

BURKINA FASO

Unité-Progrès-Justice

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR, DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET DE L'INNOVATION (MESRSI)**

UNIVERSITE NAZI BONI (UNB)

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL (IDR)



MÉMOIRE DE FIN DE CYCLE

En vue de l'obtention du

DIPLÔME D'INGENIEUR DU DEVELOPPEMENT RURAL

OPTION : Eaux et Forêts

**ETUDE DES CARACTERISTIQUES SPERMATIQUES DES
SEMENCES DE LA SOUCHE LOCALE KOU DE TILAPIA DU
NIL, *OREOCHROMIS NILOTICUS* (LINNAEUS, 1758)**

Présenté par **TAPSOBA Abdoul Aziz**

Maître de stage :

Dr. Mamadou SANGARE

Co-maître de stage

Pr. Aboubacar TOGUYENI

Directeur de mémoire :

Pr. Aboubacar TOGUYENI

Co-Directeur de mémoire

Dr. Mamadou SANGARE

N°:2017/(E & F)

Juillet 2017

Dédicace

Aux membres de ma famille :

Mon père TAPSOBA Moumouni

Ma mère BAMBA Korotimi

Mon grand frère TAPSOBA Abdoul-Rahamane

*Mes grandes sœurs TAPSOBA Salimata et TAPSOBA
Kadidiatou*

Ma petite sœur TAPSOBA Aïcha

Mon petit frère TAPSOBA Cheich Issouf

Pour les nombreux sacrifices consentis à notre égard

Remerciements

Nous voulons d'abord remercier le projet PROGEVAL qui a entièrement financé ce travail. Au moment de le boucler, deux sentiments nous animent : celui du soulagement d'avoir pu le conduire à son terme mais aussi le souvenir qu'il est le produit d'un engagement collectif où les uns et les autres ont apportés leur touche de nature diverse et d'ampleur variable. J'aimerais donc exprimer ma profonde gratitude :

Au **Pr Aboubacar TOGUYENI** pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de diriger ce mémoire et pour les soutiens inestimables dont nous avons bénéficié avant et pendant ce stage. Il nous a très tôt acceptés dans son Unité de Recherche en Aquaculture et Biodiversité Aquacole et malgré ses multiples occupations il a toujours trouvé l'énergie nécessaire pour répondre à nos multiples préoccupations. Qu'il trouve dans l'aboutissement de ce travail, le couronnement de ses efforts.

Au **Dr Mamadou SANGARE** pour avoir accepté de nous encadrer sur cette thématique. Malgré les difficultés qui se sont présentées durant ce stage il a toujours su montré sa grande disponibilité et son sens de l'écoute. Qu'il soit sincèrement remercié pour la patience dont il a fait preuve pour l'aboutissement de ce travail.

Au **Dr Valentine Chia YAPI-GNANORE**, Directrice Général du CIRDES pour avoir accepté de nous accueillir au sein de son institution.

Au **Dr Charles DAYO**, Coordonnateur régional du PROGEVAL pour sa constante disponibilité et ses encouragements.

A **Mr Oumar Coulibaly**, pour son implication entière dans la réalisation pratique de cette expérimentation. Il nous a fait partager sa grande expérience tout au long de ce travail. Qu'il trouve dans ces lignes toute notre gratitude.

Au **Pr Mipro HIEN** et **Dr. Souleymane SANOGO** pour n'avoir ménagé aucun effort en nous recommandant auprès de ce projet.

Au **Président du Jury** et aux **membres du Jury** pour avoir accepté de juger ce travail et d'apporter leur contribution à l'amélioration de sa qualité scientifique.

A nos aînés de l'UR-ABAQ, **Aboubacar SOURABIE**, **Roukyatou SISSAO**, **Inoussa COMPAORE**, **Olivier AMOUSSOU**, **Saïdou SANTI**, **Florence KAGAMBEGA**, **Morgane ANVO**, **Eric SILGA**, **Mamadou SOME**, **Charlène TOE**, **Alain HEMA** pour leur accueil chaleureux et pour leur soutien multiforme dans l'aboutissement de ce travail. Ces

lignes ne pourront être suffisantes pour exposer l'immense contribution de chacun à notre propre formation et à la réalisation de ce travail. Que la réussite de ce travail témoigne de leur effort commun.

Aux camarades stagiaires de l'UR-ABAQ, **ZOMA Carmela** et **SANOU Estelle**, pour les collaborations fructueuses que nous avons eu à entretenir tout au long de notre stage.

A nos camarades stagiaires **KAWACE Hadara**, **SANGA Issouf**, **SAWADOGO Inoussa**, **ZONGO Souleymane** ainsi qu'à **tous les stagiaires** du CIRDES pour leur grande fraternité.

A madame **Toussaint Salimata SOURA**, documentaliste au CIRDES et Madame **Alice SANOU**, secrétaire au CIRDES pour leur disponibilité.

A tous **les chercheurs** et **personnel du CIRDES** pour l'accueil chaleureux dont nous avons bénéficié.

A nos **collègues promotionnaires de l'IDR** et particulièrement à **ceux de l'option Eaux et Forêts** pour leur franche collaboration

A notre parrain de l'IDR, **OUEDRAOGO Norbert** pour sa franche collaboration.

A tous nos **enseignants de l'IDR**, de l'UFR/ST ainsi qu'à ceux du **Secondaire et du Primaire** pour la formation et la qualité du savoir qu'ils nous ont inculqués.

A la grande famille **TAPSOBA** et **BAMBA** pour leur accompagnement multiformes.

A nos amis et aînés ; **TRAORE Abdoulaye**, **KIEMDE Issoufou**, **SANOU Issouf**, **KOMOU Moussa**, **SANOU Seydou**, **DIALLO Ousmane**, **DIALLO Adama**, **OUATTARA Adama**, **KAMBOU Ignace**, **ZINA Siaka**, **ZALLE Tidiane**, **SAWADOGO Yacouba**, **SANOU Dramane** pour leur fraternité.

A notre encadreur principal **SAMANDOULGOU Mohamed** ainsi qu'à tous les **encadreurs** de la zakat pour le savoir transmis et pour leur grande fraternité.

A l'ensemble de la **communauté musulmane** pour les nombreux enseignements reçus.

Aux membres de notre famille pour les énormes sacrifices consentis à notre égard. Qu'ils trouvent dans l'aboutissement de ce travail un réconfort.

Que tout **ceux** ou **celles** dont les noms n'ont pu être cités puissent trouver dans ces lignes l'expression de notre profonde gratitude.

Table des matières

<i>Dédicace</i>	i
Remerciements	ii
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	vii
Liste des photos	viii
Sigles et abréviations	ix
Résumé	x
Abstract	xi
Introduction	1
Première partie : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
Chapitre I : Présentation de l'espèce	4
1. Berceau et aire de répartition	4
2. Systématique et description	4
3. Menaces sur la faune ichthyologique africaine	6
3.1. Aménagement et Perte d'habitats	6
3.2. Surexploitation des espèces aquatiques	7
3.3. Introduction de tilapia étrangère dans les écosystèmes aquatiques Ouest-africain	7
4. Physiologie de la reproduction	8
4.1. Stratégie de reproduction	8
4.2. Appareil génital mâle et gamétogénèse	8
5. Notion de sperme chez les poissons	11
5.1. Fluide séminal	11
5.2. Spermatozoïde	12
6. Régulation de la reproduction	12
6.1. Rôle des facteurs externes	12
6.2. Rôle des facteurs internes	13
Chapitre II : Conservation de la laitance chez les poissons	15
1. Collecte de la laitance	15
2. Volume de la laitance	15
3. Caractéristique spermatiques	15
3.1. Concentration en spermatozoïde	16
3.2. Motilité des spermatozoïdes	17

4. Facteurs affectant les caractéristiques spermatiques	20
4.1. Alimentation.....	20
4.2. Facteurs environnementaux : température, photopériode et salinité.....	20
4.3. Stress	21
4.4. Autres facteurs.....	21
5. Cryoconservation	21
5.1. Pré-congélation.....	21
5.2. Congélation	23
5.3. Décongélation.....	23
5.4. Impact de la cryoconservation sur la semence	24
6. Etat des lieux sur la cryoconservation du sperme des tilapias en Afrique	24
Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE	26
Chapitre I : Matériel et méthodes	27
1. Cadre de l'étude	27
2. Matériel	27
2.1. Matériel biologique	27
2.2. Structure d'élevage.....	27
2.3. Matériel de collecte de la laitance.....	28
2.4. Matériel d'analyse de la laitance	28
2.5. Matériel de mesure	28
2.6. Produits et réactifs utilisés.....	28
2.7. Autre matériel	28
3. Méthodes	29
3.1. Marquage des poissons.....	29
3.2. Collecte de la laitance.....	29
3.3. Evaluation de la qualité de la laitance	30
3.3.1. Détermination du pH.....	30
3.3.2. Concentration en spermatozoïdes.....	30
3.3.3. Appréciation de la motilité des spermatozoïdes.....	31
3.4. Cryoconservation de la semence de <i>O. niloticus</i>	31
3.4.1. Pré-congélation.....	31
3.4.2. Congélation	32
3.4.3. Décongélation.....	32

4. Analyse des données	33
Chapitre II : Résultats et Discussion	34
1. Résultats	34
1.1. Paramètres physico-chimiques de l'eau	34
1.2. Volume de la laitance	36
1.3. Valeur du pH et motilité de la laitance.....	36
1.4. Concentration en spermatozoïdes.....	37
1.5. Test des dilueurs pour la congélation	38
2. Discussion	39
2.1. Contraintes méthodologiques et limites d'interprétation des résultats.....	39
2.2. Caractéristiques spermatiques	40
2.3. Test des dilueurs de congélation	41
Conclusion et Perspectives.....	43
Références bibliographiques	44
Annexe : Fiche d'évaluation des paramètres morpho biométriques et spermatiques	a

Liste des tableaux

Tableau I : Echelle arbitraire pour apprécier la motilité des spermatozoïdes (<i>in</i> Sanchez-Rodriguez et Billard, 1977).....	18
Tableau II : Composition chimique de dilueurs utilisés dans la cryoconservation de semences de poissons.	22
Tableau III : Volume de laitance des mâles de la souche Kou de <i>Oreochromis niloticus</i> utilisés pour l'expérimentation en fonction des caractéristiques morpho biométriques	36
Tableau IV : pH, motilité et durée de motilité dans la laitance des mâles de la souche Kou de <i>Oreochromis niloticus</i> utilisés pour l'expérimentation.....	37
Tableau V : Concentration et nombre total de spermatozoïde dans la laitance des mâles de la souche Kou de <i>Oreochromis niloticus</i> utilisés au cours de l'expérimentation	37
Tableau VI : Test de dilueurs pendant 24 heures sur la laitance congelée des mâles de la souche Kou de <i>Oreochromis niloticus</i> utilisés pour l'expérimentation.	38
Tableau VII : Test de dilueur pendant 72 heures sur la laitance congelée des mâles de la souche Kou de <i>Oreochromis niloticus</i> utilisés au cours de l'expérimentation.	39

Liste des figures

Figure 1 : Aire de répartition originelle de <i>Oreochromis niloticus</i>	4
Figure 2 : Représentation schématique de deux types de structures testiculaires rencontrés chez les téléostéens.....	9
Figure 3 : Coupe histologique du testicule du tilapia du Nil (a) et évolution de la spermatogenèse.	10
Figure 4 : Ultrastructure du spermatozoïde de tilapia (adapté de Maise, 1990).....	12
Figure 5 : Cellule de Neubauer utilisée pour la numération des spermatozoïdes (CSCQ, 2010)	17
Figure 6 : Variation hebdomadaire des paramètres physico-chimiques (a : température ; b : pH ; c : conductivité) dans le circuit expérimental.....	35

Liste des photos

Photo 1 : Spécimen de l'espèce <i>Oreochromis niloticus</i> objet de la présente étude.....	6
Photo 2 : Présentation du circuit fermé d'élevage constitué de quatre (04) aquariums de 300 litres chacun, utilisé au cours de l'expérimentation.	27
Photo 3 : Marquage (a) et désinfection du poisson (b) avec de la Bétadine en vue de la collecte de la laitance	29
Photo 4 : Nettoyage et séchage de la région génitale (a) ; pression abdominale (b) et récupération de la laitance dans une pipette pasteur (c).....	30
Photo 5 : Détermination du pH de la laitance à l'aide d'un papier pH.....	30
Photo 6 : Dilution de la laitance dans du liquide physiologique formolé (a), dépôt de la laitance diluée sur une cellule de Neubauer (b) et numération sous un microscope (c)	31
Photo 7 : Mise en paillette (a) ; bouchage des paillettes (b) et paillettes marquées (c).....	32
Photo 8 : Processus de congélation des paillettes contenant la semence de la souche Kou de <i>Oreochromis niloticus</i>	32
Photo 9 : Bain marie (a) et décongélation des paillettes dans un bain marie (b).....	33

Sigles et abréviations

11KT : 11 Cétotestostérone

AMP-c : Adénosine monophosphate cyclique

ATP : Adénosine triphosphate

CIRDES : Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide

FAO : Food and Agricultural Organization

FSH : Folliculo-Stimulating Hormone

GIFT: Genetically Improved Farmed Tilapia

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

GRIF : Gonadotropine Release Inhibitory Factor

IDR : Institut du Développement Rural

KDa : Kilodalton

LH : Luteinizing Hormone

PROGEVAL : Projet de Valorisation des ressources Génétiques animales et Aquacoles Locales

Spz : Spermatozoïdes

SPP 120 : Seminal glycoProtein Plasma 120

T : Testostérone

UR-ABAQ : Unité de Recherche en Aquaculture et Biodiversité Aquacole

UNB : Université Nazi Boni

Résumé

Le tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus* est l'une des espèces africaines les plus largement élevées dans le monde. De nos jours, la pureté génétique des souches domestiquées et sauvages de cette espèce est de plus en plus menacée par les améliorations génétiques et la pression sur les écosystèmes aquatiques. Une considération plus importante doit donc être accordée à la conservation des souches africaines de *Oreochromis niloticus*. Cette étude a pour objectif de tester l'efficacité de quatre dilueurs synthétiques (dilueur de Mounib, Ringer, Ringer modifié et Freshwater Fish Saline) sur la cryoconservation des semences de la souche de *O. niloticus* du lac de la vallée du Kou (Bama) au Burkina Faso. L'étude a été menée sur 3 lots de 5 mâles dont un lot de mâles sauvages, pêchés dans le lac de la vallée du Kou et les deux lots issus des mêmes parents qui se sont reproduit en aquarium. Les poids moyens dans chaque lots étaient respectivement $228 \pm 65,93\text{g}$; $180,80 \pm 44,65\text{g}$ et $177,60 \pm 25,33\text{g}$. Les deux lots de mâles issus des mêmes parents (lot 2 et 3) n'ont pas donné de laitance après pression abdominale. Les données ont été donc collectées sur le lot de mâles pêchés dans le lac de la vallée du Kou. Les résultats sur les volumes de laitance recueillie ont donné des valeurs de $0,012 \pm 0,015\text{ml}$ à $0,030 \pm 0,008\text{ml}$. Les concentrations en spermatozoïdes et les durées de motilité ont respectivement variés de $3,20 \pm 0,59 \times 10^9$ spz/ml à $10,04 \pm 0,87 \times 10^9$ spz/ml et $7,64 \pm 1,80$ mn à $16,83 \pm 7,13$ mn. Les pH et la motilité de la laitance ont respectivement variés de 7 à 8 et de $2,33 \pm 1,15$ à $4,66 \pm 0,57$. L'ensemble des caractéristiques spermatiques ont révélé une bonne qualité des semences de la souche de *O. niloticus* de la vallée du Kou et cela pourrait ouvrir des perspectives pour leur cryoconservation. Par contre la courte durée des essais de congélation n'a pas permis d'avoir des résultats très satisfaisants sur les tests des dilueurs. Seuls les dilueurs de Ringer modifié et Freshwater Fish Saline ont permis d'avoir de faible activation des spermatozoïdes (valeur de motilité = 1) après congélation pendant 72 heures.

