

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الجيلالي بونعامة لخميس مليانة
Université Djellali Bounaama de Khemis Miliana
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre
Département des Sciences Biologiques



Mémoire de fin d'études
Pour l'obtention du diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Hydrobiologie marine et continentale
Spécialité : Hydrobiologie Appliquée

Amélioration de la conservation du sperme chez les cyprinidés (*Cyprinus carpio*)

Préparé par :

- * Kaddouri Soraya
- * Karahaçane Khaoula

Soutenu le 14/07/2019, devant le jury :

Président : Mr. Djeddar Miliani

MCB (UDB Khemis Miliana)

Promoteur : Mr. Rouabah Abd el-Kader

MCB (UDB Khemis Miliana)

Examineur : Mr. Saifi Mounir

MAA (UDB Khemis Miliana)

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre cher docteur et encadrant Monsieur ROUABAH Abdel Kader pour le temps qu'il a consacré, les précieuses informations, son suivi et pour son énorme soutien, qu'il n'a cessé de nous prodiguer tout au long de la période du projet.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements aux membres des jurés pour avoir bien voulu examiner et juger ce travail :

Nous remercions Monsieur DJEZZAR Miliani pour nous avoir honorées de sa présence d'avoir accepté de présider notre travail.

Nous remercions également Monsieur Saifi Mounir d'avoir accepté d'évaluer notre travail.

Nous adressons toute notre gratitude à toutes les personnes qui nous ont aidés à la réalisation de ce travail et à la finalisation.

Nous pensons plus particulièrement à l'équipe de recherche de pépinière GARDEN et à sa tête Monsieur Bouali Boualem ainsi que son directeur Monsieur Kacher Yacine.

Nous remercions grandement l'ensemble du personnel du laboratoire de biologie EL RAZI (Miliana) dirigé par le docteur NAIT TAHAR.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre I : Revue bibliographique

I. Caractéristiques de la famille	3
I.1. Systématique	3
I.2. Rôle de la GnRH et de l'hypophyse dans la reproduction des poissons	3
I.2.1. GnRH	3
I.2.2. Hypophyse	4
I.3. Reproduction chez les cyprinidés	4
II. Spermés des poissons d'eau douce	4
II.1. Généralités	4
II.2. Spermatogenèse	5
II.3. Structure du spermatozoïde	5
II.4. Evaluation de la mobilité spermatique	5
II.4.1. Mécanismes de la mobilité spermatique	6
II.4.2. Durée de la mobilité	6
II.5. Facteurs de dégradation de la qualité du sperme	6
II.5.1. Contamination urinaire de la laitance	6
II.5.2. Nutrition	6
II.5.3. Effet du pH	7

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. Présentation du site de travail	8
I.1. Matériel	9
I.1.1. Matériel biologique	9
I.2. Méthodes utilisées	10
I.2.1. Mesure des paramètres physico- chimiques de l'eau	10
I.2.2. Sélection et sexage	11
I.2.3. Anesthésie, mensuration et marquage.....	12
I.2.4. Traitement hormonal	12

I.2.4.1. Détermination du dosage	12
I.2.4.2. Doses des hormones à injecté	13
I.2.4.3. Préparation des injections	13
I.2.4.4. Lieux d'injection	14
I.2.4.5. Suture des femelles	15
I.2.5. Fécondation artificielle	15
I.2.5.1. Stripping	15
I.2.5.2. Mélange des gamètes	16
I.2.5.3. Agglutination	17
I.2.6. Incubation des œufs	17
II. Évaluation de sperme	18
II.1. Spermogramme	18
II.2. Collecte de la laitance	18
II.3. Conservation à court terme (Réfrigération)	19
II.4.1. Examen macroscopique	19
II.4.1.1. Aspect.....	19
II.4.1.2. pH.....	20
II.4.1.3. Volume.....	20
II.4.2. Examen microscopique	20
II.4.2.1. Mobilité.....	20
II.4.2.2. Concentration des spermatozoïdes.....	21
II.4.2.3. Test éosine-négrosine (coloration).....	23
II.4.2.3.1. Morphologie.....	23
II.4.2.3.2. Vitalité.....	24

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Résultats et discussion.....	25
I.1. Paramètres de l'eau	25
I.2. Développement embryonnaire	25
I.3. Eclosion.....	26
II. Spermogramme	27
II.1. Mobilité	27
II.2. Concentration	28
II.3. Morphologie.....	30

Conclusion.....	31
Référence bibliographique	31

Liste des abréviations

°d : Degré Allemand

ATP : Adénosine triphosphat

FSH : Follicule Stimulating Hormone

G : Grossissement

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

GtH : Gonadotropine Hormone

HPa : Hectopascal

LH : Luteinizing Hormone

pH : potentiel hydrogène

Spz : Spermatozoïde

Liste des figures

Figure 01 : Spermatozoïde des cyprinidés h : tête, f : flagelle, mi : pièce intermédiaire, m: Mitochondrie, cc : canal cytoplasmique (Sonja et <i>al.</i> , 2009)	5
Figure 02 : Salle d'incubation	8
Figure 03 : Laboratoire	8
Figure 04 : Bassin en terre pour le grossissement	8
Figure 05 : Balance électronique	10
Figure 06 : Bandelettes de test	10
Figure 07 : Test de Nitrate NO ₃	11
Figure 08 : Test d'ammoniaque NH ₃	11
Figure 09 : pH mètre	11
Figure 10 : Multi paramètre	11
Figure 11 : <i>Eugenia caryophyllata</i>	12
Figure 12 : Géniteurs dans le récipient d'anesthésie	12
Figure 13 : Préparation de l'injection	13
Figure 14 : Lieu d'injection	15
Figure 15 : Suture de la femelle.....	15
Figure 16 : Récolte des œufs.....	16
Figure 17 : Récolte de la laitance.....	16
Figure 18 : Mélange des gamètes	16
Figure 19 : Agglutination des œufs par le lait entier	17
Figure 20 : Incubation des œufs	18
Figure 21 : Incubateurs en béton	18
Figure 22 : Collecte de la laitance.....	19
Figure 23 : Mesure de pH de laitance	20
Figure 24 : Spermatozoïdes de l'échantillon (01) (G10x100)	21
Figure 25 : Spermatozoïdes de l'échantillon (02) (G10x100)	21
Figure 26 : Dilution du sperme.....	22

Figure 27 : Solution physiologique	22
Figure 28 : Comptage de spermatozoïdes.....	23
Figure 29 : Spermatozoïdes sur la cellule de malassez. (G10x100)	23
Figure 30 : Coloration des spermatozoïdes de l'échantillon (01) (G10x100).....	24
Figure 31 : Coloration des spermatozoïdes de l'échantillon (02) (G10x100).....	24
Figure 32 : La phase de gonflement de l'œuf (G 10 x 40)	26
Figure 33 : Développement de l'embryon (G 10 x 40)	26
Figure 34 : Larve de la carpe koi (G 10 x 40)	26
Figure 35 : Courbe de l'évaluation de la mobilité du sperme pour les 02 échantillons de la carpe koi en fonction du temps (jours).....	28
Figure 36: Histogramme de variation de la concentration spermatique (milliard/ml) en fonction des 02 échantillons de la laitance de la carpe koi.	29
Figure 37 : Histogramme de variation de la concentration spermatique totale (milliard/ml) par apport au volume (ml) en fonction des 02 échantillons de la laitance de la carpe koi.	29
Figure 38 : Morphologie du spermatozoïde de la carpe koi (G 10 X 100)	30

Liste des tableaux

Tableau 01 : Mensuration des géniteurs et température du milieu d'élevage.....	09
Tableau 02 : Doses de l'hypophyse injectées aux géniteurs.....	14
Tableau 03 : Dose de GnRH injectée à la femelle.	14
Tableau 04 : Prélèvement des échantillons de laitance.....	19
Tableau 05 : Organisation structural fine et dimensions de spermatozoïdes de la carpe koi (Sonja et <i>al.</i> , 2009).	23
Tableau 06 : Paramètres de l'eau.....	25

Résumé

Ce travail a été réalisé sur la reproduction artificielle de *Cyprinus carpio* d'eau douce (carpe koi) par une induction hormonale d'hypophyse chez les mâles et femelles dont l'objectif principal est d'évaluer et d'améliorer les techniques de conservation de la qualité du sperme de la carpe koi, et une conservation maximale à une température de réfrigération 4 °C, qui permet de prolonger la conservation du sperme avec une bonne mobilité et motilité pendant 2 jours, de même elle facilite le stockage du sperme à court terme.

Nous avons montré que la concentration spermatique de la carpe koi est de 4 à 30 x 10⁹ spermatozoïdes par millilitre, et qu'il n'y a pas une relation entre le volume de la laitance et leur concentration et que le volume peut influencer négativement sur la concentration spermatique.

Mot clés : carpe koi, reproduction, hypophyse, GnRH, sperme, conservation.

