,68 ^a $\pm 0,54$	1,40 ^a $\pm 0,75$

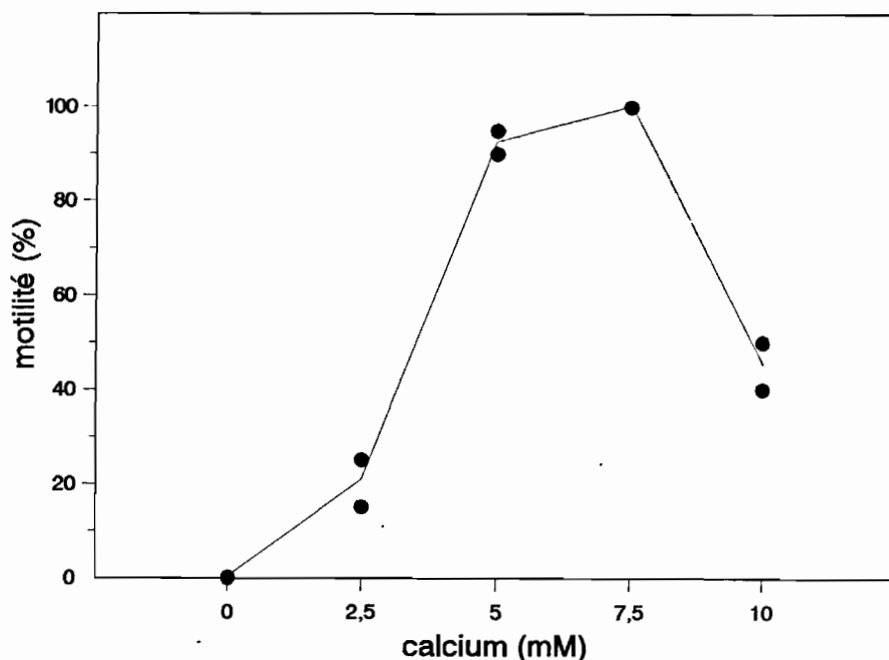


Figure 1. – Pourcentage de spermatozoïdes testiculaires mobiles en fonction de la concentration en calcium du milieu d'activation. L'expérience a été réalisée avec le sperme d'un seul néomâle de truite commune.

Motility of testicular spermatozoa in relation to the calcium level in the activating solution. Only one milt was tested in this experiment.

dans les lots traités GTH ou GnRH; dans ce cas, cependant, la trajectoire des spermatozoïdes était circulaire (parfois des pertes de flagelles et des agglutinations de spermatozoïdes ont été observées) alors que les spermatozoïdes des lots traités avaient des trajectoires plus linéaires. Les essais réalisés avec un seul sperme montrent qu'une concentration de 5 mM est suffisante (*fig. 1*) avec l'avantage de ne provoquer ni perte de flagelles ni agglutination.

Le rendement d'extraction du sperme du lot témoin a été significativement inférieur à celui obtenu dans chacun des deux lots traités. Aucune différence significative n'a été notée entre les différents lots pour le pH et le niveau d'ATP (*tabl. 1*).

DISCUSSION, CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette expérience montrent que des injections de GTH ou de GnRH à des néomâles de truite commune provoquent une « maturation *in vivo* » des spermatozoïdes qui acquièrent alors l'aptitude à être activés en absence d'ion calcium. Il est difficile de faire des hypothèses sur les mécanismes de cette maturation induite. L'analyse du paramètre rendement d'extraction du sperme laisse penser que cette maturation pourrait être liée à une sécrétion de liquide séminal. Ceci est conforté par le résultat que nous avons obtenu lors d'une autre expérience similaire menée sur des néomâles de truite commune

âgés de 2 ans : le spermatocrite (1000 g, 30 min) du sperme des néomâles traités avec de l'Ovaprim était très significativement inférieur à celui des témoins ($77 \pm 10\%$ vs $91 \pm 10\%$, $n=9$, $p<0,001$, test U). Le traitement hormonal provoque donc bien une hydratation du sperme des néomâles. Les travaux de Miura *et al.* (1992) ont montré, chez le saumon masou, que la GTH provoquait une élévation du pH dans le spermiducte ce qui entraînerait une élévation du cAMP intracellulaire permettant l'acquisition par les spermatozoïdes du potentiel à être activé; le pH intratesticulaire reste par contre insensible à la GTH. D'après ces résultats, et compte tenu de la structure particulière du tractus génital des néomâles, on pouvait s'attendre à un mécanisme semblable, mais l'élévation du pH chez les animaux traités est très faible et non significative. De même les niveaux d'ATP, qui ne diffèrent pas entre les témoins et les animaux traités, ne permettent pas de formuler une hypothèse concernant les réserves énergétiques des spermatozoïdes, d'autant plus que les spermatozoïdes des animaux témoins peuvent être activés dans un milieu contenant du Ca^{++} . Il semble donc qu'il faille rechercher la raison de cette différence de comportement des spermatozoïdes, en absence de Ca^{++} , au niveau de cet ion. Chez la truite arc-en-ciel, Boitano et Omoto (1992) ont observé une augmentation du Ca^{++} intracellulaire au moment de l'activation de spermatozoïdes provenant du spermiducte, dans un milieu dépourvu de Ca^{++} ; ils en ont conclu que ce calcium provenait de