Mots clés : dilueur, cryoconservation, laitance, motilité, souche locale, *O. niloticus*.

Abstract

Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* is one of the African species largely reared in the world. Nowadays, the genetic purity of domestic and wild strain of this species is more and more threatened by the genetic improvements and pressure on the aquatic ecosystems. Consideration must be given to the conservation of the african's strain of *Oreochromis niloticus*. The aim of this study is to evaluate the efficiency of four synthetic extenders (Mounib, Ringer, Ringer modified and Freshwater Fish Saline) on the sperm cryopreservation of *O. niloticus*'s strain coming from Kou valley's lake (Bama) in Burkina Faso. Three groups of five males are concerned by this study. The thirist group was constituted by wild males introduced from Kou valley's lake. The males of two last groups are the progenies of a same reproduction in aquaria. The mean bodyweight in every group were respectively $228 \pm 65.93\text{g}$; $180.80 \pm 44.65\text{g}$ and $177.60 \pm 25.33\text{g}$. The males of two last groups (group 2 and 3) didn't give semen after stripping. The data have been collected therefore on wild males introduced from Kou valley's lake. The sperm volumes were 0.012 ± 0.015 ml to 0.030 ± 0.008 ml. Sperms concentrations and motilities durations varied respectively from $3.20 \pm 0.59 \times 10^9$ spz/ml to $10.04 \pm 0.87 \times 10^9$ spz/ml and 7.64 ± 1.80 min to $16.83 \pm 7.13\text{mn}$. The pH and motility varied from 7 to 8 and 2.33 ± 1.15 to 4.66 ± 0.57 . The whole characteristic revealed that the sperm of the *O. niloticus* originated from Kou valley's lake are good quality. In contrast, the short time of freezing attempt didn't permit to have very satisfactory results on the extenders tests. Only Ringer modified and Freshwater Fish Saline permitted to have weak activation of the spermatozoa (value of motility = 1) after freezing during 72 hours.

Key words: extender, cryopreservation, sperm, motility, local strain, *O. niloticus*,

Introduction

La sécurité alimentaire et nutritionnelle constitue des défis majeurs pour les pays en voie de développement. Les nombreux efforts consentis dans le sous-secteur de l'agriculture et de l'élevage n'ont pas encore permis de relever ces défis. C'est dans ce contexte que la production aquacole pourrait contribuer à relever les défis qui se présenteront pour alimenter une population en pleine expansion. En effet, la richesse des ressources génétiques halieutiques offre de grandes possibilités pour renforcer la contribution des secteurs de l'aquaculture et de la pêche à la sécurité alimentaire (FAO, 2010). L'essentiel de cette richesse génétique halieutique se retrouve dans les eaux africaines (Levêque et Paugy, 2006) mais elle reste largement inexploitée (FAO, 2010). Au niveau mondial, l'aquaculture est en plein essor (FAO, 2016) mais le développement de la production piscicole ne repose que sur quelques espèces domestiquées (Shelton et Rothard, 2006 ; Lazard, 2013). Parmi celles-ci, *Clarias gariepinus* et *Oreochromis niloticus* sont les principales espèces utilisées en pisciculture dans les eaux continentales africaines. *O. niloticus* occupe également avec les autres tilapias, la 2^{ème} place de la production aquacole mondiale (Lazard, 2009). Originaire d'Afrique, cette espèce est largement élevée dans le monde en raison de sa rusticité, sa croissance rapide, sa reproduction facile, son régime alimentaire plastique et sa qualité organoleptique (Lazard, 2009). Pourtant, sa diversité génétique est de plus en plus menacée. L'ensemble des réserves exotiques de tilapia serait disséminé dans le monde à partir d'un nombre restreint de géniteurs africains résultant ainsi d'une perte de variabilité génétique (Rana et Mc Andrew, 1989). Par ailleurs, les souches domestiquées de tilapia font l'objet d'une pression de sélection pour la production de populations monosexes mâles. En effet, chez *O. niloticus* les mâles ont les meilleures performances de croissance (Toguyéni, 1996). Les techniques de production de populations monosexes mâle permettraient donc d'éviter les reproductions incontrôlées et d'obtenir les meilleurs rendements. Ces techniques incluent le sexage manuel, l'hybridation, l'inversion hormonale, chimique et thermique ainsi que l'utilisation de super géniteurs YY (Lazard, 2009 ; Toguyéni, 1996). Cependant, l'utilisation de ces techniques sur les souches domestiquées de *O. niloticus* et les menaces d'introduction d'espèce, de surpêche et de pollutions qui pèsent sur les populations sauvages pourraient également entraîner un rétrécissement irréversible de la base génétique de cette espèce. Dans un tel contexte il est indispensable de mettre en place des stratégies de conservation et de valorisation des souches africaines de tilapia. Il existe deux méthodes de conservation de la pureté du matériel génétique : la conservation *in situ* et la conservation *ex situ* (*in vivo* et *in*

vitro) (FAO, 1993). La conservation *in situ* est la préservation d'un organisme dans son milieu naturel. La conservation *ex situ* comprend la préservation d'un organisme hors de son milieu naturel (*ex situ in vivo*) et la conservation du matériel génétique au laboratoire (*ex situ in vitro* : conservation du sperme, d'embryon, d'ovocytes, etc.). La conservation *in situ* et *ex situ in vivo* présentent certains inconvénients chez les poissons dont le coût de maintien des géniteurs, la capacité d'hybridation de certaines espèces, le risque de pertes de certains géniteurs (maladies, accidents etc.), l'impact de l'environnement sur le matériel génétique, l'impossibilité du retour à une souche en cas de perte de géniteurs (Maisse *et al*, 1998). Ainsi, pour une conservation durable et une meilleure gestion des souches locales de tilapia une conservation *ex situ in vitro* de son matériel génétique au moyen de la cryoconservation s'avère nécessaire. Le Burkina Faso est une aire de répartition originelle (Jackson, 1988 ; Lacoix, 2004) de *O. niloticus* et pourrait constituer de ce fait un réservoir de matériel génétiques pures des souches locales. Le présent thème intitulé « Etude des caractéristiques spermatiques des semences de la souche locale Kou de Tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)» s'inscrit dans le cadre de la cryoconservation du sperme des souches locales de *O. niloticus* du Burkina Faso. L'objectif global de cette étude est de contribuer à la valorisation de la diversité génétique aquatique de l'Afrique de l'Ouest. Cette étude est un prélude à la mise en place des dilueurs locaux de cryoconservation des semences mâles de tilapia. Il s'agira spécifiquement dans cette étude :

1. de tester l'efficacité des dilueurs mis au point chez d'autres souches de tilapia ou chez d'autres espèces de poisson pour la cryoconservation du sperme de la souche Kou de *O. niloticus* ;
2. d'identifier les effets de la cryoconservation sur les caractéristiques spermatiques de cette souche.

Les hypothèses qui sous-tendent cette étude s'énoncent comme suit :

1. les dilueurs déjà testés chez d'autres souches de tilapia ou d'autres poissons seraient aussi efficace pour la cryoconservation du sperme de la souche Kou de *O. niloticus*;
2. la cryoconservation pourrait avoir des effets potentiellement négatifs sur les caractéristiques spermatiques de cette souche.

Le présent mémoire est structuré en deux parties. La première partie intitulée synthèse bibliographique aborde les généralités sur l'espèce et la cryoconservation de spermes chez les poissons. La deuxième partie relative à l'étude expérimentale présente le matériel utilisé; la méthodologie adoptée et les résultats et discussion.

Première partie : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Présentation de l'espèce

1. Berceau et aire de répartition

Les études sur la variabilité génétique des populations de *O. niloticus* suggèrent que cette espèce est originaire du bassin du Nil (Gourène et Agnès, 1994 ; Levêque et Paugy, 2006). Du fait des interconnexions entre les bassins du Tchad et du Nil, l'aire de répartition naturelle de cette espèce couvre les bassins du Nil, du Tchad, de la Volta, du Niger, du Sénégal, du Jourdain ainsi que les lacs du graben Est-africain jusqu'au lac Tanganyika (Levêque et Paugy, 2006) (Figure 1). Elle a été principalement introduite en Asie, en Amérique centrale, en Amérique latine et en Europe.

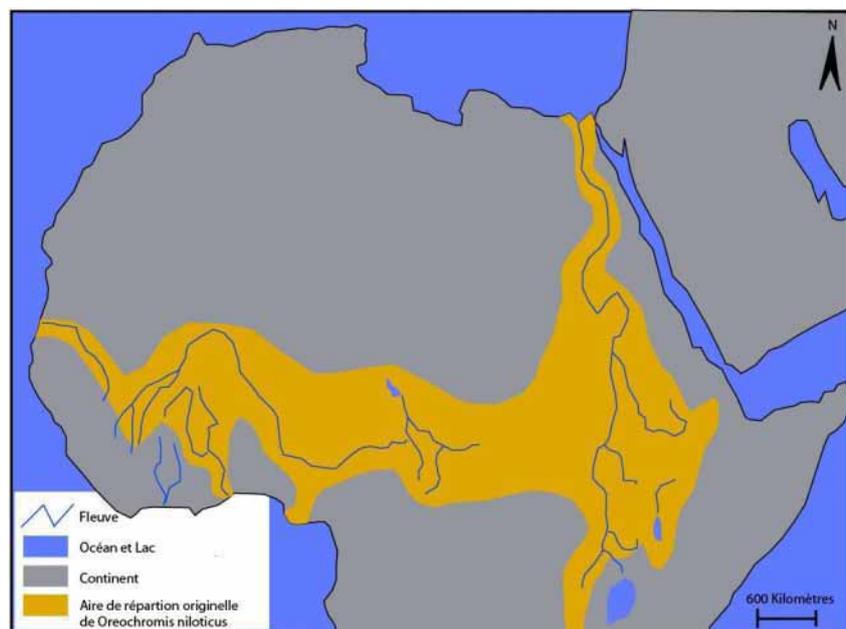


Figure 1 : Aire de répartition originelle de *Oreochromis niloticus*

2. Systématique et description

Le groupe des tilapias appartient à l'ordre des *Perciformes*, à la famille des *Cichlidae* et à la sous famille des *Tilapinae*. Cette sous famille a été subdivisé en quatre genres suivant les caractères anatomiques, le comportement reproducteur et la nutrition (Trewavas, 1983) :

- le genre *Tilapia* regroupant les espèces macrophytophages pondéuses sur substrat ;
- le genre *Sarotherodon* regroupant les planctonophages incubateurs buccaux avec garde biparentale ou paternelle ;
- le genre *Oreochromis* composé d'espèces planctonophages incubateurs buccaux avec garde uniparentale maternelle ;
- le genre *Danakilia* ayant des caractéristiques éco-morphologiques particulières.

Le genre *Oreochromis* renferme une trentaine d'espèce parmi lesquelles fait partie *O. niloticus* dont la position systématique est la suivante :

Embranchement	: Vertébrés
Sous-embranchement	: Gnathostomes
Super classe	: Poissons
Classe	: Osteichtyens
Sous-classe	: Téléostéens
Ordre	: Perciformes
Sous-ordre	: Percoïdés
Famille	: Cichlidés
Sous-famille	: Tilapinés
Genre	: <i>Oreochromis</i>
Espèce	: <i>niloticus</i>

L'espèce *O. niloticus* présente une teinte générale grisâtre (photo 1). Sa poitrine et ses flancs sont rosâtres et son corps est plus ou moins comprimé et recouvert d'écailles cycloïdes (Levêque et Paugy, 2006). Il se distingue des autres tilapias par ses rayures verticales régulières sur la nageoire caudale. Sa nageoire dorsale formée d'une seule pièce comprend une partie épineuse présentant 17 à 18 épines et une partie molle comptant 12 à 14 rayons souples (Lacroix, 2004). Son corps présente une ligne latérale discontinue. La ligne latérale supérieure couvre 21 à 24 écailles et la ligne latérale inférieure couvre 14 à 18 écailles (Lacroix, 2004 ; Levêque et Paugy, 2006).

Chez *O. niloticus* il existe un dimorphisme sexuel de la papille génitale. Chez les mâles, la papille génitale est allongée et ne présente que deux orifices alors que chez les femelles elle est courte et présente une fente transversale (oviducte) entre l'anus et l'orifice urétral.

Cette caractéristique permet de distinguer aisément les mâles et les femelles lorsqu'ils atteignent un poids de 30g soit une taille de 12 cm (Lacroix, 2004).



Photo 1 : Spécimen de l'espèce *Oreochromis niloticus* objet de la présente étude

3. Menaces sur la faune ichthyologique africaine

La biodiversité aquatique est principalement menacée par les activités humaines et le réchauffement global. La perte d'habitats résultant le plus souvent des travaux d'aménagement, la surexploitation des espèces, les pollutions d'origine diverses et les introductions d'espèces étrangères sont les principaux risques qui pèsent sur la diversité aquatique de nombreux pays africains (FAO, 1993 ; Levêque et Paugy, 2006). Les conséquences de ces activités sont amplifiées par l'accroissement de la population qui entraîne une pression de plus en plus forte sur les ressources naturelles, mettant en danger la faune ichthyologique (Levêque et Paugy, 2006).

3.1. Aménagement et Perte d'habitats

L'altération de l'habitat est une des menaces les plus importants pour la faune ichthyologique. Les aménagements sur les cours d'eau présentent une entrave majeure à la survie de beaucoup d'espèces. La création des lacs de retenu en amont des cours d'eau élimine les espèces inféodées aux eaux courantes (Levêque et Paugy, 2006). Les modifications du régime des crues à l'aval et notamment la régularisation du débit perturbe la biologie des espèces qui se reproduisent habituellement dans les zones inondées. Il en résulte une simplification des peuplements avec la disparition de certaines espèces (Levêque et Paugy, 2006). En région tropicale les barrages empêchent les espèces migratrices de remonter vers l'amont au moment des crues, pour se reproduire dans les milieux favorables. Il en résulte également la perte de

nombreuses espèces. Un effet indirect de ces aménagements est la pollution des eaux par les engrais, les sols emportés par l'érosion et les déchets humains (FAO, 1993). Ces pollutions entraînent généralement une eutrophisation (augmentation de la biomasse algale) qui asphyxie les cours d'eau et une réduction de la superficie des cours d'eau entraînant la disparition de nombreuses espèces (Paugy et Lévêque, 2007).

3.2. Surexploitation des espèces aquatiques

La pression démographique, la forte demande en poisson et la faible contribution de l'aquaculture ont entraîné une surexploitation des poissons dans les cours d'eau africaines menaçant ainsi la diversité spécifique.

En effet, la demande croissante en poisson a entraîné l'utilisation d'engins de pêche plus performants (chaluts de fond), non sélectifs (FAO, 1993) et surtout prohibés. Ces engins permettent de capturer beaucoup de poissons, ainsi que les individus immatures. Les populations des espèces qui ne peuvent plus se reproduire donc s'effondrent dramatiquement (FAO, 1993). Ces méthodes de pêche ont surtout un impact considérable sur le maintien des peuplements de Cichlidés en raison principalement de leur faible fécondité. Les Cichlidés constituent près de 30 à 50% des captures de poisson en Afrique de l'Ouest (Lévêque et Paugy, 2006).

3.3. Introduction de tilapia étrangère dans les écosystèmes aquatiques Ouest-africain

Au regard de son intérêt pour l'aquaculture mondiale, le tilapia du Nil a fait l'objet d'une très grande introduction dans le monde (Lazard, 2009). Pour améliorer la performance de cette espèce, des souches génétiquement améliorées (GIFT, Genetically Improved Farmed Tilapia) ont été mis en place aux Philippines dans les années 1980 (Lazard, 2009). Ces souches GIFT obtenues des croisements des souches africaines et asiatiques ont été introduites dans plusieurs pays et récemment en Côte d'Ivoire et au Ghana (DPH, 2009 ; Lazard, 2009). Pourtant les souches sauvages et domestiques d'*Oreochromis niloticus* d'Afrique Subsaharienne ont déjà montré un grand potentiel pour l'élevage dans les conditions de la pisciculture africain (Lazard, 2009). L'introduction de ces souches GIFT "synthétiques" pourrait donc compromettre la pureté génétique des stocks naturels du tilapia par le biais des croisements (Lazard, 2009).