Abstract

This work was performed on the artificial reproduction of the freshwater *Cyprinus carpio* (koi carp) by a hormonal induction of pituitary gland in males and females whose main objective is to evaluate and to improve sperm quality conservation techniques for koi carp, and maximum preservation at 4 °C refrigeration temperature, which prolongs sperm preservation with good mobility and motility for 2 days, as well as it facilitates the storage of semen in the short term.

We have shown that the sperm concentration of koi carp is 4 to 30 x 10⁹ spermatozoa per milliliter, and that there is no relationship between the volume of the milt and their concentration and that the volume may negatively affect the spermatoc concentration.

Key words : koi carp, reproduction, pituitary gland, GnRH, sperm, conservation.

ملخص

تم تنفيذ هذا العمل على التكاثر الصناعي لسماك المياه العذبة *Cyprinus carpi* (سمك الشبوط) عن طريق تحريض هرموني للغدة النخامية عند الذكور والإناث هدفها الرئيسي هو تقييم وتحسين تقنيات الحفاظ على جودة الحيوانات المنوية لسماك الشبوط ، والحفاظ على أقصى درجة حرارة عند 4 درجة حرارة التبريد ، مما يطيل الحفاظ على الحيوانات المنوية مع سهولة الحركة والتنقل لمدة يومين ، وكذلك أنه يسهل تخزين السائل المنوي على المدى القصير.

لقد أظهرنا أن تركيز الحيوانات المنوية لسماك الشبوط هو من 4 إلى 30×10^9 نطفة في كل مليلتر ، وأنه لا توجد علاقة بين حجم السائل المنوي وتركيزه وأن الحجم قد يؤثر سلباً تركيز الحيوانات المنوية.

الكلمات المفتاحية : التكاثر ، الغدة النخامية ، النطاف ، الحفظ , GnRH , سمك الشبوط.

Introduction

Les cyprinidés constituent l'une des familles les plus importantes et les plus connues parmi les cypriniformes, leur répartition géographique est vaste. Beaucoup de cyprinidés tolèrent une large gamme de température, à l'état adulte une espèce comme la carpe supporte des températures allant de 1 à 35 °C. Ils supportent aussi de fortes et rapides fluctuations thermiques. Beaucoup d'espèces de cyprinidés tolèrent très bien les fortes oscillations des teneurs en oxygène dissous. Elles peuvent survivre en condition de sursaturation ou en quasi-anoxie (**Billard, 1995**).

La culture des espèces nécessite un effort scientifique et technologique intense. L'un des stades les plus sensibles du cycle de vie du poisson est la période de reproduction, qui pour de nombreuses espèces est soumise à plusieurs contraintes ce qui exige la maîtrise de la reproduction. L'optimisation des performances de reproduction des géniteurs d'élevage est essentielle pour obtenir des alevins de haute qualité, ce qui permet de produire des poissons de haute qualité (**Diogo, 2010**).

L'utilisation des gamètes de haute qualité issus de géniteurs de poissons captifs revêt une grande importance pour assurer la production de produits de valeur pour l'aquaculture (**Kjorsvik et al., 1990**). Dans les écloséries, la laitance est souvent insuffisante en quantité et en qualité et ne permet pas toujours une fécondation réussie dans les procédures d'insémination artificielle couramment utilisé pour les espèces d'aquaculture (**Rurangwa et al., 2004**).

L'utilisation de spermatozoïdes de haute qualité est impérative pour l'aquaculture afin de garantir une progéniture de bonne qualité (**Kjorsvik et al., 1990 et Cabrita et al., 2008**) ont décrit les exigences en matière de qualité élevée des spermatozoïdes comme étant la capacité des spermatozoïdes à atteindre l'œuf et la capacité de traverser les enveloppes d'œufs ou d'entrer à travers le micropyle.

L'analyse fréquente du sperme du stock de reproducteurs mâles permet d'identifier les mâles présentant de meilleurs caractères de reproduction, ce qui combiné à une analyse génétique permet de sélectionner de bons reproducteurs. En outre, elle facilite la conservation du sperme grâce à un stockage à court ou à long terme, améliorant la gestion du sperme dans les fermes aquatiques (**Diogo, 2010**).

Le but de ce travail expérimental est d'évaluer la qualité du sperme de la carpe koi en utilisant l'induction hormonale par l'hypophyse et une conservation maximale à une tempéra-

ture de réfrigération 4 °C permettant d'évaluer l'activité spermatique à savoir la mobilité, la pression osmotique et la consistance qui sont tributaires de plusieurs facteurs. Ce travail de recherche va nous permettre de prolonger la durée de vie des spermatozoïdes et d'accentuer la fécondation des œufs in vitro.

Chapitre I

Revue bibliographique

I. Caractéristiques de la famille

Les cyprinidés forment la plus grande famille de poissons d'eau douce avec 2450 espèces réparties dans environ 318 genres. Les poissons de cette famille sont distribués à travers l'Afrique, l'Asie, l'Europe et l'Amérique du Nord et vivent presque exclusivement en eau douce. Cette famille est caractérisée par une tête forte, une bouche peu fendue, un corps écailleux, la nageoire dorsale précédée d'un rayon osseux, et la nageoire anale armée d'un fort aiguillon (**Tao et al., 2013**).

I.1. Systématique

Cette systématique représente l'espèce *Cyprinus carpio* : (**Corolla et al., 2019**)

- Embranchement : Chordata.
- Sous-embranchement : Vertebrata.
- Classe : Actinoptérygii.
- Sous-classe : Neopterygii.
- Infra-classe : Téléostéen.
- Super-ordre : Ostariophysi.
- Ordre : Cypriniformes.
- Super-famille : Cyprinoidea.
- Famille : Cyprinidae.
- Genre : *Cyprinus*
- Espèce : *carpio* (**Linnaeus, 1758**).

I.2. Rôle de la GnRH et de l'hypophyse dans la reproduction des poissons

I.2.1. GnRH

La substance libérée par les cellules neurosécrétrices qui a une action stimulante sur la sécrétion des gonadotrophines s'appelle hormone libérant ou GnRH (gonadotropin releasing hormone). Ce facteur hypothalamique a d'abord été mis en évidence et partiellement caractérisé chez la carpe koi ; *Cyprinus carpio* (**Linnaeus, 1758**), la présence du GnRH ne se limiterait pas seulement à l'hypothalamus, mais intéresserait aussi d'autres régions du cerveau peut-être elles-mêmes impliquées dans le contrôle de la fonction gonadotrope (**Legendre et Jala-bert, 1988**). La GnRH va agir sur les récepteurs de la GnRH des cellules gonadotropes de

l'adéno-hypophyse, ces cellules vont produire des hormones gonadotropes (GTH) (**Schlumberger, 2002**). La LH et la FSH régulent des processus différents. La LH stimule la production des stéroïdes sexuels, alors que la FSH stimule chez la femelle la croissance du follicule ovarien et l'activité aromatasase (enzyme catalysant la conversion de la testostérone en œstradiol) et chez le mâle la spermatogenèse (**Fontaine, 2014**).

I.2.2. Hypophyse

L'hypophyse agit sur les gonades en sécrétant dans la circulation générale des hormones gonadotropes (GTH). Les cellules cibles gonadiques possèdent sur leur surface membranaire des molécules réceptrices auxquelles l'hormone gonadotrope se lie spécifiquement. C'est cette liaison qui déclenche une réaction en chaîne dans la cellule cible, induisant les effets stimulants finaux (**Dufour et al, 1983**). Les hormones gonadotropes stimulent les deux fonctions des gonades : la production des gamètes (ovocytes et spermatozoïdes) et la production des hormones stéroïdes sexuelles. A leur tour, les stéroïdes stimulent un grand nombre de tissus cibles tels que les organes sexuels, le foie pour la production de vitellogénine chez la femelle (**Burzawa et al., 1994**).

Enfin, les stéroïdes gonadiques agissent en retour sur l'activité de l'axe cerveau-hypophyse par des actions inhibitrices ou stimulatrices selon l'étape du cycle reproducteur (rétrocontrôles négatif ou positif) (**Dufour, 1994**).

I.3. Reproduction chez les cyprinidés

Les processus de maturation et de ponte sont soumis à l'influence des facteurs environnementaux qui peuvent accélérer, déclencher et retarder l'ensemble des phénomènes liés à la reproduction. Les deux principaux facteurs qui régulent la reproduction en particulier la maturité sexuelle et la ponte, sont la température qui joue un rôle très important sur la maturation ovocytaire et l'ovulation, un nombre de degré jour de température est indispensable chez cette famille pour déclencher la reproduction. Chez les cyprinidés elle s'active au printemps, en général lorsque la température de l'eau est de 18 à 20 °C, les femelles pondent de 80000 à 120000 œufs par kg de poids, le diamètre de l'œuf gonflé est de 1,5 mm. La ponte est tributaire de la photopériode dont la diminution de l'intensité lumineuse provoque la diminution de la fréquence du frai (**Billard, 1979 ; Poncin, 1994 ; Olivier et Patrick, 2013 ; Hajlaoui et al., 2016**).

