

Note

Production et gestion des spermatozoïdes chez le poisson-chat européen *Silurus glanis*

Adib Saad ⁽¹⁾ et Roland Billard ⁽²⁾

⁽¹⁾ Faculté d'Agriculture, Université de Tichrine, Lattaquié, Syrie.

⁽²⁾ Muséum National d'Histoire Naturelle et Appliquée, Laboratoire d'Ichtyologie, 43, rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France.

Accepté le 22 septembre 1994.

Saad A., R. Billard. *Aquat. Living Resour.*, 1995, 8, 323-328.

*Production and management of spermatozoa in the European catfish *Silurus glanis*.*

INTRODUCTION

La physiologie de la gamétogenèse et de la fécondation chez le poisson-chat européen est encore mal connue et la reproduction artificielle pratiquée depuis plus de 10 ans dans plusieurs pays européens, présente encore quelques difficultés non surmontées, surtout en ce qui concerne les disponibilités en spermatozoïdes, la stimulation de la spermiation, la récolte du sperme et les conditions optimales de l'insémination artificielle.

La quantité de sperme récolté manuellement, par massage de la paroi abdominale de mâles matures non hypophysés, demeure très faible. Après stimulation hormonale gonadotrope, il y a production de sperme mais une contamination par de l'urine provoque l'initiation du mouvement des spermatozoïdes entraînant ainsi la perte rapide de leur pouvoir fécondant, ce qui nécessite de procéder très rapidement aux opérations de fécondation artificielle (Kouril et Hamackova, 1982). Une autre méthode consiste à sacrifier les géniteurs mâles afin de récupérer les testicules qui, une fois broyés et pressés, fournissent le sperme nécessaire aux fécondations (Hollebecq *et al.*, 1987). Dans certains cas, on a tenté de pallier au sacrifice des mâles en pratiquant une

laparotomie et en prélevant une partie du testicule. Si l'opération est pratiquée avec suffisamment de soins, un fort pourcentage d'animaux survit à cette intervention, mais nombreuses sont alors les contraintes, l'animal n'étant utilisé qu'une fois par campagne de reproduction; de plus, les conséquences sur la physiologie testiculaire n'ont pas été évaluées. Cependant, dans un contexte d'optimisation de la reproduction artificielle du silure européen, le sacrifice systématique des géniteurs mâles ne peut pas toujours être économiquement envisagé. En effet, l'âge moyen à la reproduction des mâles dans les régions tempérées est de 3 à 4 ans, ce qui représente un coût de production assez élevé. L'utilisation potentielle des géniteurs est de plusieurs années (5-7 ans), de sorte que la préservation des animaux et la mise au point d'une méthodologie fiable de stimulation de la spermiation se justifie pleinement.

Dans ce travail dont une partie a déjà été rapportée (Saad *et al.*, 1988), nous avons cherché à connaître quantitativement le nombre de spermatozoïdes produits dans les testicules au cours d'un cycle reproducteur annuel (production spermatogénétique) et quelle fraction pouvait être recueillie après stimulation de la spermiation par voie hormonale déjà pratiquée pour cette espèce (Redondo *et al.*, 1990; Linhart et

Billard, 1994). Le travail a aussi porté sur le problème de l'altération de la qualité du sperme par l'émission quasi-inévitable d'urine lors du prélèvement. Pour résoudre ce problème, il a été proposé de faire appel à une solution d'immobilisation dans laquelle le sperme est mélangé dès qu'il est prélevé (Hollebecq *et al.*, 1987; Linhart *et al.*, 1987, 1994) puis à une solution d'activation utilisée lors de l'insémination; certains paramètres de ces solutions seront précisés dans cette étude.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Production spermatogénétique et stimulation hormonale de la spermiation

La production spermatogénétique annuelle a été mesurée sur un lot de cinq mâles, âgés de 3 ans, sacrifiés au cours de leur premier cycle de reproduction. Les mâles avaient été élevés en conditions thermiques contrôlées (20°C) au Laboratoire de Zoologie de Strasbourg puis au CNRS à Kronembourg. Les mâles ont été alimentés de granulés pour truite pendant les premiers 18 mois *ad libitum* puis ensuite à 1,5 % du poids corporel/j. Les animaux ont été transférés à l'écloserie Heymann à Fénétranges 48 h avant l'expérience et mis à jeun dès leur entrée en écloserie. Les femelles dont les ovules (ovocytes ovulés) ayant servi aux tests de fécondation, ont été élevées en étang et alimentées essentiellement de poissons fourrages.

