



Rapport technique

L'INSÉMINATION DIFFÉRÉE ET LES DILUEURS POUR SALMONIDÉS

Par
Paul Grondin

Pour le
ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs

Avril 2016

*Forêts, Faune
et Parcs*

Québec 

Référence à citer

GRONDIN, Paul (2016). *L'insémination différée et les dilueurs pour salmonidés*, Québec, Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Direction générale de l'expertise sur la faune et ses habitats, Direction de la faune aquatique, 26 p. [Rapport technique].

© Gouvernement du Québec 2016
Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs
Dépôt légal – Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2016
ISBN (version imprimée) 978-2-550-75347-6
ISBN (PDF) 978-2-550-75348-3

Avant-propos

Le présent document vise à fournir l'information requise pour l'insémination différée et les différents dilueurs utilisés lors de la reproduction artificielle des salmonidés indigènes. Bien qu'il s'applique à tous les salmonidés, il concerne principalement le touladi (*Salvelinus namaycush*) et s'adresse plus particulièrement aux employés du ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP). Ses objectifs sont les suivants :

- décrire des méthodes pour prélever la laitance, la conserver et la transporter lorsqu'elle est utilisée lors d'une insémination différée sur le terrain ou à la station piscicole;
- présenter différents dilueurs utilisés pour optimiser la conservation de la laitance réfrigérée, pour en prolonger la viabilité, pour récupérer la laitance d'un prélèvement contaminé ou encore pour favoriser la hausse du taux de fécondation;
- montrer que les différents dilueurs pourraient avoir une place prédominante dans l'atteinte des objectifs de conservation du patrimoine génétique à l'intérieur du plan de reproduction de certaines lignées de salmonidés en péril.

La consultation de l'ouvrage Grondin (2016) est conseillée pour approfondir certains aspects de la reproduction artificielle des salmonidés indigènes.

Table des matières

1.	L'insémination différée	11
1.1.	Des précautions supplémentaires à adopter.....	11
2.	Les dilueurs pour salmonidés.....	15
2.1.	La fabrication et l'utilisation des dilueurs.....	16
2.1.1.	Le dilueur de conservation.....	18
2.1.2.	Le dilueur d'immobilisation.....	21
2.1.3.	Le dilueur d'insémination.....	23
	Références citées.....	25

Liste des tableaux

Tableau 1.	Les paramètres et les ingrédients de quatre dilueurs selon les résultats qui ont été obtenus en laboratoire en 2013 et en 2014 pour des titrages et des analyses du pH et de l'osmolalité.....	17
------------	--	----

Liste des figures

- Figure 1. Un débitmètre en plastique et un manomètre pour l'oxygène sont munis de connecteurs rapides qui facilitent le montage des sections de tuyau de nylon de ¼ po. L'extrémité de ce tuyau s'adapte facilement à tous les types de contenants 12
- Figure 2. Un prélèvement de laitance de touladi effectué directement dans un bécher de 250 ml. Le bécher est ensuite inséré dans un sac de plastique et l'air est remplacé par de l'oxygène. Le prélèvement de la laitance peut également s'effectuer à l'aide d'un sac de plastique du type WhirlPak®. Cette méthode est simple et elle facilite le gonflage à l'oxygène. Le fond plat du sac accroît la superficie de distribution de la laitance et assure le maintien à la verticale des sacs dans le contenant isotherme de transport. De nombreux opposants y voient par contre des risques élevés de contamination par l'eau et de fuites de l'oxygène. 12
- Figure 3. Cette glacière a été modifiée pour recevoir les béchers de laitance. Un radeau y maintient 15 béchers de 250 ml qui flottent dans un mélange composé en parts égales de glace et d'eau. Ce radeau est fabriqué de mousse de styrène de 4 à 5 cm d'épaisseur. Une plaque d'acrylique le recouvre et le solidifie..... 13
- Figure 4. Un flacon de culture Nunc®, modèle 136196, de 25 cm² est utilisé pour conserver la laitance diluée. Pour une hauteur maximale de 5 mm de la solution et un rapport de 1 : 2, le flacon peut contenir 4 ml de laitance et 8 ml de dilueur. Un contenant à fond plat en polyéthylène alimentaire, du type utilisé pour un sandwich, contiendrait quant à lui 8 ml de laitance et 16 ml de dilueur de laitance..... 19
- Figure 5. Un bac muni d'un support blanc assure le maintien des goulots des flacons hors de l'eau lors de la réfrigération de la laitance..... 20
- Figure 6. Ce support métallique contient huit tubes gradués de 50 ml pour centrifugeuse. Les tubes sont utilisés pour prélever et conserver la laitance à court terme..... 22

Figure 7.	Le support est immergé dans une petite glacière isotherme qui contient un mélange composé en parts égales de glace et d'eau glacée.....	22
Figure 8.	Appareils et matériel utilisés pour la conception et la fabrication des dilueurs. À gauche, une balance analytique et les différents produits chimiques qui composent un dilueur. Au centre, un agitateur magnétique, un cylindre gradué de 1 000 ml ainsi qu'un pH-mètre. À droite, un osmomètre Wescor® 5520 et son matériel consacré aux analyses de la pression osmotique.....	24
Figure 9.	On utilise un titrage pour obtenir l'unité de pH souhaitée. L'électrode du pH-mètre et sa sonde de température sont à l'arrière-plan du compte-gouttes qui verse la solution de NaOH 0,5 N. On ajuste l'osmolalité de la solution à une valeur précise directement dans le cylindre gradué de 1 000 ml, en agitant légèrement et en ajoutant du NaCl ou de l'eau désionisée.....	24

