Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Influence d'une alimentation à base de sous-produits agro-industriels sur la qualité du sperme du poisson-chat africain au Rwanda

Pierrard, Marie-Aline

Award date:
2006

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 03. Jul. 2025

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

INFLUENCE D'UNE ALIMENTATION A BASE DE SOUS - PRODUITS AGRO-INDUSTRIELS SUR LA QUALITE DU SPERME DU POISSON-CHAT AFRICAIN AU RWANDA

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Marie-Aline PIERRARD

Août 2006

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Influence d'une alimentation à base de sous-produits agro-industriels sur la qualité du sperme du poisson-chat africain au Rwanda

PIERRARD Marie-Aline

Résumé

L'objectif de cette étude était de déterminer dans quelle mesure la substitution de la farine de poisson par des sous-produits agro-industriels, surtout d'origines végétales, dans l'alimentation destinée aux géniteurs de *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) pouvait influencer la qualité du sperme. Après vérification de l'état hormonal des poissons, divers paramètres de reproduction ont été testés quant à un impact éventuel de quatre régimes isoprotéiques et isoénergétiques contenant des concentrations croissantes en dérivés végétaux et animaux. Le contenu en farine de poisson dans ces régimes était dans les proportions suivantes: R1: 50%, R2: 25,7%, R3: 12,5%, R4: 0%. Les résultats de cette étude furent comparés à ceux présentés dans la littérature existante. Aucun effet du régime n'a été démontré sur le rapport gonadosomatique (RGS), le pH du liquide séminal et le pourcentage de spermatozoïdes à la membrane cellulaire intacte. Par contre, l'analyse statistique des résultats de la densité spermatique et de l'analyse des caractéristiques de motilité des spermatozoïdes assistée par ordinateur montrent une meilleure qualité des gamètes mâles chez les poissons nourris avec le régime 4 dépourvu en farine de poisson ($49,5.10^9$ Spz/ml, VCL: 66,6 µm/s, VAP: 31,1 µm/s, VSL: 13,9 µm/s, PFT: 5,2 µm/s, ARE: 22,2 µm², BCF: 4,5 Hz, ALH: 5,9 µm, %MOT: 61,6%, MOT Cn: $116,9.10^6$ Spz/ml et Lin: 4,9 %). La farine de poisson peut donc être partiellement, voire totalement, remplacée par des sous-produits végétaux sans effets néfastes significatifs sur la qualité du sperme.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Août 2006
Promoteur: P. Kestemont

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

The effect of fishmeal with farm by-products on the African catfish sperm quality in Rwanda.

PIERRARD Marie-Aline

Summary

This study was performed to evaluate the effect on *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) sperm's quality by replacing fishmeal with indigenous by-products. First, the hormonal state of the fish was checked. Then, several parameters were tested to check the possible impact of four diets with increasing concentrations of vegetal and animal by-products. All diets were balanced to be equal in gross energy (19MJ/Kg) and crude proteins (38%). The fishmeal's contents in these diets were as following : R1: 50%, R2: 25,7%, R3: 12,5%, R4: 0%. The results of these analysis were compared to those in literature. There was no conclusion concerning the gonadosomatic index's analysis (IGS), the seminal liquid pH and the percentage of the sperms with a perfect cellular membrane. However, the analysis of the results about the sperm density and the use of computer assisted sperm analysis (CASA) showed a better quality of male gametes among fish feeded with the fourth diet without any fish-flour ($49{,}5.10^9$ Spz/ml, VCL: 66,6 µm/s, VAP: 31,1 µm/s, VSL: 13,9 µm/s, PFT: 5,2 µm/s, ARE: 22,2 µm², BCF: 4,5 Hz, ALH: 5,9 µm, %MOT: 61,6%, MOT Cn: $116{,}9.10^6$ Spz/ml et Lin: 4,9 %). So, fishmeal can be partly or totally replaced by plant by-products without any harmful effects on the male gametes quality.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Août 2006
Promoteur: P. Kestemont

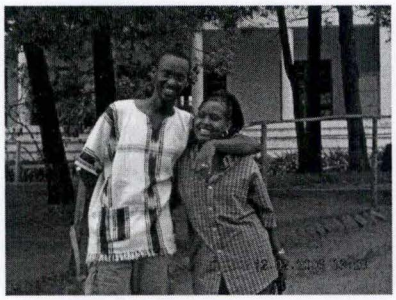
Remerciements

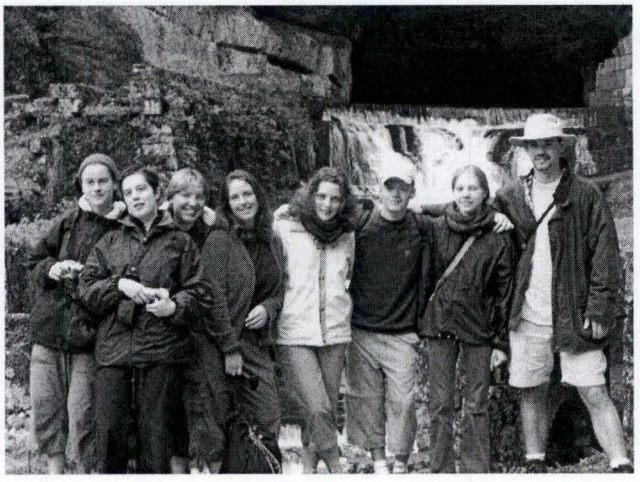
Un merci tout particulier à

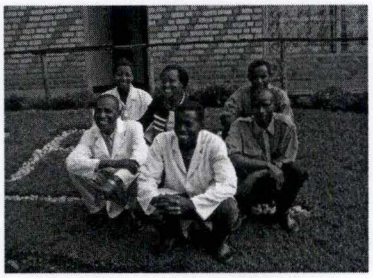
Mon promoteur de mémoire Patrick Kestemont,
Ma co-promotrice de mémoire Laetitia Nyina-Wamwiza

Un grand merci à mes divers encadreurs non attitrés

L'équipe URBO dans tout son ensemble,
Eugène Rurangwa et Katrien Van Look, chercheurs de la KUL et de l'Institut de Zoologie de Londres,
L'équipe de la SPIR,
L'équipe du LABOPHAR de Butare,
La faculté de médecine de l'UNR à Butare,
Ma grande et belle famille d'accueil du Rwanda,
Mes parents, Isa et Béa,
Tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.