Des prélèvements de 1 gramme ont été effectués dans trois régions différentes du testicule (antérieure, médiane, postérieure), et broyés séparément à l'aide d'un broyeur « Turax » dans 9 ml de solution saline 120 mM NaCl, pendant 1/2 à 1 min, puis la dilution est portée à 1/2000 dans la même solution et la quantité de spermatozoïdes est déterminé par dénombrement des têtes spermatiques sur hématimètre (Saad et Billard, 1987a). Une valeur moyenne des 3 échantillons a été établie. Le nombre des spermatozoïdes intratesticulaires a été rapporté au kg de poids vif.

Afin de déterminer la proportion de spermatozoïdes produits dans les testicules et utilisables lors de la reproduction artificielle, cinq mâles ont reçu des injections de préparations hypophysaires de carpe (Argent, activité biologique = 65 µg GtH/g), à raison de 4 mg/kg du poids vif, dissoute dans une solution saline (125 mM NaCl). Puis le sperme a été recueilli, par massage abdominal entre 20 et 24 h après l'injection, dans des tubes à essai gradués. Le volume du sperme a été mesuré et la concentration en spermatozoïdes établie, comme précédemment, à l'aide d'un hématimètre. Le volume du sperme produit par les mâles traités a été comparé à celui de cinq mâles témoins recevant uniquement la solution saline.

Tests d'inhibition de l'activité spontanée et tests motilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes de poisson-chat européen sont fréquemment contaminés par de l'urine qui est émise en même temps que le sperme, lors du prélèvement par massage abdominal (Linhart *et al.*, 1987). Dans certains cas, les prélèvements sont dépourvus d'urine (en ce cas il n'y a pas de motilité observée dans le sperme) et ces prélèvements, servent de sperme « témoins ». Les spermatozoïdes qui apparaissent très dilués par l'urine lors du prélèvement ne sont pas retenus. De l'urine dépourvue de sperme a pu être prélevée sur deux mâles profondément anesthésiés (séjour de 10 min dans un bain de phenoxythanol de 1 ml/l); les mâles étaient placés en position dorsale et une pression manuelle était appliquée juste à l'arrière de la papille urogénitale faisant jaillir un jet de liquide incolore considéré comme de l'urine. La pression osmotique en a été mesurée à l'aide d'un osmomètre (VOGEL 6300 Giesen) et le pH à l'aide d'un pH.mètre Tacussel.

Pour prévenir l'activation des spermatozoïdes par l'urine lors du prélèvement, plusieurs solutions à base de NaCl et KCl ont été utilisées à différentes concentrations (de 110 à 310 mOsmol/kg) et à pH 7,0; tampon Tris-HCl 30 mM. La réactivation des spermatozoïdes a été faite dans l'eau de l'écloserie et dans une solution saline (NaCl 30 mM, Tris HCl 30 mM, pH 7,0) constituant le dilueur d'insémination (voir ci-après). Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est évalué sous microscope (×200) après dilution du sperme au 1/1000 dans le dilueur d'insémination. La mobilité a été testée sur chacun des mâles avec, pour chacun, 4 à 5 répétitions.

Les ovules, prélevés sur des femelles ayant reçu un traitement d'hypophysation analogue à celui des mâles (injection d'hypophysées de carpe 6 mg/kg), ont été répartis par lots de 200 environ dans des boîtes de Pétri de cm de diamètre en verre en 4-6 réplicats avec du sperme dont la qualité a été vérifiée auparavant (>90 % de spermatozoïdes mobiles); au total 6 femelles ont été utilisées.