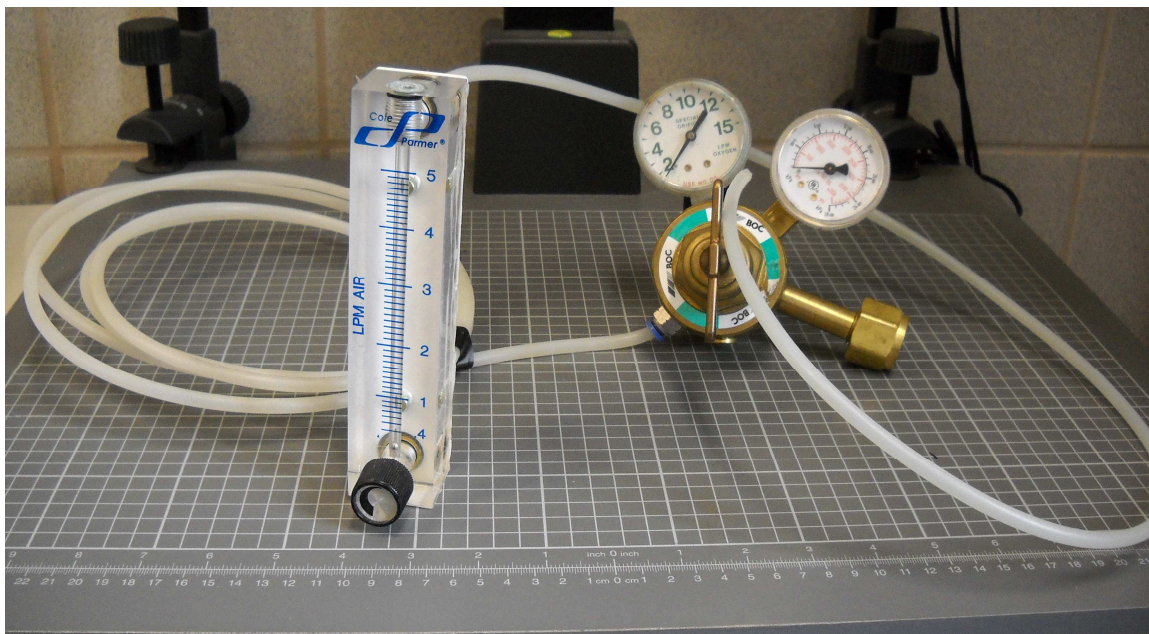
1. L'insémination différée

Le transport de la laitance des salmonidés indigènes vers une station piscicole gouvernementale est nécessaire pour la production de certaines lignées par insémination différée. À titre d'exemple, on ajoute de la laitance de touladi indigène à des ovules d'omble de fontaine domestiqué de la station piscicole pour produire l'omble moulac, un hybride interspécifique, alors qu'on insémine parfois les ovules d'omble de fontaine domestiqué avec de la laitance d'omble de fontaine indigène pour produire des œufs d'omble de fontaine croisé, une lignée d'hybride intraspécifique.

1.1. Des précautions supplémentaires à adopter

En sus des précautions habituelles à adopter lors d'une reproduction artificielle de salmonidés indigènes (voir Grondin, 2016), des précautions supplémentaires s'ajoutent lors des prélèvements qui visent l'insémination différée. Ces précautions assurent la survie, la viabilité et la conservation d'un prélèvement jusqu'à la fécondation différée. La contamination et le bris de la chaîne de froid sont les deux maillons faibles de la conservation et de la viabilité des spermatozoïdes.

- À partir de l'extraction, la laitance doit être maintenue à une température autour de 1 °C dans un bain d'eau et de glace. Cela implique de refroidir le contenant avant d'effectuer un prélèvement de laitance et d'éviter de le réchauffer inutilement avec les mains lors des manipulations. Des précautions supplémentaires permettent d'éviter qu'un contenant de laitance ne vienne à congeler au contact direct de la glace durant sa conservation. Par exemple, les contenants ne devraient jamais être déposés directement sur de la glace qui paraît sèche, car celle-ci serait excessivement froide. La glace doit plutôt être immergée dans de l'eau glacée composée en parts égales de glace et d'eau. De plus, deux fois par jour, une portion de l'eau de fonte doit être remplacée par de la glace.
- Il faut à tout prix éviter l'anoxie des spermatozoïdes. L'air à l'intérieur des contenants de laitance doit être remplacé par de l'oxygène (figure 1). De plus, la laitance ne doit pas excéder une hauteur de 4 à 5 mm depuis le fond du contenant. Par exemple, un bécher de 250 ml peut recevoir 12 ml de laitance (figures 2 et 3).



Paul Grondin

Figure 1. Un débitmètre en plastique et un manomètre pour l'oxygène sont munis de connecteurs rapides qui facilitent le montage des sections de tuyau de nylon de ¼ po. L'extrémité de ce tuyau s'adapte facilement à tous les types de contenants.