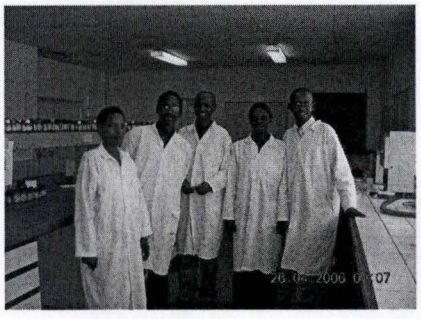


Table des matières

Synthèse bibliographique

1. Introduction 1
2. Influence de la nutrition sur la reproduction 1
   2.1. La teneur protéique 1
   2.2. Les anti-oxydants 1
   2.3. Les acides gras 2
3. Substitution de la farine de poisson par des sous-produits végétaux 3
   3.1. Intérêts et enjeux 3
   3.2. Les facteurs anti-nutritionnels 3
   3.3. Les phytoestrogènes 4
   3.4. Les acides gras 5
4. Stéroïdes sexuels et protéines impliqués dans le processus de reproduction 6
   4.1. Testostérone 6
   4.2. 11-Ketotestostérone 6
   4.3. Oestradiol 7
   4.4. Vitellogénine 7
5. Caractéristiques du sperme de poisson 7
   5.1. La production de la semence 7
   5.2. La spermatogenèse 7
   5.3. Particularités générales des spermatozoïdes de poisson 8
   5.4. La motilité des spermatozoïdes de poisson 8
   5.5. Le liquide séminal 9
6. Biologie du modèle d'étude: *Clarias gariepinus* 10
   6.1. Intérêt en aquaculture 10
   6.2. Ecologie 10
7. Reproduction et spécificités du sperme du poisson-chat africain *Clarias gariepinus* 11
   7.1. Généralités 11
   7.2. La récolte du sperme 12
   7.3. Les états de maturation du sperme 12
   7.4. Structure des spermatozoïdes 13
   7.5. La motilité 13
8. Evaluation de la qualité des gamètes mâles 14
   8.1. Différentes méthodes pour évaluer la qualité du sperme 14
   8.2. Computer assisted sperm analysis (C.A.S.A.) 16
9. Résultats de la recherche doctorale de Nyina-Wamwiza Laetitia 18
10. Conclusion de cette synthèse bibliographique 19

Matériel et méthodes

1. Infrastructure expérimentale et poissons 20
2. Conditions expérimentales 20
3. Régimes expérimentaux 21
4. Evaluation de la qualité du sperme 23
   a. Collecte du sperme 23
   b. Mesure du pH du liquide séminal 23
   c. Enregistrement de la motilité des spermatozoïdes 23
   d. Spermatocrite 26
   e. Intégrité membranaire des spermatozoïdes 26

5. Dosage des stéroïdes sexuels : Testostérone, Estradiol, 11 Keto-testostérone par Radio Immuno Assay (RIA)....27
- Les prélèvements....27
- Phase d'extraction....27
- Phase de compétition – incubation....27

6. Dosage de l'ALP (Alkali-labile phosphate assay)....28
7. Analyse Statistique....29

Présentation des résultats

1. Etat général des poissons....30
2. Rapports gonadosomatiques....30
3. Spermatocrite et densité du sperme....30
4. Le pH du liquide séminal....31
5. Intégrité membranaire des spermatozoïdes....32
6. Dosage des stéroïdes sexuels....33
   - Testostérone....33
   - 11-kétotestostérone....33
   - Oestradiol....34
   - Rapports E_2/T et 11KT/T....35
7. Dosage de l'ALP (Alkali-labile phosphate assay)....35
8. L'analyse du sperme assistée par ordinateur (CASA)....36
   - Les paramètres de vitesse des spermatozoïdes (VCL, VAP, VSL et PFT)....36
   - L'amplitude du déplacement latéral de la tête du spermatozoïde (ALH)....37
   - L'aire de la tête du spermatozoïde (ARE)....37
   - La fréquence des battements flagellaires (BCF)....38
   - Le pourcentage et la concentration de spermatozoïdes motiles (%MOT et MOT Cn)....38
   - La linéarité (Lin)....38

Discussion

1. Etat hormonal des mâles avant récolte du sperme et effet du régime....39
2. Qualité du sperme....41
3. Caractéristiques des spermatozoïdes....42
   - Les paramètres de vitesse VCL, VAP, VSL et PFT....43
   - Amplitude du mouvement latéral de la tête spermatique, ALH....43
   - La morphométrie de la tête spermatique, ARE....44
   - La fréquence des battements flagellaires, BCF....44
   - Le pourcentage et la concentration de spermatozoïdes motiles, %MOT et MOT Cn....45
   - La linéarité, Lin....46
4. Effet des régimes sur la qualité du sperme....46