L'insémination a été pratiquée dans 10 ml de dilueur à la dilution de 1/1000 (en considérant le mélange sperme et urine et en excluant le milieu d'immobilisation dont le volume est connu). Le dilueur d'insémination, à base de NaCl et de Tris-HCl 30 mM pH 7,0, a été testé à différentes pressions osmotiques (entre 0 et 350 mosmol/kg, valeurs calculées) obtenues en faisant varier la concentration en NaCl. Le pH optimum du dilueur a été recherché en procédant à l'insémination dans une solution saline (NaCl 30 mM, Tris HCl 30 mM) à des pH compris entre 3,7 et 11. Pour éviter un effet lié à la nature des tampons, seul le Tris a été utilisé mais il en est résulté une faible stabilité des pH inférieurs à 6. L'incubation a été conduite directement dans les boîtes de Pétri en verre (au fond desquelles les œufs adhèrent), fermées par des couvercles grillagés et transférées en incubateurs

à la température de 24 °C en circuit ouvert. Le taux d'oxygène dissous dans l'eau était d'environ 8 mg/l. Le pourcentage de fécondation (œufs embryonnés) a été mesuré après 24 h d'incubation.

La comparaison statistique entre les traitements a été faite par analyse de variance après transformation angulaire des pourcentages.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Production spermatogénétique et induction de la spermiation

Le nombre de spermatozoïdes intratesticulaires est de $1,21 \pm 0,21 \times 10^{10}$ par g de testicule ; rapporté au kg du poids vif, il s'élève à $1,7 \pm 0,3 \times 10^{11}$ /kg (tab. 1), ce qui correspond à la production spermatogénétique annuelle. Cette valeur est faible par comparaison à celle des autres poissons d'intérêt aquacole et ne représente que 10 à 20% de celle observée chez la truite *Oncorhynchus mykiss* (Billard, 1974) et la carpe *Cyprinus carpio* (Saad et Billard, 1987a), au moins en ce qui concerne la première saison de reproduction. Cette faible production est à rapprocher du faible poids testiculaire (RGS = $1,4 \pm 0,2$) qui classe le poisson-chat européen parmi les espèces de téléostéens ayant de faibles poids testiculaires (Billard, 1986, 1987). Cette espèce peut donc être considérée comme oligospermique. Le caractère d'oligospermie est encore plus marquée chez le « channel catfish » *Ictalurus punctatus* dont le RGS n'est que de 0,25% et la production spermatogénétique de l'ordre de $1,8 \times 10^{10}$ spermatozoïdes par kg de poids vif (Guest *et al.*, 1976). Du fait des faibles disponibilités en spermatozoïdes chez ces espèces il existe vraisemblablement des mécanismes « d'économie » allant du faible volume de laitance émis lors de l'accouplement (c'est sans doute le cas

pour le poisson-chat européen où il y aurait une sorte de « verrouillage » de la spermiation) à des comportements reproducteurs complexes (comme c'est aussi le cas chez le poisson-chat européen amenant le mâle à déposer le sperme au niveau de la papille génitale de la femelle) ou encore au choix de nids où l'émission des gamètes et la fécondation s'opèrent dans un milieu confiné et où la dilution du sperme est limitée.

Considérant le caractère oligospermique du poisson-chat européen, il est donc difficile d'espérer pouvoir prélever de grandes quantités de sperme chez cette espèce comme c'est le cas pour la carpe ou la truite (même à l'issue d'une stimulation hormonale). Nos expériences de stimulation à l'aide de la poudre hypophysaire de carpe (4 mg/kg de poids vif), ont permis une récolte du sperme qui demeure assez faible ($1,49 \pm 0,70$ ml par mâle) à la concentration de $7,18 \pm 1,29 \times 10^9$ spermatozoïdes par ml, alors que les mâles témoins ayant reçu le solvant seulement n'ont pas produit de sperme. La quantité de spermatozoïdes récoltés après une seule stimulation soit $3,6 \times 10^9$ spermatozoïdes par kg est de l'ordre de 2% de la production totale annuelle. Des essais associant la gonadolibérine (LH-RHA), au dompéridone (substance favorisant l'efficacité du traitement à LH-RHA en levant l'inhibition dopaminergique de la sécrétion gonadotrope observée dans quelques groupes de poissons dont celui des poissons-chats africains) (Van Asselt, 1989) n'ont pas notablement stimulé la spermiation du poisson-chat européen (Redondo, 1990; Linhart et Billard, 1994). De leur côté Koldras *et al.* (1991) ont montré que l'injection de poudre hypophysaire ne stimule pas la production de sperme chez *Silurus glanis*.