Paul Grondin

Figure 2. Un prélèvement de laitance de touladi effectué directement dans un bécher de 250 ml. Le bécher est ensuite inséré dans un sac de plastique et l'air est remplacé par de l'oxygène. Le prélèvement de la laitance peut également s'effectuer à l'aide d'un sac de plastique du type WhirlPak®. Cette méthode est simple et elle facilite le gonflage à l'oxygène. Le fond plat du sac accroît la superficie de distribution de la laitance et assure le maintien à la verticale des sacs dans le contenant isotherme de transport. De nombreux opposants y voient par contre des risques élevés de contamination par l'eau et de fuites de l'oxygène.



Figure 3. Cette glacière a été modifiée pour recevoir les béchers de laitance. Un radeau y maintient 15 béchers de 250 ml qui flottent dans un mélange composé en parts égales de glace et d'eau. Ce radeau est fabriqué de mousse de styrène de 4 à 5 cm d'épaisseur. Une plaque d'acrylique le recouvre et le solidifie.

Paul Grondin

- Il est important de favoriser la conservation de la laitance de qualité. Cette laitance est abondante, bien liquéfiée et d'un blanc opaque. Au contraire, la laitance de qualité inférieure sera moins abondante, moins liquéfiée, parfois plus claire et translucide. La laitance qui possède une teinte jaunâtre ou beige, avec des amas, est de mauvaise qualité et sa viabilité doit être évaluée. La laitance de fin de saison ou qui provient de spécimens ayant subi une longue rétention pourrait également avoir cette apparence.

Il est préférable de vérifier l'absence de motilité de chacun des prélèvements, puisque la laitance n'est pas utilisée immédiatement. Cette vérification valide l'innocuité des techniques de prélèvement utilisées. La détermination du taux et de la durée de la motilité permet quant à elle d'évaluer la qualité de chacun des prélèvements (pour la méthodologie, voir Grondin, 2016).

- Il faut à tout prix éviter de contaminer le sperme avec de l'urine, de l'eau, du mucus ou des fèces. Un instrument, telle une cuillère à thé, est prévu pour le retrait des amas. Une contamination peut déclencher l'activation des spermatozoïdes; dans ce cas, la présence de motilité ou d'une très légère vibration des spermatozoïdes sera visible au microscope. Au bout du compte, la longévité du prélèvement contaminé peut être réduite ou sa viabilité anéantie. Il est indispensable d'éponger les reproducteurs avant et pendant le prélèvement à l'aide de feuilles d'essuie-tout blanc. La laitance est stockée directement dans un contenant neuf et stérile. L'utilisation de contenants usagés n'est pas recommandée en raison des risques de contamination du prélèvement de laitance. Il est également important de ne pas conserver le premier

jet de laitance qui semble plus clair, puisque de l'urine y est mélangée. Avant d'extraire la laitance, on effectue donc de légères pressions du pouce et de l'index à proximité de l'orifice urogénital pour soutirer une portion de l'urine sans trop extraire de laitance de qualité. De plus, il faut éviter l'immersion du goulot et l'infiltration d'eau par l'ouverture des contenants. Il faut donc réduire le suintement sur les parois du contenant lors de la conservation et éponger l'eau avant toute ouverture de celui-ci. On doit également porter attention au surplus de condensation à l'intérieur du contenant, c'est-à-dire à la formation de fines gouttelettes qui glissent sur les parois et pourraient entraîner l'activation des spermatozoïdes par contact.

Même lorsque toutes les précautions sont prises pour tenter de limiter la contamination par l'urine, il est démontré que la collecte de sperme par pression abdominale entraîne ce type de contamination (Maisse et coll., 1998) et que l'urine dissoute abaisse la pression osmotique et le pH de la laitance (Nynca et coll., 2012), alors qu'il est primordial de maintenir ces paramètres physicochimiques pour assurer la viabilité de la laitance en vue de la fécondation différée.

2. Les dilueurs pour salmonidés

Depuis plusieurs années, le Ministère met au point, adapte et utilise différents types de dilueurs pour la reproduction artificielle. Ces dilueurs ont été utilisés avec succès pour la conservation de la laitance réfrigérée et la cryoconservation de la laitance du chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*). Les dilueurs optimisent les résultats des inséminations différées et l'utilisation d'un prélèvement tout en facilitant l'exécution des nombreux croisements.

Cette approche est intéressante pour la reproduction artificielle du touladi. Le touladi captif produit parfois un faible volume de laitance. Se débarrasser du premier jet de laitance, qui peut contenir de l'urine, représente donc un certain non-sens lorsque la laitance semble de bonne qualité. Ce problème est résolu par l'ajout d'un dilueur à la laitance immédiatement après le prélèvement. Lors de la conservation, ce dilueur réduit les effets néfastes de l'urine, qui entraîne une diminution du pH, de l'osmolalité et de la concentration des différents minéraux du liquide séminal. Par exemple, chez la truite arc-en-ciel, il a été démontré que la viabilité d'une laitance contaminée par l'urine peut être maintenue à l'aide d'un dilueur au pH tamponné (Nynca et coll., 2012). Une laitance ayant été conservée en pH tamponné élevé aura un fort taux de motilité dans l'eau désionisée, contrairement à celle qui a été gardée à un pH faible (Woolsey et coll., 2006). Le saumon atlantique, la truite brune et l'omble de fontaine supportent d'ailleurs une gamme de pH plus large lors de la motilité (Ciereszko et coll., 2010).