Conclusion et perspectives 48

Références bibliographiques 50

Liste des espèces citées

Ablette lacustre	*Chalcalburnus chalcoides*	Güldenstadt, 1772
Aiglefin ou Eglefin	*Melanogrammus aeglefinus*	Linnaeus, 1758
Anguille européenne	*Anguilla anguilla*	Schrank, 1798
Bar européen	*Dicentrarchus labrax*	Linnaeus, 1758
Brochet	*Esox lucius*	Linnaeus, 1758
Carpe	*Cyprinus carpio*	Linnaeus, 1758
Chabot	*Cottus gobio*	Linnaeus, 1758
Cichlidé zébré	*Cichlosoma nigrofasciatum*	Günther, 1867
Daurade	*Sparus auratus*	Linnaeus, 1758
Esturgeon de lac	*Acipenser fulvescens*	Rafinesque, 1817
Esturgeon persan	*Acipenser persicus*	Borodin, 1897
Esturgeon sibérien	*Acipenser baeri*	Brandt, 1869
Flétan blanc - Halibut atlantique	*Hippoglossus hippoglossus*	Linnaeus, 1758
Gambusie	*Gambusia affinis*	Baird & Girard, 1853
Guppy	*Poecilia reticulata*	Peters, 1859
L'ombre commun	*Thymallus thymallus*	Linnaeus, 1758
Lamproie marine	*Petromyzon marinus*	Linnaeus, 1758
Loquette d'Amérique	*Macrozoarces americanus*	Bloch & Schneider, 1801
Medaka japonais	*Oryzias latipes*	Temminck & Schlegel, 1846
Morue	*Gadus morhua*	Linnaeus, 1758
Mulet doré	*Mugil auratus*	Risso, 1810
Perchaude ou perche	*Perca flavescens*	Linnaeus, 1758
Perche commune	*Perca fluviatilis*	Linnaeus, 1758
Poisson rouge	*Carassius auratus*	Linnaeus, 1758
Poisson spatule	*Polyodon spathula*	Walbaum, 1792
Poisson-chat à grosse tête	*Clarias macrocephalus*	Günther, 1864
Poisson-chat africain	*Clarias gariepinus*	Burchell, 1822
Poisson-chat américain	*Ictalurus punctatus*	Rafinesque, 1818
Poisson-chat bleu	*Ictalurus furcatus*	Valenciennes, 1840
Poisson-chat européen	*Silurus glanis*	Linnaeus, 1758
Poisson-lapin doré	*Siganus guttatus*	Bloch, 1787
Poisson zèbre	*Danio rerio*	Buchanan-Hamilton, 1822
Porte-écuelle naine à barbillons	*Lepadogaster lepadogaster nindus*	Bonnaterre, 1788
Saumon du Danube	*Hucho hucho*	Linnaeus, 1758
Silure africain	*Heterobranchus longifilis*	Valenciennes, 1840
Spare épineux	*Sparus pagrus*	Cuvier, 1816
Tambour brésilien	*Micropogonias undulatus*	Linnaeus, 1766
Tilapia du Nile	*Oreochromis niloticus*	Linnaeus, 1758
Truite arc-en-ciel	*Oncorhynchus mykiss*	Walbaum, 1972
Truite commune	*Salmo trutta fario*	Linnaeus, 1758
Turbot	*Psetta maxima, Scophtalmus maximus*	Linnaeus, 1758

Liste des abréviations

ACP :	analyse des composantes principales
ADN :	acide désoxyribonucléique
ALH:	amplitude du déplacement latéral de la tête spermatique (Amplitude of Lateral Displacement)
ALP :	phosphate alcalin libre
ANOVA :	analyse de la variance
ARE:	aire de la tête spermatique (Area Morphometry)
ARN :	acide ribonucléique
ASMA :	analyse automatique de la morphologie du sperme (Automatic Sperm Morphology Analysis)
ATP :	adénosine triphosphate
BCF:	fréquence des battements flagellaires (Beat Cross Frequency)
BSA :	sérum albumine bovine
CASA:	analyse du sperme assistée par ordinateur (Computer Assisted Sperm Analysis)
DHA :	acide docosahexaénoïque
DMN:	danse moyenne (Dance Mean)
E_2 :	oestradiol
EPA :	acide eicosapentaénoïque
FSH :	Follicle Stimulating Hormone
GTH :	hormone gonadotrope
hCG :	gonadotrophine chorionique humaine
11-KT :	11-kétotestotérone
LH :	Luteinizing Hormone
LIM ou LIN MOR:	morphométrie linéaire de la tête spermatique (Linear Morphometry)
Lin:	linéarité (linearity)
MAD:	déplacement angulaire moyen de la tête spermatique (Mean Angular Displacement)
%MOT :	pourcentage de spermatozoïdes motiles (Pourcentage of Motile Sperm)
MOT Cn :	concentration de spermatozoïdes motiles (Motile Concentration)
OHA :	11ß-Hydroxyandrosténédione
PEG :	polyéthylèneglycol
PFT :	variation de la vitesse linéaire (pause or variation of VSL)
PG :	prostaglandine
RGS :	indice gonadosomatique
RIA :	Radio Immuno Assay
SEM :	microscope électronique à balayage
Spz. :	spermatozoïde
STR:	indice de rectitude (Straightness)
T :	testostérone
TCA :	trichloroacétate
TEM :	microscope électronique à transmission
VAP :	vitesse angulaire (Angular Path Velocity)
VCL :	vitesse curvilinéaire (Curvilinear Velocity)
VSL :	vitesse linéaire (Straigth Line Velocity)
VTG :	vitellogénine

Introduction

Les problèmes de mal-nutrition en Afrique sont principalement dus à un manque d'accès aux sources protéiques, surtout d'origines animales. Au Rwanda, l'élevage est limité par la rareté et la faible fertilité des terres cultivables. En considérant un taux d'accroissement démographique de 2,43% (CIA World Factbook, 2005), la population du Rwanda pourrait générer un déficit de la production halieutique nationale qui devra être comblé par les importations et l'aquaculture. Par ailleurs, il semblerait que la population rwandaise accorde une attention croissante à la consommation de poissons. Il est souhaitable que les efforts à venir se portent sur les facteurs de développement susceptibles de baisser le prix des poissons afin de permettre aux populations rurales, qui constituent 95% de la population totale, d'avoir accès à ces produits malgré l'érosion de leur pouvoir d'achat.

Parmi les contraintes du développement de la pisciculture au Rwanda, on peut notamment relever le manque de personnel d'encadrement technique compétent, le manque d'apports réguliers en alevins, une production en poissons insuffisante, le manque d'aliments pour poissons et la construction onéreuse des étangs. Bien que l'utilisation de sous-produits agricoles comme aliments pour poissons soit une alternative intéressante, elle est encore peu répandue au Rwanda. Cette situation pourrait être imputable à un problème économique: prix de transport et prix du produit trop élevé, prix de vente du poisson trop faible et enfin, pouvoir d'achat de la population insuffisant (FAO, 1991).

Le choix de l'espèce d'élevage est également un point important. Les poissons-chats africains sont des animaux de haute valeur alimentaire en Afrique et constituent des espèces commerciales largement développées de par leurs facultés d'adaptation aux conditions d'élevage (Hecht, 1996 in Fagbenro 1999a). Néanmoins, ces poissons ont des besoins protéiques élevés. La farine de poisson, généralement le composant majeur des aliments en aquaculture, coûte cher et représente le principal obstacle pour l'élevage de cette espèce (Hardy, 1999). Développer des sources protéiques alternatives dans la nutrition des poissons permettra de résoudre le problème de la disponibilité en protéines animales accessibles à la population rurale puisque produites à moindre coût.