Motilité et pouvoir fécondant des spermatozoïdes

Identification d'un dilueur d'immobilisation

Les spermatozoïdes prélevés par massage abdominal, montrent une activation spontanée due à une contamination par de l'urine. Nous avons observé expérimentalement que de l'urine prélevée séparément et ajoutée au sperme provoquait une activation brève d'une fraction des spermatozoïdes. La pression osmotique du liquide séminal de sperme prélevé par massage abdominal centrifugé 3 000 rpm (650 g) et mesuré à l'aide d'un osmomètre est apparue très variable d'un mâle à l'autre (entre 105 et 244 mOsmol/kg) sans doute du fait de la contamination plus ou moins forte par de l'urine. Cette dernière a pu être prélevée indépendamment du sperme et la p.o. mesurée comme ci-dessus sur 3 mâles a varié entre 30 et 50 mOsmol/kg. Le pH du liquide séminal est lui-même très variable selon les mâles (variation observée entre 7,8 et 8,8) et celui de l'urine varie entre 5,8 et 6.

La motilité des spermatozoïdes est inhibée de façon réversible par des solutions salines dont la pression

Tableau 1. – Rapport gonado-somatique (RGS) et production spermatogénétique (nombre de spermatozoïdes intratesticulaires produits par kg de poids vif pendant le premier cycle spermatogénétique) chez le poisson-chat européen (*Silurus glanis*).

Gonado-somatic index (RGS) and sperm production (number of spermatozoa/kg body weight produced during the first spermatogenic cycle and found in the testis before the beginning of spermiation) in the European catfish (Silurus glanis).

Mâle n°	Poids vif (kg)	RGS (%)	Production spermatogénétique spermatozoïdes par kg × 10
1	2,0	1,67	1,80
2	2,3	1,50	1,47
3	3	1,30	2,19
4	3,5	1,43	1,57
5	4	1,14	1,28
$\bar{x} \pm SD$	$2,96 \pm 0,74$	$1,4 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,3$

Tableau 2. – Évolution de la motilité des spermatozoïdes de *S. glanis* (pourcentage de cellules mobiles et durée de nage de la majorité – plus de 50% – des spermatozoïdes) en fonction de la pression osmotique et de la nature de la solution utilisée; les milieux sont tamponnés par Tris-HCl 30 mM.

Changes in sperm motility in S. glanis (% of motile sperm and swimming time of the majority – more than 50% – of spermatozoa) in relation to the osmotic pressure and the nature of the saline solution used as diluent; the solutions are buffered with Tris-HCl 30 mM.

	Pression osmotique mOsmol/kg	Concentration (mM)	% de spermatozoïdes mobiles (¹) $n=5 \times 4$ (²)	Durée de mobilité (secondes) $n=4$ (³)
NaCl	110	55	88 ± 5	40 ± 3
	125	63	86 ± 6	45 ± 2
	220	110	60 ± 3	30 ± 3
	250	125	20 ± 5	20 ± 1
	310	155	0	0
KCl	125	63	88 ± 5	50 ± 4
	250	125	70 ± 4	15 ± 2
	280	140	20 ± 3	10 ± 1
	310	155	0	0

¹ Mesures faites 10 secondes environ après l'activation.

² $n=4$ mesures successives sur les spermatozoïdes de 5 mâles différents; $\bar{x} \pm SD$.

³ Période pendant laquelle plus de 50% des spermatozoïdes sont mobiles; $\bar{x} \pm SD$.

osmotique est supérieure à 300 mOsmol/kg (tabl. 2). Ces résultats confirment les données de Linhart *et al.* (1987). L'immobilisation dans le tractus génital est vraisemblablement due à la pression osmotique du plasma séminal comme c'est le cas chez divers cyprinidés (Morizawa, 1985; Saad et Billard, 1987 b).