Dans le testicule, les spermatozoïdes de truites arc-en-ciel en maturation sont exposés à un pH inférieur à 7,5. Cette valeur de pH inhibe la motilité de la laitance testiculaire en maturation. Puis, les spermatozoïdes matures s'accumulent dans les spermiductes avant d'être expulsés lors de la fraie. À l'intérieur des spermiductes, un pH de 8,0 ou plus ainsi qu'une concentration plus élevée des bicarbonates assurent le développement des mécanismes de la motilité des spermatozoïdes (Morisawa et Morisawa, 1988). D'ailleurs, le bicarbonate de sodium entre dans la composition de plusieurs des dilueurs utilisés pour les salmonidés. Un dilueur qui vise à hausser le taux d'insémination des salmonidés offre un milieu composé uniquement de bicarbonate de sodium et un pH semblable à celui qui se trouve dans les spermiductes (pH > 8).

Il existe trois types de dilueurs : (1) le dilueur de conservation permettant de maintenir la qualité d'un prélèvement de laitance, de prolonger sa durée de conservation et de récupérer un prélèvement contaminé par l'urine ou l'eau, (2) le dilueur d'immobilisation utilisé pour la conservation à très court terme de la laitance lors de la fécondation différée sur le terrain et (3) le dilueur d'insémination, versé directement sur les ovules en même temps que la laitance fraîche, permettant de prolonger la durée de la motilité des spermatozoïdes lors de la fécondation.

Lors de la fabrication d'un dilueur, des analyses permettent d'ajuster le pH et l'osmolalité à l'aide des ingrédients. Le pH et la pression osmotique du dilueur sont habituellement ajustés à une valeur légèrement supérieure à celle du plasma sanguin ou du liquide séminal de l'espèce visée. Le liquide séminal des salmonidés possède une pression osmotique qui varie habituellement entre 295 et 335 mOsmol/kg, mais étonnamment leurs spermatozoïdes sont mobiles dans un dilueur qui possède une osmolalité de 450 mOsmol/kg (basé sur un soluté de chlorure de sodium). La pression osmotique n'est effectivement pas le facteur déterminant qui inhibe la motilité des spermatozoïdes matures des salmonidés; le facteur déterminant est plutôt lié à une hausse du potassium dans le conduit spermatique. Par exemple, l'ajout de 0,5 g/l de chlorure de potassium (KCl) permet d'arrêter tout mouvement des spermatozoïdes (Morisawa, Suzuki et Morisawa, 1983). Ce paramètre est important lors de la fabrication d'un dilueur pour la laitance de salmonidés.

L'insémination artificielle de 10 000 ovules de salmonidés, soit environ un litre, a lieu en présence de 2 ml de laitance fraîchement extraite, ce qui représente 6 ml de laitance nouvellement diluée dans un rapport de 1 : 2. Pour une utilisation à plus long terme, la quantité requise de laitance diluée est réajustée selon le taux de motilité observé à ce moment. Une durée prolongée de réfrigération, la détérioration plus rapide d'un prélèvement contaminé et la mauvaise qualité d'un prélèvement sont les facteurs qui contribuent à diminuer le taux de motilité.

Il faut toujours effectuer des tests biologiques pour démontrer l'innocuité du dilueur, des techniques et du matériel sur le maintien de la viabilité de la laitance, pour confirmer l'aptitude de la laitance de la population visée à être diluée et pour connaître la durée anticipée de réfrigération des prélèvements. Des résultats négatifs demandent certaines modifications aux paramètres du dilueur ou un changement de dilueur pour la lignée visée.

2.1. La fabrication et l'utilisation des dilueurs

En 2013 et en 2014, des analyses et des ajustements du pH et de la pression osmotique (osmolalité) ont été effectués en laboratoire sur certains dilueurs utilisés pour les salmonidés. Une sélection de quatre solutions a été reproduite en laboratoire. Le tableau 1 indique leur composition et fournit les résultats obtenus après des analyses et des ajustements aux ingrédients pour obtenir le pH et l'osmolalité visés.

Tableau 1. Les paramètres et les ingrédients de quatre dilueurs selon les résultats qui ont été obtenus en laboratoire en 2013 et en 2014 pour des titrages et des analyses du pH et de l'osmolalité

	Dilueur de conservation		Dilueur d'immobilisation	Dilueur d'insémination
Type de dilueur	Cortland		Potassium	Bicarbonate de sodium
Référence	Baynes (1999) (lab. 2014)	Johnson et coll. (2013) (lab. 2014)	Baynes (1999) (lab. 2013)	Baynes (1999) (lab. 2013)
Rapport laitance : dilueur	1 : 2		1 : 2	2 ovules : 1
H ₂ O, désionisé ¹ , ml	1 250	1 000	s. o.	s. o.
H ₂ O, plan d'eau ² , ml	s. o.	s. o.	1 000	1 000
Osmolalité, mOsmol/kg	271	276	237	204
pH initial solution (19 °C)	6,97	6,96	7,51 ²	7,51 ²
Gouttes de NaOH 0,5 N (2 g/100 ml)	150	100	0	0
pH final solution (19 °C)	8,22	8,26	7,98	8,24
Solution A, 1 000 ml		s. o.	s. o.	s. o.
KCl g/l	9,00	0,38	10,00	
NaCl g/l	2,35	7,25		
CaCl ₂ .2H ₂ O g/l	0,29			
MgSO ₄ .7H ₂ O g/l	0,29	0,47		
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O g/l	0,51	0,40		
MgCl ₂ g/l		0,22		
Solution B, 250 ml		s. o.	s. o.	s. o.
NaHCO ₃ g/l	1,25	1,00		10,00
Glucose g/l	1,25	1,00		

¹ Eau désionisée 33-34 mOsmol/kg.² Eau de l'aqueduc (provenant du lac Saint-Charles), pH de 7,51 et 33 mOsmol/kg.

