
Compte rendu des premières expérimentations de fécondation artificielle chez l'ombrine, *Sciaenops ocellatus*

Etudes préliminaires de la maturation finale des ovocytes et
de la qualité du sperme

Numéro d'identification du rapport : DRV/RA/RST/00/15		date de publication Septembre 2000
Diffusion : libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/>		nombre de pages 17
Validé par : Jean Barret		bibliographie (Oui)
Version du document : définitive		illustration(s) (Oui)
		langue du rapport Français
Titre et sous-titre du rapport : Compte rendu des premières expérimentations de fécondation artificielle chez l'ombrine, <i>Sciaenops ocellatus</i> . Etudes préliminaires de la maturation finale des ovocytes et de la qualité du sperme.		
Titre traduit : Report on the first artificial insemination experiments in red drum, <i>Sciaenops ocellatus</i>. Preliminary studies of oocytes final maturation and sperm quality.		
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom Gardes Lionel, Buchet Vincent, Villanove Philippe Fauvel Christian	Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER/DRV/RA/Martinique IFREMER/DRV/RA/Palavas	
Collaborateur(s) : nom, prénom	Organisme / Direction / Service, laboratoire	
Travaux universitaires : diplôme : _____ discipline : _____ établissement de soutenance : _____ année de soutenance : _____		
Titre du contrat de recherche : Programme de recherche en soutien à la filière aquacole marine, convention n° 98-550 Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse Conseil Régional de la Martinique rue Gaston Defferre – BP 601 – 97200 Fort de France		n° de contrat IFREMER
Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s) Ifremer , Laboratoire ressources aquacoles Pointe Fort – 97231 Le Robert Responsable scientifique : Vincent Buchet		
Cadre de la recherche : Programme : Physiologie de la reproduction de l'ombrine, <i>Scianops ocellatus</i> . Convention : _____ Projet : _____ Autres (préciser) : _____ Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)		

Résumé :

La mise au point de la fécondation artificielle chez l'ombrine, *Sciaenops ocellatus*, passe par une étape préalable d'acquisition de données biologiques de base. Concernant les mâles, une relation entre densité optique de la solution (DO) mesurée par spectrophotométrie et concentration spermatique (CS) a été établie : $DO = 0,161 * CS + 0,119$. La concentration spermatique moyenne mesurée est de $4,36.10^{10}$ spz.mL⁻¹. L'étude met en évidence une influence du dilueur de fécondation utilisé sur la motilité des spermatozoïdes et son évolution lors de la conservation à court terme. En ce qui concerne les femelles, le suivi de la maturation finale par observation d'échantillons prélevés lors de strippings réguliers, semble être une bonne technique pour limiter les problèmes de sur maturation et de libération spontanée des ovules. Quelques essais de fécondation à sec ont été réalisés. Ils mettent en évidence la faisabilité technique de la procédure retenue et la difficulté à mettre en œuvre ces expérimentations en raison de l'extrême rapidité de l'ensemble des processus biologiques dans le contexte tropical.

Abstract :

Artificial insemination mastery in red drum, *Sciaenops ocellatus*, requires a first experimental step aiming at getting basic biological data. Regarding males, a relation between optical density of the solution (OD) measured by spectrophotometry and sperm concentration (SC) has been established : $OD = 0,161 * SC + 0,119$. Mean sperm concentration measured is $4,36.10^{10}$ spz.mL⁻¹. This study shows an influence of the solution of dilution on spermatozoa motility and its evolution during short term preservation. As far as females are concerned, the follow-up of final maturation through the observation of samples taken during regular strippings, seems to be a good technique to limit overripening and spontaneous liberation of ovules. Some artificial insemination trials were realised. They show technical feasibility of the process chosen and the difficulty to bring these experiments into operation because of the extreme rapidity of the whole biological processes under tropical conditions.

Mots-clés :

Fécondation artificielle, concentration spermatique, motilité du sperme, ovogenèse, ovulation, sur maturation, ombrine, *Sciaenops ocellatus*.

Keywords :

Artificial insemination, sperm concentration, sperm motility, oogenesis, ovulation, overripening, red drum, *Sciaenops ocellatus*.

Commentaire :

1. INTRODUCTION.....	1
2. MATERIEL ET METHODES	2
2.1. Conditionnement des reproducteurs	2
2.2. Cinétique de la maturation finale	2
2.3. Qualité du sperme.....	3
2.3.1. Concentration spermatique.....	3
2.3.2. Motilité.....	3
2.4. Fécondation artificielle	4
3. RESULTATS.....	5
3.1. Maturation finale	5
3.2. Qualité du sperme.....	10
3.2.1. Spectre d'absorption du sperme	10
3.2.2. Concentration spermatique.....	10
3.2.3. Motilité du sperme.....	13
3.3. Technique de fécondation.....	14
4. DISCUSSION ET PROPOSITIONS	15
5. CONCLUSION.....	17
REMERCIEMENTS.....	17
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	18



1. INTRODUCTION

Ce travail relatif aux premiers essais de mise au point de la fécondation artificielle des ovules d'ombrine, *Sciaenops ocellatus*, dans les conditions tropicales martiniquaises, fait suite aux expérimentations menées sur le contrôle hormonal de la ponte à l'aide de la LH-RHa (Gardes *et al.*, 1999). Il a été initié afin de répondre aux besoins de la filière de production.

Il nous a semblé nécessaire de disposer dès à présent d'un certain nombre de données biologiques et techniques indispensables à la mise au point de la fécondation artificielle. Ceci devrait nous permettre d'anticiper la demande qui ne manquera pas de s'exprimer sur des aspects concernant la génétique (sélection, cryoconservation du sperme...). Cette demande émanant du secteur professionnel lorsque l'aquaculture de l'Ombrine aura fini sa première phase de développement.

Trois lignes directrices ont orienté cette étude : l'étude des mécanismes de la maturation finale conduisant à l'ovulation, l'évaluation de la qualité du sperme et l'essai de la technique de fécondation elle-même.

Une meilleure connaissance du processus de maturation finale des ovocytes est apparue comme un préalable fondamental dans un contexte tropical où les différents mécanismes physiologiques se déroulent généralement très rapidement.

Après étude des travaux relatifs aux caractéristiques du sperme de bar, *Dicentrarchus labrax* (Fauvel *et al.*, 1999) et de turbot, *Scophthalmus maximus* (Suquet *et al.*, 1992), la mise au point d'une méthode d'évaluation de la concentration spermatique est apparue comme le point de départ du travail sur l'acquisition de connaissances biologiques relatives au sperme de l'ombrine. Le second point est l'étude de la motilité du sperme afin d'évaluer son pouvoir fécondant et l'évolution de cette capacité en fonction du milieu de dilution et l'intérêt éventuel de l'utilisation de protéines, du temps et des conditions de conservation. Les travaux antérieurs (Fauvel *et al.*, 1993a ; Suquet *et al.*, 1992 et Suquet *et al.*, 1993) ont montré le rôle protecteur des protéines dont l'ajout au dilueur permettait d'éviter l'agrégation de spermatozoïdes après addition de l'eau de mer dans les cas de forte dilution.

Un essai de transfert de la procédure standard de fécondation artificielle (Fauvel *et al.*, 1999 ; Suquet *et al.*, 1995) semblait enfin nécessaire afin d'évaluer s'il était possible d'appliquer ces acquis chez l'ombrine et quelles seraient les particularités à prendre en compte pour les expérimentations à venir.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Conditionnement des reproducteurs

L'étude est réalisée sur un lot d'ombrines nées en captivité, *Sciaenops ocellatus*, composé de 14 mâles ($5300 \pm 900\text{g}$) et 23 femelles ($5080 \pm 680\text{g}$) ayant subi un cycle de conditionnement photo et thermopériodique de 4 mois (Figure 1) dans un bassin de 16 m^3 équipé d'un circuit fermé.