4. Physiologie de la reproduction

4.1. Stratégie de reproduction

La période de reproduction du tilapia du Nil est étalée sur toute l'année lorsque les températures sont supérieures à 22°C (Philippart et Ruwet, 1982). Cette reproduction est liée à un ensemble de comportement physiologique ou éthologique.

Lorsque les conditions sont favorables, chaque mâle défend un territoire et creuse un nid dans les zones littorales où il cherche à attirer une femelle. C'est une organisation en arène de reproduction. Lorsqu'une femelle courtisée est attirée dans un nid, une parade de synchronisation sexuelle s'ensuit et la femelle dépose des tas successifs d'ovules qui sont immédiatement fécondés par le mâle (en lâchant la laitance sur ces ovules). La femelle reprend alors dans sa bouche les œufs fécondés pour les incubés (Lacroix, 2004). Durant cette période la femelle ne s'alimente presque pas. Une femelle peut se reproduire successivement tous les 4 à 6 semaines et il n'y a pas de synchronisation dans le cycle reproducteur des femelles d'une même population. Ceci se traduit par une production continue d'alevins.

4.2. Appareil génital mâle et gamétogénèse

4.2.1. Origine des constituants gonadiques et différenciation sexuelle

La mise en place des gonades commence au cours de l'embryogénèse (Legendre et Jalabert, 1988). Durant cette période il y a ségrégation de certaines cellules appelées cellules germinales primordiales ou gonocytes primordiaux. Ces cellules migrent ensuite grâce à des pseudopodes et se concentrent dans la région de formation des futures gonades (primordium gonadique). La différenciation ultérieure de ces cellules germinales primordiales en spermatogonies ou ovogonies ainsi que les changements structuraux du primordium gonadique sont sous l'influence de facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux (Legendre et Jalabert, 1988). Chez le tilapia la différenciation se produit entre 9 et 15 jours après la fécondation (D'Cotta *et al.*, 2007). La gamétogénèse peut être déclenchée à l'âge de 3 mois. Le déclenchement de la puberté dépend probablement, en plus des facteurs génétiques, des facteurs environnementaux et en particulier la température et la photopériode (Hyder, 1970).

4.2.2. Anatomie des testicules et spermatogénèse

Chez la plupart des téléostéens, le testicule est un organe pair situé dans la partie dorsale de la cavité abdominale. Il est prolongé postérieurement par un canal déférent (spermiducte) se terminant au niveau de la papille génitale (Legendre et Jalabert, 1988). Deux types de structures testiculaires peuvent être identifiés selon le mode de spermatogénèse (Billard *et al.*, 1982 ; Legendre et Jalabert, 1988). Il s'agit du type lobulaire et du type tubulaire (Figure 2).

Le type lobulaire présente un aspect lobé en histologie. Les cellules germinales contenues dans les cystes migrent très peu au cours de leur évolution et les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière centrale des tubes en communication avec le canal déférent. Dans le type tubulaire les cystes de cellules germinales sont localisés à l'extrémité des tubules et durant la spermatogénèse ils migrent vers la cavité centrale des testicules où sont libérés les spermatozoïdes. Chez les tilapias le type de structure testiculaire est le type tubulaire (Chao *et al.*, 1987).

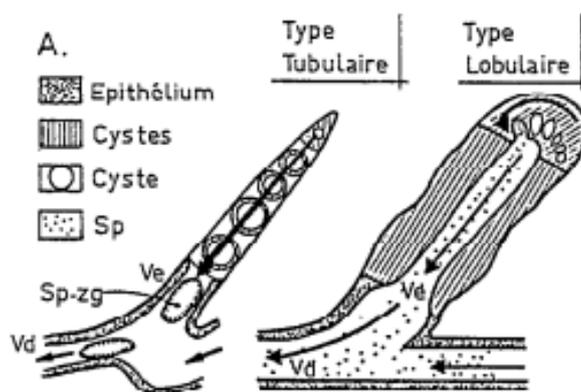


Figure 2 : Représentation schématique de deux types de structures testiculaires rencontrés chez les téléostéens (*in* Legendre et Jalabert, 1988). *Ve* : Canal efférent; *Vd* : Canal déférent ; *Sp* : Spermatozoïde ; *Sp-zg* : Spermatozeugme

4.2.3. Notion de spermatogénèse chez les tilapias

Le processus de spermatogénèse regroupe l'ensemble des phases cytologiques conduisant à l'élaboration des spermatozoïdes à partir des cellules indifférenciées (spermatogonies A), elles-mêmes issues des cellules germinales de l'embryon. La spermatogénèse peut avoir suivant les espèces, un caractère continu (tilapia) ou saisonnier (poisson chat) (Billard *et al.*, 1982). Une coupe histologique du testicule de tilapia révèle une organisation du testicule en plusieurs lobules (Figure 3) (Hyder, 1970 ; Msiska, 2002). Les lobules qui contiennent les étapes les plus avancés de la spermatogénèse sont localisés au centre de la gonade. Il semble

qu'un groupe de cellules germinales primordiales et de spermatogonies primaires se regroupent dans un tissu conjonctif de la paroi testiculaire pour former les premiers lobules de grandes tailles à la périphérie du testicule (Hyder, 1970). Une proportion de spermatogonies primaires entourées de cellules somatiques subit une division mitotique pour former les spermatogonies secondaires. Ces derniers restent encapsulés à l'intérieur d'une couche de cellules somatiques qui retient tous les produits issus de la division des spermatogonies primaires résultant d'une cellule caractéristique appelée cyste. D'autres divisions mitotiques des spermatogonies secondaires aboutiront aux spermatocytes primaires puis après les deux divisions de la méiose aux spermatides qui sont toujours retenus à l'intérieur de la paroi des cystes. Chaque spermatide subit une série de transformation cytologique (élaboration du flagelle, diminution du cytoplasme, condensation de la chromatine etc.) et se différencie en spermatozoïdes. A cette étape, les parois des cystes devenus minces se rompent pour libérer les spermatozoïdes dans la lumière des lobules, c'est la spermiation.

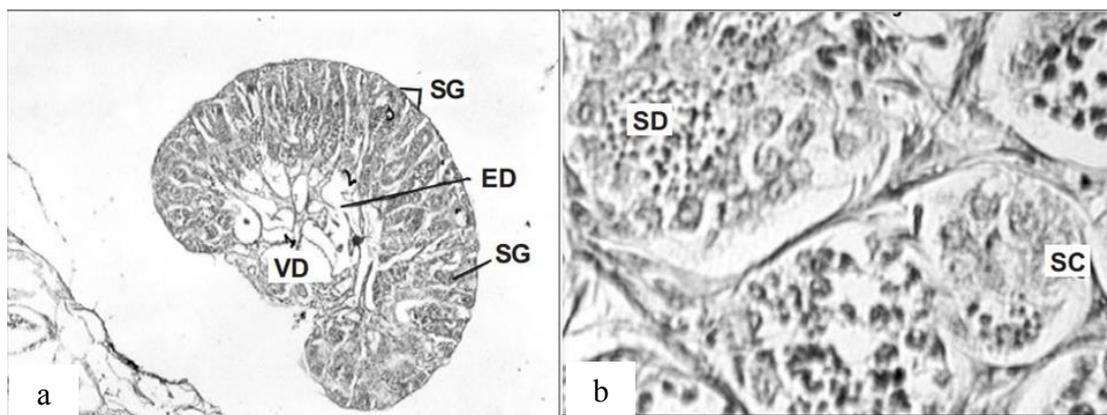


Figure 3 : Coupe histologique du testicule du tilapia du Nil (a) et évolution de la spermatogenèse (b) (*in* Herrera *et al.*, 2001). VD : canal déférent ; ED : canal efférent ; SG : cellules germinales ; SC : spermatocytes ; SD : spermatides.

4.2.4. Spermiation

Le terme spermiation correspond à la séparation des dernières spermatides des cellules de Sertoli et la libération des spermatozoïdes dans la lumière des lobules. Cette définition est valide pour les poissons de type tubulaire dans lequel les spermatides sont implantées dans les cellules du cyste. Chez les poissons à testicule lobulaire la spermiation correspond à une hydratation du sperme laquelle est hormone dépendante (Billard *et al.*, 1982). La dilution du sperme dû à l'hydratation augmente probablement la pression intralobulaire et permet aux spermatozoïdes d'émigrer vers le canal déférent où ils peuvent être stockés (Billard *et al.*, 1982).

4.2.5. Libération du sperme

La libération du sperme est plus spécifiquement l'expulsion du sperme à travers la papille génitale et les mécanismes nerveux sont probablement impliqués dans la libération naturelle du sperme (éjaculation) (Billard *et al.*, 1982). Cette libération se fait par contraction abdominale lors de la reproduction. La libération du sperme doit être une synchronisation entre mâles et femelles à cause de la très courte durée de vie des spermatozoïdes dans l'eau. Lors de l'émission du sperme (éjaculation), les spermatozoïdes sont libres dans le plasma séminal chez les espèces à fécondation externe alors qu'ils sont souvent groupés en spermatophores ou spermatozeugmes (Figure 3 ci-dessus) chez les espèces à fécondation interne (Billard *et al.*, 1982).

5. Notion de sperme chez les poissons

Le sperme chez les poissons est généralement un liquide blanc laiteux, couleur qui lui a valu la dénomination courante de laitance (Maisse, 1990). Il est composé de spermatozoïdes en suspension dans un fluide séminal.

5.1. Fluide séminal

Une partie du fluide séminal serait originaire des lobules et le reste proviendrait de l'épithélium du canal efférent et du canal déférent (Billard *et al.*, 1982). Le fluide séminal peut occuper 80% du volume total du sperme (Maisse, 1990). Son rôle est de créer un environnement optimal pour le stockage des spermatozoïdes. C'est un mélange complexe contenant des ions, des antioxydants et des protéines.

Les principaux ions du fluide séminal sont le Na^+ , le K^+ , le Ca^{2+} , le Mg^{2+} et le Cl^- (Maisse, 1990, Sadiqul Islam et Akhter, 2011). Les antioxydants comprennent les antioxydants non enzymatiques (acide ascorbique, acide urique, alpha-tocophérol) et les enzymes antioxydants (superoxydase dismutase, le glutathion réduit, la catalase et le glutathion peroxydase) qui protègent les spermatozoïdes des dommages oxydatifs (Shalutina, 2013). Les protéines qui ont été identifiées dans le fluide séminal du tilapia sont le Sperm Plasma glycoprotein 120 (SPP120) et l'Ubiquitins (Shalutina, 2013). Ces protéines sont également impliquées dans la protection des spermatozoïdes lors de leur stockage.

Le pH et l'osmolarité du fluide séminal peuvent servir d'indicateurs de la qualité du sperme. Ils varient selon les espèces et dans une même espèce d'un individu à un autre (Maisse, 1990). Chez le tilapia les valeurs de pH varient de 6,2 à 8,2 et l'osmolarité de 240 à 380 mosmol/kg (Chao *et al.*, 1987).

5.2. Spermatozoïde

Plusieurs études indiquent des variations larges dans les modèles morphologiques et morphométriques de spermatozoïdes chez les téléostéens (Lou et Takahashi, 1989 ; Sadiqul Islam et Akhtar, 2011). Mais ces études semblent suggérer une relation possible avec le mode de reproduction dans le groupe de poisson considéré. De par sa morphologie le spermatozoïde du tilapia fait partie du type simple (Figure 4). Il a une tête arrondie avec 2 µm de diamètre moyen, une petite pièce intermédiaire excentrique d'approximativement 1,5 µm de longueur et un flagelle relativement court de 20,3 µm de longueur (Lou et Takahashi, 1989). La portion de la tête est occupée essentiellement par des globules de chromatine et le noyau est dépourvu d'acrosome. La pièce intermédiaire renferme généralement à sa base 8 à 10 mitochondries dans un cytoplasme réduit. Le flagelle contient un axonème qui comprend 9 microtubules périphériques et 2 microtubules centraux (type 9 + 2). La membrane plasmique flagellaire présente deux extensions cytoplasmiques latérales (Lou et Takahashi, 1989).

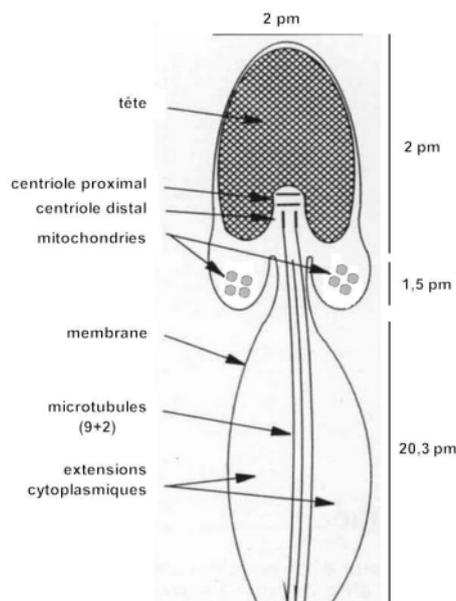


Figure 4 : Ultrastructure du spermatozoïde de tilapia (adapté de Maisse, 1990)

6. Régulation de la reproduction

6.1. Rôle des facteurs externes

La reproduction chez les téléostéens comme les autres vertébrés est un phénomène cyclique contrôlé à la fois par un rythme physiologique interne et par les variations saisonnières de l'environnement (Legendre et Jalabert, 1988). Chez la plupart des animaux la reproduction précède plus ou moins une période où les facteurs du milieu sont le plus favorables à la survie des jeunes et donc à la pérennité de l'espèce. En générale, les facteurs environnementaux qui

influencent la reproduction des poissons sont la température, la photopériode, la luminosité, les facteurs sociaux (densité, sexe ratio) et le substrat sur lequel les œufs sont pondus (Baroiller *et al.*, 1995).

Le tilapia du Nil cesse de se reproduire à des températures inférieures à 22°C (Charo-Karissa *et al.*, 2005). Les hautes températures induisent également des masculinisations chez cette espèce (Baroiller *et al.*, 1995; Sissao, 2014). L'intensité et la durée de l'éclairage peuvent favoriser la maturation ovarienne chez le tilapia (Lévêque et Paugy, 2006). Les fortes densités peuvent aussi entraîner une inhibition physiologique ou comportementale chez les espèces territoriales comme le tilapia (Tsadik et Bar, 2007). Les facteurs de stress comme le confinement ou les manipulations en captivité peuvent provoquer une augmentation du taux de cortisol (Bobe *et al.*, 2014) et bloquer différentes phases de la gamétogénèse chez plusieurs espèces (Billard *et al.*, 1980). Enfin, les conditions d'élevage favorables peuvent retarder l'ontogénèse gonadique chez le tilapia du Nil (Toguyéni, 1996).

6.2. Rôle des facteurs internes

Le complexe hypothalamo-hypophysaire sert de lien entre l'environnement et les organes reproducteurs chez les poissons (Legendre et Jalabert, 1988). L'hypothalamus stimule ou inhibe l'activité de l'hypophyse des poissons téléostéens par l'intermédiaire d'une hormone libérante (GnRH) et d'un facteur hypothalamique inhibiteur, la Gonadotropine Release Inhibitory Factor (GRIF). En réponse aux stimuli de l'hypothalamus, l'hypophyse secrète plusieurs hormones parmi lesquelles les gonadotropines exerceraient un rôle majeur sur l'activité des gonades (Legendre et Jalabert, 1988 ; Bobe *et al.*, 2014). La Folliculo-Stimulating Hormone (FSH) et la Luteinizing Hormone (LH) sont les deux gonadotropines suspectés d'être impliqués dans la spermatogénèse chez les tilapias (Hyder, 1970).