Ce mémoire est intégré au projet de thèse de Laetitia Nyina-Wamwiza qui teste la qualité de régimes alimentaires à base de dérivés animaux et végétaux sur le poisson-chat africain, *Clarias gariepinus*. Ces sous-produits peuvent contenir des substances antinutritionnelles ou des phytoestrogènes capables d'agir sur la reproduction des poissons. Dans le but de développer une production piscicole à partir de ce type d'aliment, l'impact sur le système reproducteur ne doit pas être négligé.

Ce travail commence par la présentation d'informations générales relatives à l'influence de la nutrition sur la reproduction, sur les caractéristiques du sperme de poisson et plus particulièrement de *Clarias gariepinus* et enfin sur les méthodes d'évaluation de la qualité des gamètes mâles chez les poissons. Une partie de ce mémoire a été réalisée à Butare au Rwanda où sont acclimatés les poissons. Le matériel et les méthodes employés lors de ce travail sont succinctement décrits. Les résultats sont présentés et discutés afin d'émettre une conclusion quant à l'analyse de la qualité du sperme des poissons nourris à base de sous-produits agro-industriels.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse bibliographique

1. Introduction

La reproduction est un phénomène biologique crucial dans le règne animal et il est influencé par divers facteurs externes dont la nutrition. En effet, l'apport d'énergie satisfaisant du point de vue quantitatif et qualitatif est essentiel pour le bon déroulement de cette période critique pour les géniteurs. La nutrition des poissons est une discipline encore récente dans laquelle de nombreux concepts sont découverts ou améliorés. Parmi les essais, le remplacement de la farine de poisson par des substituts protéiques d'autres origines semble très prometteur. Cependant, qu'en est-il de l'impact de ces régimes expérimentaux sur les capacités reproductives des poissons ? Plusieurs techniques d'évaluation de la qualité des gamètes peuvent, en tout cas en partie, répondre à cette question. C'est le sperme des reproducteurs mâles du poisson-chat africain, *Clarias gariepinus*, qui fait l'objet de notre attention dans cette synthèse bibliographique.

2. Influence de la nutrition sur la reproduction

Des déficiences alimentaires en nutriments essentiels dans le régime de poissons matures sont associées à une réduction de la fécondité, de la taille des œufs et du taux d'éclosion des œufs (Watanabe et Kiron, 1995 in Hardy, 1999). Certains nutriments tels que les acides gras essentiels et les antioxydants sont particulièrement importants dans la nutrition des géniteurs, particulièrement les reproducteurs permanents avec de courtes périodes vitellogéniques (Izquierdo et al., 2001). L'alimentation des géniteurs peut également affecter la qualité du sperme (Li et al., 2005).

2.1. La teneur protéique

Des régimes à teneur protéique plus élevée augmentent les performances des géniteurs et augmentent la production de larves. La puberté et la maturation des ovocytes des femelles de tilapia, *Oreochromis niloticus*, se produisent plus tôt lorsqu'elles sont nourries avec des niveaux supérieurs de protéines. Gunasekera et al. (1995) conclurent que cela doit être dû à l'effet du régime sur la croissance des poissons. La taille des ovocytes et la fécondité des femelles de tilapia semblent également plus importantes pour un régime de teneur protéique élevée (Gunasekera et al., 1995 in Chong et al., 2004).

2.2. Les anti-oxydants

La fonction anti-oxydante de certaines vitamines fournit une protection importante pour les cellules spermatiques, depuis la spermatogenèse jusqu'à la fertilisation, en réduisant le risque de peroxydation des lipides qui est préjudiciable à la motilité des spermatozoïdes. Les besoins en antioxydants dans l'alimentation des poissons augmentent durant la reproduction (Fernandèz-Palacios et al., 1998 in Izquierdo et al., 2001). Cela peut être lié à la formation de radicaux libres durant la biosynthèse des stéroïdes sexuels (Rapoport et al., 1998 in Izquierdo et al., 2001). Une déficience en vitamine E affecte les performances reproductives en entraînant l'immaturité des gonades et un faible taux de survie de la progéniture. A l'inverse, une augmentation de la teneur en α-tocopherol (une teneur de 125 mg/kg) produit une amélioration de la fécondation chez les daurades, *Sparus auratus* (Izquierdo et al., 2001). De même, des régimes alimentaires supplémentés en vitamine C favorisent la capacité de fécondation des spermatozoïdes. L'acide ascorbique, par ces propriétés anti-oxydantes,

protègerait l'ADN nucléaire et les membranes d'éventuels dommages (Dabrowski et Ciereszko, 1996 in Rurangwa et al., 2004). Le contenu en vitamine C dans le régime des truites arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, est corrélé à sa concentration dans les œufs et est associé à une amélioration de la qualité des œufs (Sandnes et al., 1984 in Izquierdo et al., 2001). Les caroténoïdes peuvent également jouer le rôle de protecteur de l'intégrité membranaire contre les radicaux libres et les espèces oxygénées actives. Une étude de Watanabe et Kiron (1995) montre que l'addition d'astaxanthine purifiée au régime des géniteurs de spare épineux, *Sparus pagrus*, améliore clairement le pourcentage d'œufs flottants, d'éclosions ainsi que le pourcentage de larves normales.