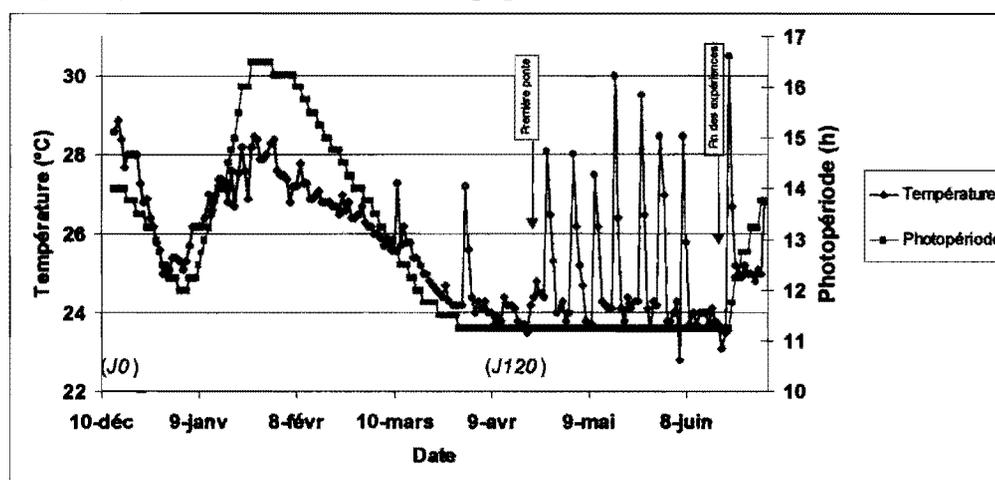


Figure 1 : Evolution de la température et de la photopériode au cours du conditionnement des géniteurs.

Les pics de température apparaissant à intervalles réguliers (ronds) correspondent aux biopsies dont la réalisation nécessitait la vidange complète du bassin. Les biopsies réalisées mensuellement durant les quatre mois de conditionnement, puis de façon hebdomadaire une fois la période de ponte commencée, ont permis de suivre l'évolution du développement ovocytaire tout au long de la période expérimentale. Le niveau de spermiation des mâles était également évalué au cours de ces manipulations en fonction de la quantité de sperme libéré par pression abdominale et noté, 0 (pas d'émission de sperme), 1 (mince filet de sperme) ou 2 (émission importante de sperme). Les géniteurs étaient manipulés après anesthésie au Phénoxy-2 éthanol, selon les protocoles usuellement appliqués (Derozier, 1989).

2.2. Cinétique de la maturation finale

Une série d'expériences a été réalisée afin d'évaluer la cinétique de la maturation finale. 24 heures après la stimulation hormonale, les femelles anesthésiées étaient soumises à une première pression abdominale (« stripping ») dans le but d'extraire les gamètes ovulés. L'opération était ensuite renouvelée toutes les heures, jusqu'à 29 heures post-stimulation.



Chaque échantillon prélevé au cours de ces manipulations a fait l'objet d'une observation macroscopique (aspect général de l'échantillon) et microscopique (taille des ovules, couleur et structure du cytoplasme, % d'ovules à 1 globule lipidique, aspect de la membrane). Le volume et le pH de la ponte étaient également enregistrés lorsqu'un nombre suffisant d'ovules était obtenu (>100mL).

2.3. Qualité du sperme

2.3.1. Concentration spermatique

Huit mâles ont été utilisés pour la mise au point de la méthode d'évaluation de la concentration spermatique. Les mâles choisis étaient isolés dans des bacs de 2 m³ et le prélèvement du sperme réalisé par massage abdominal.

A l'aide d'un spectrophotomètre Jasco V530, permettant de travailler avec des longueurs d'ondes comprises entre 200 et 1000 nm, une première observation du spectre d'absorption d'un sperme dilué au 1/250 a été réalisée. Une cuve en quartz était utilisée afin d'effectuer les mesures jusqu'aux courtes longueurs d'ondes (UV). A partir de cette observation du spectre, cinq longueurs d'ondes ont été choisies (260, 300, 350, 420, 500 nm) pour y mesurer la densité optique (DO) de huit spermes à six dilutions (1/500, 1/600, 1/750, 1/1000, 1/1250, 1/1500). Parallèlement, pour chaque dilution, le comptage des spermatozoïdes de trois échantillons de 1µL était réalisé sur cellule de Malassez après quelques minutes de décantation. 300 spermatozoïdes, au minimum, étaient comptés par cellule selon les recommandations de Fauvel (comm. pers.). Les dilutions étaient réalisées dans de l'eau distillée afin de conserver l'intégrité des cellules spermatiques, ainsi que leur immobilité. Le blanc était réalisé avec l'eau distillée.

2.3.2. Motilité

Les premières observations ont été réalisées après dilution du sperme d'ombrine dans une solution de NaCl (9 ‰) et dans un milieu non activant isotonique (NAM) d'après les travaux de Fauvel *et al.* (1999) sur le bar (NaCl : 3,5g.L⁻¹ ; KCL : 0,11g.L⁻¹ ; MgCl₂ : 1,23g.L⁻¹ ; CaCl₂ : 0,39g.L⁻¹ ; NaHCO₃ : 1,68g.L⁻¹ ; glucose : 0,08g.L⁻¹ ; pression osmotique : 310mOsm.kg⁻¹ ; pH : 7,7), avec et sans ajout d'albumine humaine. L'évaluation de la motilité a été effectuée conformément à la procédure décrite par Suquet *et al.* (1992). Le sperme de trois mâles était tout d'abord mélangé puis dilué au 1/20 dans le NAM. Des échantillons de 20 µL de sperme dilué étaient ensuite activés dans 1 mL d'eau de mer, conduisant ainsi à une dilution finale au 1/1000 et permettant l'observation des spermatozoïdes au microscope (grossissement ×400). La motilité était observée par activation du sperme juste après la dilution (T0) et deux heures plus tard (T2) avec conservation à température ambiante (25°C).

Le nombre de cellules mobiles était évalué toutes les 10 s après activation, jusqu'à ce que les derniers spermatozoïdes présentant des mouvements propulsifs s'arrêtent ou vibrent sur place. L'enregistrement du temps nécessaire à l'arrêt complet des cellules définit la durée de motilité.

La motilité était classée en 6 catégories : 0 pour le sperme immobile, 1 pour 0-20% de cellules mobiles, 2 pour 20-40%, 3 pour 40-60%, 4 pour 60-80%, 5 pour 80-100%. Les échantillons étaient traités en triplicats.

2.4. Fécondation artificielle

Lors des biopsies hebdomadaires, les femelles présentant des ovocytes aux stades B ou C de la phase noyau en migration et une homogénéité élevée de l'échantillon (niveaux 2 ou 3, homogène à très homogène) (Gardes *et al.*, 1999) étaient isolées dans des bacs de 2 m³ (température 29,5-31,5°C) pour y subir une stimulation hormonale. L'hormone utilisée est la [DTrp6] LH-RHa (Réf. L9761 - SIGMA chimie). Les injections étaient réalisées à la dose de 20 µg.kg⁻¹, à raison de 1 mL.kg⁻¹.

Les premiers essais de fécondation à sec ont été réalisés conformément à la procédure expérimentale standard décrite par Fauvel *et al.* (1999) pour le bar. Ces essais ont été effectués lorsque le volume d'œufs prélevé était supérieur à 100mL.