La FSH semble intervenir dans les premières phases de la spermatogénèse chez le tilapia et serait responsable de la croissance des spermatogonies chez plusieurs téléostéens (Schulz et Miula, 2002). La LH stimulerait la production ultérieure de la testostérone avec ou sans l'influence de la FSH (Hyder, 1970). La testostérone jouerait un rôle régulateur dans la production de la FSH (Schulz et Miula, 2002). C'est la 11 Cétostestostérone (11KT) qui est susceptible d'être responsable de la prolifération des spermatogonies et de la stimulation des différentes étapes de la spermiogénèse chez les poissons (Schulz et Miula, 2002).

D'autres stéroïdes tels que l'œstradiol et les progestines sont également susceptibles d'agir sur la spermatogénèse chez les téléostéens (Schulz et Miula, 2002 ; Bobe *et al.*, 2014). Les

progestines seraient impliqués dans l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes et dans l'hydratation du sperme. L'œstradiol serait impliqué dans la prolifération des spermatogonies (Bobe *et al.*, 2014).

Chapitre II : Conservation de la laitance chez les poissons

1. Collecte de la laitance

La collecte de la laitance chez les poissons se fait par pression abdominale (stripping) ou par dilacération des testicules dans une solution tamponnée (Milon, 2013). Dans ce dernier cas la suspension de laitance est recueillie après centrifugation. Le prélèvement des testicules pour la collecte de la laitance nécessite le sacrifice des mâles et est surtout appliqué chez les poissons à reproduction saisonnier comme les Clarias. Pour les poissons à spermatogénèse continu comme le tilapia, la laitance peut être recueillie par simple pression abdominale. A la suite de cette pression, la laitance est aspirée au niveau de la papille génitale avec une seringue, une pipette pasteur ou tout autre matériel adéquat. La collecte par pression abdominale nécessite beaucoup d'attention. Un manque d'attention peut entraîner la contamination de la semence avec la sortie du liquide fécale ou de l'urine (Rana et Mc Donald, 1989 ; Milon, 2013). Une pression abdominale trop forte peut également engendrer les blessures et même la mort de l'animal (Milon, 2013).

2. Volume de la laitance

Le volume de la laitance recueillie varie en fonction des espèces et pour une même espèce, il varie en fonction de la taille de l'individu et l'avancement de la période de spermiation (Maisse, 1990). Chez les espèces comme les salmonidés le volume d'un éjaculat peut dépasser 50 ml (Maisse, 1990). Chez les tilapias par contre, le volume de laitance recueillie par pression abdominale est d'environ 0,3 ml (Chao *et al.*, 1987) et chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) il est de l'ordre de 0,001 à 0,003 ml (Milon, 2013). Il faut noter que l'estimation du volume de laitance collectée par pression abdominale n'a pas fait l'objet d'une grande documentation au niveau des poissons. La quantité de laitance collectée chez le poisson n'exprime pas la quantité réellement produite (Billard *et al.*, 1971). La majeure partie des études d'évaluation de la quantité de la laitance a pour la plupart porté sur la détermination de l'indice gonadosomatique (poids testicules/poids total de l'individu) (Billard *et al.*, 1971 ; Gennotte *et al.*, 2012.)

3. Caractéristique spermatiques

Les paramètres communément utilisés pour estimer la qualité de la laitance chez les poissons incluent la concentration en spermatozoïdes, les propriétés chimiques et la composition du liquide séminal, la motilité des spermatozoïdes, le métabolisme de la laitance, la morphologie,

l'ultrastructure, la qualité de la membrane plasmique, la qualité du noyau et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Ces paramètres ne présentent pas la même pertinence ou la même objectivité dans l'évaluation de la qualité du sperme et l'utilisation de certains d'entre eux peut donner une meilleure vue d'ensemble (Gennotte *et al.*, 2012).

3.1. Concentration en spermatozoïde

La concentration exprime le nombre de spermatozoïde par millilitre de sperme. Elle peut être déterminée directement par la numération des spermatozoïdes au moyen d'un hématimètre ou indirectement par la spectrophotométrie, la cytométrie en flux et la valeur des spermatocrites (Fauve *et al.*, 2010). La détermination de la concentration par la spectrophotométrie ou par la cytométrie à flux consiste à observer les variations de la densité optique des spectres d'absorption d'une suspension de sperme à des longueurs d'ondes appropriés (Billard *et al.*, 1971 ; Fauve *et al.*, 2010). La méthode de la valeur des spermatocrites consiste à déterminer la densité des spermatozoïdes après centrifugation (Fauve *et al.*, 2010). Chacun de ces techniques présente des inconvénients (Fauve *et al.*, 2010). Cependant, la méthode de base pour la détermination de la concentration est la numération au moyen d'un hématimètre (Fauve *et al.*, 2010). Elle consiste à compter le nombre de spermatozoïdes sur une zone quadrillée de l'hématimètre et à déterminer la concentration par une formule de calcul établie en fonction de chaque hématimètre. Cette méthode exige une dilution préalable du sperme dans une solution susceptible de fixer les spermatozoïdes et de se rependre sur toute la surface de la zone de numération (solution physiologique formolé à 4% ou solution d'eau physiologique de NaCl à 8 ‰ (Billard *et al.*, 1971)). Le taux de dilution varie en fonction des auteurs et des cellules hématimétriques utilisées. Cependant un taux de dilution de 1/2000 est couramment utilisé (Billard *et al.*, 1971 ; Legendre et Billard, 1980 ; Gennotte *et al.*, 2012 ;).

Exemple d'hématimètre : la cellule de Neubauer

Un hématimètre est généralement constitué d'une lame de verre creusé d'une petite cuvette dont le fond est garni d'un quadrillage. Il existe plusieurs types d'hématimètre (cellule de Malassez, de Thoma, de Bürker, de Neubauer, etc.) qui se caractérisent par leur surface et la profondeur de leur chambre de numération.

La cellule de Neubauer est divisée en trois zones de quadrillage dont quatre grands carrés reparties aux quatre angles droits (Figure 5). Chaque grand carré comporte 16 petits carrés (cellules) de 0,25 mm de côté à l'intérieur desquelles s'effectue le comptage des spermatozoïdes. Par convention, pour les spermatozoïdes situés sur la ligne des carreaux, on

compte seulement ceux touchant la ligne supérieure et la ligne de droite (CSCQ, 2010). La hauteur de la chambre de numération de la cellule est de 0,1 mm. La concentration du sperme est déterminée par la formule générale suivante :

$$\text{Concentration} = \frac{\text{nombre de spermatozoïde} \times \text{facteur de dilution} \times \text{facteur de conversion}}{\text{nombres de carrés} \times \text{volume d un carré}}$$

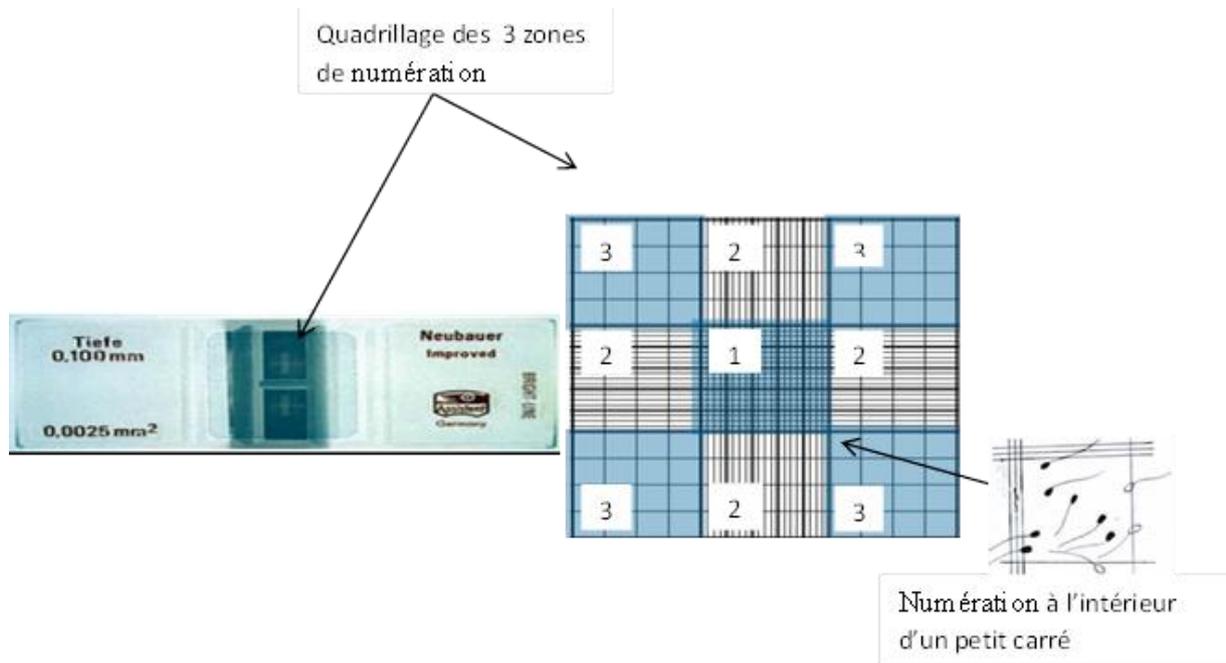


Figure 5 : Cellule de Neubauer utilisée pour la numération des spermatozoïdes (CSCQ, 2010)

3.2. Motilité des spermatozoïdes

Chez les poissons les spermatozoïdes sont immobiles dans le plasma séminal. Ils n'acquièrent leur motilité qu'au contact de l'eau (eau considérée comme milieu de fécondation) (Harvey et Hoar, 1980). On appelle activation le processus d'acquisition de cette motilité. La motilité des spermatozoïdes peut être étudiée d'une manière globale à partir d'une échelle de notation de Sanchez-Rodriguez et Billard (1977) présentée dans le tableau I ci-dessous. Il existe de nos jours des analyseurs d'image de type CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) qui permettent de quantifier de manière plus précise la nature et la vitesse de déplacement des spermatozoïdes (Rurangwa *et al.*, 2004 ; Gennotte *et al.*, 2012). Comme la motilité intègre différentes caractéristiques cellulaires et séminales, il apparaît comme l'estimateur le plus objectif et le plus fiable pour évaluer la qualité des semences (Legendre et Billard, 1980 ; Chao *et al.*, 1987 ; Gennotte *et al.*, 2012, Shaliutina, 2013). Bien qu'elle ne soit pas une garantie absolue de fécondité, les spermatozoïdes qui ont perdu leur motilité sont incapables de fécondation (Billard *et al.*, 1971).

Tableau I : Echelle arbitraire pour apprécier la motilité des spermatozoïdes (*in* Sanchez-Rodriguez et Billard, 1977)

Valeur	Observations
5	Tous les spermatozoïdes se déplacent vigoureusement ; impossibilité de fixer la vue sur aucun d'entre eux.
4	La majorité des spermatozoïdes se déplacent encore rapidement ; seuls quelques-uns sont visibles du fait de leur déplacement plus lent.
3	les spermatozoïdes présentent trois comportements (en nombre sensiblement égaux) : - soit ils se déplacent vigoureusement ; - soit ils se déplacent lentement ; - soit ils sont immobiles.
2	Peu de spermatozoïdes se déplacent rapidement ; quelques-uns se déplacent lentement. La majorité des spermatozoïdes est immobile.
1	Seuls quelques spermatozoïdes ont une légère agitation.
0	Tous les spermatozoïdes sont immobiles.

3.2.1. Mécanisme de la motilité

Le mécanisme de la motilité semble complexe et diffère en fonction des espèces. En générale, il a été démontré que l'activation des spermatozoïdes serait due à une variation de la pression osmotique du milieu environnant des spermatozoïdes (Maisse, 1990, Sadiqul Islam, 2011). Chez les poissons marins, c'est le passage dans un milieu hypertonique (> 300 mOsmoles) qui provoquerait la mise en mouvement des spermatozoïdes. Chez les poissons d'eau douce, c'est le passage dans un milieu hypotonique qui activerait les spermatozoïdes (Maisse, 1990). Cependant, l'osmolarité en lui-même ne semble pas avoir de rôle régulateur dans l'activation de la motilité.

En effet, chez les Salmonidés l'inhibition de la motilité est liée à une forte concentration d'ions potassiums dans le fluide séminal (Maise, 1990). Le passage dans un milieu hypotonique entraîne donc une dilution du potassium présent dans le fluide séminal (Maise, 1990). Cette dilution est caractérisée par une fuite des ions K^+ et une pénétration des ions Ca^{2+} . Ce phénomène activerait la transformation de l'Adénosine triphosphate (ATP) en Adénosine monophosphate cyclique (AMP- cyclique). L'AMP-cyclique activerait une enzyme (la protéine-kinase) qui catalyse la phosphorylation d'une protéine (15 KDa) présente dans l'axonème. Cette protéine phosphorylée serait responsable de l'activation du flagelle par un mécanisme non élucidé (Maise, 1990).

Chez le tilapia le mécanisme est tout autre (Mochida *et al.*, 1999). Le facteur d'immobilisation des spermatozoïdes chez *O. niloticus* est une glycoprotéine de haut poids moléculaire (Masse moléculaire = 120 000) liés à la tête des spermatozoïdes. Cette glycoprotéine également présente dans le liquide séminal serait sécrétée par les cellules de Sertoli et les cellules épithéliales du spermiducte. Une agglutination mutuelle entre les glycoprotéines présentes dans le liquide séminal et ceux liés à la tête du spermatozoïde crée un environnement viscoélastique susceptible de garder les spermatozoïdes immobiles. Cette agglutination serait provoquée par un antigène testiculaire le TAT-30 (Testicular Antigen Tilapia). Le mécanisme de dissociation de cet antigène dans l'eau n'est pas clairement élucidé (Mochida *et al.*, 1999).

3.2.2. Durée de motilité

La durée de motilité des spermatozoïdes après activation est variable chez les poissons. Elle dure généralement plus longtemps chez les poissons qui pondent en eau saumâtre et salée que ceux qui pondent en eau douce (Harvey et Hoar, 1980 ; Rurangwa *et al.*, 2004). La motilité dure en générale une dizaine de seconde à une dizaine de minutes selon l'espèce (Fauve *et al.*, 2010). Chez *O. niloticus* par contre, les spermatozoïdes restent mobiles de 4 mn à plus de 40 mn (Gennotte *et al.*, 2012).

3.2.3. Pouvoir fécondant

Le pouvoir fécondant traduit la capacité du spermatozoïde à féconder l'ovule. Il est l'ultime paramètre de mesure de la qualité de la semence après la motilité (Gennotte *et al.*, 2012). Bien que la motilité du sperme chez plusieurs espèces soit fortement corrélée avec la réussite de la fécondation, le test de pouvoir fécondant s'avère souvent nécessaire pour les tests de dilueurs en cryoconservation. Il permet de mesurer le degré de toxicité du dilueur ou du cryoprotecteur

sur l'ovule et d'extraire ou non le sperme du milieu de dilution avant la fécondation artificielle. Cependant, ce test nécessite l'utilisation de plusieurs femelles matures pour constituer des pools d'ovules (Gennotte *et al.*, 2012). Ce qui constitue un handicap pour sa réalisation dans le cadre de la cryoconservation des espèces asynchrones comme le tilapia.

4. Facteurs affectant les caractéristiques spermatiques

Plusieurs facteurs affectent la qualité du sperme chez les téléostéens. L'alimentation, la température, la photopériode, le stress et les interactions sociales sont différents facteurs qui agissent sur la qualité du sperme (Rurangwa *et al.*, 2004 ; Bobe et Labbe, 2010).

4.1. Alimentation

L'alimentation des géniteurs est un facteur important susceptible d'affecter la qualité des gamètes (Bobe et Labbe, 2010). Elle procure aux poissons des éléments minéraux, les acides gras insaturés et les vitamines indispensables à la qualité du sperme.