Identification d'un dilueur d'activation

Les spermatozoïdes sont progressivement inhibés lorsque la pression osmotique augmente (tabl. 2) et le pouvoir fécondant est maximum lorsque l'insémination est pratiquée dans un dilueur dont la pression osmotique est comprise entre 100 et 150 mOsmol/kg (fig. 1). Dans un dilueur de pression osmotique voisine de 100 mOsmol/kg (30 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7,0) la survie des spermatozoïdes est meilleure que dans l'eau douce; une minute après dilution 60% des spermatozoïdes sont encore en mouvement alors qu'après dilution dans l'eau douce, 5% seulement des spermatozoïdes sont actifs (fig. 2). L'étude de l'effet du pH du dilueur sur le succès de la fécondation montre que le pH optimum est de 7 (fig. 3) mais la qualité des ovules de la femelle utilisée était médiocre.

Afin d'éviter l'activation spontanée des spermatozoïdes il est donc possible de prélever le sperme directement dans 5 ml de solution d'immobilisation (200 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 7,0) préalablement placés dans une seringue ou un tube

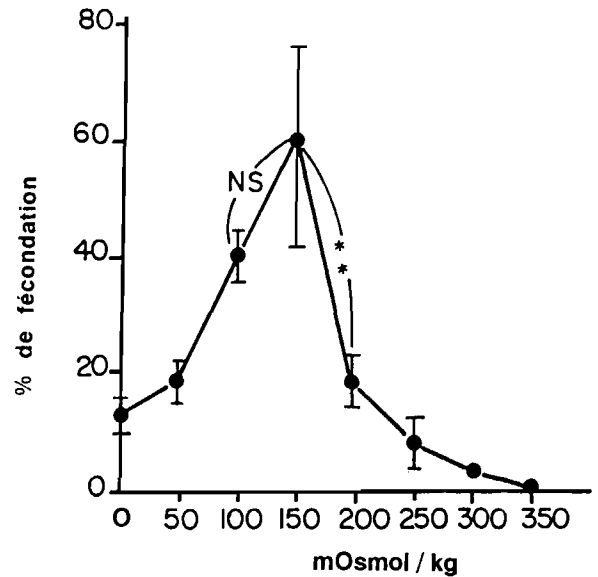


Figure 1. – Effet de la pression osmotique (calculée) du dilueur (NaCl, Tris-HCl 30 mM, pH 7,0) en mOsmol/kg sur le pourcentage de fécondation chez *Silurus glanis*; $\bar{x} \pm SD$. La pression osmotique 0 correspond à une insémination dans l'eau douce de l'écloserie. ** $p < 0,01$; NS: non significatif ($n=6$ réplicats pour les essais de fécondation avec des ovules provenant d'une seule femelle).

*Effect of the osmotic pressure (calculated) of the extender (NaCl, Tris-HCl 30 mM, pH 7,0) on sperm fertilizing capacity; The zero osmotic pressure (0) corresponds to fertilization in hatchery freshwater. ** $p < 0.01$; NS: non significant ($n = 6$ replicates of fertilization trials).*

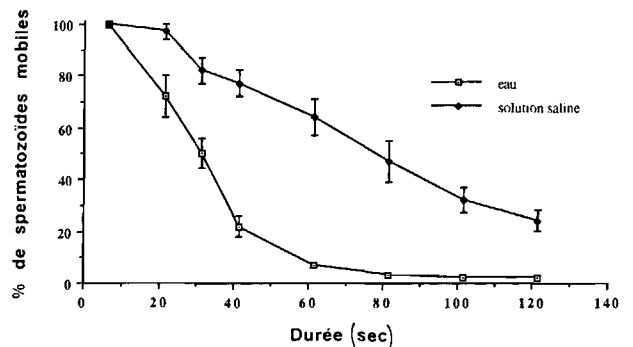


Figure 2. – Évolution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles ($\bar{x} \pm SD$) après dilution au 1/1 000 dans une solution saline (30 mM NaCl, 30 mM Tris HCl, pH 7,0, p.o. 100 mOsmol/kg) et de l'eau douce prise dans l'écloserie. L'eau douce présente une pression osmotique < 5 mOsmol/kg.