Deux millilitres d'œufs d'une même ponte étaient placés dans des béchers en plastique de 10mL, chaque ponte étant traitée en triplicat. Vingt microlitres de sperme dilué au 1/8 (sperme non limitant) à l'aide du NAM additionné d'albumine étaient ensuite déposés sur les œufs et incorporés au liquide ovarien par une douce agitation. Un millilitre d'eau de mer (35‰, 25°C) était enfin ajouté pour activer le sperme. Au bout de cinq minutes, le bécher était complété à 10 mL pour permettre l'incubation des œufs dans de bonnes conditions. Le taux de fécondation était évalué lorsque les œufs présentaient les premières divisions cellulaires, soit moins d'une heure après la fécondation à 25°C. Pour chaque ponte, un comptage aléatoire de deux cent œufs était réalisé dans trois réplicats.



3. RESULTATS

3.1. Maturation finale

Les essais préliminaires à ce travail ont permis de mettre en évidence deux problèmes majeurs :

- Les femelles isolées ne conservent pas leurs œufs. Une fois l'ovulation réalisée, elles libèrent la ponte même en l'absence de stimulus du mâle. Cette caractéristique est particulièrement handicapante dans le contexte de la fécondation artificielle.
- Selon les individus, la cinétique de la maturation finale est influencée de façon plus ou moins importante par la température de l'eau de mer. Certaines pontes ont en effet été obtenues moins de 24 h après l'injection hormonale, phénomène pouvant être mis en rapport avec la température élevée de l'eau de mer au cours des expérimentations (29,5-31,5 °C).

Au vu de ces premiers résultats, il est apparu fondamental de tenter d'affiner la connaissance du processus de maturation finale et de sa cinétique chez l'ombrine en conditions tropicales. Sept femelles ont ainsi été utilisées pour cette étude et les observations réalisées pour chacune d'entre elles sont précisées ici.

Tableau 1 : Observations de la maturation finale chez la femelle A, 24^h, 25^h30, 26^h30 et 28^h après la stimulation hormonale. (%1GL : pourcentage d'œufs présentant un seul globule lipidique)

	24 h	25 h 30	26 h 30	28 h
Diamètre (µm)	800		-	
Couleur	marron		-	
Structure du cytoplasme	rétracté		-	
Membrane	Surface plissée		-	
%1GL	élevé		-	
Volume (mL)	Insignifiant		-	
pH	Non déterminé		-	
Divers	Œufs éclatés		-	

La femelle A a libéré sa ponte dans le bac avant le début des observations et n'a donné des œufs par pression abdominale qu'à 24 h. Alors que le diamètre des œufs et le pourcentage d'œufs à un seul globule lipidique représentent les caractéristiques d'œufs de qualité, les œufs observés apparaissent de mauvaise qualité selon les autres paramètres observés (Tableau 1). Il s'agissait donc vraisemblablement d'œufs non émis de la ponte intervenue moins de 24 h après la stimulation.



Tableau 2 : Observations de la maturation finale chez la femelle B, 24^h, 25^h30, 26^h30 et 28^h après la stimulation hormonale.

	24 h	25 h 30	26 h 30	28 h
Diamètre (µm)	900	700-800		
Couleur	marron	marron / noir	Marron	
Structure du cytoplasme	rétracté	Rétracté		
Membrane	lisse	surface plissée		
%IGL	élevé	Elevé		
Volume (mL)	Insignifiant	NS		
PH	Non déterminé	Non déterminé	6,0	
Divers	œufs normaux	-	œufs déformés	

La femelle B a également pondu moins de 24 h après l'injection. Le suivi effectué (*Tableau 2*) permet cependant une observation de la progression du phénomène de vieillissement des œufs (surmaturation) : le cytoplasme des œufs devient marron et se regroupe autour du globule lipidique (« rétracté »). La structure des œufs se dégrade progressivement : la surface membranaire se plisse puis se déforme. Un pH de 6,0 a pu être observé à 28 h.

Tableau 3 : Observations de la maturation finale chez la femelle C, 24^h30, 25^h30, 27^h et 28^h après la stimulation hormonale.

	24 h 30	25 h 30	27 h	28 h
Diamètre (µm)	820			
Couleur	Marron			
Structure du cytoplasme	Rétracté			
Membrane	surface lisse		surface plissée	
%IGL	Elevé			
Volume (mL)	Insignifiant		10	Insignifiant
pH	Non déterminé		6,0	Non déterminé
Divers	consistance gélatineuse, œufs agglomérés, quelques œufs éclatés	idem	consistance gélatineuse, œufs éclatés ou déformés (la plupart)	œufs éclatés

Les observations réalisées sur la femelle C illustrent une nouvelle fois le processus de dégénérescence des œufs par déstructuration progressive.

Tableau 4 : Observations de la maturation finale chez la femelle D, 24^h30, 25^h30, 26^h30 et 27^h30 après la stimulation hormonale.

	24 h 30	25 h 30	26 h 30	27 h 30
Diamètre (µm)	900			
Couleur	Transparents + quelques marrons	marron se généralisant	marron	
Structure du cytoplasme	rétracté	rétracté	rétracté	
Membrane	lisse		plissée	
%1GL	élevé			
Volume (mL)	25	20	10	Insignifiant
PH	6,4	6,0	6,0	Non déterminé
Divers	œufs collants	œufs formant un bloc compact, gélatineux	quelques œufs déformés ou éclatés	beaucoup d'œufs déformés ou éclatés

La femelle D a libéré sa ponte dans le bac avant le délai de 24 h. Le suivi effectué semble faire apparaître une baisse du pH au cours du processus de surmaturation des œufs.

Tableau 5 : Observations de la maturation finale chez la femelle E, 24^h30, 25^h30, 27^h et 28^h après la stimulation hormonale.

	24 h 30	25 h 30	27 h	28 h
Diamètre (µm)	850			
Couleur	transparents		transparents + quelques marrons	marrons
Structure du cytoplasme	normale		normale + quelques rétractés	rétracté
Membrane	lisse			
%1GL	élevé			
Volume (mL)	Insignifiant	100	Insignifiant	Insignifiant
pH	Non déterminé	6,2	6,2	Non déterminé
Divers	œufs normaux	œufs normaux ponte collante	œufs normaux globalement	début déformation

Le Tableau 5 permet d'observer qu'il a été possible d'obtenir une ponte de 100mL d'œufs (25 h 30) une heure après une première observation de quelques œufs juste ovulés (transparents, membrane lisse, bel aspect du cytoplasme). Il s'agit d'une ponte collante présentant un pH de 6,2. Les observations suivantes (27 et 28 h) permettent de confirmer la description du processus de vieillissement des œufs non émis présentée pour la femelle B.



Tableau 6 : Observations de la maturation finale chez la femelle F, 24^h, 25^h30, 26^h30 et 28^h après la stimulation hormonale.

	24 h	25 h 30	26 h 30	28 h
Diamètre (µm)	-	870		850
Couleur	-	Clairs + quelques œufs marrons	grand nombre d'œufs marrons	Transparents + quelques œufs marrons
Structure du cytoplasme	-	Rétracté		normale + rétracté
Membrane	-	-		surface plissée
%1GL	-	Elevé		Idem
Volume (mL)	-	Insignifiant		275
pH	-	Non déterminé		6,7
Divers	-	quelques paquets d'œufs		ponte collante, déformation des œufs marrons

Le Tableau 6 permet d'observer que la femelle F a tout d'abord présenté des œufs marrons et formant des petits paquets. Lors du stripping à 28 h, il a ensuite été possible d'obtenir une ponte assez volumineuse, mais de consistance collante.