En effet, la stabilité de la membrane plasmique des spermatozoïdes dépend de certains polyacides gras insaturés qui ne sont pas synthétisés par les poissons. Ces acides gras se fixent préférentiellement sur la membrane plasmique et assurent sa stabilité (Labbe *et al.*, 1995). Aussi, la carence en acide ascorbique influence la qualité du sperme chez les téléostéens. Des faibles niveaux d'acides ascorbiques dans le plasma séminal de la truite arc-en-ciel ont entraîné une diminution de la concentration, de la motilité, du pouvoir fécondant du sperme et un faible taux de survie des embryons engendrés par ces mâles déficients (Dabrowski et Ciereszko, 1996). Cependant, l'effet de l'alimentation sur la qualité du sperme est généralement observable à long terme (Bobe et Labbe, 2010).

4.2. Facteurs environnementaux : température, photopériode et salinité

L'effet des variations de la température et de la photopériode sur la qualité du sperme n'a pas fait l'objet de beaucoup d'étude. Les rares études qui ont portés sur l'effet de la température sur les qualités du sperme stipulent une influence possible de la température sur la composition lipidique du sperme chez certains téléostéens (Labbe *et al.*, 1995).

La teneur en sel du milieu d'élevage est également susceptible d'influencer la membrane plasmique des spermatozoïdes. Chez la truite-arc-en-ciel par exemple, les spermatozoïdes des individus élevés en eaux salées avaient une plus grande perméabilité de la membrane et/ou une résistance plus faible au stress hypoosmotique que ceux des individus gardés en eau douce (Bobe et Labbe, 2010).

4.3. Stress

L'effet du stress sur la qualité du sperme dépend de l'espèce, de la période d'application du stress, du type et de l'intensité du stress. Le stress peut agir en induisant des changements d'osmolarité du plasma qui peut affecter la qualité du sperme chez les poissons (Rurangwa, 2004). Des stress aigus peuvent entraîner une diminution de la concentration de la laitance et un faible taux de survie des larves (Bobe et Labbe, 2010). Les stress provoqués par la capture et le transport des mâles sauvages de truite ont également été responsables de la décroissance de la motilité des spermatozoïdes (Allyn *et al.*, 2001).

4.4. Autres facteurs

Plusieurs autres facteurs sont susceptibles d'avoir des effets sur la qualité du sperme même s'il n'existe pas encore de données expérimentales sur ces derniers. Il s'agit de l'exposition des poissons aux polluants, les propriétés physico-chimiques de l'eau (Rurangwa, 2004 ; Bobe et Labbe, 2010), certaines pathologies (Rurangwa, 2004), les facteurs sociaux, l'âge du géniteur et la consanguinité (Gennotte *et al.*, 2012).

5. Cryoconservation

La cryoconservation est la conservation *ex situ* des gamètes au moyen de la congélation à de très basses températures. L'objectif de la cryoconservation est de permettre la conservation des génotypes des espèces d'intérêt au sein de banques de semences et de faciliter la gestion de la reproduction en augmentant le coefficient de diffusion des mâles (Milon, 2013). La réussite de la cryoconservation passe par la maîtrise de l'utilisation dilueurs et cryoprotecteurs adéquats ainsi que les procédures de congélation et de décongélation (Maisse *et al.*, 1998).

5.1. Pré-congélation

Les semences collectées doivent être d'abord diluées dans un milieu physiologique (dilueur) avant leur congélation. Ce milieu de congélation joue un rôle majeur dans la protection des fonctions cellulaires des spermatozoïdes. Le pH et la pression osmotique du milieu doivent être proches de ceux du plasma séminal. Il doit aussi contenir des éléments nutritifs et des éléments cryoprotecteurs pour limiter les dommages cellulaires lors de la congélation et surtout maintenir les spermatozoïdes immobiles. Plusieurs types de dilueurs ont été testés dans le cadre de la cryoconservation de la laitance de poissons dont les plus couramment rencontrés sont présentés dans le tableau II.

Tableau II : Composition chimique de dilueurs utilisés dans la cryoconservation de semences de poissons.

Dilueurs	Milieu Minéral de Liquide Séminal (g/l)	Cortland modifié (g/l)	Solution de Ringer (g/l)*	Solution Ringer modifié (g/l)*	Freshwater Fish Saline (g/l)*	Dilueur de Mounib (g/l)**	Menzo INRA B	Actifish-300	Cryofish	
Chlorure de sodium (NaCl)	5,775	1,88	6,5	6,5	7,5		Licence INRA-IMV-SYSAAF			
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	0,237	0,23	0,3	0,3	0,2					
Chlorure de potassium (Kcl)	1,886	7,2	0,25	3	0,2					
Dihydrogenophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)		0,41								
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃)		1	0,2	0,2	0,2					
Magnesium sulfate (MgSO ₄)	0,243	0,23								
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)		1								
Gluthation réduit (C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S)						2				
Bicarbonate de potassium (KHCO ₃)						10				
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)						42,78				
Tampon (nature et volume)	glycocolle 0,02M Tris 0,02M 10%	glycocolle 0,02M Tris 0,02M 10%								
pH	9		7	8,06	7	7,57				
* dilueurs déjà testé pour la cryoconservation du sperme d'autres souches de tilapia										
** dilueur beaucoup utilisé dans la cryoconservation du sperme d'autres espèces de poisson										

Deux types de cryoprotecteurs peuvent être considérés (Maise *et al.*, 1998). Les cryoprotecteurs non perméants à savoir les sucres (lactose, saccharose) ou les additifs protéiques et lipidiques (lait écrémé, jaune d'œuf) agissent seulement au niveau extracellulaire selon des mécanismes souvent difficiles à caractériser (Milon, 2013). Les cryoprotecteurs perméants ou cryoprotecteurs internes sont ceux qui peuvent traverser la membrane plasmique et assurer une isotonicité entre le milieu intra et extra cellulaire lors de la congélation. Le choix du cryoprotecteur perméant doit être adapté à l'espèce (Maise *et al.*, 1998). Le DMSO (Diméthylsulfoxyde) et le méthanol sont les cryoprotecteurs perméants majoritairement utilisés pour la congélation de la semence de poisson. Le méthanol est le

cryoprotecteur perméant retenu pour la congélation de la semence des tilapias (Rana et Mc Andrew, 1989 ; Harvey, 1983 ; Ogier de Baulny, 1997 ; Maisse *et al.*, 1998).

Le dilueur de congélation doit être porté à la même température que le sperme (4°C) avant le mélange pour éviter des chocs thermiques. Plusieurs ratios de dilution (volume de semence / volume de dilueur) ont été testés chez les poissons. Il est suggéré de ne pas dépasser des ratios de dilution de 1/10 (Suquet *et al.*, 2000). Il est probable que les protéines du plasma séminal assure une protection de la viabilité des spermatozoïde et des dilutions à des ratios de plus de 1/10 pourraient réduire cet effet (Suquet *et al.*, 2000). Après la dilution, la suspension de sperme-dilueur est aspirée dans des paillettes de 250 µl, 500 µl ou 5 ml sous une vitrine réfrigérée.

5.2. Congélation

La congélation de la semence est fonction du mode d'utilisation. Ainsi, il existe une congélation à court terme et une congélation à long terme. La congélation à court terme se fait à des températures voisines de 0°C (Carpentier et Billard, 1978) et a généralement pour objectif d'assurer une large diffusion de la laitance lors des fécondations artificielles. La congélation à long terme se fait à des températures de -196 °C dans de l'azote liquide. Deux techniques sont couramment utilisées :

- la congélation en granules de 100 µl, qui sont congelés directement sur un bloc de carboglace puis transférés au bout de 5 minutes dans l'azote liquide ;
- en paillettes (250 µl, 500 µl, 5 ml) congelés horizontalement à 3 cm au-dessus du niveau de l'azote liquide pendant 20 minutes puis elles transférées dans l'azote liquide à -196°C. La température atteint avant le transfert dans l'azote liquide doit être inférieur à -80°C (Milon, 2013).

5.3. Décongélation

Une décongélation rapide des semences congelées est nécessaire pour éviter la recristallisation. Les paillettes retirées de l'azote liquide sont décongelées à des températures qui varient en fonction des espèces (Suquet *et al.*, 2000). Pour les espèces d'eau douce la gamme des températures de décongélation est de 30 à 80°C (Rana, 1995). Rana et Mc Donald (1987) ont décongelé la semence de tilapia à 40°C.

5.4. Impact de la cryoconservation sur la semence

La cryoconservation peut avoir des impacts négatifs sur la qualité des semences. Lorsque le refroidissement est très rapide, les spermatozoïdes subissent le « *cold shock* » ou « choc froid » qui induit un changement de phase des phospholipides membranaires (John *et al.*, 1992). Cela se traduit par des fuites de matériel intracellulaires et une perte de la motilité. Aussi, la descente de température peut entraîner la formation de glace extracellulaire induisant une augmentation de la concentration de ce milieu (Ryan, 2004). Cela a pour conséquence une fuite d'eau de la cellule vers le milieu extracellulaire entraînant un stress mécanique sur la membrane plasmique (Freeze-deshydratation) (Mazur, 1974). Ainsi, la membrane plasmique apparaît souvent soulevée, voire rompu, au niveau de la tête. La pièce intermédiaire peut être atteinte avec une déstructuration de la mitochondrie. Le flagelle est souvent déformé. Dans certains cas le noyau présente un décollement de la membrane nucléaire et ou une altération de la chromatine (Maisse *et al.*, 1998).

La cryoconservation peut également avoir des impacts négatifs sur l'ADN des spermatozoïdes et par conséquent sur la descendance (Milon, 2013). L'ADN peut subir deux principaux types de traumatisme à l'origine des problèmes de développement embryonnaire : soit une cassure de la molécule d'ADN, soit des altérations épigénétiques (modification de la chromatine). Les cassures d'ADN sont plus ou moins importantes sur les spermatozoïdes chez les poissons et leurs conséquences difficiles à caractériser à cause des systèmes de réparation de l'ADN par l'ovocytes (Pérez-Cerezales *et al.*, 2010).

6. Etat des lieux sur la cryoconservation du sperme des tilapias en Afrique

De nombreuses études ont porté sur la congélation du sperme des poissons téléostéens. Mais ces études ont surtout été menées sur les espèces aquacoles européennes comme les salmonidés (Maisse *et al.*, 1998). Les intérêts se sont portés très tôt sur cette famille du fait de son importance en aquaculture européenne et des nombreux acquis qui existaient déjà sur la physiologie testiculaire et la biologie de leurs spermatozoïdes (Maisse *et al.*, 1998). Par contre pour la majeure partie des espèces comme les tilapias, les études de cryoconservation sont rares et restent parfois ponctuelles (faible effectif d'individus) (Maisse *et al.*, 1998). Seules les études de Chao *et al.* (1987) existent sur les propriétés du sperme des tilapias et le test de dilueurs de congélation. Les autres études qui existent ont porté sur les tests de cryoprotecteurs, les ratios de dilution et les températures de pré-congélation (Harvey, 1983 ; Rana et Mc Donald, 1989 ; Ogier de Baulny, 1997). A notre connaissance, les études de

cryoconservation du sperme de tilapia ou des autres poissons sont rares en Afrique et pratiquement inexistante en Afrique Subsaharienne. Cette étude se veut donc une contribution à la mise en place de la cryoconservation de la laitance des espèces d'intérêt aquacole d'Afrique de l'Ouest.

Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Cadre de l'étude

La présente étude a été effectuée au Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES). Des poissons de la souche locale Kou de *O. niloticus* ont été élevés dans ce centre depuis juin 2016, en vue de la collecte de semence pour la cryoconservation. Une partie des poissons (souche Kou) utilisés au cours de l'expérimentation proviennent de l'Unité de Recherche en Aquaculture et Biodiversité Aquacole (UR-ABAO). La phase de congélation a été effectuée dans le laboratoire de conservation de semences du CIRDES.

2. Matériel

2.1. Matériel biologique

La collecte du sperme a été réalisée sur 15 individus mâles de *O. niloticus* de la population de la vallée du Kou. Les individus du lot 1, d'un poids moyen de $228 \pm 65,93\text{g}$ ont été capturés dans le lac de la vallée du Kou 9 mois avant le début de l'expérimentation. Les mâles du lot 2 et 3 avec respectivement un poids moyen de $180,80 \pm 44,65\text{g}$ et $177,60 \pm 25,33\text{g}$ ont été sélectionnés dans une descendance F1 obtenue en aquarium.

2.2. Structure d'élevage

Les trois lots de poisson ont été maintenus en élevage dans un circuit fermé de 4 aquariums de 300 l avec un système de filtration mécanique et une photopériode de 12L/12N (Photo 2). Les propriétés physico-chimiques de l'eau sont relevées les matins et soirs à l'aide d'un multi-paramètres *HANNA*. Les poissons sont nourris à satiété apparente (3 fois par jour) avec de l'aliment locale dosant 40% de protéines brutes.



Photo 2 : Présentation du circuit fermé d'élevage constitué de quatre (04) aquariums de 300 litres chacun, utilisé au cours de l'expérimentation.

2.3. Matériel de collecte de la laitance

La laitance des différents lots de poisson a été collectée à l'aide de pipettes pasteurs. Une glacière contenant de la glace a servi pour maintenir la laitance à 4°C avant leur utilisation.

2.4. Matériel d'analyse de la laitance

Pour l'analyse des caractéristiques spermatiques deux microscopes à contraste de phase ont été utilisés pour observer la motilité des spermatozoïdes et pour faire la numération. Un hématimètre (cellule de Neubauer améliorée) a été utilisé pour déterminer la concentration en spermatozoïdes de la laitance.

2.5. Matériel de mesure

Au cours de cette expérimentation, une balance électronique Soehnle de gabarie 5kg ± 1g a été utilisée pour peser les poissons et un ichtyomètre de 1,5m de long a été utilisé pour leurs mensurations.

Une balance électronique Sartorius de précision 1/1000^{ème} a servi également pour la pesée des produits chimiques nécessaires à la préparation des dilueurs et liquides physiologiques et un papier pH a été utilisé pour mesurer le pH de la laitance.

2.6. Produits et réactifs utilisés

Pour la préparation des dilueurs les réactifs suivants ont été utilisés : le chlorure de sodium (NaCl), le chlorure de calcium (CaCl₂), le chlorure de potassium (KCl), le bicarbonate de sodium (NaHCO₃), le bicarbonate de potassium (KHCO₃), le Glutathion réduit (C₁₀H₁₇N₃O₆S), le sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁), le méthanol (CH₃OH).

L'azote liquide a servi de milieu de congélation des semences.

2.7. Autre matériel

Pour la réalisation de cette expérimentation, divers matériels ont été utilisés :

- une tanguie pour le stockage dans l'azote liquide ;
- un aspirateur pour aspirer la vapeur d'azote liquide ;
- un bain marie pour la décongélation des paillettes ;
- des éprouvettes, des béchers, des erlenmeyers etc. pour les manipulations;
- des perles pour le marquage des poissons.

3. Méthodes

3.1. Marquage des poissons

Pour l'identification des poissons, chaque mâle a été marqué au niveau du pédoncule caudal par une combinaison de quatre perles de couleurs différentes (photo 3). Après le marquage, la blessure a été désinfecté avec de la Bétadine.