Change with time of the motility of spermatozoa diluted (1/1 000) in an extender (saline solution) (30 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7.0) and in hatchery freshwater (eau) (osmotic pressure < 5 mOsmol/kg).

de 10 ml: ce volume peut admettre jusqu'à 5 ml de sperme. En retranchant 5 ml du volume final on obtient le volume du sperme et d'urine mais il n'est pas possible de connaître le volume de sperme seul.

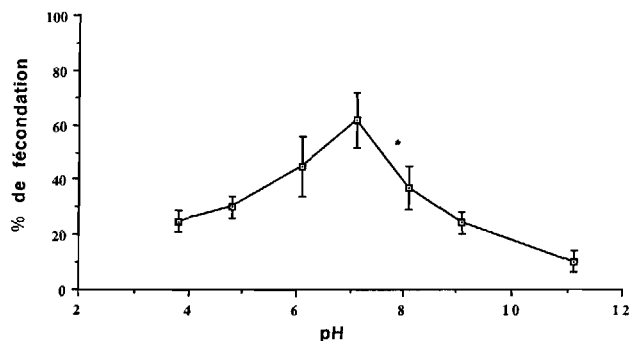


Figure 3. – Effet du pH du dilueur d’insémination (30 mM NaCl, 30 mM Tris HCl) sur le succès de la fécondation chez *Silurus glanis*. * $p < 0.05$, NS : non significatif ($n = 4$ réplicats pour le test de fécondation avec des ovules provenant d’une seule femelle), $\bar{x} \pm SD$.

*Change in sperm fertilizing capacity with the pH of the diluent of artificial insemination (30 mM NaCl, 30 mM Tris HCl). * $p < 0.05$, $n = 4$ replicates, $\bar{x} \pm SD$.*

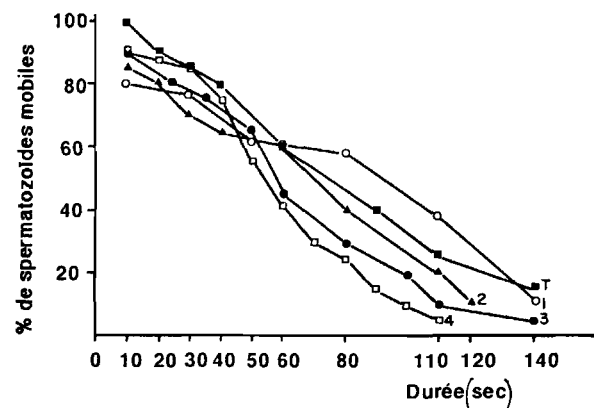


Figure 4. – Survie (évaluée par le % de cellules mobiles) des spermatozoïdes conservés immobilisés sur glace pendant 10 h dans une solution saline (200 mM NaCl, 30 mM tris-HCl, pH 7,0) (1 volume de sperme + 1 volume de solution d’immobilisation). La réactivation est obtenue après dilution au 1/1 000 dans une solution de NaCl 30 mM, Tris HCl 30 mM, pH 7,0; 1, 2, 3, 4 = n° des mâles; T = témoin (mobilité du pool des spermatozoïdes des mêmes mâles mesurés immédiatement après prélèvement).

Changes of the survival (percentage of motile spermatozoa) stored immobile for 10 h on ice in the immobilization solution (250 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 7.0) (dilution 1 volume sperm + 1 volume solution) and activation was initiated after dilution 1/1 000 in an activation solution NaCl 30 mM, Tris-HCl 30 mM, pH 7.0; 1 to 4: male number, T: control (motility of a pool of freshly collected sperm from the same males).

Dans l’expérience rapportée dans la *figure 4* le sperme ainsi dilué conserve au bout de 10 h une motilité comparable à celle du sperme témoin fraîchement prélevé également dans la solution d’immobilisation (cf. *fig. 2*).