II. Spermatozoïdes des poissons d'eau douce

II.1. Généralités

Les cyprinidés, sont des ovipares, leur fécondation se produit dans l'eau douce. L'activité spermatique dépend de plusieurs facteurs externes, pour les cyprinidés c'est la pression osmotique qui reste le facteur le plus important (**Hamamah et Gatti, 1998**). La mobilité spermatique est inhibée par une pression osmotique élevée chez les cyprinidés (**Billard et Marcel, 1986**).

II.2. Spermatogenèse

La spermatogenèse est la succession cellulaire et des transformations, au sein des testicules, d'une cellule germinale peu différenciée (la spermatogonie) en une cellule fonctionnelle (spermatozoïde). Les cellules germinales n'évoluent pas seules, elles sont toujours en contact avec des cellules somatiques de soutien appelées cellules de Sertoli (**Billard, 1979**).

II.3. Structure du spermatozoïde

Selon **Billard (1995)**, le spermatozoïde des cyprinidés est caractérisé par :

- La tête qui est sans acrosome et sphérique.
- Le flagelle est de (40-50 μm).
- La pièce intermédiaire est réduite à quelques mitochondries.

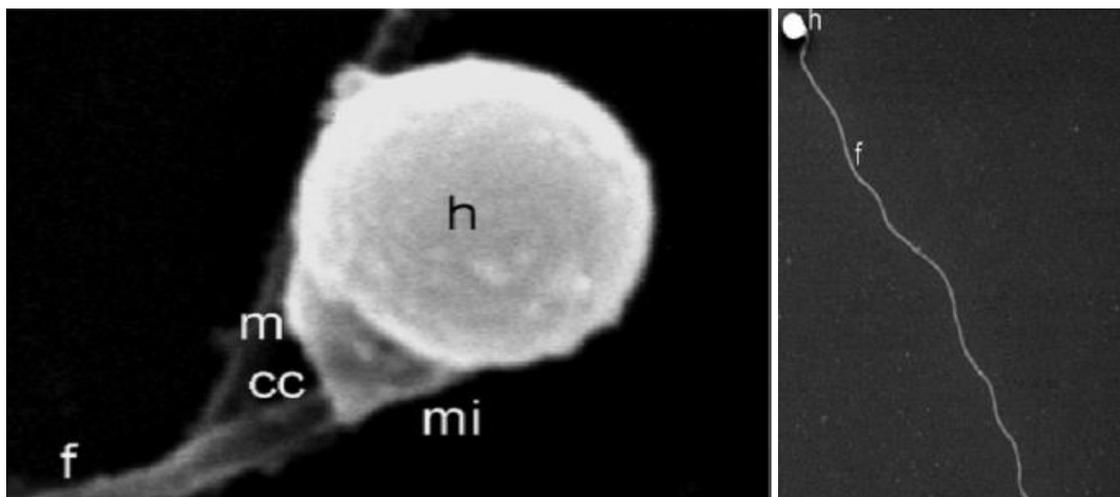


Figure 01 : Spermatozoïde des cyprinidés h : tête, f : flagelle, mi : pièce intermédiaire, m: Mitochondrie, cc : canal cytoplasmique (**Sonja et al., 2009**)

II.4. Évaluation de la mobilité spermatique

L'évaluation de la mobilité est indispensable pour se prononcer sur la qualité du sperme, la semence est de bonne qualité quand le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est supérieur à 90 % (**Perchec *et al.*, 1995**)

II.4.1. Mécanismes de la mobilité spermatique

Les spermatozoïdes des téléostéens d'eau douce sont au repos à l'osmolarité du plasma séminal, appelés conditions isotoniques (environ 300 mosmol kg⁻¹). Ils commencent à bouger lorsqu'ils sont suspendus dans l'eau hypotonique (< 300 mosmol kg⁻¹) et montrent une grande mobilité (en % de spermatozoïdes mobiles) en eau douce. En revanche, les spermatozoïdes des téléostéens marins commencent à se déplacer lorsqu'ils sont libérés dans une eau hypertonique (> 300 mosmol kg⁻¹) et montrent la plus grande mobilité avec environ 1000 (mosmol kg⁻¹), ce qui est presque équivalent à la mer (**Morita *et al.*, 2003**).

II.4.2. Durée de la mobilité

La durée de mobilité est brève, elle diminue régulièrement entre le moment de l'activation et l'arrêt du déplacement qui intervient entre 60-80 s après dilution dans une solution physiologique, et entre 40-60 s dilution dans l'eau douce (**Billard, 1995**).

II.5. Facteurs de dégradation de la qualité du sperme

La qualité du sperme peut être affectée par les conditions environnementales dans lesquelles les mâles sont exposés.

II.5.1. Contamination de la laitance par les urines

Chez les poissons d'eau douce la contamination du sperme par l'urine se déroule pendant le stripping, l'urine initie le mouvement spontané du sperme (**Rurangwa, 2004**).

II.5.2. Nutrition

L'amélioration de la nutrition et de l'alimentation des géniteurs améliore considérablement la qualité des gamètes et production de semences (**Izquierdo *et al.*, 2001**).

L'importance de l'acide ascorbique alimentaire (vitamine C) sur la fertilité des poissons mâles, la fonction anti-oxydante de la vitamine C protège les spermatozoïdes en réduisant le

risque de peroxydation lipidique et la carence en acide ascorbique réduit la concentration de sperme et la mobilité et par conséquent la fertilité (**Canyurt *et al.*, 2008**).

II.5.3. Effet du pH

Le pH est l'un des principaux facteurs de réactivation des spermatozoïdes chez les espèces de poisson, il affecte également la capacité de fertilisation du sperme. La mobilité optimale des spermatozoïdes a été signalée à pH 7,0 et 8,0 chez *Cyprinus carpio*.

Il a été rapporté qu'une modification de la valeur du pH externe induit une modification du pH interne (**Alavi, 2004**).

Chapitre II

Matériels et méthodes

I. Présentation du site de travail

Notre stage s'est effectué au sein de la pépinière Garden durant la période du 31 Mars au 10 Avril pour la reproduction des géniteurs.

L'évaluation du sperme c'est faite au laboratoire de biologie EL RAZI du docteur NAIT TAHAR à Miliana de la période du 11/04 au 16/04 ainsi qu'au laboratoire de recherche de l'université de Khemis-Miliana du 17/04 au 20/04.

GARDEN est une pépinière située dans la commune de Cheraga, Wilaya d'Alger, créé en 2004, elle s'étend sur plus de 38 Hectares. Elle comporte :

Une salle d'incubation avec 10 bassins circulaires d'une capacité de 1000 L, une salle de grossissement, salle d'élevage larvaire et 42 aquariums utilisés pour le pré grossissement et un laboratoire de contrôle (Induction hormonale, contrôle de l'embryogenèse et traitements prophylactiques) (**figure 02, 03 et 04**).



Figure 02 : Salle d'incubation (Originale)



Figure 03 : Laboratoire (Originale)



Figure 04 : Bassin en terre pour le grossissement (Originale)

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel biologique

Nous avons utilisé 7 géniteurs femelles et 7 géniteurs mâles de carpe koï. Des pesées ont été faites à l'aide d'une balance électronique (**figure 05**), et les mesures de température à l'aide d'un thermomètre digital, et la taille par un mètre ruban (**tableau 01**).

Tableau 01 : Mensuration des géniteurs et la température des milieux d'élevage

Sexe	Géniteurs	Poids (g)	Taille totale (cm)	T (°C)
Mâles	Rouge, noire+blanc	420	22	21
	Blanc tache noire	330	20,5	
	Blanc taches noires sur le dorsale	330	21	
	Blanc	206	18,5	
	Blanc	167	17	
	Blanc taches rouge sur le dorsale	250	18	
	Blanc taches rouges a la tête	270	18,5	
Femelles	Noire, tache orange	730	29	22,2
	Blanche, orange+noire	750	30,5	
	Blanche	350	20	
	Jaune écaillée noire	420	21	
	Jaune orange	330	19,5	
	Grise argentée	317	18,5	
	Orange jaune	245	16	



Figure 05 : Balance électronique.

I.2. Méthodes utilisées

I.2.1. Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau

Nous avons utilisé pour la mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau des : Bandelettes permettant une lecture aisée. La lecture des résultats se fait par comparaison d'un nuancier, ce test nous permet de mesurer le nitrate NO_3 , nitrite NO_2 , dureté totale GH, dureté carbonatée KH, pH, et le chlore Cl_2 (figure 06).