2.3. Les acides gras

La composition en acides gras et lipides du régime des géniteurs est un facteur important qui détermine le succès de reproduction et la survie de la progéniture (Izquierdo et al., 2001). Les acides gras sont des composants structuraux et physiologiques importants des membranes cellulaires et peuvent jouer un rôle important dans la perméabilité, les activités enzymatiques et autres (Li et al., 2005). Chez la truite arc-en ciel un régime à teneur lipidique élevée altère la composition, mais pas la fluidité, des membranes des spermatozoïdes et augmente leur capacité de fertilisation (Labbé et al., 1995 in Rurangwa et al., 2004). La composition en acides gras du sperme détermine l'intégrité membranaire après congélation de la semence. Un rapport cholestérol-phospholipide faible est corrélé avec une meilleure résistance du sperme à la congélation (Labbe et Maisse, 1996 in Izquierdo et al., 2001). Des régimes riches en acides gras influencent les profils en acides gras du sperme chez les poissons (Bell et al., 1996), les oiseaux et les humains (Conquer et al., 2000 in Pérez et al., 2000). On ne connaît pas encore les composants du liquide séminal où des spermatozoïdes pouvant être impliqués dans la régulation de la motilité des spermatozoïdes. Cependant, des études in vitro utilisant les poissons ont montré que l'acide arachidonique (AA; 20:4n-6), à partir d'une conversion en prostaglandines (PGs), stimule la production de testostérone dans les ovaires et testicules du poisson rouge, *Carassius auratus* L. (Mercure et Van Der Kraak, 1996 in Pérez et al., 2000) et dans les testicules du bar européen, *Dicentrarchus labrax* (Asturiano et al., 1999 in Pérez et al., 2000). Ceux-ci, nourris avec des pelotes commerciales enrichies en huile de poisson ont une période de spermiation plus longue, des volumes de sperme et des concentrations en spermatozoïdes plus élevés et un meilleur taux de survie des embryons et des larves après la fertilisation que les individus contrôles (Astuarino et al., 2001). Par contre, d'autres acides gras polyinsaturés, incluant l'EPA et le DHA, atténuent la stimulation des gonadotrophines dans la production des stéroïdes à la fois dans les testicules du poisson rouge et de la truite et dans les ovaires du poisson rouge (Mercure et Van Der Kraak, 1995 in Pérez et al., 2000). Chez les humains, des niveaux élevés de DHA dans le sperme sont associés à des spermatozoïdes de bonne qualité en terme de densité et de mobilité (Conquer et al., 1999 in Pérez et al., 2000) et ce, bien que les régimes suppléés en DHA n'aient pas d'effet sur la motilité du sperme (Conquer et al., 2000 in Pérez et al., 2000). Les acides gras insaturés avec 20 atomes de carbone ou plus, affectent directement ou à travers leurs métabolites, la maturation des poissons et la stéroïdogenèse (Izquierdo et al., 2001).
Chez certaines espèces de poissons, les longs acides gras insaturés augmentent la fécondité, la fertilisation et la qualité des œufs (Duray et al., 1994 in Izquierdo et al., 2001). Les acides gras polyinsaturés peuvent réguler la production des prostaglandines qui sont impliquées dans plusieurs processus de reproduction dont la production de stéroïdes sexuels et le développement gonadique tel que l'ovulation. Lorsque le niveau d'acides gras longs insaturés (n-3) augmente dans le régime des géniteurs, le pourcentage d'œufs morphologiquement normaux s'élève également, tout comme le taux d'incorporation de ces acides gras essentiels dans les œufs (Fernandez-Palacios et al., 1997 in Izquierdo et al., 2001). La composition en

lipides des œufs de poissons n'est pas seulement dépendante du régime mais elle est également fonction de l'espèce (Pickova et al., 1997 in Izquierdo et al., 2001). Une augmentation du niveau de lipides de 12 à 18 % dans le régime des géniteurs du poisson-lapin, *Siganus guttatus*, conduit à une élévation de la fécondité et du taux d'éclosion (Duray et al., 1994 in Izquierdo et al., 2001). Le taux optimal d'acides gras longs polyinsaturés n-3 requis pour une qualité d'œufs élevée est approximativement de 11 à 20 % du total des acides gras nécessaires à l'espèce de poisson considérée (Bruce et al., 1999 in Li et al., 2005). L'effet de la composition en acides gras d'un régime sur le contenu en acides gras des œufs peut être étendu aux larves (Li et al., 2005).

3. Substitution de la farine de poisson par des sous-produits végétaux

3.1. Intérêts et enjeux

Dans de nombreux pays, la source protéique d'un régime conventionnel pour l'alimentation des poissons-chats est souvent peu abondante et coûteuse (Fagbenro, 1999a). Une augmentation de l'utilisation de dérivés végétaux comme source protéique réduirait le coût des productions aquacoles. Les produits végétaux peuvent remplacer une portion significative des protéines animales dans l'alimentation des poissons avec des bénéfices sur les plans économique, nutritionnel et environnemental (Rumsey, 1993 in Fagbenro, 1999a). Ces sous-produits contiennent un nombre variable de facteurs antinutritionnels, un taux de fibre élevé, un haut niveau d'hydrates de carbone, une faible teneur en protéines, certaines substances toxiques et parfois même, des pesticides. Ceci limite l'emploi des déchets agricoles dans l'alimentation des poissons. Leur utilisation est fonction de leur composition nutritionnelle, leur quantité et leur disponibilité durant l'année, le coût engendré par leur transport, le risque de pollution, le coût des traitements thermiques ou autres (Ulloa et al., 2004). Bien que les graines de légumes n'aient pas été largement utilisées en alimentation pour poissons, elles constituent une bonne source de protéines et d'énergie (Fagbenro, 1999a). Par exemple, l'huile de palme représente, de par sa disponibilité, son moindre coût et sa concentration élevée en vitamine E, un substitut de choix de l'huile de poisson pour la formulation de régime alimentaire (Ng et al., 2003). Sont classés parmi les sous-produits végétaux, les résidus utilisés et les déchets, c'est-à-dire les résidus non utilisés. De nombreuses études démontrent la possibilité d'incorporer certains déchets agricoles dans le régime de poissons omnivores et spécialement s'ils sont élevés en système semi intensif (étangs ou cages localisées dans des étangs) (Rathbone et al., 2001 in Ulloa et al., 2004)

3.2. Les facteurs anti-nutritionnels

Les aliments à base de dérivés végétaux sont connus pour contenir de nombreuses substances anti-nutritionnelles. Parmi celles-ci, les inhibiteurs de protéases, les phytates, les glucosinolates, les saponines, les tannins, les lectines, les oligosaccharides, les phytoestrogènes, les alcaloïdes, les composés antigéniques, le gossypol, les cyanogènes, les mymosines, les anti-vitamines et encore bien d'autres (Francis et al., 2001). Les anti-nutriments sont définis comme étant des substances qui, de par elles-mêmes ou de par leurs produits métaboliques, interfèrent avec l'utilisation de l'aliment (Makkar, 1993 in Francis et al., 2001). La plupart des ingrédients dérivés des végétaux contiennent plus d'une substance anti-nutritionnelle et il est, de ce fait, difficile d'affecter un seul composant comme étant le coupable des effets néfastes. Aussi, il est important de tenir compte des interactions possibles entre différents facteurs anti-nutritionnels qui peuvent, dans certains cas, conduire à une diminution ou à une augmentation de l'effet toxique global (Francis et al., 2001). La variété de facteurs anti-nutritionnels endogènes aux végétaux est un frein à l'emploi de cette source