Dans la pratique de la fécondation artificielle, le sperme peut d’abord être prélevé et stocké sur

glace pendant quelques heures, en attendant que les ovules soient prélevés. Le sperme dilué dans la solution d’immobilisation, est mélangé aux ovules et le dilueur d’insémination défini ci-dessus est ajouté immédiatement après; les proportions optimales œufs, sperme et dilueur restent à définir. Il a été observé que les spermatozoïdes immobilisés dans la solution de NaCl à 200 mM et mélangés (dans la proportion 1 v/1 v) aux ovules accompagnés de leur liquide ovarien ne s’activaient que très progressivement après l’addition de la solution d’activation: de ce fait le pourcentage maximum de fécondation des ovules n’est acquis qu’après une minute de mise en contact avec les spermatozoïdes (*fig. 5*). Il est possible que cette latence soit due à la solution d’immobilisation dont la pression osmotique reste pour un temps trop élevé autour des spermatozoïdes et quand ces derniers sont dilués dans la solution d’activation (diluée d’insémination), ils ne sont pas immédiatement activés. Le temps minimum pendant lequel les œufs inséminés doivent rester dans le dilueur avant d’être transférés en incubateur est au moins de 2 min et ne doit pas excéder 25 min (*fig. 5*). Chez certains salmonidés le pourcentage de fécondation s’est trouvé réduit lorsque de l’eau était ajoutée immédiatement après l’insémination (mélange du sperme avec les ovules) (Munkittrick *et al.*, 1992).

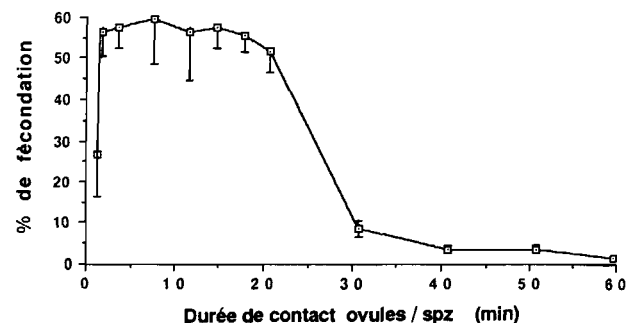


Figure 5. – Effet sur le taux de fécondation de la durée de l’exposition des œufs aux spermatozoïdes et au dilueur après insémination et avant transfert en incubateurs. Les spermatozoïdes sont mélangés aux ovules puis dilués 1/1 000 dans la solution d’activation au temps 0; ensuite, à des temps croissants, le mélange est transféré dans des incubateurs ou la forte dilution dans l’eau douce prévient toute possibilité de fécondation ultérieure (tests de fécondation répétés 4 fois avec les ovules d’une seule femelle).

Change with time in the fertilization rate of eggs exposed to diluent and spermatozoa after artificial insemination and before transfer to incubators. Spermatozoa are mixed with ova and diluted (1/1 000) in the activation solution at time zero; after, at increasing times, the mixture (egg + spermatozoa + diluent) is transferred to incubators at a high dilution in freshwater; this inhibits all further possibility of fertilization (4 replicates for fertilization tests with the eggs of a single female).

Il convient aussi de se demander si l’urine contribue à l’activation des spermatozoïdes lors de l’accouplement dans les conditions naturelles. S’il en était ainsi, une telle émission d’urine

pourrait 1) réduire le choc hypo-osmotique que subit le spermatozoïde dans l'eau douce (pression osmotique de l'urine 30-50 mOsmol/kg); 2) pré-activer les spermatozoïdes qui se trouveraient alors en mouvement lorsqu'ils arrivent au contact des ovules ce qui permettrait d'éviter le temps de latence observé lors de la mise en contact ovule/spermatozoïde (fig. 5).

En conclusion, la production spermatogénétique annuelle de *Silurus glanis* est peu importante, comparativement à d'autres espèces comme la carpe ou la truite et la concentration du sperme en spermatozoïdes est faible. Il faut donc être conscient de ces disponibilités limitées en spermatozoïdes dans la gestion des gamètes et de la reproduction artificielle de cette espèce.

Remerciements

Ce travail a été réalisé avec l'aide du Ministère de la Recherche, de la Technologie en France et de la CCE (Programme de coopération avec les pays d'Europe Centrale et de l'Est, projet 4399). Nous remercions MM. Kirsh et Heymann pour la mise à disposition des géniteurs et des équipements d'élevage et d'incubation. La frappe du manuscrit a été assurée par Jocelyne Faurillon.