Figure 06 : Bandelettes de test

Pour la mesure d'ammoniaque et nitrate on a utilisé deux tests :

- Pour le test de nitrate NO_3 :

On commence par le rinçage de la fiole 3 fois, ensuite remplir la fiole par l'eau de bassin d'élevage jusqu'au trait signalé sur la fiole, après rajouter une cuillère de réactif dans le tube, secouer et attendre 10 minute pour la lecture des résultats (figure07).

- Pour le test de l'ammoniaque NH_3 :

On commence par le rinçage de la fiole 3 fois, ensuite remplir la fiole par l'eau de bassin d'élevage jusqu'au trait mentionné sur la fiole, après prendre le réactif numéro I et mettre 2 gouttes, ensuite rajouter 5 gouttes de réactif numéro II, secouer et attendre 10 minute pour la lecture des résultats (**figure 08**).



Figure 07 : Test de Nitrate NO_3 (Originale).



Figure 08 : Test d'ammoniaque NH_3 (Originale).

- Un pH mètre : pour la mesure du pH du milieu d'élevage (**figure 09**).

- Un multi paramètres : Pour la mesure de la température, O_2 dissous, saturation en O_2 , pression, et la salinité (**figure 10**).



Figure 09 : pH mètre (Originale).



Figure 10 : Multi paramètres (Originale).

I.2.2. Sélection et sexage

Les mâles et les femelles ont été sélectionnés sur la base des critères suivants :

- Appréciation d'un état de santé satisfaisant avec absence de lésions externes.
- Présence de dimorphisme sexuel.

- Papille génitale saillante chez la femelle de couleur rouge ou rose.
- Protubérances prononcées chez les mâles au niveau de la tête.
- Émission de laitance après pression abdominale.

I.2.3. Anesthésie, mensuration et marquage

L'huile essentielle de clou de girofle (*Eugenia caryophyllata* à 90 %) est un anesthésique naturel. De nombreuses écloseries et établissements de recherche emploient de nos jours l'huile essentielle de clou de girofle en baignation pour immobiliser les poissons afin de les manipuler, les trier, les marquer, faire des reproductions artificielles sans pour autant les stresser (Javahery et Nekoubin, 2013).

La longueur totale des géniteurs est évaluée à l'aide d'un mètre ruban et leurs poids avec une balance électronique (poids maximal 7000 g ; précision 0,1 g).

On a utilisé une goutte par litre d'eau ou 0,5 ml par 10 l d'eau (Horvath *et al.*, 2002). L'immobilisation totale du poisson a nécessité environ 3 minutes. Une fois les géniteurs endormis, ils sont enveloppés dans une serpillière mouillée en prenant soins de recouvrir les yeux afin de diminuer le stress et les risques de blessures (figure 11), puis on a introduit les géniteurs dans ce récipient pendant 1 min (figure 12).



Figure 11 : *Eugenia caryophyllata* (Originale).



Figure 12 : Géniteurs dans le récipient d'anesthésie (Originale).

I.2.4. Traitement hormonal

I.2.4.1. Détermination du dosage

L'ovulation est généralement provoquée par application de l'extrait hypophysaire (FSH-LH) ou de la gonadotrophine en deux doses (GnRH).

I.2.4.2. Doses d'hormones à injecté

Première dose : chez les femelles, la première injection présente 1/10 du volume total à injecter dite stimulante, elle active la migration de la vésicule germinative.

Deuxième dose : la seconde injection appelée décisive ou de résolution (9/10 du volume total) est pratiqué 12 à 14 heures après l'injection stimulante, elle permet la rupture de la vésicule germinative, l'ovulation et la ponte.

Les mâles ne subissent qu'une seule injection hormonale dont le rôle est d'augmenter le volume de laitance (**Meddour *et al.*, 2005**).

I.2.4.3. Préparation des injections

Les doses de l'hypophyse et la GnRH sont déterminées en fonction du poids de chaque géniteurs (**figure 13**) ; elles sont de 3 mg/kg du poids vif de géniteurs (**tableau 02**). Une seule femelle est injectée par une seule dose de GnRH (**tableau 03**).



Figure 13 : Préparation de l'injection (Originale).

Tableau 02 : Doses de l'hypophyse injectées aux géniteurs

Sexe	Géniteurs	Poids(g)	1 ^{ere} dose (mg)	2 ^{eme} dose (mg)
Mâles	Rouge, noire+blanc	420		840
	Blanc tache noire	330		660
	Blanc taches noires sur le dorsale	330		660
	Blanc	206		412
	Blanc	167		334
	Blanc taches rouge sur le dorsale	250		500
	Blanc taches rouges a la tête	270		540
Femelles	Blanche, orange+noire	750	225	2625
	Blanche	350	105	1225
	Jaune écaillée noire	420	126	1470
	Jaune orange	330	99	1155
	Grise argentée	317	95,1	1109,5
	Orange jaune	245	73,5	857,5

Tableau 03 : Dose de GnRH injectée à la femelle.

sexe	Couleur	Poids (mg)	La dose (mg)
Femelle	Noire, tache orange	730	3

I.2.4.4. Lieux d'injection

La femelle est posée à plat sur la table, la serpillière humide sur les yeux et la tête maintenue (Gilles *et al.*, 2001), l'aiguille de 2 à 3 cm est introduite dans le muscle sous un angle de 45°, lors du retrait de l'aiguille, le point d'injection est massé afin d'éviter le refoulement de la solution (Janssen, 1985 ; Gilles *et al.*, 2001) (figure 14).



Figure 14 : Lieu d'injection (Originale)

I.2.4.5. Suture des femelles

On peut empêcher la perte d'œufs en suturant l'orifice génital au moment de l'injection ; cette opération doit s'effectuer sous légère anesthésie (**figure 15**) (**Harvey et Hoar, 1980**). La femelle suturée est celle qui est injectée par la GnRH.



Figure 15 : Suture de la femelle Originale)

I.2.5. Fécondation artificielle

I.2.5.1. Stripping

Après l'anesthésie, on a bien séché les flancs, le ventre et surtout l'orifice génital, puis on a appliqué de légère pression sur l'abdomen du poisson pour recueillir les ovules dans une

cuvette. L'intervalle entre injection et ovulation varie selon le nombre d'injections et la température de l'eau (**Harvey et Hoar, 1980**) (**figure 16**)

La récolte de la laitance est faite de la même manière que le stripping des femelles sauf que la laitance a été retirée directement dans des seringues (**figure 17**).



Figure 16 : Récolte des œufs (Originale).

Figure 17 : Récolte de la laitance (Originale).

I.2.5.2. Mélange des gamètes

La fécondation artificielle se fait souvent selon la méthode dite «sèche» ; les deux géniteurs sont séchés à l'aide de serviette, les œufs sont expulsés dans un récipient sec, la laitance est répandue sur les œufs et l'on mélange doucement avec une plume ou une cuillère en plastique (**Harvey et Hoar, 1980**) (**figure 18**).



Figure 18 : Mélange des gamètes (Originale).

I.2.5.3. Agglutination

L'adhérence des œufs aide les embryons à survivre dans les eaux vives, mais pose des problèmes lors de l'incubation dans des systèmes artificiels (bouteille de Zug ou de Mc Donald) dans lesquels les œufs s'agglutinent et peuvent suffoquer ou être infectés par des champignons et des bactéries. Par conséquent, l'élimination du caractère collant est fondamentale pour la reproduction artificielle et le choix d'une méthode de désadhésion peut influencer de manière significative sur la survie des embryons et le taux d'éclosion (**Pšenička, 2018**).

Pour éviter l'agglutination des œufs dans les incubateurs, nous avons utilisé du lait entier à savoir deux doses de lait + dix doses d'eau (**figure 19**). On peut également employer de l'argile ou de l'acide tannique qui ont les mêmes propriétés de dés agglutination que le lait entier.



Figure 19 : Agglutination des œufs par le lait entier (Originale).

I.2.6. Incubation des œufs

Les œufs sont déversés directement dans les incubateurs remplis d'eau.

Le jour de l'incubation est le 02/04/2019, la durée est de 50 à 60 degré jours à une température de 20 °C.

Afin d'éviter la saprolegniose des traitements au vert de malachite sont effectués tous les jours (5 mg/m³ pendant cinq minutes) (**Schlumberger, 2002**) (**figure 20**).

Les incubateurs sont en béton, ont une forme ronde, ils reçoivent un courant d'eau descendant et une évacuation à la partie inférieure de l'incubateur, des aérateurs sont placés de manière que l'air diffuse dans le fond afin d'éviter la création des turbulences et assure une température homogène (**figure 21**).



Figure 20 : Incubation des œufs (Originale). **Figure 21** : Incubateurs en béton (Originale).

II. Évaluation du sperme

L'évaluation du sperme c'est faite au laboratoire de biologie EL RAZI du docteur NAIT TAHAR, à Miliana de la période du 11 Avril 2019 au 16 Avril 2019 ainsi qu'au laboratoire de recherche de l'université de Khemis-Miliana du 17 Avril 2019 au 20 Avril 2019.