réerves intracellulaires. D'après cette observation, il est possible que les spermatozoïdes des néomâles non traités soient dépourvus de réserves en Ca^{++} suffisantes ou bien ne soient pas en mesure de les mobiliser pour déclencher le mouvement du flagelle, l'alternative étant alors un apport de Ca^{++} exogène pénétrant dans la cellule par la voie des canaux calciques (dont le rôle a été mis en évidence par Tanimoto et Morisawa, 1988 et Cosson *et al.*, 1989) au moment de l'activation.

En conclusion, les résultats de ces expériences montrent qu'il est possible d'améliorer la motilité des spermatozoïdes intratesticulaires des néomâles de truite commune en début de période de reproduction par deux méthodes: (1) le traitement hormonal (GnRHa ou GTH) des géniteurs et (2) l'utilisation d'un dilueur d'activation contenant 5 à 10 mM CaCl_2 . Ces deux méthodes devront être testées, à différents moments de la période de reproduction, quant à leur efficacité en terme de taux de fécondation.

Remerciements

Cette expérimentation s'est déroulée dans le cadre de la Salmoniculture expérimentale marine IFREMER-INRA dirigée par A. Fauré, avec la collaboration technique du personnel GIE-RA. L'étude a été financée en partie par la Région Bretagne dans le cadre du programme BRITTA. Le dosage des protéines a été réalisé par Micheline Heydorff.

RÉFÉRENCES

- Baynes S. M., A. P. Scott, A. P. Dawson 1981. Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, spermatozoa : effects of cations and pH on motility. *J. Fish Biol.* **19**, 259-267.
- Billard R. 1977. A new technique of artificial insemination for salmonids using a sperm diluent. *Fisheries* **1**, 24-25.
- Billard R., A. Fostier, C. Weil, B. Breton 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**, 65-79.
- Billard R., M. P. Cosson 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. Exp. Zool.* **261**, 122-131.
- Boitano S., C. K. Omoto 1992. Trout sperm swimming patterns and role of intracellular Ca^{++} . *Cell. Motil. Cytoskel.* **21**, 74-82.
- Breton B., P. Prunet, P. Reinaud 1978. Sexual differences in Salmon gonadotropin. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* **18**, 754-765.
- Chevassus B., F. Krieg 1992. Effect of the concentration and duration of methyltestosterone treatment on masculinisation rate in brown trout (*Salmo trutta*). *Aquat. Living Resour.* **5**, 325-328.
- Cosson M. P., R. Billard, J. L. Gatti, R. Christen 1985. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. *Aquaculture* **46**, 71-75.
- Cosson M. P., R. Billard, L. Letellier 1989. Rise of internal Ca^{2+} accompanies the initiation of trout sperm motility. *Cell. Motil. Cytoskel.* **14**, 424-434.
- Cousin-Gerber M., G. Burger, C. Boisseau, B. Chevassus 1989. Effect of methyltestosterone on sex differentiation and gonad morphogenesis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Living Resour.* **2**, 225-230.
- Fauré A. 1991. La truite fario; vers une filière salmonicole marine à la française? *Aqua revue* **35**, 7-13.
- Fiorelli G., C. Orlando, A. L. Caldini, S. Cuomo, M. Serio 1982. ATP and ADP measurement in human spermatozoa by luciferin-luciferase system. In : Luminescent assays : perspectives in endocrinology and clinical chemistry. M. Serio, M. Pazzagli eds., New York, Raven Press, 79-87.
- Miura T., K. Yamauchi, H. Takahashi, Y. Nagahama 1992. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *J. Exp. Zool.* **261**, 359-363.
- Quillet E., L. Foisil, B. Chevassus, D. Chourrout, F. G. Liu 1991. Production of all-triploid and all-female brown trout for aquaculture. *Aquat. Living Resour.* **4**, 27-32.
- Smith P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk 1985. Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Analyt. Biochem.* **150**, 76-85.
- Tanimoto S., M. Morisawa 1988. Roles for potassium and calcium channels in the initiation of sperm motility in rainbow trout. *Dev. Growth Differ.* **30**, 117-124.