2.1.1. Le dilueur de conservation

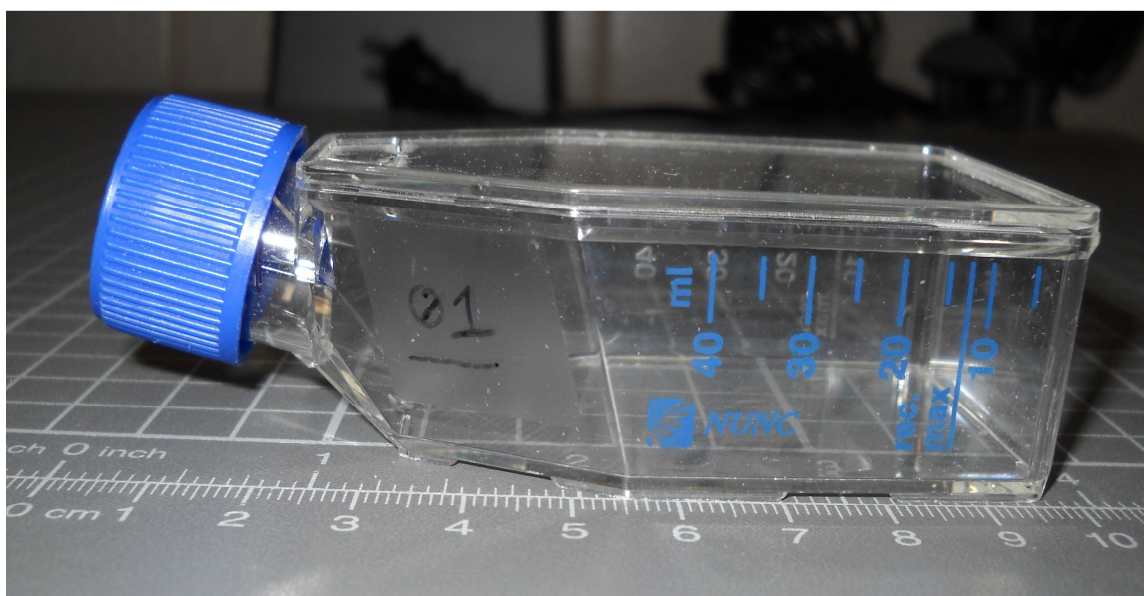
Le dilueur de conservation est également nommé dilueur de laitance (Billard et Jalabert, 1974). C'est une solution qui tente de simuler la composition minérale du liquide séminal d'une espèce, et un milieu qui procure un niveau acceptable de conservation d'une laitance réfrigérée ou transportée en vue de la fécondation différée. Ce dilueur liquéfie la laitance, optimise l'utilisation des prélèvements et facilite les manipulations lors des inséminations. De plus, un prélèvement contaminé et rapidement dilué conserve sa viabilité pour la fécondation différée. Sans cette dilution, il risque fort d'être à motilité restreinte ou non viable lors de l'insémination différée. Un dilueur de conservation est composé d'eau désionisée, de sels minéraux, d'un tampon et parfois de glucose. Lors de l'insémination, les ingrédients qui composent le dilueur permettent de prolonger considérablement la durée durant laquelle les spermatozoïdes sont motiles, ce qui favorise une hausse du taux de fécondation. Deux dilueurs de conservation, dit du type Cortland, sont présentés au tableau 1.

La première solution reproduite en laboratoire, qui inclut les modifications effectuées par Baynes (1999), est caractérisée par une importante quantité de potassium. On est alors en droit de redouter que la concentration résiduelle de potassium après la dilution avec l'eau interfère avec le niveau de motilité des spermatozoïdes lors de l'insémination. Ce dilueur dit de Baynes est formé de deux solutions qui doivent être congelées séparément. Cela évite une précipitation du calcium lors de la décongélation. La première solution (A) peut être réfrigérée pour une certaine période. Par contre, comme la seconde (B) contient du glucose, on doit la congeler immédiatement pour en assurer la qualité et pour prévenir la croissance d'organismes indésirables. On prépare le dilueur en mélangeant quatre parties de la solution A à une partie de la solution B. Ce mélange devrait avoir une pression osmotique autour de 270 mOsmol/kg⁻¹. Un pH-mètre a indiqué que l'ajout d'environ 150 gouttes d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,5 N (2 g de NaOH par 100 ml) aux 1 250 ml des deux solutions de Baynes permet d'obtenir un pH de 8,20. La pression osmotique de la solution originale du dilueur de Cortland (Phillips et coll., 1957; Wolf, 1963) provient principalement de la présence de NaCl et non du chlorure de potassium utilisé par Baynes (1999).