II.1. Spermogramme

Le spermogramme, ou analyse spermatique, est un examen biologique qui permet d'évaluer la qualité du sperme. Les paramètres pris en compte lors de cette étude sont le volume et le pH spermatique ainsi que la morphologie, la mobilité et la concentration de spermatozoïdes (Marieta *et al.*, 2018).

II.2. Collecte de la laitance

Legendre et Billard (1980), ont proposé la méthode pour la collecte de la laitance où la papille génitale de poisson vivant est séchée, pour éviter la contamination de la semence par l'urine ou par l'eau, et la laitance émis par pression abdominale est recueilli dans le tube à essai.

Le sperme est récupéré par des massages abdominaux dans des seringues positionnés au dessous de l'ouverture génitale (**figure 22**). On a pris deux échantillons après injection d'hypophyse (**tableau 04**) :

Tableau 04 : Prélèvement des échantillons de laitance

Échantillon	Géniteurs	Poids (g)	Taille (cm)	La dose D'hypophyse	La date et heure d'injection	La date et heure de prélèvement
1	Rouge, noire + blanc	420	22	840	06/04/2019 à 8h : 15	07/04/2019 à 16h
2	Blanc tache noire	330	20,5	660	08/04/2019 à 9h	09/04/2019 à 17h



Figure 22 : Collecte de la laitance (Originale).

II.3. Conservation à court terme (Réfrigération)

La conservation à court terme est une opération relativement simple, comportant le maintien de la laitance sur la glace ou dans un réfrigérateur, à des températures entre 0 et 10 °C (**Harvey et Hoar, 1980**). La meilleure température pour la conservation du sperme paraît être (3-5 °C) au-dessus de (0 °C) (**François, 1946**).

Nous avons visé l'optimisation de la conservation du sperme de la carpe au Réfrigérateur à (+4 °C).

II.4.1. Examen macroscopique

II.4.1.1. Aspect

- Le sperme est un liquide blanc laiteux (**Maisse, 1990**).
- Le fluide séminal, dans lequel baignent les spermatozoïdes, représente plus de 80 % du volume du sperme (**Maisse, 1990**).

II.4.1.2. pH

On a mesuré le pH à l'aide d'un test de bandelette, il suffit de mettre une goutte de laitance, attendre quelques secondes, ensuite faire une lecture des résultats par comparaison d'un nuancier (**figure 23**).

- Le pH d'échantillon 01 est : 7,6
- Le pH d'échantillon 02 est : 7,6



Figure 23 : Mesure de pH de la laitance (Originale).

II.4.1.3. Volume

Le volume d'un éjaculat, obtenu par pression des flancs d'un mâle mature, varie avec la taille de l'individu et avec l'avancement de la période de spermiation (**Maisse, 1990**).

La lecture de volume est faite directement par la seringue le jour de prélèvement.

- Le volume de l'échantillon 01 est : 3 ml.
- Le volume de l'échantillon 02 est : 2,1 ml.

II. 4. 2. Examen microscopique

II.4.2.1. Mobilité

Les spermatozoïdes des cyprinidés sont immobiles dans le testicule et le liquide séminale. L'immobilisation est due à la pression osmotique (environ 300 milli osmoles/Kg) et la diminution de cette dernière, qui se produit lors de la dilution dans l'eau entraîne immédiatement la mise en mouvement (**Billard, 1995**).

L'évaluation de la mobilité en termes de pourcentage de spermatozoïdes en mouvement dans le champ de vision. Elle est utilisée pour évaluer le pourcentage de cellules en mouvement selon la classification suivante :

- 0- lorsqu'aucun mouvement n'a été observé.
- 1- quand jusqu'à 25 % des cellules étaient en mouvement.
- 2- quand jusqu'à 50 % des cellules étaient en mouvement.
- 3- quand jusqu'à 75 % des cellules se déplaçaient.
- 4- quand plus de 75 % des cellules se déplaçaient (**Viveiros *et al.*, 2003**).

On a mesuré la mobilité pour les deux échantillons après dilution 10^3 par solution physiologique à une concentration 9 ‰ à une osmolarité $287 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (**Hassan, 2013**), du fait de son importance sur la qualité du sperme et afin d'augmenter l'efficacité de la fertilisation artificielle, on a fait un suivi de la mobilité des spermatozoïdes pendant 7 jours afin de déterminer la durée de mobilité de ce dernier avec une conservation à 4°C (**figure 24, 25**). L'observation se fait sous microscope (G10 x100) + l'huile d'immersion.



Figure 24 : Spermatozoïdes de l'échantillon (01) (G 10 x 100) (Originale).



Figure 25 : Spermatozoïdes de l'échantillon (02) (G 10 x 100) (Originale).

II.4.2.2. Concentration des spermatozoïdes

La concentration spermatique chez la carpe est très élevée ($4 \text{ à } 30 \times 10^9$ spermatozoïdes ml^{-1}) avec une grande viscosité qui est à l'origine d'une difficulté dans la dispersion de cette semence dans les dilueurs (**Perchec *et al.*, 1995**).

Pour la mesure de la concentration des spermatozoïdes par la cellule de malassez on a :

- Fixé les spermatozoïdes par une goutte d'alcool dans 1 ml d'échantillon dilué 10^3 par l'eau physiologique (**figure 26, 27**).

- Monté une goutte de l'échantillon entre lame et lamelle.
- Placé le quadrillage dans l'axe du faisceau lumineux de microscope (G 10 x 100) (**figure 28**).
- Compté les spermés des petits carrés de 20 afin d'effectuer une moyenne (**figure 29**).
- La moyenne de 5 rectangles :

$$M = \text{nombre de spermatozoïdes (n)}/5$$

- Sachant qu'il y a $0,01 \text{ mm}^3$ dans un rectangle, on a multiplié par 100 pour connaître le nombre de spermatozoïdes par mm^3 (pour avoir la concentration par ml on a multiplié par 10^3).

- La concentration (C) :

$$C = M \times 100 \times 10^3(\text{dilution}) \times 10^3(\text{ml})$$

- Concentration totale (C_t) :

$$C_t = C \times \text{Volume total de spermatozoïdes}$$



Figure 26 : Dilution du sperme (Originale).



Figure 27 : Solution physiologique (Originale).



Figure 28 : Comptage de spermatozoïdes sous microscope (Originale).

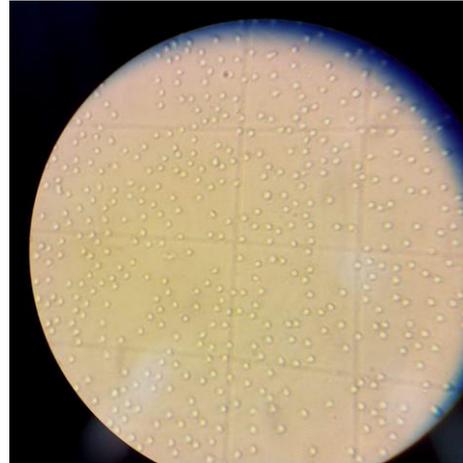


Figure 29 : Spermatozoïdes sur la cellule de malassez (G 10 x 100) (Originale).

II.4.2.3. Test éosine-négrosine (coloration)

La coloration permet de déterminer les anomalies des spermatozoïdes et la vitalité.

- Prendre 10 μ l de sperme à l'aide d'une micropipette et ajouter 20 μ l d'éosine ensuite agiter avec vortex et rajouter 30 μ l de négrosine et agiter 30 s.
- Appliquer un frottis sur une lame et ajouter de l'huile d'immersion, l'observation au microscope objectif x 100.

II.4.2.3.1. Morphologie

La morphologie permet de connaître le nombre de spermatozoïdes anormales (tête, pièce intermédiaire, flagelle, forme typique) sur 100 spermatozoïdes observés. La morphologie des spermatozoïdes de la carpe koi est présentée dans le (tableau 05) :

Tableau 05 : Organisation structural fine et dimensions de spermatozoïdes de la carpe koi (Sonja *et al.*, 2009)

Le spermatozoïde de la carpe koi	La tête		Pièce intermédiaire	Le flagelle	
	Longueur (μ m)	Largeur (μ m)		Longueur (μ m)	diamètre (μ m)
		1,87 \pm 0,21	1,68 \pm 0,20	826 \pm 182	246 \pm 17

II.4.2.3.2. Vitalité

La vitalité permet de connaître le nombre de spermatozoïdes vivants sur 100 spermatozoïdes observés (**figure 30, 31**). Ceux en blanc ont une membrane qui n'est pas lésée, c'est-à-dire qu'ils résistent à la coloration à l'éosine, tandis que ceux en rouge ont une membrane lésée permettant à l'éosine de pénétrer à l'intérieur de la cellule. Quant à la négrosine, elle sert seulement à colorer le fond du frottis (**Dussault, 2009**).