Tableau 1 : Plusieurs études traitant de l'impact des phytoestrogènes dans la nutrition des poissons sur la reproduction

Aliment ou Phytoestrogène	Etude	Variables	Résultats	Références
Composés isoflavoniques du soja	Trois régimes: régime à base de soja, régime commercial pour truites et régime synthétique fait de caséine (le contrôle) testés sur l'esturgeon sibérien, *Acipencer baeri*.	Concentration de vitellogénine dans le sang.	La vitellogénine était en concentration significativement plus élevée pour le régime commercial pour truites et encore plus pour le régime à base de composés isoflavoniques. Les niveaux d'androgènes plasmatiques étaient élevés dans les trois groupes mais il n'y avait pas de différence significative entre ceux-ci. Les esturgeons nourris avec le régime commercial pour truites ont leur foie ainsi que leurs hépatocytes hypertrophiés par rapport aux deux autres régimes.	Pelissero et al., 1991a
Génistéine, formononetin, daïdzéine, coumestrol, biochanin A et equol	Ces phytoestrogènes ont été synthétisés et biologiquement testés chez des esturgeons sibériens, *Acipencer baeri*, âgés d'un an.	L'induction de la sécrétion de vitellogénine.	Tous ces phytoestrogènes ont démontré une activité oestrogénique par l'induction de la synthèse hépatique de vitellogénine lorsqu'ils sont injectés en intrapéritonéale. Le coumestrol semble être le phytœstrogène le plus actif pour la dose la plus faiblement administrée. Tous ces phytoestrogènes se sont montrés considérablement moins puissants que la 17β-oestradiol.	Pelissero et al., 1991b
Graines de soja	*Oncorhynchus mykiss* nourries avec des régimes à base de graines de soja de teneur variable.	Concentration en vitellogénine et cholestérol plasmatiques, activité antigénique du soja, anti-corps contre le soja dans le plasma, phytoestrogènes dans le soja et dans la bile.	Concentration plasmatique en vitellogénine pas significativement affectée par les différents régimes. Pas d'anticorps contre le soja détectés dans le sérum et peu de phytoestrogènes étaient présents dans les ingrédients. Des traces de phytoestrogènes ont étés détectés au niveau de la bile des truites nourries avec un régime contenant 100% de protéines de soja, la concentration en cholestérol plasmatique a été réduite par rapport aux poissons nourris avec 100% d'aliments pour poisson.	Kaushik et al., 1995
Génistéine	*Oncorhynchus mykiss* nourries selon trois régimes contenant de la génistéine à un taux d'incorporation de 0, 500 et 1000 ppm.	Performance de croissance et niveaux de cholestérols plasmatiques. Concentrations en vitellogénine, testostérone, β-FSH, β-LH, 17α20βP. Motilité et concentration du sperme, développement testiculaire, pourcentage d'ovulation, taux de fertilisation et viabilité des larves.	Développement testiculaire des mâles accéléré, la motilité du sperme et sa concentration sont diminuées de manière dose-dépendante au moment du frai. Diminution de la synthèse de testostérone. Faible mais constante induction de la synthèse de vitellogénine, Diminution du pourcentage de femelles ovulant (100 à 79%), plus faible taux de fertilisation, plus faible viabilité des larves.	Bennetau-Pelissero et al., 2001

protéique alternative. On peut néanmoins inactiver ceux-ci par un traitement physique (la cuisson, le trempage, le séchage, l'ébullition, etc.), biologique (ensilage, fermentation, champignons), chimique (basique et acide) ou encore en les combinant (Ulloa et al., 2004). Toutefois, un traitement thermique trop important peut réduire la disponibilité de certains acides aminés tels que la lysine (Fagbenro, 1999a).
Par exemple, les haricots ailés, *Psophocarpus tetragonolobus*, contiennent à l'état cru des tannins et des lectines qui peuvent être supprimés par stérilisation à l'autoclave et torréfaction. Ils peuvent être utilisé comme source alternative de protéine à condition d'un supplément en méthionine, d'autant qu'il existe des variétés contenant de faibles niveaux de facteurs anti-nutritionnels et que de nouveaux processus technologiques de traitement se développent (Fagbenro, 1999b).

Action du gossypol sur le sperme
Des aliments contenant des niveaux de coton supérieurs à 8% provoquent une altération dans l'activité spermatique en augmentant le nombre de spermatozoïdes anormaux et le nombre d'anomalies histologiques au niveau des testicules (Salaro et al., 2000 in Francis et al., 2001). Les cellules spermatiques de la perchaude, *Perca flavescens*, sont immobilisées, in vitro, par un niveau de 200 µM de gossypol (Ciereszko et Dabrowski, 2000 in Rurangwa et al., 2004). Nourrir la truite arc-en ciel avec du gossypol n'affecte pas la motilité du sperme ni la capacité de fertilisation bien que la testostérone et la 11-ketotestostérone soient élevées dans certains groupes expérimentaux (Dabrowski et al., 2001). Cependant, les mâles de la lamproie marine, *Petromyzon marinus* injectés avec du gossypol, voient la motilité de leurs spermatozoïdes diminuer (Rinchard et al., 2000). On a, de plus, récemment découvert le transfert du gossypol aux œufs de truite arc-en-ciel, ce qui peut conduire à une réduction des performances reproductives des femelles de truites. Et ce, bien qu'aucun effet sur la croissance ou la mortalité des poissons n'ait été démontré (Blom et al., 2001 in Rurangwa et al., 2004).