La seconde solution reproduite en laboratoire est semblable au dilueur de Cortland original. Elle a été utilisée pour diluer et immobiliser les spermatozoïdes de touladi avant le comptage sur un hématimètre (Johnson et coll., 2013). Les résultats des analyses en laboratoire de ce dilueur, en 2014, sont inscrits au tableau 1. On peut penser que lors de l'insémination, ce dilueur de laitance peut fournir un niveau de motilité globalement supérieur à celui offert par le dilueur de Baynes (1999), et qu'il permet une meilleure viabilité à moyen terme des spermatozoïdes réfrigérés comparativement à ceux conservés dans un dilueur d'immobilisation. Sans en mentionner la raison, Johnson et coll. (2013) ont retiré le chlorure de calcium du dilueur. Toutefois, depuis 2006, cette pratique est devenue courante en ce qui concerne les nombreux dilueurs fabriqués pour la reproduction artificielle du chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*). Le retrait du chlorure de calcium, combiné aux ajustements du pH et de l'osmolalité des dilueurs pour le chevalier cuivré, a permis de résoudre un syndrome de forte agglutination très hâtive de

la laitance, diluée ou non. C'est le point culminant qui a permis d'atteindre les objectifs du plan de reproduction de cette espèce. La réduction du nombre de prélèvements de laitance qui en découle assure un meilleur maintien de l'état de santé des mâles, lors de leur remise à l'eau.

Un dilueur de conservation est conservé et utilisé à une température de 1 °C, dans un bain composé en parts égales de glace et d'eau. L'utilisation de flacons de culture est recommandée. Dans un rapport de dilution de 1 : 2, on peut ajouter 4 ml de sperme et 8 ml de dilueur de laitance dans un flacon de 25 cm² (figure 4). Il a été démontré que cette technique préserve la qualité de la laitance des dorés jaunes durant plusieurs jours à 1 °C (Moore, 1997). Lors de tous les travaux du Ministère cités dans ce document, les flacons de culture de 25 cm² étaient munis d'un goulot avec filtre à membrane hydrophobe. De plus, lors des manipulations, l'utilisation des flacons est simplifiée si le diamètre intérieur du goulot permet d'insérer des seringues de 3 ou de 10 ml.



Paul Grondin

Figure 4. Un flacon de culture Nunc®, modèle 136196, de 25 cm² est utilisé pour conserver la laitance diluée. Pour une hauteur maximale de 5 mm de la solution et un rapport de 1 : 2, le flacon peut contenir 4 ml de laitance et 8 ml de dilueur. Un contenant à fond plat en polyéthylène alimentaire, du type utilisé pour un sandwich, contiendrait quant à lui 8 ml de laitance et 16 ml de dilueur de laitance.

Lors de l'ouverture d'un contenant de laitance diluée, on doit éponger le goulot à l'aide d'essuie-tout. Omettre de le faire est l'erreur à ne pas commettre lors des manipulations. Le dilueur est préférablement mesuré et distribué à l'aide d'une seringue de 10 ml ou plus. La seringue possède un embout à verrouillage du type Luer-Lok, muni d'un porte-filtre de 0,22 µm. Ce filtre permet de retirer les particules et les organismes indésirables présents dans un dilueur qui a été fabriqué. La filtration représente par ailleurs une solution de

rechange à l'utilisation d'antibiotiques dissous dans le dilueur. Une pipette automatisée avec embout jetable ou une seringue jetable de 3 ml avec embout lisse sont suggérées pour la mesure de la laitance avant l'insémination.

L'entretien des contenants de laitance diluée est effectué deux fois par jour. Le surplus d'eau de fonte est versé, puis de la glace est ajoutée aux plats. La présence d'une quantité résiduelle de glace avant le début de l'entretien est presque obligatoire. Ces résidus de glace confirment que le mélange glacé, les manipulations et la température du réfrigérateur sont conformes au maintien de la viabilité de la laitance. La quantité de glace et d'eau est alors réajustée pour former un mélange en parts égales qui permet au goulot de reposer sur le support et au flacon d'être presque à l'horizontale, ce qui optimise l'oxygénation des cellules (figure 5). L'air est également remplacé par de l'oxygène deux fois par jour. On remue délicatement le flacon pour en aérer le contenu et dissoudre toute adhésion ou gélatinisation qui pourrait s'y être formée avant de le remettre dans le bac de réfrigération.



Paul Grondin

Figure 5. Un bac muni d'un support blanc assure le maintien des goulots des flacons hors de l'eau lors de la réfrigération de la laitance.

2.1.2. Le dilueur d'immobilisation

Le dilueur d'immobilisation des spermatozoïdes est un autre type de solution utilisé sur le terrain pour conserver à très court terme de la laitance, contaminée ou non. Il est composé uniquement de chlorure de potassium dissous qui inhibe la motilité des spermatozoïdes des salmonidés. Le dilueur d'immobilisation est relativement simple à fabriquer sur place, ce qui assure la fraîcheur de la solution. Il est fabriqué sur le terrain avec un litre d'eau traitée du plan d'eau et 10 g prépesés de chlorure de potassium.