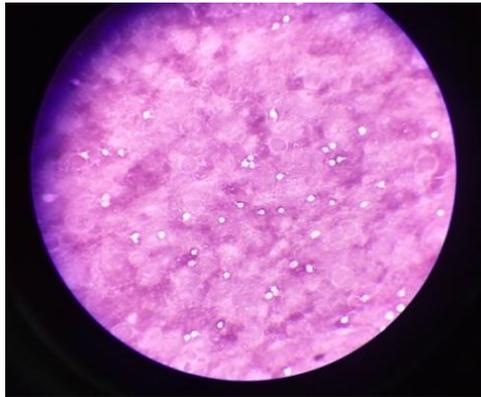


Figure 30 : Coloration des spermatozoïdes échantillon 01 (G 10 x 100) (Originale).

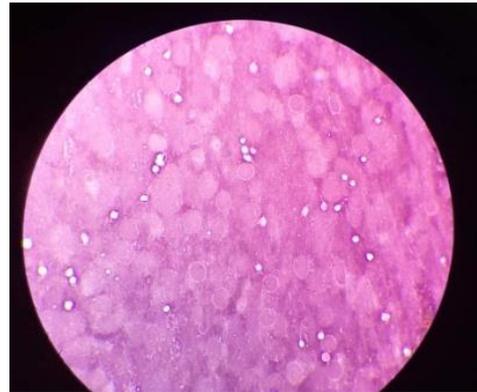


Figure 31 : Coloration des spermatozoïdes échantillon 02 (G 10 x 100) (Originale).

Chapitre III

Résultats et discussion

I. Résultats et discussion

I.1. Paramètres de l'eau :

Les mesures sont présentées dans le **(tableau 06)** :

Tableau 06 : Paramètres de l'eau

Paramètres	Bassin des femelles	Bassin des mâles
Température (°C)	22,2	21
O ₂ (mg/l)	7,15	8,03
Saturation en oxygène (%)	78,9	86,2
Pression (hPa)	1042	1042
pH	7,2	7,6
GH (°d)	>14	>21
KH (°d)	6	10
NO ₂ (mg/l)	5	5
NO ₃ (mg/l)	0,01	0,01
NH ₃ (mg/l)	0,2	0,2
Salinité (‰)	0	0
Cl ₂ (mg/l)	0	0

I.2. Développement embryonnaire :

Généralement, les cyprinidés produisent des petits œufs de 1-2 mm dont l'éclosion est rapide (2-4 jours), avec des larves de petite taille (4-7 mm) (**Poncin, 1996**). Le nombre de degrés jours est l'unité permettant de déterminer la durée de développement embryonnaire en fonction de la température moyenne journalière.

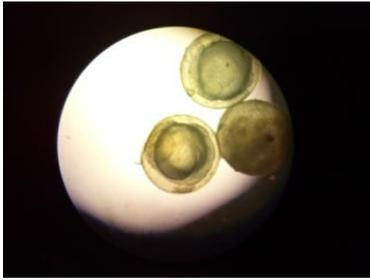


Figure 32 : Phase de gonflement de l'œuf (G 10 x 40) (Originale).

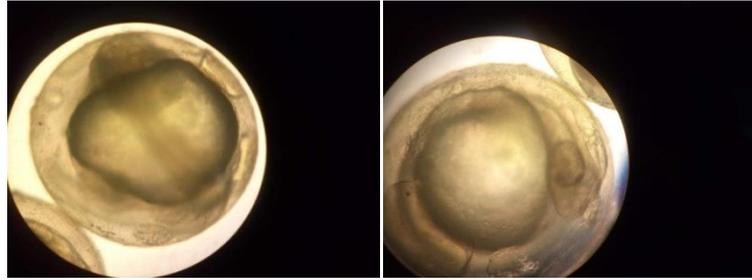


Figure 33 : Développement de l'embryon (G 10 x 40) (Originale)

Figure 32 : La phase de gonflement de l'œuf : les œufs secs fécondés absorbent de l'eau pour s'hydrater et on observe que l'espace pré vitellin se développe.

Figure 33 : L'embryon du poisson se forme autour de vitellus. La tête et la queue sont formées, et on peut distinguer les yeux. Les mouvements s'intensifient jusqu'à ce que la coquille de l'œuf soit rompue et que l'éclosion se produise (**Woynarovich et Horvath, 1981**).

I.3. Éclosion

Après 72 h d'incubation les œufs ont éclos le 04/04/2019 à 16 h dans une température de 20 °C. L'observation de la larve de 2 jours a été faite sous une loupe binoculaire (G 40 x 40) (**figure 34**).



Figure 34 : Larve de carpe koi (G 40 x 40) (Originale).

II. Spermogramme

II.1. Mobilité

Nous avons présenté dans la **figure 35** l'évolution de la mobilité des spermatozoïdes en fonction du temps (jours), on a fait un suivi de la mobilité pendant 7 jours afin de savoir comment la température (à 4 °C) influe sur la mobilité des spermatozoïdes. Pour les deux échantillons de la carpe koi la mobilité du sperme était plus de 75 % pendant les deux premiers jours puis elle a commencée à diminuer jusqu'à 15 % au 7^{eme} jour.

La vitalité est en relation avec la mobilité, elle est de 85 % pour chaque échantillon, selon **Forges *et al.* (2009)**, le résultat doit être confronté à la mobilité du même échantillon, puisque, théoriquement, le nombre de spermatozoïdes non vivants ne peut être supérieur au nombre d'immobiles.

La mobilité de spermatozoïde est liée à l'ATP après sa synthèse par les mitochondries, l'ATP devrait être transporté et distribué tout au long du flagelle, de manière à fournir de l'énergie chimique pour soutenir l'énergie mécanique.

Le sperme peut être stocké *in vitro* ; une bonne mobilité à 2-5 °C enregistrée après 2 jours. Le pourcentage de cellules mobiles et la teneur en ATP peuvent être observés après 8 à 10 heures de stockage. Au-delà, la qualité du sperme (taux de mobilité, pourcentage de sperme mobile) continue à diminuer régulièrement et au bout de 6 jours, la capacité de fertilisation est entièrement perdue (**Billard *et al.*, 1995**).

Selon **Hulata et Rothbard (1979)**, la semence de carpe peut être conservée pendant au moins 45 h à des températures comprises entre 0 et 5 °C avant la fertilisation artificielle.

Selon **Billard (1986)**, le sperme stocké pour 2 jours à 2-5 °C avec une bonne mobilité et une bonne capacité de fertilisation après une longue période de stockage, une diminution de la mobilité a été observée après 4 jours de stockage et une diminution de la capacité de fertilisation après 10 jours.

La durée de la mobilité est plus longue à 4 °C, ce qui renforce le rôle crucial de la disponibilité de l'ATP aux températures plus basses en mobilité prolongée.

Il a été montré que la durée de la mobilité des spermatozoïdes était significative car augmente à la faveur d'une basse température chez différentes espèces de poisson (**Dadras *et al.*, 2016**).

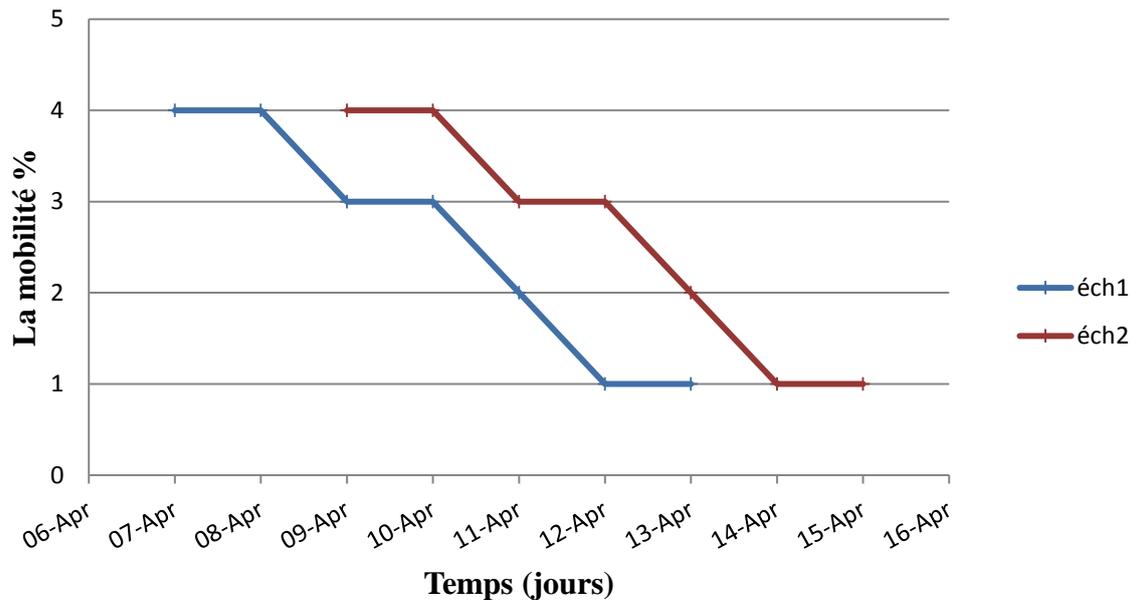


Figure 35 : Courbe de l'évaluation de la mobilité du sperme pour les 02 échantillons de la carpe koi en fonction du temps (jours).