3.3. Les phytoestrogènes

Les phytoestrogènes sont des substances naturellement présentes dans les plantes ou issues du métabolisme de précurseurs présents dans les végétaux. Ces molécules ont une analogie de structure chimique avec le 17β-oestradiol à l'origine de similarités fonctionnelles (Tapiero et al., 2002). Les phytoestrogènes sont représentés par un ensemble de quatorze molécules appartenant à six familles chimiques: isoflavones, isoflavanes, coumestanes, flavanones, chalcones et enterolignanes. Les phytoestrogènes sont considérés comme des xénobiotiques, perturbateurs endocriniens. Ils peuvent affecter le système hormonal de différentes façons: soit produire une réponse hormonale normale, soit ne provoquer aucune réponse en bloquant le site de liaison du récepteur, soit se lier à d'autres récepteurs et créer une nouvelle réaction ou interférer indirectement avec l'action hormonale normale, soit altérer la production et le métabolisme des récepteurs hormonaux en modifiant les réponses endocrines (Tapiero et al., 2002). Il existe des sources animales et végétales variables de stéroïdes et de substances « steroid-like » dans les régimes de poisson. Les composés sont absorbés à travers la paroi de l'intestin et entrent dans la circulation entérohépatique, soit tels quels, soit sous formes conjuguées. Au niveau du foie, certaines formes sont détoxifiées mais le foie peut aussi être la cible de certains de ces composés. Les substances, une fois absorbées, peuvent stimuler la production de vitellogénine et de protéines se liant aux stéroïdes, ces dernières entraînant une accumulation de stéroïdes. Les stéroïdes naturels et les substances « steroid-like » semblent affecter le développement du système reproducteur et la croissance (Pelissero et Sumpter, 1992). Les phytoestrogènes tels que les isoflavones et les lignanes sont plus stables et restent dans le corps plus longtemps que les estrogènes naturels. La plupart de ces composés sont

Suite du tableau 1 :

Aliment ou Phytoestrogène	Etude	Variables	Résultats	Références
Génistéine	Des adultes Médaka, *Oryzias latipes*, des deux sexes exposés, par injection intrapéritonéale, à 75, 750 et 30 000 ng génistéine/poisson. Le contrôle correspond à une injection de 300ng/poisson de 17β-oestradiol.	Concentration en vitellogénine (Western blots), E_2 et T (EIA). La capacité des gonades à synthétiser et libérer les stéroïdes (ex vivo, incubation avec 25-hydroxycholesterol).	Les femelles traitées avec 750 et 30000ng de génistéine ont une production d'E2 plus élevée que pour le traitement avec la 17β-oestradiol. Les mâles traités avec la génistéine ont une production de testostérone diminuée in vivo et ex vivo.	Zhang et al., 2002
Phytosterols isolés du bois et des grains de soja	Le poisson zèbre, *Danio rerio*, des deux sexes, continuellement exposés durant trois générations à deux préparations de phytostérol Une préparation isolée du bois : 80% β-sitosterol, 10-15% β-sitostanol, 8% campesterol et 1% campestanol Une préparation isolée du soja : 50% β-sitosterol et le reste campesterol et dihydrobrassecasterol.	Concentration de vitellogénine dans le sang, Changement du sexe ratio.	Induction de la synthèse de vitellogénine pour les deux préparations de phytostérol. Les stérols du bois entraînent un changement du sexe ratio à 10 et 20 µg/l. Les stérols du soja conduisent à la mort des individus F1 exposés à une dose de 10µg/l.	Nakari et Erkomaa, 2003
Oestradiol-17β	Nourrir la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, avec de larges quantités d'oestradiol.	Etat du foie et des reins.	Accumulation d'une grande quantité de matériel hyalin dans le foie et les reins qui cause une pathologie conséquente de ces tissus. Les auteurs suggèrent qu'il s'agit de la VTG.	Wester et al., 1985 in Folmar et al., 2001
Gossypol	Effet d'une seule injection (100 ou 200 mg gossypol/kg et 25 ou 50 mg/kg) de gossypol sur la viabilité du sperme des mâles lamproie, *Petromyzon marinus*.	Concentration, quantité et motilité du sperme, taux de fertilisation, concentrations des stéroïdes sexuels plasmatiques (T, P, E2, 17α20βP). Examen histologique des testicules.	Haute mortalité suite à l'injection de gossypol (84,6% pour une injection de 200mg/kg). Motilité et concentration du sperme supérieures pour le groupe contrôle. Pas d'effet sur le taux de fertilisation. La concentration d'E2 diminue avec l'augmentation de la concentration de gossypol. La structure histologique des testicules est inchangée.	Rinchard et al., 2000
Gossypol	Etude sur le rôle des isomères de gossypol se liant au plasma sanguin, au liquide séminal et aux spermatozoïdes afin d'élucider l'action de stérilité chez la truite arc-en-ciel, *Onchorhynchus mykiss*.	La concentration et la motilité du sperme. La concentration en stéroïdes sexuels (11KT, T, 17 α20βP). Le taux de fertilisation et d'éclosion. Mesure de l'hématocrite [%], de la concentration en hémoglobine [g/l], les protéines présentes dans le sang et le liquide séminal [mg/ml].	La concentration de spermatozoïdes diminue avec l'incorporation de gossypol dans le régime (0,22 à 0,95 %). La motilité du sperme et la capacité de fertilisation n'ont pas été affectées. Les concentrations en stéroïdes sexuelles n'ont pas été supprimées. Le gossypol est 100 fois plus concentré dans le le plasma sanguin que dans le liquide séminal démontrant l'existence d'une barrière entre la circulation générale et les testicules.	Dabrowski et al., 2001
Ethynylestradiol	Exposition d'adultes de poissons zèbres, *Danio rerio*, à 5 ng/l d'ethynylesradiol.	Motilité, morphologie et capacité de fertilisation du sperme, nombre d'oeufs, taille et succès d'éclosion.	Arrêt du développement des oeufs au stade de blastula et induction de la vitellogenèse chez les mâles exposés.	Kime et Nash, 1999