Le dilueur d'immobilisation du tableau 1 a été produit en 2013 avec l'eau d'un lac de pH de 7,5, ce qui a donné une solution d'un pH final de 8,0 et d'une pression osmotique de 237 mOsmol/kg. La même mise en garde que pour le dilueur de Baynes s'applique au dilueur d'immobilisation quant à d'éventuelles interactions liées à la concentration résiduelle de potassium lors du processus d'insémination. Ce dilueur d'immobilisation ne contient que du chlorure de potassium. Par conséquent, lors de l'insémination et en fonction des dilutions effectuées lors de celle-ci, on peut suspecter une interférence entre la concentration résiduelle de potassium et la motilité. En cas de doute, il est plus prudent d'opter pour un dilueur de conservation ainsi que pour des contenants qui permettent d'éviter l'anoxie et de conserver la laitance plus que quelques heures. Un autre type de dilueur d'immobilisation, celui-ci fabriqué en laboratoire, est composé de NaCl, de KCl et de tris (Cosson et coll., 1995; Woolsey et coll., 2006). Ce dilueur tamponné avec le tris est titré à un pH de 8,5 avec de l'acide chlorhydrique (HCl) de 1 mole par litre. Un dilueur qui contient un tampon prolonge la viabilité d'un prélèvement, même si celui-ci est contaminé par l'urine. Peu importe la solution choisie, le dilueur d'immobilisation doit être refroidi à près de 1 °C dans un bain composé en parts égales de glace et d'eau avant d'être utilisé. La laitance des mâles est prélevée avant qu'on procède à l'extraction des ovules, et elle sera accessible en tout temps. On conserve les prélèvements dans une glacière à proximité pour faciliter la production des nombreux croisements.

La laitance est prélevée directement dans le tube de 50 ml pour centrifugeuse. Il est préférable d'opter pour des tubes qui possèdent une graduation noire qui contraste mieux avec l'opacité de la laitance. Deux parts de dilueur sont immédiatement ajoutées au prélèvement de laitance, mais sans excéder un volume total de 25 ml pour une courte période de conservation. Pour une plus longue période, ne pas excéder de 10 à 20 ml, et remplacer l'oxygène deux fois par jour. Le fait de conserver un espace permet d'aérer la laitance lors des manipulations en renversant les tubes à plusieurs reprises. La substitution de l'air par de l'oxygène est suggérée pour assurer la viabilité des cellules. Les tubes sont insérés dans un support métallique qui baigne dans une glacière isotherme. Un mélange composé en parts égales de glace et d'eau est maintenu dans la glacière. Lors des croisements, la laitance diluée est mesurée à l'aide d'une seringue de 3 ml à embout lisse et versée directement sur les ovules.



Paul Grondin

Figure 6. Ce support métallique contient huit tubes gradués de 50 ml pour centrifugeuse. Les tubes sont utilisés pour prélever et conserver la laitance à court terme.



Paul Grondin

Figure 7. Le support est immergé dans une petite glacière isotherme qui contient un mélange composé en parts égales de glace et d'eau glacée.

2.1.3. Le dilueur d'insémination

L'utilisation du dilueur d'insémination permet de réduire la rapidité de la désorganisation du flagelle et l'éclatement de la membrane plasmique des spermatozoïdes qui survient après l'activation de la laitance fraîche avec de l'eau. Ce dilueur prolonge ainsi la période de motilité des spermatozoïdes des salmonidés lors des inséminations avec de la laitance fraîche. La réaction corticale des ovules est également ralentie par ce dilueur. Cela signifie que la période de fécondité des ovules se trouve prolongée. Le dilueur d'insémination permet aussi d'optimiser la distribution d'un volume réduit de laitance avant que la fécondation soit déclenchée. Pour plusieurs auteurs, dont Wipf, Barnes et Durben (2011), l'effet positif de la présence de liquide ovarien (cœlomique) est plutôt imprévisible. Il semble donc préférable d'en soutirer tout surplus avant l'insémination. L'abondance de liquide ovarien augmente les probabilités que la présence de substances et de débris d'ovules rompus abaisse le pH lors de l'insémination ou empêche l'insémination d'une portion des ovules en bloquant leur micropyle (Billard, 1992; Dietrich et coll., 2007). Le dilueur d'insémination permet d'effectuer un rinçage rapide des ovules contaminés. La quantité résiduelle de dilueur autour des ovules ne peut que favoriser leur insémination.

Tout comme celui d'immobilisation, le dilueur d'insémination est fabriqué facilement sur le terrain par l'ajout de 10 g prépesés de bicarbonate de sodium à un litre d'eau traitée. Toutefois, il est maintenu à la température du plan d'eau (des gonades). La solution remplace l'eau normalement utilisée à l'étape de la fécondation artificielle (51^e étape sur les 69 de la reproduction artificielle – voir Grondin, 2016). Le dilueur d'insémination est ajouté selon un rapport d'un volume de dilueur pour deux volumes d'ovules. Ce rapport convient également à d'autres espèces, dont la carpe (Saad et Billard, 1987). En fait, cette quantité de solution permet à peine de recouvrir les ovules; si l'on en met trop, on risque d'obtenir l'effet inverse. On ajoute la laitance au plat d'ovules et de dilueur, puis on fait pivoter le contenant afin de mélanger les gamètes. Le dilueur permet de distribuer les spermatozoïdes autour des ovules à une pression osmotique de 250 à 300 mOsmol/kg. La pression osmotique chute autour de 125 à 150 mOsmol/kg après l'ajout d'un volume d'eau supplémentaire qui déclenche une pleine motilité prolongée par les bicarbonates et un pH plus élevé.

Le dilueur d'insémination présenté au tableau 1 a été fabriqué avec de l'eau d'aqueduc de 7,5 unités de pH provenant du lac Saint-Charles. Il a permis de fabriquer une solution en laboratoire d'un pH final de 8,25 unités et d'une pression osmotique de 204 mOsmol/kg.