II.2. Concentration spermatique

Sur les **figures 36 et 37**, nous avons présenté les variations de la concentration spermatique et la concentration totale par rapport au volume des 02 échantillons de la carpe koi.

A partir des figures, nous pouvons observer que la moyenne de la concentration de l'échantillon (2) ($29,7 \times 10^3 \text{ spz.ml}^{-1}$) ($C_t = 62,37 \times 10^9 \text{ spz.ml}^{-1}$ pour un volume de 2,1 ml) est plus importante que l'échantillon (1) ($9,6 \times 10^3 \text{ spz.ml}^{-1}$) ($C_t = 28,8 \text{ spz.ml}^{-1}$ pour un volume de 3 ml). Notre résultat est dans les normes par rapport au résultat rapporté par **Perchec et al. (1995)**, pour la carpe où la concentration varie entre $4 \times 10^3 \text{ spz.ml}^{-1}$ et $30 \times 10^3 \text{ spz.ml}^{-1}$, puisque les géniteurs de la carpe koi sont jugés matures et la dose d'hypophyse a été suffisante pour la production du spermes, donc la diminution de la quantité des spermatozoïdes peut être expliquée par la dilution du spermes au niveau du canal déférent. Pour **Clemens et Sneed (1962)** ; **Clemens et Johnson (1964)** ; **Clemens et al. (1964)** ; **Billard et al. (1971)**, la diminution de la concentration du sperme au cours de son transit dans le canal déférent prouve que, en plus des phénomènes d'hydratation qui interviennent dans le testicule au moment de la spermiation, il y a une dilution des spermatozoïdes dans le canal déférent lui-même due aux sécrétions de l'épithélium.

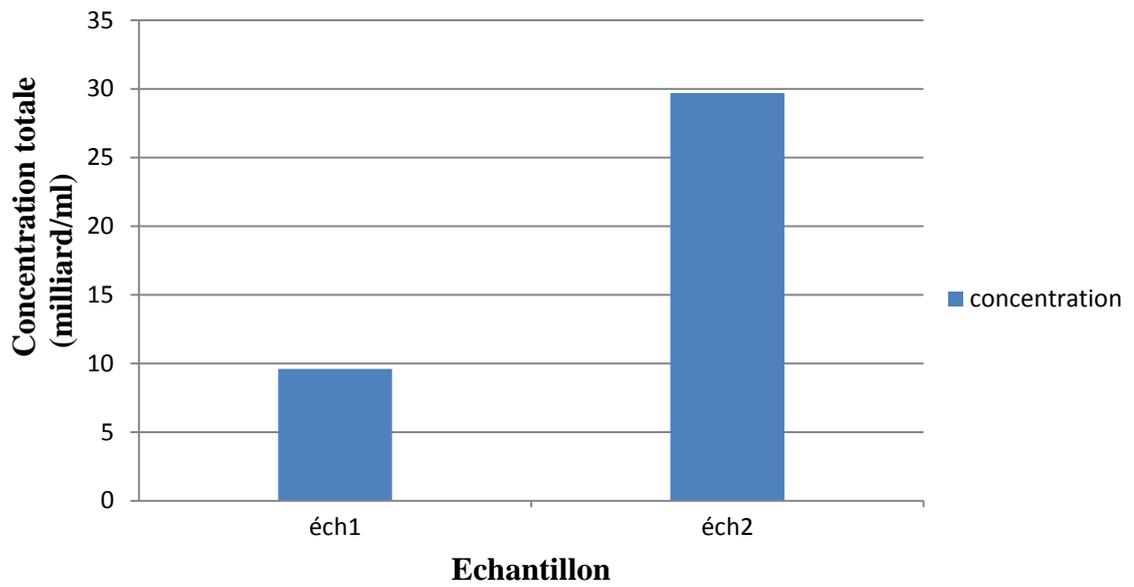


Figure 36 : Histogramme de variation de la concentration spermatique (milliard/ml) en fonction des 02 échantillons de la laitance de la carpe koï.

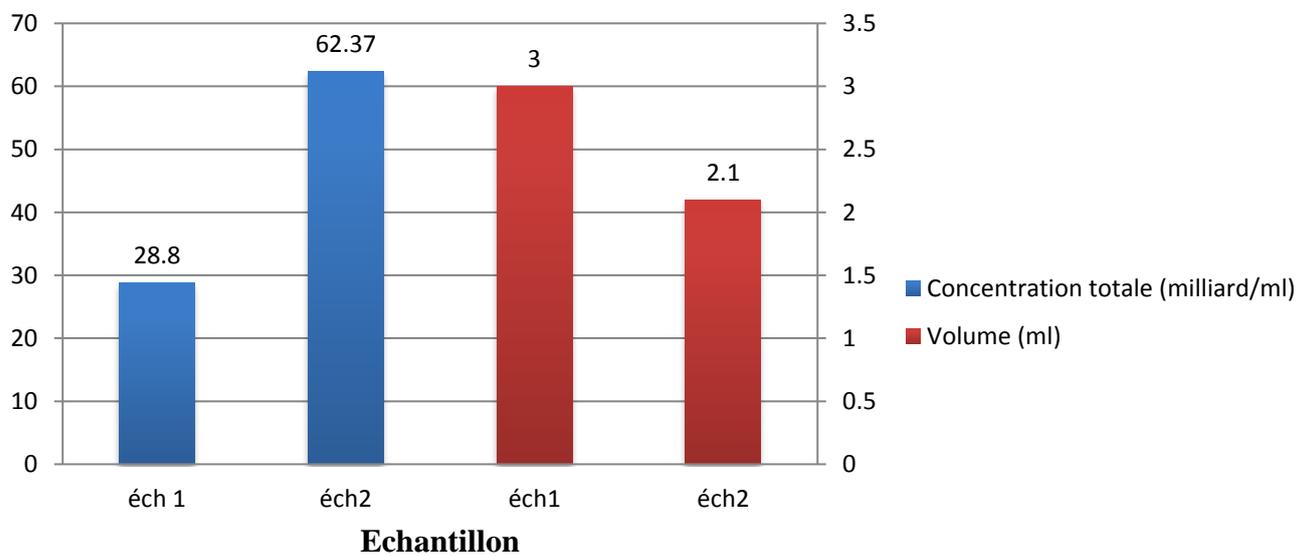


Figure 37 : Histogramme de variation de la concentration spermatique totale (milliard/ml) par apport au volume (ml) en fonction des 02 échantillons de la laitance de la carpe koï.

III.3. Morphologie

Après une coloration avec éosine-négrosine pour chacun des échantillons.

Nous avons observé la morphologie des spermatozoïdes de la carpe koï des 02 échantillons, qui ont été de forme typique (la tête : arrondie, la pièce intermédiaire : peu développée, le flagelle : s'insère sur un coté de la tête spermatique) (**figure 38**), selon **Billard, (1970)**, chez la carpe, les spermatozoïdes peu élaborés, tête ovoïde, mitochondries et cytoplasme simplement rejetés dans la partie postérieure de la tête spermatique et ne constituant pas une véritable pièce intermédiaire, flagelle inséré sur un coté de la tête spermatique.



Photo 38 : Morphologie du spermatozoïde de la carpe koï (G 10 x 100) (Originale).

Conclusion

Le présent travail est mené sur l'étude de variation des paramètres spermatiques de la carpe koï après une induction hormonale par l'hypophyse et sous une conservation à 4 °C.

Les paramètres que nous avons considérés dans cette étude sont la durée de la mobilité, et la concentration spermatiques, qui jouent un rôle très important dans l'amélioration de la fertilisation artificielle.

Ces résultats nous ont permis de faire valoir :

- Que la concentration spermatique n'a aucune relation avec le volume de la laitance, ce qui explique que dans la reproduction artificielle, le mélange de la laitance de différents mâles est une pratique très courante qui permet l'amélioration de la fécondation .

- Que la durée de mobilité diminue en fonction du temps (jours).

- Que la réfrigération de la laitance est une technique qui permet de prolonger la conservation du sperme avec une bonne mobilité et motilité pendant 2 jours, de même elle facilite le stockage du sperme à court terme.

A l'avenir nous suggérons que d'autres recherches sur les techniques innovantes de cryoconservation du sperme soient développées afin de prolonger sa conservation et sa durée de vie.