Tableau 7 : Observations de la maturation finale chez la femelle G, 24^h, 25^h30, 26^h30 et 27^h30 après la stimulation hormonale.

	24 h 30	25 h 30	26 h 30	27 h 30
Diamètre (µm)	850		840	
Couleur	marron	marron + quelques transparents	transparent	devenant marron autour du GL
Structure du cytoplasme	Rétracté		normale	
Membrane	Plissée		lisse	
%1GL	Elevé		élevé	
Volume (mL)	Insignifiant	Insignifiant	10	10
pH	Non déterminé	Non déterminé	7,6	7,2
Divers	œufs éclatés	œufs en décomposition avancée + quelques jolis œufs récemment ovulés	œufs normaux	début vieillissement des œufs

Le premier prélèvement réalisé sur la femelle G a permis d'observer des œufs ayant mûri précocement et étant en cours de dégénérescence. Une heure plus tard, la seconde observation a fait apparaître quelques œufs fraîchement émis, tout à fait viables. Au cours de la troisième observation, 10 mL d'œufs fraîchement émis ont pu être prélevés, mais l'ovulation ne devait pas être

achevée. Une heure plus tard en revanche, la femelle avait pondu. Les œufs non libérés ont pu être prélevés par stripping, mais ils présentaient déjà les premières caractéristiques d'œufs débutant le processus de surmaturation.

L'ensemble des résultats du suivi de la maturation finale des femelles induites hormonalement permet de mettre en évidence la difficulté à maîtriser la cinétique de ce processus :

- Certaines femelles pondent dans un délai très court après l'injection hormonale (<24 h) alors que les stades de maturation sont comparables au moment de la stimulation. Température dans les bacs d'induction et variation individuelle de la sensibilité à la LH-RHa sont vraisemblablement à mettre en cause.
- L'intervalle entre l'ovulation des premiers œufs, le pic d'ovulation et la libération des œufs est vraisemblablement très court. La libération des œufs dans le milieu semblerait se dérouler très rapidement après l'ovulation puisque dans le cas des femelles E et G, un délai d'une heure a été observé. Pour la femelle F, l'ensemble du processus, de l'ovulation à la fin de la libération, s'est même réalisé en moins de 90 minutes.

Les pontes significatives récupérées (2 sur 7 inductions hormonales) ont présenté des volumes relativement faibles (100 et 275 mL) par rapport aux pontes naturelles et une bonne qualité si on l'évalue, en première approche, par le très faible fractionnement du globule lipidique observé (Gardes *et al.*, 1999). En ce qui concerne le pH du liquide ovarien, on note cependant une différence importante entre les pontes puisqu'elles se situent tout au long de la gamme de pH rencontrée (6,0-7,6) : 6,2 (femelle E), 6,7 (femelle F) et pH compris entre 7,2 et 7,6 (femelle G).

Enfin, en ce qui concerne le processus de surmaturation, d'importantes observations ont également été réalisées :

- Au niveau du cytoplasme des œufs, le contenu initialement transparent devient progressivement marron. Ce brunissement débute autour du globule lipidique, puis se généralise à l'ensemble du cytoplasme. Parallèlement, le cytoplasme occupant au départ la totalité du volume de l'œuf, se rétracte petit à petit autour du globule lipidique.
- La membrane de l'œuf subit également des changements dans sa structure externe qui, normalement lisse, devient plissée lorsque le processus de vieillissement est avancé. Au terme de cette évolution, la membrane se déforme de plus en plus, jusqu'à ce que la déstructuration complète aboutisse à la rupture de l'œuf.
- Le pH du liquide ovarien semble également subir une évolution. On remarque en effet que tous les échantillons présentant des œufs en cours de dégradation ont des pH très faibles (entre 6,0 et 6,4), le pH semblant être d'autant plus faible que le vieillissement est important (femelle D).

• En ce qui concerne enfin la cinétique, cette étude met en évidence l'extrême rapidité de la mise en place du processus de dégradation. Dans le contexte tropical, la surmaturation semble débiter tout de suite après l'ovulation.

3.2. Qualité du sperme

3.2.1. Spectre d'absorption du sperme

Le spectre d'absorption du sperme d'ombrine (*Figure 2*) peut se décomposer en deux parties : une augmentation légère mais constante de densité optique entre 1000 et 300 nm, suivie d'une forte augmentation de DO entre 300 et 200 nm. L'augmentation de DO n'est cependant pas uniforme et on observe un ralentissement entre 280 et 240 nm formant un épaulement caractéristique des spermatozoïdes de poissons autour de 260 nm.

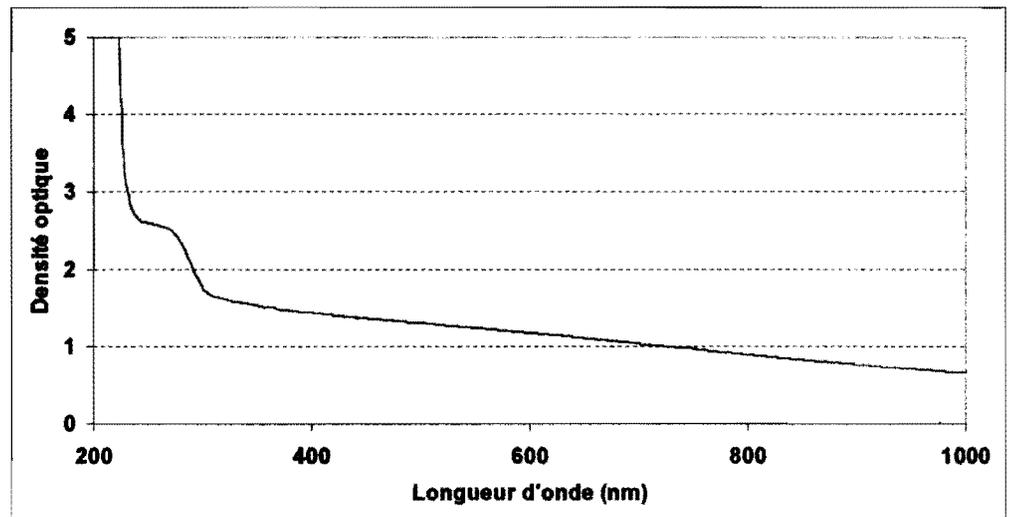


Figure 2 : Spectre d'absorption du sperme de l'ombrine dilué au 1/200 dans l'eau distillée.

3.2.2. Concentration spermatique

Les droites de régression obtenues pour les différentes longueurs d'onde (*Figure 3*) présentent des coefficients de détermination (R^2) extrêmement proches. On remarque en revanche que la pente (coefficient $a = dy/dx$) de ces droites augmente lorsque la longueur d'onde diminue. Or, plus « a » est grand, plus on gagne en précision lorsque, connaissant une mesure de « y », on cherche à déterminer la valeur de « x » correspondante. La longueur d'onde de 260 nm sera donc retenue pour la suite.