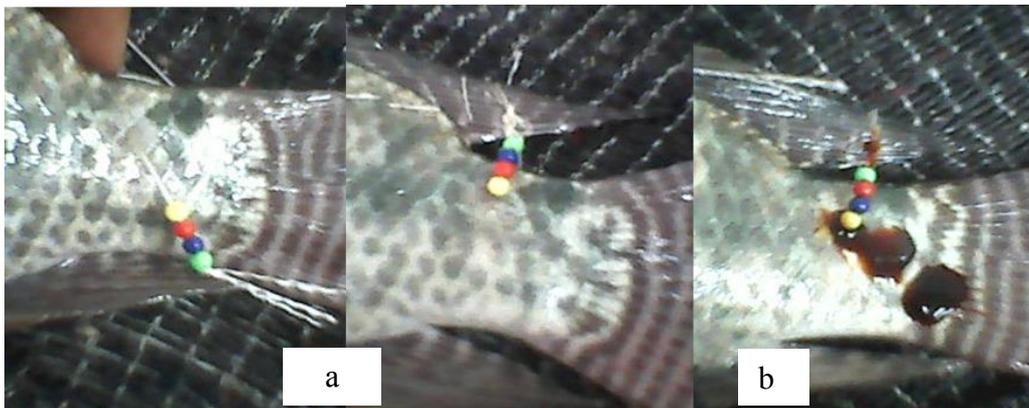


Photo 3 : Marquage (a) et désinfection du poisson (b) avec de la Bétadine en vue de la collecte de la laitance

3.2. Collecte de la laitance

Pour la collecte de la laitance, chaque mâle est pêché à l'aide d'une épuisette et déposé sur un tissu préalablement mouillé. Le poisson est ensuite placé sur sa nageoire dorsale et immobilisé au niveau de la tête (recouverte par le tissu) par une main. A l'aide d'un essuie-tout la région génitale du poisson est nettoyée et asséchée. A partir des deux doigts, une légère pression est exercée sur la région abdominale (stripper) pour évacuer d'abord le maximum d'urine et la laitance est ensuite recueillie au niveau de la papille génitale à l'aide des pipettes pasteurs (Photo 4). Au moment de la collecte, la laitance peut rentrer en contact avec l'urine ou les liquides fécaux entraînant l'activation des spermatozoïdes. Ainsi, pour contrôler l'intégrité de la semence, un échantillon (1µl) de chaque laitance a été observé au microscope (x 40). Les tubes contenant plus de 0,1% de spermatozoïdes mobiles sont considérés comme contaminés et ont été éliminés (Harvey, 1983 ; Rana et Mc Donald, 1989). Juste après la collecte, les poissons ont été pesés avant de mesurer leur longueurs totales (du museau à l'extrémité de la nageoire caudale) et standards (du museau à la base de la nageoire caudale). Trois collectes ont été effectuées dans chaque lot avec une fréquence de 15 jours entre la première et la deuxième collecte et 10 jours entre la deuxième et la troisième collecte.



Photo 4 : Nettoyage et séchage de la région génitale (a) ; pression abdominale (b) et récupération de la laitance dans une pipette pasteur (c)

3.3. Evaluation de la qualité de la laitance

3.3.1. Détermination du pH

Pour la détermination du pH, une goutte de chaque échantillon de laitance a été déposée sur un morceau de papier pH (1 cm). La couleur prise par le papier pH a été ensuite comparée à l'échelle de teinte qui donne les différentes valeurs de pH (photo 5).



Photo 5 : Détermination du pH de la laitance à l'aide d'un papier pH

3.3.2. Concentration en spermatozoïdes

La concentration en spermatozoïdes (spz) a été déterminée par comptage du nombre de spermatozoïdes sur la cellule hématimétrique de Neubauer. Une goutte de laitance diluée à 1/2000 au liquide physiologique formolé a été placée entre la zone de numération de la cellule et une lamelle, avant d'être observé au microscope (photo 6). Les spermatozoïdes ont été ensuite comptés dans les cellules des quatre grands carreaux repartis au quatre angles droits. Pour chaque grand carreau, les spermatozoïdes ont été compté dans dix petits carrés soit quarante petits carrés au total. Chaque carré mesurant 0,25 mm de côté avec une hauteur de numération de 0,1 mm :

-l'aire du carrée = $0,25\text{mm} \times 0,25\text{mm} = 0,0625\text{mm}^2$

-le volume du carré = $0,0625\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} = 6,25 \times 10^{-3}\text{mm}^3 = 6,25 \times 10^{-6}\text{ml}$

La concentration en spermatozoïde (spz/ml) a été déterminé par:

$$\text{Concentration en spz} = \frac{\text{nombre total de spz comptés}}{\text{nombre de carrés}} \times 160\,000 \times \text{TD}$$

TD = Taux de dilution (dans le cas présent, TD = 2000 car le sperme dilué à 1/2000)

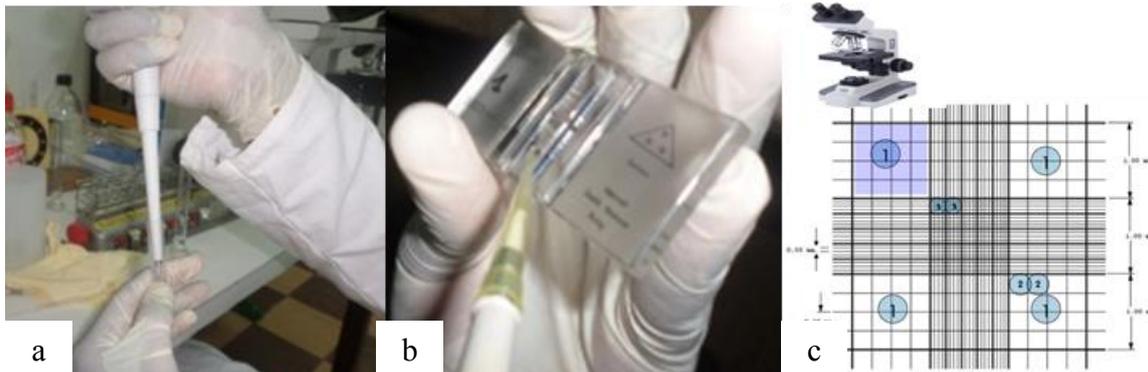


Photo 6 : Dilution de la laitance dans du liquide physiologique formolé (a), dépôt de la laitance diluée sur une cellule de Neubauer (b) et numération sous un microscope (c)

3.3.3. Appréciation de la motilité des spermatozoïdes

L'appréciation de la motilité des spermatozoïdes a été faite en diluant entre lame et lamelle $1\mu\text{l}$ de sperme avec $10\mu\text{l}$ d'eau distillée. L'intervalle de temps entre la dilution et l'observation a varié de 10s à 15s. Les valeurs de motilité des spermatozoïdes ont été appréciées selon l'échelle de Sanchez-Rodriguez et Billard (1977). Ces valeurs correspondent au nombre de spermatozoïdes mobiles ayant un mouvement traçant par rapport au nombre totale de spermatozoïdes. La durée de motilité a été également déterminée.

3.4. Cryoconservation de la semence de *O. niloticus*

3.4.1. Pré-congélation

La laitance collectée a été maintenue sur la glace (jusqu'à la dilution et à la congélation) à une température de 4°C pour prévenir le développement bactérien et la dessiccation (Chao et al., 1987). Quatre dilueurs ont été utilisées pour la constitution des milieux de dilution. Il s'agit du dilueur de Mounib, la solution de Ringer, la solution de Ringer modifié et le dilueur Freshwater Fish saline. Le méthanol a été utilisé comme cryoprotecteur à la dose de 10% (Rana et Mc Donald 1989). La laitance de chaque mâle a été ensuite répartie en quatre aliquots et chaque aliquot a été mélangé avec un milieu de dilution selon un ratio (volume semence/volume

dilueur) de 1/10. Pour chaque mélange constitué, 3 répliques de 10 μl ont été dispensé dans des paillettes (type CASSOU) de 250 μl à l'aide d'une pipette Eppendorf. Les paillettes ont été ensuite bouchées par de la poudre d'alcool de polyvinyle. Pour l'identification de chaque paillette un code a été inscrit sur les fourreaux d'identification (Photo 7).

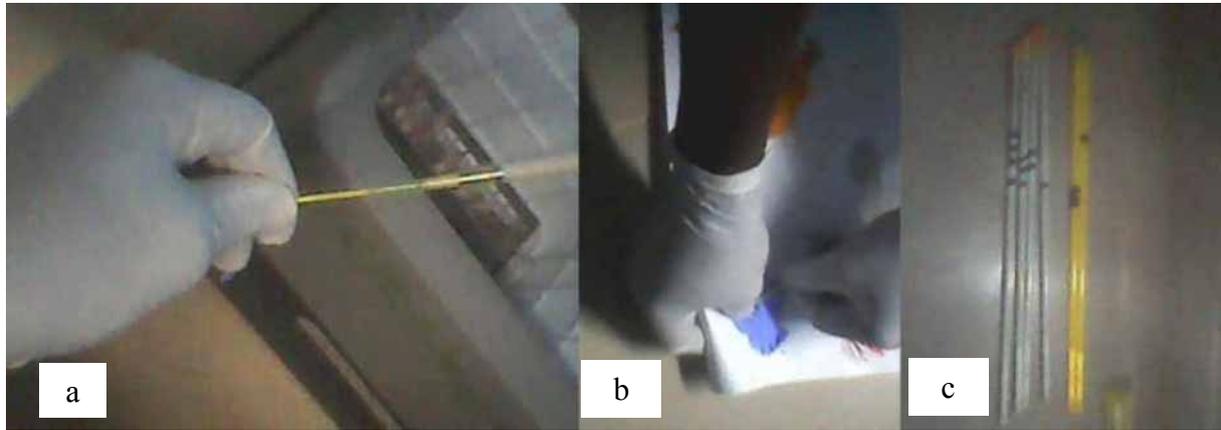


Photo 7 : Mise en paillette (a) ; bouchage des paillettes (b) et paillettes marquées (c)

3.4.2. Congélation

Pour la congélation les paillettes ont été disposées horizontalement à 3cm au-dessus de l'azote liquide dans une tange de congélation pour les refroidir à -120°C pendant 9 mn (photo 8). Après les 9 mn les paillettes ont été retirés et immergés immédiatement dans des visu tubes plongés dans l'azote liquide à -196°C .

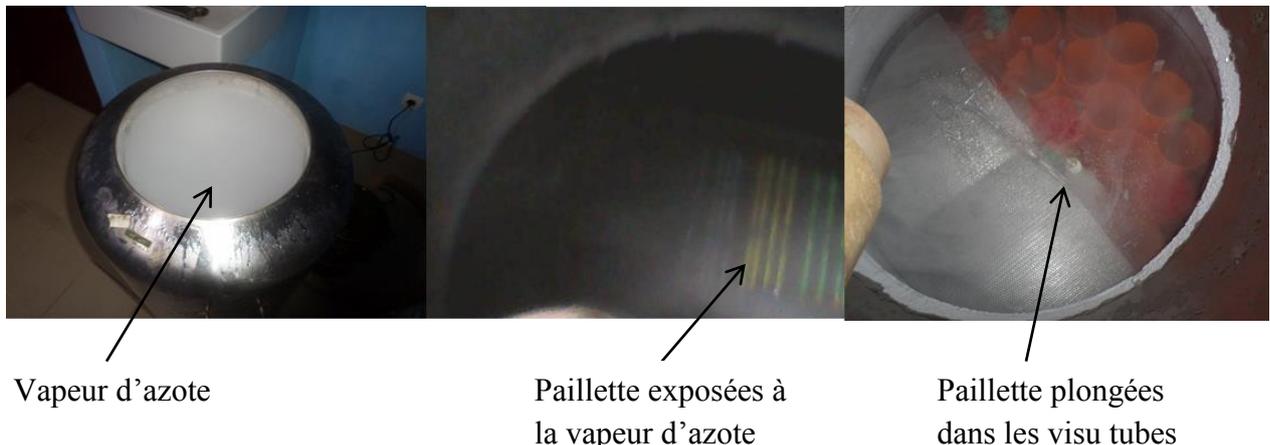


Photo 8 : Processus de congélation des paillettes contenant la semence de la souche Kou de *Oreochromis niloticus*

3.4.3. Décongélation

Pour les analyses post décongélation, une paillette de chaque réplique a été prélevée chaque jour dans la tange de congélation et a été décongelée. Après leur retrait de l'azote liquide,

les paillettes ont été immédiatement plongées dans un bain marie à 40°C pendant 8s (Photo 9). La motilité a été appréciée en diluant entre lame et lamelle les 10 µl de semence décongelé avec 10 µl d'eau distillée. Ces valeurs ont été ensuite comparées à ceux du sperme frais.



Photo 9 : Bain marie (a) et décongélation des paillettes dans un bain marie (b)

4. Analyse des données

Le tableur Excel 2010 a été utilisé pour la saisie des données et la réalisation des graphiques. Le logiciel Xlsat. 2007. 7 a été utilisé pour l'analyse statistique des données. Le test de Tukey a été utilisé pour la comparaison des différentes moyennes. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écartype. Les différences ont été considérées significatives au seuil de probabilité $P < 0,05$.

Chapitre II : Résultats et Discussion

1. Résultats

1.1. Paramètres physico-chimiques de l'eau

Pour une vérification de la qualité de l'eau du circuit d'élevage, trois paramètres physico-chimiques (la température, le pH et la conductivité) ont été régulièrement mesurés.

Le suivi de la température hebdomadaire indique un minimum de $27,42 \pm 0,54^{\circ}\text{C}$ à la 4^{ème} semaine et un maximum de $28,80 \pm 0,88^{\circ}\text{C}$ à la 1^{ère} semaine (Figure 6a). Les variations des températures moyennes du matin suivent celles observées les soirs et il n'y a pas de différence significative entre les températures du matin et du soir, ce qui traduit une certaine homogénéité thermique au cours de la journée.

En ce qui concerne le pH, les valeurs extrêmes ont été obtenues les matins et ont variés de $7,36 \pm 0,70$ à $7,99 \pm 0,26$ (Figure 6b). Les pH du matin et du soir évoluent également dans le même sens et il n'y a pas de différences significatives entre les valeurs moyennes de pH observés pendant ces deux périodes.

Tout comme les deux précédents paramètres, la conductivité de l'eau a peu fluctué au cours de cette expérimentation. La conductivité moyenne la plus élevée est de $151,83 \pm 11,83$ $\mu\text{S}/\text{cm}$ et a été obtenu le matin tandis que la plus faible ($137,17 \pm 8,18$ $\mu\text{S}/\text{cm}$) a été obtenu le soir (Figure 6c). Cependant il n'y a pas de différence significative entre la conductivité du matin et celle du soir.

Les valeurs de ces trois paramètres physico-chimiques se situent dans l'intervalle de tolérance de l'espèce *O. niloticus*.