Paul Grondin

Figure 8. Appareils et matériel utilisés pour la conception et la fabrication des dilueurs. À gauche, une balance analytique et les différents produits chimiques qui composent un dilueur. Au centre, un agitateur magnétique, un cylindre gradué de 1 000 ml ainsi qu'un pH-mètre. À droite, un osmomètre Wescor® 5520 et son matériel consacré aux analyses de la pression osmotique.



Nathalie Vachon

Figure 9. On utilise un titrage pour obtenir l'unité de pH souhaitée. L'électrode du pH-mètre et sa sonde de température sont à l'arrière-plan du compte-gouttes qui verse la solution de NaOH 0,5 N. On ajuste l'osmolalité de la solution à une valeur précise directement dans le cylindre gradué de 1 000 ml, en agitant légèrement et en ajoutant du NaCl ou de l'eau désionisée.

Références citées

- BAYNES, S. (1999). "Fertilisation Procedures for Use in All-Female Brood Production", *Trout News*, n° 28, p. 23-25.
- BILLARD, R. (1992). "Reproduction in Rainbow Trout: Sex Differentiation, Dynamics of Gametogenesis, Biology and Preservation of Gametes", *Aquaculture*, vol. 100, n°s 1-3, p. 263-298.
- BILLARD, R., et B. JALABERT (1974). « Insémination artificielle de la truite (*Salmo gairdneri* Richardson) », *Annales de biologie animale biochimie biophysique*, vol. 14, n° 4A, p. 601-610.
- CIERESZKO, A., et coll. (2010). "Effects of pH on Sperm Motility in Several Salmoniformes Species: *Onchorhynchus mykiss*, *Salvelinus fontinalis*, *Salmo trutta* and *Thymallus thymallus*", *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 26, n° 5, p. 665-667.
- COSSON, M.-P., et coll. (1995). "cAPMP/ATP Relationship in the Activation of Trout Sperm Motility: Their Interaction in Membrane-Derived Models and in Live Spermatozoa", *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol. 31, n° 2, p. 159-176.
- DIETRICH, G. J., et coll. (2007). "Broken Eggs Decrease pH of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Ovarian Fluid", *Aquaculture*, vol. 273, n° 4, p. 248-251.
- GRONDIN, P. (2016). « La reproduction artificielle des salmonidés indigènes », Québec, Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Direction générale de l'expertise sur la faune et ses habitats, Direction de la faune aquatique, 56 p. [Rapport technique].
- JOHNSON, K., et coll. (2013). "Sperm Quality of Hatchery-Reared Lake Trout Throughout the Spawning Season", *North American Journal of Aquaculture*, vol. 75, n° 1, p. 102-108.
- MAISSE, G., et coll. (1998). « Influence du maintien en mer des mâles de saumon atlantique (*Salmo salar*), pendant la période de reproduction, sur la qualité du sperme », *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture*, vol. 350-351, p. 349-357.
- MOORE, A. A. (1997). Manipulation of Hatchery Spawning Procedures to Improve Walleye Egg Fertility and Survival, Iowa Department of Natural Resources, Technical Bulletin 6 Des Moines.

- MORISAWA, M., K. SUZUKI et S. MORISAWA (1983). "Effects of Potassium and Osmolality on Spermatozoan Motility of Salmonids Fishes", *Journal of Experimental Biology*, vol. 107, p. 105-113.
- MORISAWA, S., et M. MORISAWA (1988). "Induction of Potential for Sperm Motility by Bicarbonate and pH in Rainbow Trout and Chum Salmon", *Journal of Experimental Biology*, vol. 136, p. 13-22.
- NYNCA, J., et coll. (2012). "Motility Activation of Rainbow Trout Spermatozoa at pH 6.5 is Directly Related to Contamination of Milt with Urine", *Aquaculture*, vol. 330-333, p. 185-188.
- PHILLIPS, A. M. Jr., et coll. (1957). *The Nutrition of Trout: Cortland Hatchery Report n° 25 for the year 1956*, New York, New York Conservation Department, 61 p. [Fishery Research Bulletin 20].
- SAAD, A., et R. BILLARD (1987). « Composition et emploi d'un dilueur d'insémination chez la carpe (*Cyprinus carpio*) », *Aquaculture*, vol. 66, n^{os} 3-4, p. 329-345.
- WIPF, M., M. E. BARNES et D. J. DURBEN (2011). "An Evaluation of Two Egg Collection and Two Fertilization Techniques During Landlocked Fall Chinook Salmon Spawning", *North American Journal of Aquaculture*, vol. 73, n° 3, p. 339-342.
- WITHLER, R. E., et T. D. BEACHMAN (1994). "Genetic Consequence of the Simultaneous or Sequential Addition of Semen from Multiple Males During Hatchery Spawning of Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)", *Aquaculture*, vol. 126, n^{os} 1-2, p. 11-23.
- WOLF, K. (1963). "Physiological Salines for Fresh-Water Teleosts", *The Progressive Fish-Culturist*, vol. 25, n° 3, p. 135-140.
- WOOLSEY, J., et coll. (2006). "Sperm Motility in the Steelhead *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): Influence of the Composition of the Incubation and Activation Media", *Aquaculture Research*, vol. 37, n° 3, p. 21.