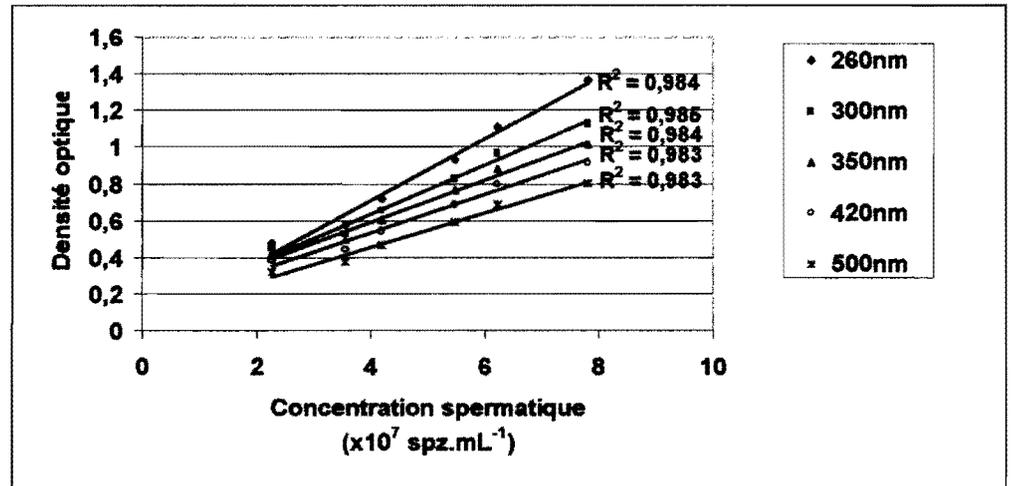


Figure 3 : Relation entre densité optique et concentration spermatique à cinq longueurs d'onde différentes (n=1).

Afin d'évaluer si la dilution exerce une influence sur la relation concentration spermatique - DO, il est également possible de représenter sur une même figure (Figure 4) les mesures regroupées en séries caractérisées par la dilution effectuée.

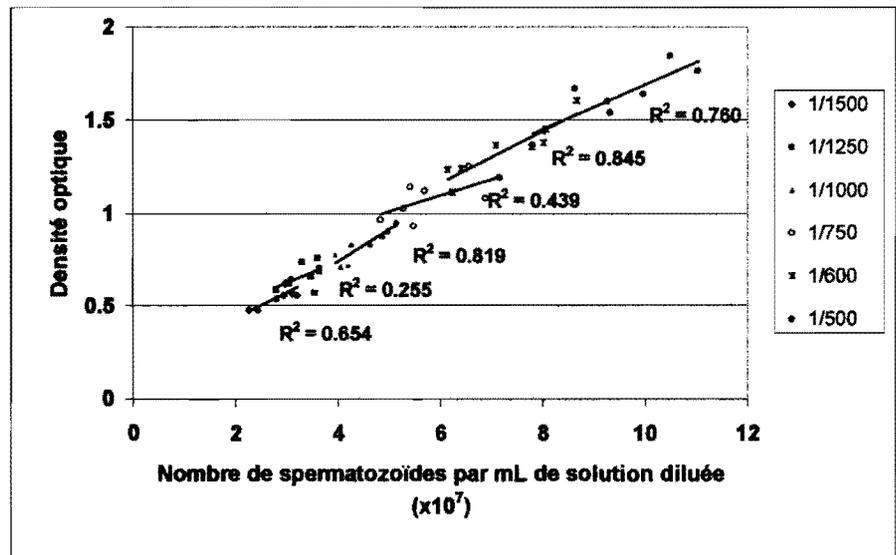


Figure 4 : Relation entre densité optique mesurée à $\lambda=260\text{nm}$ et nombre de spermatozoïdes dans 1 mL de solution diluée, en fonction de la dilution (n=8).

Les droites de régression obtenues pour les différentes séries présentent des coefficients de détermination relativement variables, mais bons dans l'ensemble (hormis pour les dilutions 1/1250 et 1/750). Une analyse de variance réalisée sur ces séries met en évidence l'action significative de la dilution sur la concentration spermatique ($P < 0,05$). Un test de comparaison



multiple de moyennes (Student Newan-Keuls) montre que les différences sont significatives entre toutes les concentrations excepté 1/1000 et 1/600 (*Tableau 8*).

Tableau 8 : Moyennes et différences significatives (lettres différentes) observées entre les six dilutions réalisées (n=8).

Dilutions	1/1500	1/1250	1/1000	1/750	1/600	1/500
Moyennes (spz.mL ⁻¹)	42,5.E ⁺⁹	42,1.E ⁺⁹	44,1.E ⁺⁹	42,8.E ⁺⁹	44,2.E ⁺⁹	46,1.E ⁺⁹
	a	b	abcd	c	abcd	D

Ces dernières sont en outre les valeurs les plus proches de la concentration spermatique moyenne obtenue pour l'ensemble des mesures effectuées sur les huit mâles : $43,6.10^9$ spz.mL⁻¹ ($\pm 5.10^9$).

Compte tenu des valeurs élevées et très proches ($\approx 0,8$) des coefficients de détermination des droites de régression relatives à ces deux séries (*Figure 4*), les dilutions 1/600 et 1/1000 pourront être utilisées indifféremment pour les études ultérieures du sperme.

Enfin, la *Figure 5* présente la droite de régression obtenue à l'aide de l'ensemble des mesures effectuées sur les huit mâles à la dilution 1/1000.

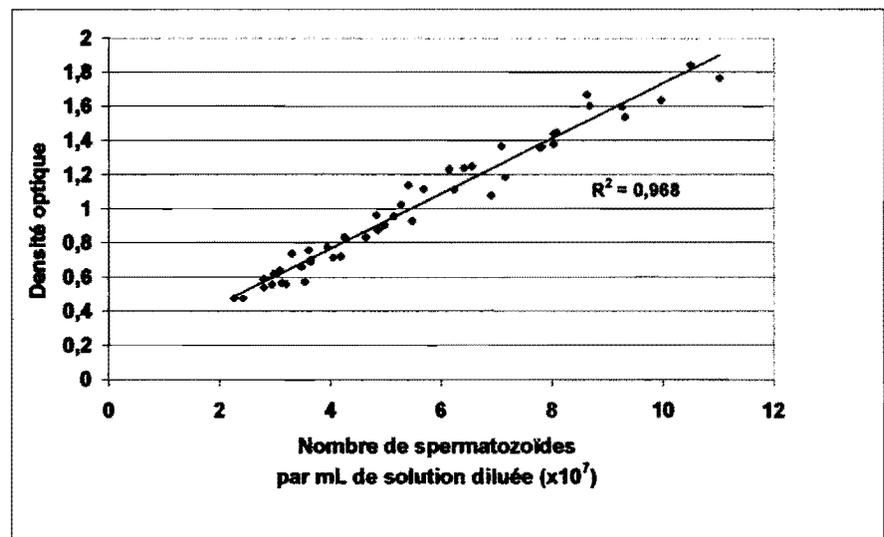


Figure 5 : Relation entre densité optique mesurée à $\lambda=260$ nm et nombre de spermatozoïdes dans 1 mL de solution diluée.

Avec un coefficient de détermination $R^2=0,968$, cette droite pourra être utilisée par la suite pour déterminer de façon précise et rapide la concentration spermatique.



D'après l'équation de cette droite, la concentration spermatique pourra être calculée à l'aide de la formule suivante :

$$x = \frac{y - 0,119 \times 10^{10}}{0,161}$$

y : densité optique

x : concentration spermatique (spz.mL⁻¹)

La mesure de la densité optique sera réalisée à $\lambda = 260\text{nm}$. Le sperme sera dilué au 1/1000.

3.2.3. Motilité du sperme

Les premières observations de la motilité du sperme en fonction du dilueur choisi sont présentées *Figure 6*.