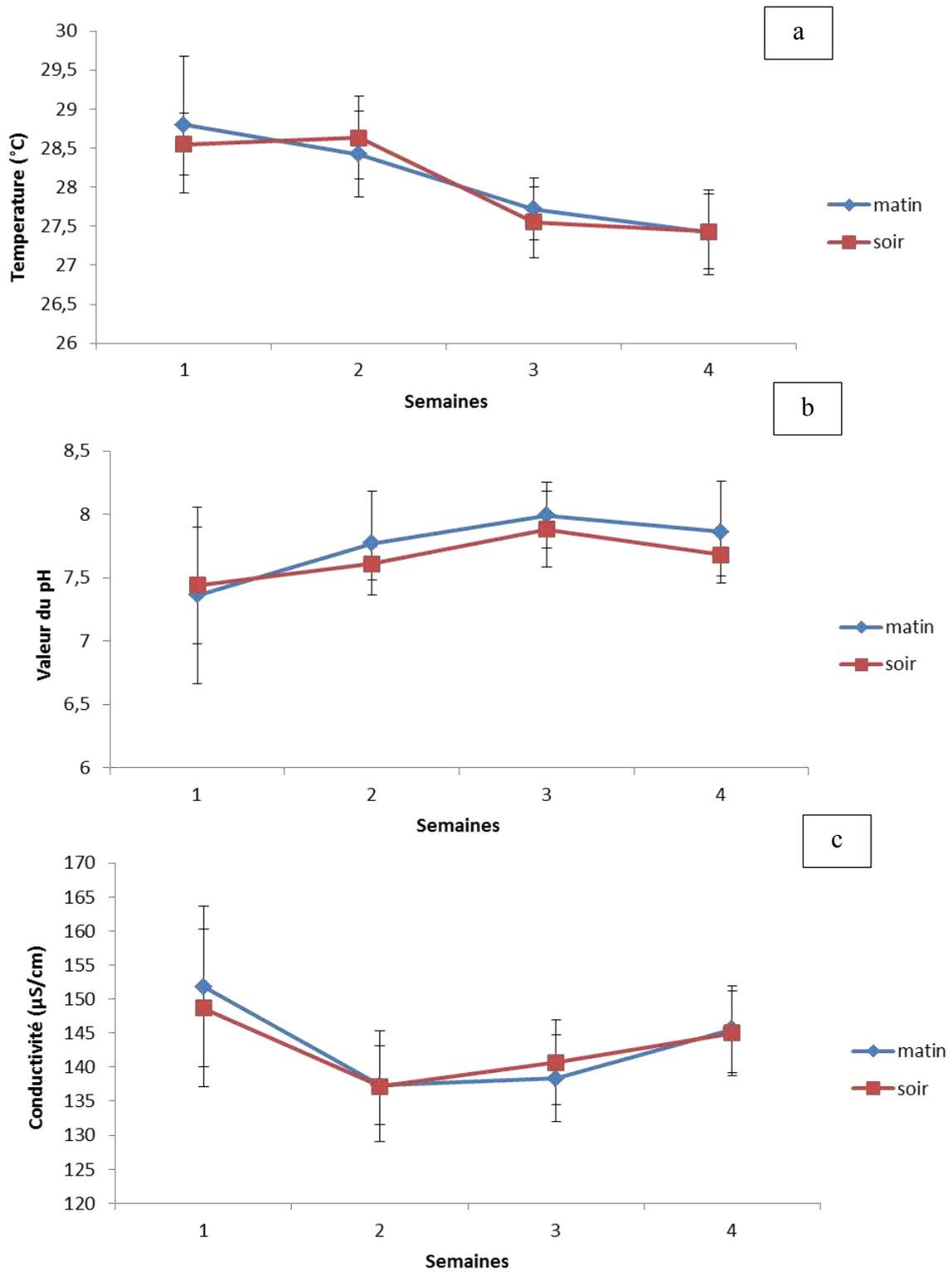


Figure 6 : Variation hebdomadaire des paramètres physico-chimiques (a : température ; b : pH ; c : conductivité) dans le circuit expérimental.

1.2. Volume de la laitance

Les volumes moyens de laitance recueillie pour chaque mâle sont présentés dans le tableau IV. Ces volumes ont varié de $0,012 \pm 0,015$ ml à $0,30 \pm 0,008$ ml. Le volume maximum de laitance a été obtenu chez le plus grand individu (mâle 1). Il n'y a cependant pas de différence significative entre le volume moyen recueilli chez les cinq mâles ($P > 0,05$).

Tableau III : Volume de laitance des mâles de la souche Kou de *Oreochromis niloticus* utilisés pour l'expérimentation en fonction des caractéristiques morpho biométriques

Poisson	Poids (g)	Longueur totale (cm)	Longueur standard (cm)	Volume (ml)
1	$336,00 \pm 1,73^a$	$27,00 \pm 0,00^a$	$21,00 \pm 0,00^a$	$0,030 \pm 0,008^a$
2	$223,00 \pm 0,00^b$	$22,33 \pm 0,57^{bc}$	$17,30 \pm 0,00^b$	$0,019 \pm 0,009^a$
3	$227,00 \pm 0,00^b$	$23,00 \pm 0,00^b$	$18,20 \pm 0,00^c$	$0,012 \pm 0,015^a$
4	$164,66 \pm 2,08^c$	$21,53 \pm 0,05^d$	$16,30 \pm 0,00^d$	$0,021 \pm 0,004^a$
5	$188,00 \pm 3,46^d$	$21,86 \pm 0,11^{cd}$	$16,86 \pm 0,11^e$	$0,017 \pm 0,004^a$

Les valeurs de la même colonne portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% ($P < 0,05$) selon le test de Tukey.

1.3. Valeur du pH et motilité de la laitance

Le pH de la laitance, la motilité et les durées de motilités des spermatozoïdes des cinq mâles sont résumés dans le tableau V. Ces résultats montrent que le pH de la laitance a varié de 7 à 8. Toutes les valeurs de motilité sont supérieures à 2. Les durées moyennes de motilité vont de $7,64 \pm 1,80$ mn et à $16,83 \pm 7,13$ mn. Malgré cette différence du simple au double, il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$) entre les motilités et les durées de motilité des cinq mâles.

Tableau IV : pH, motilité et durée de motilité dans la laitance des mâles de la souche Kou de *Oreochromis niloticus* utilisés pour l'expérimentation

Poisson	pH	valeur motilité	Durée motilité (mn)
1	7,2	2,33 ± 1,15 ^a	16,83 ± 7,13 ^a
2	7	4,66 ± 0,57 ^a	7,66 ± 0,94 ^a
3	7,5	3,23 ± 2,82 ^a	9,01 ± 1,42 ^a
4	8	4,00 ± 0,00 ^a	7,64 ± 1,80 ^a
5	8	4,33 ± 1,15 ^a	16,43 ± 1,46 ^a

Les valeurs de la même colonne portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% ($P < 0,05$) selon le test de Tukey

Valeur de motilité : 0 = tous les spermatozoïdes sont immobiles ; 1 = seuls quelques spermatozoïdes ont une légère agitation ; 2 = peu de spermatozoïdes se déplacent rapidement, quelques-uns se déplacent lentement, la majorité est immobile ; 3 = les spermatozoïdes présentent trois comportements (en nombre sensiblement égaux), soit ils se déplacent vigoureusement, soit ils se déplacent lentement, soit ils sont immobiles ; 4 = la majorité des spermatozoïdes se déplacent encore rapidement, seuls quelques-uns sont visibles du fait de leur déplacement plus lent ; 5 = tous les spermatozoïdes se déplacent vigoureusement, impossibilité de fixer la vue sur aucun.

1.4. Concentration en spermatozoïdes

La concentration ainsi que le nombre total de spermatozoïdes de la laitance de chaque mâle sont présentés au tableau VI. Les concentrations en spermatozoïdes les plus élevées et les plus faibles sont obtenues respectivement chez le mâle 4 ($10,04 \pm 0,873 \times 10^9$ spz/ml) et chez le mâle 1 ($3,20 \pm 0,595 \times 10^9$ spz/ml). Cependant, les analyses n'ont révélé aucune différence significative ($P > 0,05$) entre le nombre total de spermatozoïde des cinq mâles.

Tableau V : Concentration et nombre total de spermatozoïde dans la laitance des mâles de la souche Kou de *Oreochromis niloticus* utilisés au cours de l'expérimentation

Poisson	Concentration ($\times 10^9$ spz/ml)	Nombre total ($\times 10^9$ spz/ml)
1	3,20 ± 0,59 ^a	0,09 ± 0,04 ^a
2	5,99 ± 0,67 ^{ab}	0,12 ± 0,07 ^a
3	8,48 ± 0,61 ^{cb}	0,15 ± 0,13 ^a
4	10,04 ± 0,87 ^c	0,21 ± 0,06 ^a
5	8,92 ± 1,80 ^{cb}	0,15 ± 0,06 ^a

Les valeurs de la même colonne portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% ($P < 0,05$) selon le test de Tukey

1.5. Test des dilueurs pour la congélation

Un premier test de congélation de la laitance des mâles 3, 4 et 5 pendant 24 h a donné les valeurs moyennes qui figurent au tableau VII. Le deuxième test a porté sur la congélation de la laitance d'un mâle (issu de l'UR-ABAQ) pendant 72 heures et les résultats sont consignés au tableau VIII. Ces résultats montrent qu'aucun des dilueurs n'a pu assurer une bonne conservation de laitance de la souche Kou de *O. niloticus*. Néanmoins, les dilueurs Ringer modifié et Freshwater Fish Saline ont permis d'avoir de très faible réanimations (valeur de motilité =1) des spermatozoïdes même après 72 heures de conservation. Les résultats montrent également que les durées de motilités ont fortement diminué durant le temps de conservation.

Tableau VI : Test de dilueurs pendant 24 heures sur la laitance congelée des mâles de la souche Kou de *Oreochromis niloticus* utilisés pour l'expérimentation.

Temps de congélation	Dilueur	Valeur de motilité	Durée de motilité
t0	Sperme pur	3,33 ± 0,57 ^a	4,76 ± 1,53 ^a
t1 = 24h	Mounib	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
	Ringer	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
	Ringer modifié	1,00 ± 0,00 ^c	1,82 ± 0,45 ^c
	Freshwater Fish Saline	1,00 ± 0,00 ^c	1,91 ± 0,16 ^c

Les valeurs de la même colonne portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% ($P < 0,05$) selon le test de Tukey

Valeur de motilité : 0 = tous les spermatozoïdes sont immobiles ; 1 = seuls quelques spermatozoïdes ont une légère agitation ; 2 = peu de spermatozoïdes se déplacent rapidement, quelques-uns se déplacent lentement, la majorité est immobile ; 3 = les spermatozoïdes présentent trois comportements (en nombre sensiblement égaux), soit ils se déplacent vigoureusement, soit ils se déplacent lentement, soit ils sont immobiles ; 4 = la majorité des spermatozoïdes se déplacent encore rapidement, seuls quelques-uns sont visibles du fait de leur déplacement plus lent ; 5 = tous les spermatozoïdes se déplacent vigoureusement, impossibilité de fixer la vue sur aucun d'entre eux

Tableau VII : Test de dilueur pendant 72 heures sur la laitance congelée des mâles de la souche Kou de *Oreochromis niloticus* utilisés au cours de l'expérimentation.

Temps de congélation	Dilueur	Valeur de motilité	Durée de motilité
t0	Sperme pur	5	40,05
t1 = 24h	Mounib	0	0
	Ringer	0	0
	Ringer modifié	1	7,42
	Freshwater fish saline	1	5,28
t2 = 48h	Mounib	0	0
	Ringer	0	0
	Ringer modifié	1	4,6
	Freshwater fish saline	1	5,03
t3 = 72h	Mounib	0	0
	Ringer	0	0
	Ringer modifié	1	4,05
	Freshwater fish saline	1	5,08

Valeur de motilité : 0 = tous les spermatozoïdes sont immobiles ; 1 = seuls quelques spermatozoïdes ont une légère agitation ; 2 = peu de spermatozoïdes se déplacent rapidement, quelques-uns se déplacent lentement, la majorité est immobile ; 3 = les spermatozoïdes présentent trois comportements (en nombre sensiblement égaux), soit ils se déplacent vigoureusement, soit ils se déplacent lentement, soit ils sont immobiles ; 4 = la majorité des spermatozoïdes se déplacent encore rapidement, seuls quelques-uns sont visibles du fait de leur déplacement plus lent ; 5 = tous les spermatozoïdes se déplacent vigoureusement, impossibilité de fixer la vue sur aucun d'entre eux

2. Discussion

2.1. Contraintes méthodologiques et limites d'interprétation des résultats

Les quantités de semences diluées (10µl) mises en paillettes étaient faibles. La méthodologie qui a été adoptée, a consisté d'abord à réduire de 2 cm la taille des paillettes. Les 10 µl ont été ensuite déposés à l'intérieur de chaque paillette à l'aide des micropipettes Eppendorf. Au premier essai de congélation, les paillettes ont été plongées dans les visu tubes immergés dans l'azote liquide mais sont très rapidement remontées à la surface du fait des faibles volumes contenus dans les paillettes. Les paillettes ont donc été retirées et placées dans un tube à essai avant de les plonger. Au moment, de les retirer certaines paillettes ont été coincées entre les visu tubes et se sont retrouvés au fond de la tangué et n'ont pas pu être récupéré. Cela n'a donc pas permis d'apprécier la valeur de ces paillettes dans la comparaison de l'efficacité des différents dilueurs.

Une caractéristique spermatique très importante qui est le pouvoir fécondant des spermatozoïdes n'a pas également pu être estimée dans cette étude du fait que sa réalisation nécessite la mise en place et l'utilisation des certains équipements particuliers pour l'incubation de ces ovules fécondés (écloserie). Aussi, la réalisation des tests de pouvoir fécondant nécessite l'utilisation de plusieurs femelles matures pour l'obtention des ovules (en quantité et en qualité) ce qui constitue un handicap pour les espèces asynchrones comme le tilapia. Cependant, il faut noter que l'appréciation de la motilité donne une idée du pouvoir fécondant car plusieurs études (Rurangwa *et al.*, 2004 ; Gennotte *et al.*, 2012) ont montré que la motilité des spermatozoïdes est fortement corrélée la réussite de la fécondation.

2.2. Caractéristiques spermatiques

Le volume moyen maximum recueilli ($30 \pm 8 \mu\text{l}$) chez les cinq mâles est très faible par rapport à ceux rapportés dans la littérature. En effet, Chao *et al.* (1987) avaient obtenus un volume de $300 \mu\text{l}$ sur les souches de tilapia introduites de Philippines tandis que Harvey (1983) avait obtenu chez une autre espèce de tilapia (*O. mossambicus*), un volume de 400 à $500 \mu\text{l}$ de laitance. Les faibles volumes récoltés au cours de la présente étude pourraient s'expliquer par une faible prise alimentaire par certains individus dus aux interactions sociales et par conséquent une quantité d'énergie insuffisante pour une bonne gamétogénèse (Toguyéni, 1996) et une bonne production spermatique.

Selon la littérature, les valeurs de pH optimum qui maintiennent un bon motilité des spermatozoïdes chez les poissons sont compris entre 7 et 9 (Chao *et al.*, 1987 ; Maisse, 1990, Saad et Billard 1995, Mansour *et al.*, 2002). Le pH de la laitance de la souche Kou de *O. niloticus* est donc dans la gamme d'une bonne motilité. En effet les valeurs de motilité (>2) et les durées de motilité obtenues au cours de notre expérimentation, sont conformes à celles trouvées par Chao *et al.* (1987) chez le tilapia (pH de 6,2 à 8,2 et motilité de 2 à 3). Ces auteurs sont parvenus à congeler la laitance pendant 10 mois. Ces résultats suggèrent donc que les semences de souche Kou de *O. niloticus* peuvent être cryoconservés convenablement et pendant une longue période.

En ce qui concerne les concentrations, les valeurs obtenues sont dans la même gamme que celle d'autres souches de tilapia (Chao *et al.* 1987 ; Gennotte *et al.*, 2012). Il en est de même pour les durées de motilité qui sont compris entre 4 et 40 mn (Gennotte *et al.*, 2012). Comparativement à d'autres espèces comme *Silurus glanis* (Saad et Billard, 1995), *Clarias gariepinus* (Dada et Ogunduyile, 2011), *Cyprinus carpio* (Nahiduzzaman *et al.*, 2014), le

tilapia du Nil est donc une espèce caractérisée par une faible concentration en spermatozoïde et des durées de motilité très élevées comme l'a souligné aussi Gennotte *et al.* 2012. Ces deux caractéristiques sont surtout liées à la stratégie de reproduction de cette espèce.

En effet, au moment de la reproduction, la femelle de tilapia est courtisée dans un nid. Après une parade nuptiale, elle dépose successivement les ovules en petits tas (300 à 600 ovules) et le mâle émet sa laitance par-dessus. Le mâle n'essayerait pas de féconder les ovules après chaque dépôt et il est probable que la fécondation s'achève dans la bouche de la femelle après les avoir repris (Philippart et Ruwet 1982). Par conséquent le temps de fécondation pourrait être retardé par rapport à l'émission des gamètes. Le succès de la reproduction chez le tilapia pourrait donc être lié à la longue durée de vie des spermatozoïdes (Gennotte *et al.* 2012).

Les différences de concentration observées entre les mâles pourraient s'expliquer par une dilution plus importante du sperme dans le canal déférent des mâles qui avaient également les plus grands volumes. Cette hypothèse a été émise par Billard *et al.* (1971). Ils avaient observé cette différence chez la truite arc-en-ciel et l'avaient attribué à une baisse de concentration du sperme due à une sécrétion plus abondante dans le canal déférent.

Il ressort de cette analyse des caractéristiques spermatiques que les semences de la souche Kou de *O. niloticus* sont de bonnes qualités et pourraient être cryoconservés. Une amélioration de la production spermatique pourrait faciliter la mise en place d'un protocole de congélation des semences de cette souche.