Référence bibliographique

Références bibliographiques

A

- **Alavi, S. M. H., Cosson, J., Karami, M., Amiri, B. M., et Akhoundzadeh, M. A. (2004).** Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Reproduction*, 128(6), 819-828.

B

- **Billard, R. (1970).** Ultra structure comparée de spermatozoïdes de quelques poissons téléostéens. *Academic Press, New York*, 71-79.

- **Billard, R., Breton, B., Jalabert, B., Escaffre, A. M., et Solari, A. (1971).** La production spermatogénétique chez la truite. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 11, No. 2, pp. 199-212). *EDP Sciences*.

- **Billard, R. (1979).** La gamétogenèse, le cycle sexuel et le contrôle de la reproduction chez les poissons téléostéens. *Bulletin Français de Pisciculture*, (273), 117-136.

- **Billard, R., Marcel, J. (Eds.). (1986).** Aquaculture of cyprinids. 1^{ère} édition. *Editions Quae*. Evry (France) P502. Inra

- **Billard, R. (1995).** Les carpes : biologie et élevage. *Editions Quae*. Inra. Paris.

- **Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., et Linhart, O. (1995).** Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129(1-4), 95-112.

- **Burzawa-Gerard E, Baloche S, Leloup-Hatey J, Le Menn f, Messaouri H, Nunez--Rodriguez J, Peyonp., Roger C, (1994).** Ovogenèse chez l'anguille, *Anguilla anguilla* : ultrastructure de l'ovaire à différents stades de développement et implication des lipoprotéines au cours de la vitellogenèse. *Bull. Fr. Pêche Piscic*, 335.

C

- **Cabrita, E., Robles, V., et Herráez, P. (2008).** -Sperm quality assessment. In *Methods in Reproductive Aquaculture* (pp. 115-170). CRC press.

- **Canyurt, M. A., et Akhan, S. (2008).** Effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8(1), 171-175.

- **Clemens, H. P., Sneed K. E., (1962).** Bioassay and use of pituitary materials to spawn warm-water fishes. *U. S. Dept. Interior Fish and Wildlife Derv. Res. Reprod.*, 61, 30

- **Clemens, H. P., Johnson, W. W. (1964).** Specificity of the gonadal hydration factor in the pituitary of some freshwater fishes. *Copeia*, 389-398.
- **Clemens, H P., Cierfszko S., Shoemaker D., Grant F., (1964).** Partial characterization of the gonadal hydration principle in the pituitaries of carp (*Cyprinus carpio*). *Gen. Comp. Endocr.*, 4, 503.
- **COROLLA Jean-Pierre, DACHEUX Jean-Louis, KUPFER Michel in : DORIS,** 21/02/2019 : *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758, <https://doris.ffesm.fr/ref/specie/248>.

D

- **Dadras, H., Dzyuba, V., Cosson, J., Golpour, A., et Dzyuba, B. (2016).** The in vitro effect of temperature on motility and antioxidant response of common carp *Cyprinus carpio* spermatozoa. *Journal of thermal biology*, 59, 64-68.
- **Diogo, P. A. C. (2010).** *Sperm motility in Solea senegalensis: effect of temperature, salinity, pH and ovarian fluid* (Doctoral dissertation).
- **Dufour, S., Delerue-Le Belle N., Fontaine Y.A., (1983).** Effects of steroid hormones on pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 52, 190-197.
- **Dufour, S. (1994).** Neuroendocrinologie de la reproduction de l'anguille: de la recherche fondamentale aux problèmes appliqués. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (335), 187-211.
- **Dussault J. (2009).** Le Spermogramme. Volume 16, n° 2

F

- **Fontaine, R. (2014).** Etude Du Système Dopaminergique Inhibiteur De La Fonction Gonadotrope Chez Le Poisson-Zébre.
- **François, Y. (1946).** Quelques Aspects de la Reproduction chez les Poissons. *Bull. Fr. Piscic.* 140 : p.108-113

G

- **Gilles S., Dugué R., Slembrouck J., (2001).** Manuel de production d'alevins du silure africain, *Heterobranchus longifilis*. Ed. maisonneuve et Larose, Paris, 128 p.

H

- Hajlaoui, W., Mili, S., Troudi, D., et Missaoui, H. (2016).** Etude de la biologie de reproduction chez la carpe commune *Cyprinus carpio communis* pêchée dans la retenue du barrage de Sidi Saad (centre de la tunisie). *Bulletin Société Zoologique de France*, 141(1), 25-39.
- **Hamamah, S., Gatti, J.-L., (1998).** Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Human Reproduction*. Vol. 13 Supplement
- **Harvey B. J. et Hoar W. S. (1980).** Reproduction Provoquée chez les Poissons: Théorie et Pratique. *Aquaculture*. p.48.
- **Hassan, M. M., Nahiduzzaman, M., Al Mamun, S. N., Taher, M. A., et Hossain, M. A. R. (2013).** Fertilization by refrigerator stored sperm of the Indian major carp, *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Aquaculture Research*, 45(1), 150-158.
- **Hulata, G., et Rothbard, S. (1979).** Cold storage of carp semen for short periods. *Aquaculture*, 16(3), 267-269.)

I

- **Izquierdo, M. S., Fernandez-Palacios, H., et Tacon, A. G. J. (2001).** Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197(1-4), 25-42.

J

- **Janssen J., (1985).** Elevage du poisson chat africain *Clarias lazera* (Cuv. & Val., 1840) en République Centrafricain : 1. *Reproduction artificielle*. Bagui,FAO,FAO/GCP/CAF/007/NET, Document technique No. 20, 100 p.
- **Javahery, S. et Nekoubin, H. (2013).** '<http://www.bibliomer.com/>'.

K

- **Kjorsvik, E.; Mangor, Jensen, A.; Holmefjord, T., (1990).** Egg quality in fishes. *Adv. Mar. Biol.* 26, 71-113.

L

- **Legendre, M. et Billard R. (1980).** Cryoconservation du Sperme de Truite Arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.). *Bulletin Français de Pisciculture Cinquante* .Troisième année N°278 3eme Trimestre. p.12-23.
- **Legendre, M., et Jalabert, B. (1980).** Physiologie de la reproduction = Physiology of reproduction.
- **Linnaeus, 1785.** <http://doris.ffessm.fr/ref/specie/248>.

M

- **Maisse G. (1990).** Le sperme des salmonidés : le point sur les connaissances. Applications à la salmoniculture. *INRA Prod .Anim.* 3 (3) : p.223-228.
- **Marieta, C. O., Santé, C. A., Tévar, L. G., et Reus, R. (2018).** Le spermogramme : résultat et interprétation.
- **Meddour, A., Rouabah, A., Meddour-Bouderda, K., Loucif, N., Remili, A., Khatal, Y., (2005).** Expérimentations sur la reproduction artificielle de sander *Lucioperca*, *Hypophthalmichthys Molitrix* et *Aristichthys Nobilis* en Algérie.
- **Morita, M., Takemura, A., et Okuno, M. (2003).** Requirement of Ca²⁺ on activation of sperm motility in euryhaline tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Biology*, 206(5), 913-921.

O

- **Olivier, S., et Patrick, G. (2013).** Mémento de pisciculture d'étang : 5e édition. Editions Quae.

P

- **Perchec, G., Jeulin, C., Cosson, J., Andre, F., et Billard, R. (1995).** Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science*, 108(2), 747-753.
- **Poncin, P. (1994).** Bilan de 4 années d'étude du comportement reproducteur et de l'hybridation chez *Barbus barbus* (L., 1758) et *Barbus meridionalis* (RISSO, 1826). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (334), 169-176.
- **Pšenička, M. (2018).** Rapid de-adhesion of northern pike *Esox lucius* eggs using sodium hypochlorite. *Fish physiology and biochemistry*, 44(6), 1535-1539.

R

- **Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., et Nash, J. P. (2004).** The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234(1-4), 1-28.

S

- **Schlumberger O., (2002).** Mémento de pisciculture d'étang. 4eme édition, Ed.cemagref, Montpellier (France), 238p.

- **Sonja F., Franz L. Et Robert A. P. (2009).** A fine Structural Review on the Spermatozoa of Cyprinidae with Attention to their Phylogenetic Implications. *Histol. Histopathol.* 24: p.1233-1244.

T

- **Tao, W., Mayden, R. L., et He, S. (2013).** Remarkable phylogenetic resolution of the most complex clade of Cyprinidae (Teleostei: Cypriniformes): A proof of concept of homology assessment and partitioning sequence data integrated with mixed model Bayesian analyses. *Molecular phylogenetics and evolution*, 66(3), 603-616.

V

- **Viveiros, A. T. M., Jatzkowski, A., et Komen, J. (2003).** Effects of oxytocin on semen release response in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, 59(9), 1905-1917.

W

- **Woynarovich, E., Horvath, L., (1981).** La reproduction artificielle des poissons en eau-chaude : manuel de vulgarisation. *FAO, Doc et Tech. Pêches*, (201).