RÉFÉRENCES

- Asselt van A. 1989. Cell biological aspects of the control of gonadotropin release in the African catfish, *Clarias gariepinus*. Ph.D. Thesis Utrecht Univ., 115 p.
- Billard R. 1974. La production spermatogénétique de la truite arc-en-ciel au cours du premier cycle reproducteur. *Bull. Fr. Piscic.* **253**, 139-149.
- Billard R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dév.* **26**, 877-920.
- Billard R. 1987. Testis growth and spermatogenesis in fish, the problem of the large interspecies variability in testis size. In : Reproductive Physiology of Fish. D. R. Idler, L. W. Crim, J. M. Walsh eds. Proc. 3rd Int. Symp. St John's Canada, 183-186.
- Guest W. C., J. V. Avault, J. D. Roussel 1976. A spermatology study of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Trans. Am. Fish. Soc.* **105**, 463-468.
- Hollebecq M. G., A. Saad, E. Pionnier, A. Heymann, R. Billard 1987. Etudes expérimentales sur la reproduction artificielle du silure glane, *Silurus glanis* L. *Aqua revue Bordeaux* **17**, 22-24.
- Koldras M., S. Bhattacharya, K. Bienarz, D. E. Kime 1991. Steroidogenesis and sperm production in the European catfish, *Silurus glanis*. In : Proc. 4th Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish. A. P. Scott, J. P. Sumpter, D. E. Kime, M. S. Rolfe eds. Norwich UK, 101 p.
- Kouril J., J. Hamackova 1982. Artificial spawning, egg incubation and forced fry rearing of the sheat-fish *Silurus glanis* L. *Prace VURH Vodnany* **11**, 119-126.
- Linhart O., J. Kouril, J. Hamackova 1987. Increased rate of egg fertilisation in artificial propagation of sheatfish *Silurus glanis* L. by means of suppressing the movements of spermatozoa with immobilization solution. *Aquaculture* **65**, 353-358.
- Linhart O., R. Billard, J. P. Proteau 1993. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* L. spermatozoa. *Aquaculture* **115**, 347-359.
- Linhart O., R. Billard 1994. Spermiation and sperm quality of European catfish (*Silurus glanis* L.) after implantation of GnRH analogues and injection of carp pituitary extract. *J. Appl. Ichthyol.*, **10**, 182-188.
- Munkittrick K. R., S. M. McGeachy, M. G. Burke, P. A. Flett 1992. Effects of delay in water addition or rinsing on fertilization rates of chinook salmon, coho salmon, atlantic salmon, and rainbow trout eggs. *Progress. Fish. Cult.* **54**, 14-20.
- Morisawa M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleost. *Zool. Sci.* **2**, 605-615.
- Redondo Ch. 1990. Biología del esperma de la carpa comun, *Cyprinus carpio* L. y del siluro europeo *Silurus glanis* L. Thesis Dr. Univ. Zaragoza, 193 p.
- Redondo Ch., V. Hilge, R. Billard 1989. Artificial insemination of catfish *Silurus glanis* L. *Europ. Aquacult. Soc. Bredene, Belgique, Spec. Publ.* **10**, 211-212.
- Redondo Ch., R. Billard, E. Espinosa, A. Josa 1990. Inducción a la espermiación del Siluro europeo, *Silurus glanis* L., mediante la aplicación de extractos hipofisarios de Carpa (EHC). *Int. Reprod. Anim. Ins. Artif.* June 1990, Zaragoza, 211-214.
- Saad A., R. Billard 1987a. Spermatogenetic production and spermiation yield in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* **65**, 67-77.
- Saad A., R. Billard 1987b. Composition et emploi d'un dilueur d'insémination chez la carpe *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* **66**, 327-345.
- Saad A., M. G. Hollebecq, R. Billard, E. Pionnier, A. Heymann 1988. Production spermatogénétique, dilution et conservation du sperme du Silure Européen *Silurus glanis*. In: Symp. Cultivo Intensivo de Peces Continentales, Assoc. Española de Acuicultura Madrid.