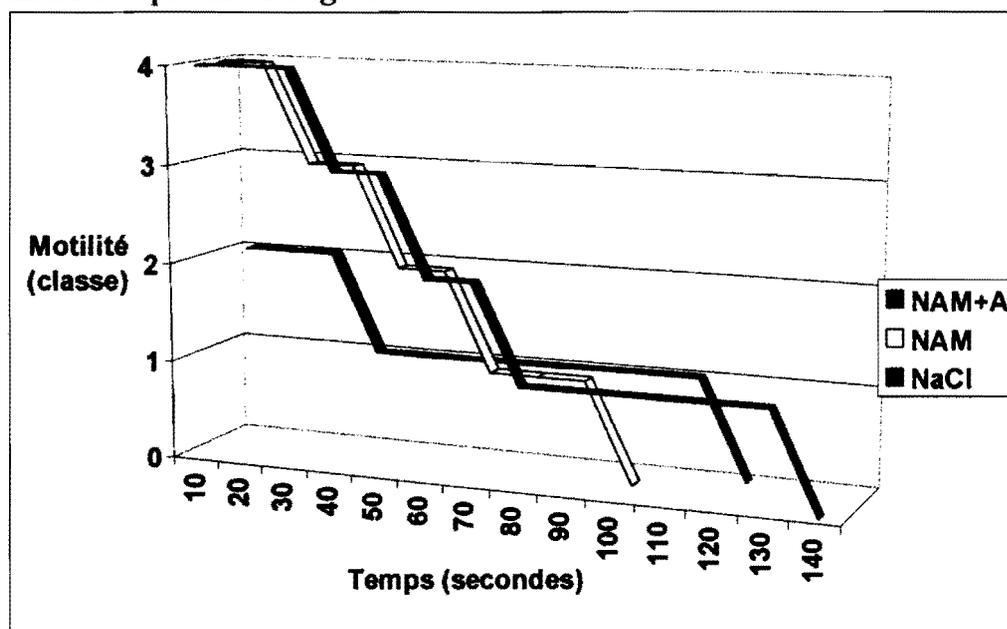


Figure 6 : Evolution de la motilité en fonction du dilueur choisi, (NAM, NAM+Albumine et NaCl).

Le sperme dilué dans le NAM sans albumine ou avec ajout d'albumine (NAM+A) présente une motilité initiale, après activation à l'eau de mer, beaucoup plus importante (classes 4 puis 3) que celui dilué dans le NaCl (classe 2). En revanche, en ce qui concerne la durée de motilité, la plus longue durée a été observée pour la dilution dans le NAM additionné d'albumine (140 sec.), suivie du NaCl (120 sec.) et du NAM seul (100 sec.).

La *Figure 7* présente l'évolution de la motilité des spermatozoïdes activés à l'eau de mer après deux heures de conservation à température ambiante (26 °C). En ce qui concerne le dilueur NAM + albumine, l'évolution de la motilité dans le temps est identique à T0 et T2 et seule la durée de motilité est altérée par le temps de conservation. Sans albumine en revanche, le dilueur NAM présente à la fois une baisse de la motilité initiale (classe 3 au lieu de 4) et de la durée de motilité (80 sec.). Le sperme dilué au NaCl présente quant à lui des caractéristiques de motilité identiques entre les deux observations.

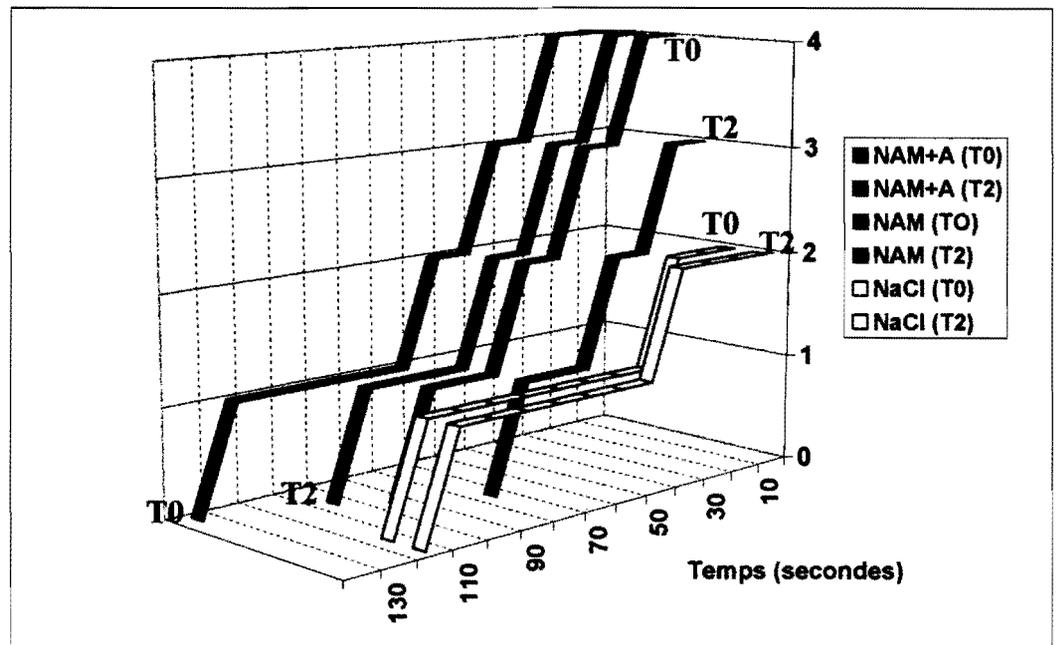


Figure 7 : Evolution de la motilité en fonction du temps et du dilueur. T0 : activation du sperme juste après la dilution ; T2 : activation du sperme deux heures après la dilution.

Ces premières observations mettent en évidence une durée de motilité d'environ deux minutes chez l'ombrine et une évolution variable de cette aptitude en fonction à la fois du temps de conservation et du dilueur de sperme utilisé.

3.3. Technique de fécondation

Les essais de fécondation à sec en petit volume réalisés au cours de ce travail ont permis de mettre en évidence la faisabilité technique de la procédure : des œufs ont pu être fécondés, mais les taux de fécondation ont été très faibles ($25\% \pm 15\%$) ;

On a pu constater que la cinétique, très rapide, des premiers stades du développement embryonnaire rendait difficile les observations. En effet, les premières divisions cellulaires se déroulent très rapidement et on dispose d'un intervalle de 2 heures maximum pour l'observation du taux de fécondation.

4. DISCUSSION ET PROPOSITIONS

Le travail d'étalonnage de la relation concentration spermatique / DO a permis d'observer que le spectre d'absorption du sperme d'ombrine est tout à fait conforme aux spectres observés chez d'autres espèces d'intérêt aquacole (Fauvel, comm. pers.). Cette étude aboutit au choix de la longueur d'onde de 260 nm pour les mesures de DO, longueur d'onde également utilisée chez le bar, *Dicentrarchus labrax* (Fauvel *et al.*, 1999).

La concentration spermatique moyenne observée est de $43,6 \cdot 10^9$ spz.mL⁻¹ ce qui fait du sperme de l'ombrine un sperme très concentré par rapport à une majorité de téléostéens : $0,7-11,0 \cdot 10^9$ spz.mL⁻¹ chez le turbot, $11,9-37,2 \cdot 10^9$ spz.mL⁻¹ chez le flétan atlantique, $10-40 \cdot 10^9$ spz.mL⁻¹ chez le bar, $3,5-17,9 \cdot 10^9$ spz.mL⁻¹ chez le saumon atlantique, $1,9-25 \cdot 10^9$ spz.mL⁻¹ chez la truite arc-en-ciel (Suquet *et al.*, 1994). Il serait intéressant d'utiliser la méthode spectrophotométrique élaborée pour suivre l'évolution de la concentration spermatique au cours de la saison de reproduction, ainsi qu'au fil des saisons.