2.3. Test des dilueurs de congélation

Les pourcentages de réanimation des spermatozoïdes après congélation ont été très faible dans l'ensemble des dilueurs testés. Nos résultats pourraient s'expliquer par une activation préalable des spermatozoïdes par les dilueurs avant le début de la congélation. En effet, certains dilueurs sont susceptibles d'activer les spermatozoïdes si la concentration de certains réactifs n'est pas suffisante pour les immobiliser. Cela a été suggéré par Rana et Mc Donald (1989) qui ont montré qu'au cours de leur expérimentation, le faible pourcentage de spermatozoïde mobile obtenu après la décongélation était dû à une activation par le dilueur de Ringer. Ils étaient arrivés à obtenir de meilleurs résultats en augmentant le taux de potassium du dilueur.

Les faibles taux de réanimation au cours de notre expérimentation pourraient également s'expliquer par le temps mis entre la dilution et le début de la congélation (temps

d'équilibration). Le processus de mélange et de mise en paillette a duré environ 3 heures et pourrait avoir entraîné une baisse du pourcentage de spermatozoïde mobile. Harvey (1983) a montré que le pourcentage de spermatozoïdes mobiles de tilapia pouvait baisser de 60% à 40% en 20 mn de temps d'équilibration dans les dilueurs. Chao *et al.* (1987) ont également trouvé une baisse de 70% à 20% de spermatozoïdes mobiles en 2 heures de temps d'équilibration. Rana et Mc Donald (1989) ont aussi montré que le temps d'équilibration est nuisible et que la procédure la plus sûre est de congeler le sperme dilué immédiatement après la dilution.

Les faibles réanimations constatées dans les dilueurs de Ringer modifié et Freshwater Fish Saline démontrent que les dilueurs synthétiques pourraient bien conserver le sperme des souches de *O. niloticus* de la vallée du Kou. Cependant, la très courte durée des essais de congélation (4 jours) n'a pas permis de corriger les mises au point et de tester l'aptitude réelle des dilueurs à utiliser pour la cryoconservation la semence de la souche Kou de *O. niloticus*.

Conclusion et Perspectives

L'étude sur les caractéristiques spermatiques du tilapia du Nil, *O. niloticus* a permis de tester l'efficacité de quatre dilueurs synthétiques sur la congélation de la semence de la souche Kou. Les résultats obtenus sur les caractéristiques spermatiques (pH, motilité du sperme et les concentrations en spermatozoïdes) ont montré que les laitances de la souche Kou de *O. niloticus* sont de bonne qualité. Les dilueurs de Ringer modifié et Freshwater Fish Saline ont aussi permis une conservation du sperme avec cependant de faibles taux de réanimations. Toutefois, les résultats obtenus avec ces dilueurs après 72 heures de congélation, laissent entrevoir une possibilité d'amélioration de leur efficacité pour la cryoconservation de la semence de la souche Kou une fois le processus de congélation maîtrisé.

Des études plus approfondies pourraient être envisagées en vue d'une amélioration de la production spermatique des souches locales de *O. niloticus* et de la formulation des dilueurs de congélations locales efficaces. Nous suggérons donc les orientations suivantes :

1. Consolider les résultats sur les dilueurs synthétiques en mettant l'accent sur les dilueurs potentiels ;
2. entreprendre une étude de comparaison des dilueurs potentiels avec des formulations de dilueurs à base de produits locaux comme l'eau de coco, le jus de canne à sucre, le jus de souchet et lait de soja qui ont été déjà testés chez d'autres espèces comme *Clarias gariepinus*;
3. améliorer le processus de congélation en utilisant un congélateur programmable en vue d'un meilleur contrôle des vitesses de refroidissement ;
4. entreprendre une étude de comparaison entre les caractéristiques spermatiques de la souche de *O. niloticus* de la vallée du Kou et d'autres souches de la même espèce ou d'une autre espèce de tilapia.

Références bibliographiques

- Allyn M. L., Sheehan R. J., Kohler C. C., (2001).** The effect of capture and transportation stress on white bass semen osmolality and their alleviation via sodium chloride. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 130: 706-711.
- Baroiller J. F., Chourrout D., Fostier A., Jalabert. (1995).** Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding Cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.*, 273: 216-223.
- Baroiller J. F., D’Cotta H., et Saillant E. (2009).** Environmental effect on fish sex determination and differentiation. *Sexual development*, 3: 118-135.
- Billard R., Breton B., Jalabert B., Escraffre A. M., Solari A. (1971).** La production spermatogénétique chez la truite. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 11 (2) : 199-212.
- Billard R., Fostier A., Weil C., Breton B. (1982).** Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 65-79.
- Bobé J. et Labbé C. (2010).** Egg and sperm quality in fish. *General and comparative endocrinology*, 165: 535-548.
- Bobé J., Fostier A., Guiguen Y., Lareyre J. -J., Le Gac F. (2014).** La reproduction chez les poissons. *In La reproduction animale et humaine*, Dizier M. S. et Maillard S. C. eds quae, pp 653-671.
- Carpentier P. et Billard R. (1978).** Conservation à court terme des gamètes de Salmonidés à des températures voisines de 0°C. *Annales de biologies animale, biochimie, biophysique*, 18 (4) : 1083-1088.
- Chao N. H., Chao W. C., Liu K. C., Liao I. C.(1987).** The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J. Fish Biol.*, 30: 107-118.
- Charo-Karisa H., Rezk M.A., Bovenhuis H., and Komen H. (2005).** Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. *Aquaculture* 249: 115–123.
- Chereguini O., Cal R. M., Dreanno C., Ogier De Baulny B., Suquet M., Maise G. (1997).** Short term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. *Aquat. Living Resour.*, 10: 251-255.

Coward K., Bromage N. R., Little D. C (1998). Inhibition of spawning and associated suppression of sex steroid levels during confinement in the substrate spawning *Tilapia zillii*. *J. Fish Biol.* 52: 152-162.

CSCQ (2010). Fiche technique : numération cellulaire sur l'hématimètre de Neubauer. Fiche revue, Kessler D., Rider A. 2p.

Dabrowski K. et Ciereszko A. (1996). Ascorbic acids protect against male infertility in a teleost fish. *Experientia*, 52: 97-100.

Dada A. A. et Ogunduyile F. D. (2011). Effect of Velvet Bean (*Mucuna pruriens*) on sperm Quality of African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Broodstock. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 6(6) : 655-661.

D'Cotta, H., Pepey, E., Pfennig, F., Bienvenu, D., Gutze it, H.O., Volff, J.N., Wenning, M., Baroiller, J.F. (2007). Sox9a , Sox9b and Amh are up-regulated in the gonads during natural and temperature-induced tilapia male differentiation. Proceedings of the 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, June 3rd – 8th, Saint-Malo, France.

DPH (2009). Atelier Régional de Lancement du Projet de Développement Durable des Ressources Génétiques du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) dans le Bassin de la Volta. Ministère de la Production Animale et des Ressources Halieutiques, Côte d'Ivoire. Rapport final, Abidjan du 17 au 20 mars 2009.

FAO (1993). Valorisons la diversité de la nature. Archives de documents de la FAO. 8p.

FAO (2010). Diversité aquatique, une richesse inexploitée. Commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Rome, Italie. 2p.

FAO (2016). La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Contribuer à la sécurité alimentaire et à la nutrition pour tous. Rome. 224 p.

Fauve C., Suquet M., Cosson J. (2010). Evaluation of fish sperm quality. *Journal of applied Ichthyology*, 26 (5): 636-643.

Gennotte V., François E., Rougeot C., Ponthier J., Deleuze S., Mélard C. (2012). Sperm quality analysis in XX, XY and YY males of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Theriogenology*, 78: 210-217.

- Gourène B. et Agnès J. F. (1994).** Différenciation génétique de 20 populations d'*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Atelier Biodiversité et aquaculture en Afrique, Abidjan. 7p.
- Harvey B. J. et Hoar W. S. (1980).** La reproduction provoquée chez les poissons: Théorie et pratique. Ottawa, Ont, IDRC. 48p.
- Harvey B. (1983).** Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture*, 32: 313-320.
- Herrera A. A., Cruz R. R. et The Fish Genetics Breeding Programm Genetic Manipulation for Improved Tilapia Project (2001).** Developmental Biology of the supermale YY Tilapia (*Oreochromis niloticus*) : Histogenesis of the reproductive system. *Science Diliman*, 13 : 1, 33-40.
- Hyder M. (1970).** Histological studies on the testes of ponds specimens of *Tilapia nigra* (Gunther) (Pisces: *Cichlidae*) and their implications of the pituitary-testis relationship. *General and comparative endocrinology*, 14: 198-211.
- Jackson P. B. N. N. (1988).** Aquaculture in africa. In Lévêque C., M. Bruton and G. Ssentonge, eds. *Biology and Ecology of African Freshwater Fishes*. ORSTOM, Paris, pp. 459-480.
- John E., Parks V., Daniel V., Linch (1992).** Lipid composition and thermotropic phase behavior and boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiologie*, 29 : 255-266.
- Labe C., Maise G., Muller K., Zachowski A., Kaushik S., Loir M. (1995).** Thermal acclimation and dietary lipids alter the composition, but not fluidity, of trout sperm plasma membrane. *Lipids*, 30: 23-33.
- Lacroix E. (2004).** Pisciculture en zone tropical. GFA Terra system, Hamburg, Allemagne. 231p.
- Lazard J. (2009).** Synthèse pisciculture de quelques espèces : la pisciculture des tilapias. *Cahiers de l'agriculture*, 18 (2-3) : 174-182.
- Lazard J. (2013).** Les paradoxes et les questionnements soulevés par l'exploitation de la biodiversité (autochtones et introduites) en aquaculture. Académie d'agriculture de France. Groupe de travail sur les potentiels de la science pour l'avenir de l'agriculture, de l'alimentation et de l'environnement. 13p.

- Legendre M. et Billard R. (1980).** Cryoconservation du sperme de truite Arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.). *Bull. Fr. Piscic*, 278 : 11-33.
- Legendre M. et Jalabert B. (1988).** Physiologie de la reproduction = Physiology of reproduction. In Lévêque C., M. Bruton and G. Ssentongo, eds. *Biology and Ecology of African Freshwater Fishes*. ORSTOM, Paris, pp. 153-187.
- Lévêque C. et Paugy D. (2006).** Les poissons des eaux continentales africaines : diversité, écologie et utilisation par l'Homme. IRD Editions, 573p.
- Lou Y.-H. et Takahashi H. (1989).** Spermatogenesis in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* with notes on a unique pattern of nuclear chromatin condensation. *Journal of morphology*, 200: 321-330.
- Maisse G. (1990).** Le sperme des salmonidés : le point sur les connaissances. Applications à la salmoniculture. *INRA Prod. Anim.*, 3 : 223-228.
- Maisse G., Labbé C., Ogier De Baulny B., Leveroni Calvi S., Haffray P. (1998).** Cryoconservation du sperme et des embryons de poissons. *INRA Prod. Anim.*, 11: 57-65.
- Mazur P. (1974).** Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, 247: 125-142.
- Milon P. (2013).** Etude de l'impact de trois conditions d'élevage du poisson zebra et mise au point d'une méthode de congélation de sa semence dans l'optique de réaliser une analyse comparative entre le niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de poisson zèbre et d'étalon après congélation/décongélation. Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage ; Spécialité Productions Animales, Option Ingénierie zootechnique, CFR Rennes.46p (+ annexes).
- Mochida K., Kondo T., Matsubara T., Adachi S., Yamauchi K. (1999).** A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Develop. Growth Differ.*, 41: 619-627.
- Msiska O. V. (2002).** The histology of mature gonads of *Oreochromis* (Nyasalapia) *karongae* (Trevawas). *East African Wild Life Society, Afr. J. Ecol.*, 40: 164-171.
- Nahiduzzaman M., Akter S., Hassan M. M., Azad Shah A. K. M., Hossein M. A. R. (2014).** Sperm biology of artificially induced common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *International Journal of Fisheries and Aquatic studies*, 1(6) : 27-31.

Ogier De Baulny B. (1997). Cryoconservation du sperme de poissons (Truite Arc-en-ciel (*Onchorhynchus mykiss*), Turbot (*Scophthalmus maximus*), Silure glane (*Silurus glanis* L.), et Tilapia (*Oreochromis niloticus*)). Evaluation des dommages cellulaires, Amélioration de la technique de congélation, et Perméabilité membranaire aux cryoprotecteurs. Résumé de Thèse de Doctorat Sciences Biologiques Fondamentales et Appliquées, Sciences médicales, ENSA Rennes. 129p.

Paugy D. et Lévêque C. (2007). Le lac Victoria (Afrique de l'Est) malade de la Perche du Nil : réalité, mythe ou mystification ? *Natures Sciences et Sociétés*, 15 : 389-398.

Perez-Cerezales S., Martinez-Paramo S., Beirao J., Herraes M. P. (2010). Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damage sperm and embryo developmental success. *Reproduction*, 139: 989-997.

Philippart J-CI. et Ruwet J-CI. (1982). Ecology and distribution of tilapias, p15-19. In R. S. V. Pullin and R. H. Lowe-Mc Connell (eds) The biology and culture of tilapias. ICLARM Conference Proceedings 7, 432p. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.

Rana K. J. et Mc Andrew B. J. (1989). The viability of cryopreserved Tilapia spermatozoa. *Aquaculture*, 76: 335-345.

Rana K. J. (1995). Cryopreservation of aquatic gametes and embryos: recent advances and applications. In : Proceedings of the Fifth International Symposium, *Reproductive Physiology of fish* (ed. by F. W. Gotz et P. Thomas), p 85-89.

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

Ryan J. (2004). Guide général de cryoconservation de cultures de cellules animales. Bulletin technique. Corning Incorporated, Life Sciences, Lowell MA 01851, USA. 10p.

Saad A. et Billard R. (1995). Production et gestion des spermatozoïdes chez le poisson chat européen *Silurus glanis*. *Aquat. Living Resour.*, 8 : 323-328.

Sadiqul Islam M. et Akhter T. (2011). Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review. *Advances in Life Sciences*, 1 (1): 11-19.

Sanchez-Rodriguez M. et Billard R. (1977). Conservation de la motilité et du pouvoir fécondant du sperme de Truite Arc-en-ciel maintenu à des températures voisines de 0°C. *Bull. Fr. Piscic.*, 265 : 143-152.

- Shaliutina A. (2013).** Fish sperm motility parameters and total proteins profiles in seminal plasma during in vivo and in vitro storage. Thèse de Doctorat, Faculté des poisons et de la protection des eaux, Université du Sud Bohemie, République Czech. 96p.
- Shelton W. L. et Rothard S. (2006).** Exotic species in global aquaculture: a review. *Isr. J. Aquac. Bamidgeh*, 58 : 3-28.
- Schulz R. W. et Miura T. (2002).** Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 43-56.
- Sissao R. (2014).** Inversion thermique du sexe chez le Tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) : étude de la thermosensibilité des alevins de la population du lac de la vallée du Kou. Diplôme d'Etudes Approfondies en Gestion Intégrée des Ressources Naturelles; Option : Système de productions forestières ; Spécialité Halieutique, IDR/UPB. 35p.
- Suquet M., Dreanno C., Fauvel C., Cosson J., Billard R. (2000).** Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31 (3): 231-243.
- Toguyéni A. (1996).** La croissance différentielle liée au sexe chez le tilapia (Pisces : *Cichlidae*), *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) : contribution des facteurs génétiques, nutritionnels, comportementaux et recherche d'un relais endocrinien. Thèse de Doctorat, mention : Biologie et Agronomie, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Département Halieutique, Laboratoire de Physiologie des Poissons/INRA. 130p.
- Trevawas E. (1983).** Tilapia fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* et *Danikilia*. British Museum (Natural History). London. 583p.
- Tsadik G.G. et Bart A.N. (2007).** Effects of feeding, stocking density and water-flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 272 : 380-388.