Les premières observations de la motilité ont permis de mettre en évidence une influence du dilueur sur la mobilité des spermatozoïdes. Cette influence semble d'autant plus décisive que le temps entre la dilution du sperme et son utilisation pour les fécondations à sec est long. Cette caractéristique est d'autant plus importante lorsqu'elle est mise en parallèle avec les problèmes liés à la cinétique de la maturation finale des ovocytes. Il apparaît ainsi important de prolonger ce premier travail par une étude de la composition du liquide séminal afin d'en connaître les caractéristiques biologiques (pression osmotique, pH, protéines totales, Na⁺, K⁺, Cl⁻), comme cela a été fait chez le turbot (Suquet *et al.*, 1993). Des travaux ultérieurs devront être menés qui permettront de proposer différents dilueurs ; Ces travaux consisteront à tester de façon approfondie : l'influence des ions contenus dans le dilueur, l'effet de la dilution, du mode de conservation (sperme dilué initialement ou non, influence de la température de stockage) et du temps de conservation sur la motilité des spermatozoïdes. Enfin, nous avons pu observer que l'apport de protéine (albumine) a un effet sur le niveau de motilité du sperme. Cependant nous n'avons pas observé d'amas de spermatozoïdes, comme cela a été remarqué chez le turbot (Fauvel *et al.*, 1993a), lorsqu'il n'y avait pas d'ajout de protéine. L'étude de la composition du liquide séminal chez l'ombrine sera indispensable pour le choix du dilueur utilisé.

Les suivis de la maturation finale et du phénomène de surmaturation ont permis de mieux évaluer la cinétique de ces processus. Cette étude aboutit à la proposition d'une procédure de suivi des dernières étapes conduisant à l'ovulation par stripping régulier des femelles. Cette procédure, certes lourde

dans sa mise en œuvre, devrait être efficace pour la prédiction du moment de l'ovulation. Elle permet en effet de s'affranchir, en partie, des problèmes de variation individuelle de temps de réponse à la stimulation hormonale.

L'autre problème à résoudre est la libération spontanée des œufs, même en l'absence de stimulus du mâle. Les facteurs environnementaux tels que l'intensité lumineuse dans les bacs d'isolement pourraient éventuellement être en cause, leur influence devra être étudiée. Ces bacs de couleur claire laissent en effet passer la lumière du jour. L'obscurcissement des bacs devrait permettre de vérifier la véracité de cette hypothèse. En revanche, si la rétention des œufs ovulés pouvait être obtenue, un suivi régulier de la maturation finale aurait toujours une grande importance en raison de la très grande rapidité du phénomène de surmaturation.

Des hypothèses de liens entre pH et surmaturation et entre pH et qualité des pontes sont par ailleurs proposées. Chez le turbot (Fauvel *et al.*, 1993b), une évaluation de la surmaturation et de la qualité des gamètes est possible au travers de ce paramètre du liquide ovarien. D'ores et déjà, le présent travail met en évidence que le pH du liquide ovarien de l'ombrine présente une variation (6,0–7,6) différente de celle observée chez le turbot (7,0–8,2). Il semblerait cependant que le phénomène de surmaturation soit accompagné d'une baisse du pH comme chez le turbot : de 8,1 à 7,1 chez le turbot et de 7-7,6 à 6-6,4 chez l'ombrine. Ainsi, l'aspect collant de la ponte de la femelle E (tab. 6) est peut-être à mettre en rapport avec son faible pH puisque le même phénomène a été observé chez les femelles C et D (tab. 4 et 5). Le lien entre pH et qualité de la ponte reste néanmoins à approfondir. Ces observations restent néanmoins à approfondir, ainsi que le lien entre pH et taux de fécondation mis en évidence par ces auteurs.

Enfin, la maîtrise de la fécondation artificielle sera vraisemblablement une question plus longue à résoudre chez l'ombrine que chez les espèces tempérées (Suquet *et al.*, 1995 ; Fauvel *et al.*, 1999) en raison des limites expérimentales mises en évidence. Ce travail passe par l'acquisition progressive d'un ensemble de données biologiques de base. Les premiers éléments en matière de maturation finale et de qualité du sperme sont maintenant disponibles. Ces éléments doivent à présent servir de base à l'obtention de gamètes mâles et femelles de qualité et de réaliser des travaux permettant de répondre à des questions telles que l'influence de la disponibilité en sperme sur le taux de fécondation : étude du nombre optimal de spermatozoïdes par rapport au nombre d'ovules.

Ce travail a surtout permis de mettre en évidence certaines limites dans le contexte tropical martiniquais. Ainsi, le problème lié aux cinétiques de la maturation finale et du processus de surmaturation (cf. 3.1.) qui conduisent à la réalisation de multiples strippings et fécondations sur un intervalle de temps relativement long. Cette caractéristique peut-être gênante si on considère la



conservation du sperme puisque sa motilité semble être affectée assez rapidement après la dilution (cf. 3.2.).

5. CONCLUSION

Ce travail sur la maîtrise de la fécondation artificielle a permis d'acquérir des premiers éléments sur la qualité du sperme de l'ombrine. Il a rendu possible, en outre, l'acquisition des informations indispensables en vue de l'acquisition d'une meilleure connaissance des mécanismes physiologiques de maturation finale et d'ovulation. Ce travail devra être poursuivi ultérieurement.

Enfin, il permet ainsi d'établir les bases des futurs travaux devant progressivement conduire à la maîtrise complète de la procédure de fécondation.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier tout particulièrement Marc Suquet pour son aide lors de l'élaboration des protocoles. Nous remercions également la Région Martinique qui a participé au financement de ce travail dans le cadre du Contrat de Plan Etat Région 1994 - 1998.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Derozier C. 1989. L'anesthésie du poisson au phénoxy-2 éthanol. Thèse de docteur vétérinaire. Nantes : Ecole Nationale Vétérinaire. 100p.

Fauvel C., Omnes M.H., Mugnier C., Normant Y., Dorange G., Suquet M. 1993a. La reproduction du Turbot. Aspects biologiques et gestion des reproducteurs. *Piscic. Fr.* **112**, 23-39.

Fauvel C., Omnes M.H., Suquet M., Normant Y. 1993b. Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement. *Aquaculture.* **117**, 107-113.

Fauvel C., Savoye O., Dreanno C., Cosson J., Suquet M. 1999. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology.* **54**, 356-369.

Gardes L., Villanove P., Buchet V., Fauvel C. 1999. L'induction hormonale de la ponte a l'aide de la LH-RH chez l'ombrine, *Sciaenops ocellatus*. Mise en évidence des conditions optimales pour la production d'œufs et de larves de qualité. IFREMER, DRV/RA/RST/99-11, 41p.

Suquet M., Omnes M.H., Normant Y., Fauvel C. 1992. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture.* **101**, 177-185.

Suquet M., Dorange G., Omnes M.H., Normant Y., Le Roux A., Fauvel C. 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Fish Biology.* **42**, 509-516.

Suquet M., Billard R., Cosson J., Dorange G., Chauvaud L., Mugnier C., Fauvel C. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*) : a comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquatic Living Resources.* **7**, 283-294.

Suquet M., Billard R., Cosson J., Normant Y., Fauvel C. 1995. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*) : determination of optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. *Aquaculture.* **133**, 83-90.

RIDRV2000

N° RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUSION	NB PAGES	TIRAGE
00/01	RH	Port-en-Bessin	E. Foucher, A. Tetard, O. Abellard	Essai d'un chalut sélectif pour la pêche à la crevette grise en estuaire de Seine. Résultats et perspectives.	fév	libre	23	50
00/02	RA	La Tremblade	O. Le Moine, P. Geairon, P. Soletchnik, N. Faury, P. Gouletquer, S. Robert, D. Razet, S. Heurtebise, S. Taillade	Réseau de surveillance de la croissance et de la production de l'huître creuse <i>C. gigas</i> dans le bassin de Marennes Oléron: bilan de 12 années de suivi (1986-98)	mars	libre	57	
00/03	RH	Boulogne-sur-mer	A. Carpentier, F. Coppin	Campagnes expérimentales de chalutage en Manche orientale. Les campagnes CGFS 1997 et 1998.	mars	libre	174	40
00/04	RA	La Tremblade	P. Soletchnik, O. Le Moine, N. Faury, D. Razet, P. Geairon, S. Robert, P. Gouletquer, S. Taillade	Mortalité et croissance de l'huître creuse <i>C. gigas</i> dans le Bassin de Marennes Oléron. Résultats obtenus sur le site atelier de Ronce-Perquis en 1997-1999	mars	libre	83	
00/05	RH	LASAA - Brest	A. Edeyer	Caractérisation du comportement chimique du complexe otolithique en réaction à des perturbations induites.	mars	libre	212	50
00/06	RH	Nantes (MAERHA) Boulogne-sur-mer	V. Trenkel, C. Mellon	Comparaison de deux méthodes conduisant aux structures démographiques en âge des débarquements de merlans (<i>Merlangius merlangus</i>) de Manche Est et du sud de la Mer du Nord	mars	libre		
00/07	RA	Tahiti	G. Le Moullac, L. Chim, P. Lemaire, G. Cuzon, R. Bouveret, P. Le Roux, B. Bertin, O. Parry, D. Saunier, D. Ansquer	Etude de la relation santé-nutrition chez la crevette <i>Penaeus stylirostris</i> . Recherche de l'effet des protéines alimentaires sur les défenses et la résistance à l'infection: aspect quantitatif	avril	libre	50	
00/08	RH	La Rochelle	JP. Leaute	Typologies des flotilles du sud du Golfe de Gascogne en 1986, 1989, 1992 et 1995 de Noirmoutier à Bayonne. Description et évolution des composantes de pêche.				
00/09	RH	Nantes - (ECOHAL)	D. Halgand, G. Arzul, M-L Cochard, E. Erard-Le-Denn, J. Huet, J. Le Claire, F. Quiniou, A. Tétard	Surveillance écologique et halieutique de l'environnement marin du site de la centrale de Perly (Manche est): année 1999	mai	restreinte	139	40
00/10	RA	Port-en-Bessin	M. Ropert, J. Kopp	Etudes des mortalités ostréicoles de l'hiver 1998-1999 en Baie des Veys. Caractérisation et analyse temporelle des dessalures observées sur les parcs conchylicoles de la Baie des Veys depuis 1996.	juin	libre	53	
00/11	RA	Brest	M. Suquet	Le lieu jaune <i>Pollachius pollachius</i> : biologie, pêche, marché et potentiel aquacole.	juin	libre	20	

RIDRV2000

N° RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUSION	NB PAGES	TIRAGE
00/01	RH	Port-en-Bessin	E. Foucher, A. Tetard, O. Abellard	Essai d'un chalut sélectif pour la pêche à la crevette grise en estuaire de Seine. Résultats et perspectives.	fév	libre	23	50
00/02	RA	La Tremblade	O. Le Moine, P. Geairon, P. Soletchnik, N. Faury, P. Gouletquer, S. Robert, D. Razet, S. Heurtebise, S. Tailade	Réseau de surveillance de la croissance et de la production de l'huître creuse <i>C. gigas</i> dans le bassin de Marennes Oléron: bilan de 12 années de suivi (1986-98)	mars	libre	57	
00/03	RH	Boulogne-sur-mer	A. Carpentier, F. Coppin	Campagnes expérimentales de chalutage en Manche orientale. Les campagnes CGFS 1997 et 1998.	mars	libre	174	40
00/04	RA	La Tremblade	P. Soletchnik, O. Le Moine, N. Faury, D. Razet, P. Geairon, S. Robert, P. Gouletquer, S. Tailade	Mortalité et croissance de l'huître creuse <i>C. gigas</i> dans le Bassin de Marennes Oléron. Résultats obtenus sur le site atelier de Ronce-Perquis en 1997-1999	mars	libre	83	
00/05	RH	LASAA - Brest	A. Edeyer	Caractérisation du comportement chimique du complexe otosac-tolithe en réaction à des perturbations induites.	mars	libre	212	50
00/06	RH	Nantes (MAERHA) Boulogne-sur-mer	V. Trenkel, C. Mellon	Comparaison de deux méthodes conduisant aux structures démographiques en âge des débarquements de merlans (<i>Merlangius merlangus</i>) de Manche Est et du sud de la Mer du Nord	mars	libre		
00/07	RA	Tahiti	G. Le Moullac, L. Chim, P. Lemaire, G. Cuzon, R. Bouveret, P. Le Roux, B. Bertin, O. Parry, D. Saulnier, D. Ansquer	Etude de la relation santé-nutrition chez la crevette <i>Penaeus stylirostris</i> . Recherche de l'effet des protéines alimentaires sur les défenses et la résistance à l'infection: aspect quantitatif	avril	libre	50	
00/08	RH	La Rochelle	JP. Leaute	Typologies des flottilles du sud du Golfe de Gascogne en 1986, 1989, 1992 et 1995 de Noirmoutier à Bayonne. Description et évolution des composantes de pêche.				
00/09	RH	Nantes - (ECOHAL)	D. Halgand, G. Arzul, M-L Cochard, E. Erard-Le-Denn, J. Huet, J. Le Claire, F. Quiniou, A. Tétard	Surveillance écologique et halieutique de l'environnement marin du site de la centrale de Penly (Manche est): année 1999	mai	restreinte	139	40
00/10	RA	Port-en-Bessin	M. Ropert, J. Kopp	Etudes des mortalités ostréicoles de l'hiver 1998-1999 en Baie des Veys. Caractérisation et analyse temporelle des dessales observées sur les parcs conchylicoles de la Baie des Veys depuis 1996.	juin	libre	53	
00/11	RA	Brest	M. Suquet	Le lieu jaune <i>Pollachius pollachius</i> : biologie, pêche, marché et potentiel aquacole.	juin	libre	20	

RIDRV2000

N° RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUSION	NB PAGES	TIRAGE
00/12	RA	Brest	M. Suquet, J. Person-Le-Ruyet	Les rougets-barbets: biologie, pêche, marché et potentiel aquacole	juillet	libre	46	
00/13	RA	Port-en-Bessin	M. Ropert, J.L. Blin, F. Cornette, S. Pacary, S. Pien, E. Legagneur, J. Kopp, O. Richard	REMONOR: mise en place et premier bilan du Réseau Mollusques de NORmandie (1998-1999)	septembre	libre	40	
00/14	RA	La Trinité-sur-mer	J. Mazurié, P.G. Fleury, J.F. Bouget, S. Claude, T. Hirata, A. Langlade, A.G. Martin, B. North	Comparaison des performances d'élevage et de la vitalité de naissaim d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> , en 3 sites du Morbihan, de mai 1999 à mars 2000	septembre	libre	48	
00/15	RA	Martinique	L. Gardes, V. Buchet, Ph. Villanova, C. Fauvel	Compte rendu des premières expérimentation de fécondation artificielle chez l'ombrine <i>Sciaenops ocellatus</i> . Etudes préliminaires de la maturation finale des ovocytes et de la qualité du sperme.	octobre	libre	17	