lipophiles et s'accumulent dans le tissu graisseux de l'animal. Cependant, si on compare l'oestradiol ou l'estrone aux estrogènes « alimentaires », ceux-ci sont nettement moins puissants (Tapiero et al., 2002). Les phyto tout comme les xéno-oestrogènes, sont 10^4 à 10^5 fois moins puissant que l'E_2 (Gutendorf et Westendorf, 2001). Leur action dépend de leur concentration, du statut du récepteur, de la concentration des estrogènes endogènes et de l'organe ou de la cellule cible (Tapiero et al., 2002). Parmi les isoflavones présents dans les légumes et les haricots, les phytoestrogènes les plus étudiés sont la génistéine et la daïdzéine. Les lignanes sont largement distribuées dans les plantes incluant les céréales, les légumes, les huiles, les légumineuses et les fruits. Parmi ces aliments, les haricots rouges, présents dans nos régimes expérimentaux, sont une bonne source de lignanes (Kardinaal et al., 1997). Chez les humains, la consommation d'isoflavones et de lignanes végétaux se poursuit par une conversion métabolique au niveau de l'intestin. La formation de composés hétérocycliques phénols ayant une structure proche des estrogènes en résulte (Brzezinski et Debi, 1999). La daïdzéine peut être transformée en equol par la microflore intestinale de nombreux mammifères. Or, l'equol est environ dix fois plus oestrogénique que la daïdzéine (Pelissero et al, 1990 in Bennetau-Pelissero et al., 2001). Comparée aux mammifères, la dégradation de xénobiotiques chez certains poissons tels que la truite arc-en-ciel semble être moins importante car l'influence de la microflore de l'intestin est quasiment nulle (Lesel, 1987 in Bennetau-Pelissero et al., 2001). L'étude menée par Bennetau-Pelissero et al. (2001) suggère que la génistéine conduit à une accélération de la spermatogenèse. Sous certaines circonstances, une dégradation de la motilité du sperme et une diminution de sa concentration peuvent être attendues au moment du frai. En fonction de l'espèce, les isoflavones, lorsqu'ils se lient aux récepteurs oestrogéniques du tissu cible, peuvent agir comme des agonistes des oestrogènes en augmentant la synthèse d'ARN (Thompson et al., 1984 in Bennetau-Pelissero et al., 2001) ou agir comme antagonistes en bloquant la réplication de l'ARN (Adlercreutz et al., 1987 in Bennetau-Pelissero et al., 2001). L'induction de la synthèse de vitellogénine au niveau du foie est largement employée comme biomarqueur de l'exposition à des oestrogènes environnementaux. Aussi, parmi les effets d'une exposition aux oestrogènes, on s'attend à une augmentation de la libération d'oestradiol au niveau des gonades, à la fois chez les mâles et les femelles, et à une diminution de la libération de testostérone au niveau des testicules. Mais ces effets ne sont pas toujours confirmés. Plusieurs études traitant de l'impact des phytoestrogènes dans la nutrition des poissons sur la reproduction sont présentées au tableau1.

Finalement, l'action des différents phytoestrogènes présente une grande variabilité en fonction de l'espèce, de la durée et de la dose d'exposition, ainsi que de quelques facteurs encore inconnus incluant l'activation différentielle des sous-types du récepteur oestrogénique et des enzymes impliquées dans ces mécanismes (Zhang et al., 2002).

3.4. Les acides gras

La source lipidique alimentaire peut modifier la composition du sperme et de la membrane des gamètes mâles (Labbé et al., 1995 in Dreanno, 1997). Les huiles végétales contiennent des taux élevés d'acides gras polyinsaturés mais manquent d'acides éicosapentaénoïques (EPA) et d'acides docosahexaénoïques (DHA) (Figueiredo-Silva et al., 2005). Or, les poissons marins sont présumés incapables de convertir des acides gras à 18C tels que l'acide linoléique (18 :2 n-6) et l'acide linolénique (18 :3 n-3) en acides gras longs polyinsaturés de 20 à 22C. C'est pourquoi ceux-ci sont considérés comme des acides gras essentiels du régime alimentaire de ces poissons (Sargent et al., 2002 in Li et al., 2005).
En général, des niveaux faibles d'acides gras longs polyinsaturés n-3 dans le régime des géniteurs diminuent la qualité des œufs et des larves (Rodriguez et al., 1998).

Tableau 2 : La densité du sperme [10^9 Spz/ml] de plusieurs espèces de poissons.

Espèces	Densité du sperme [10^9 Spz /ml]	Références
Sperme de poisson en général	0,002 - 65 0,7-130	Billard et al., 1995a Suquet et al., 1994
Cyprinus carpio	18,7 ± 3,1 15	Rurangwa et al., 2002 Lubzens et al., 1997
Melanogrammus aeglefinus	1,84 - 13,15	Rideout 2004
Scophtalmus maximus	0,7 à 11	Taborsky, 2001
Perca fluviatilis	17,0 ± 0,23 32,0	Lahnsteiner et al., 1995 Rougeot et al., 2004
Dicentrarchus labrax	60 15,9 ± 0,48 5 - 55	Fauvel et al., 1999 Felip et al., 2006 Mylonas et al., 2003
Anguilla anguilla	1 - 1,4	Perez et al., 2000
Heterobranchus longifilis	2,94	Legendre et al., 1992
Clarias gariepinus	18,5 ± 1,8 4,00 8,2 ± 2,0	Rurangwa et al., 2002 Legendre et al., 1992 Mansour et al., 2003

Tableau 3 : Le rapport gonadosomatique [%] de plusieurs espèces de poissons.

Espèces	RGS [%]	Références
Poecilia reticulata	5	Suquet et al., 1994
Oreochromis niloticus	0,2 à 2,7	Suquet et al., 1994
Gadus morhua	16	Suquet et al., 1994
Perca fluviatilis	7,9	Rougeot et al., 2004
Silurus glanis.	1 à 1,5	Billard et al., 1997
Heterobranchus longifilis	0,37	Legendre et al., 1992
Clarias gariepinus	0,49	Legendre et al., 1992
Oncorhynchus mykiss	6 à 10	Suquet et al., 1994

Tableau 4 : Le pH du liquide séminal de diverses espèces de poissons.

Espèces	pH du liquide séminal	Références
Cyprinus carpio	7,0 - 8,0	Cosson et al., 1991
Clarias macrocephalus	6,4 - 9,4 6,4 - 9,4	Tan-fermin et al., 1999 Josefa et al., 1999
Oncorhynchus mykiss	9,0 8,0 - 8,2	Billard et Cosson, 1988 Lahnsteiner et al., 1998
Scophtalmus maximus	9,0	Chevaud et al., 1995
Ictalurus punctatus	6,5 - 8,5	Brunson 1989; Bates et al., 1996
Acipenser persicus	8,0	Alavi et al., 2004 a
Acipenser baeri	8,2	Gallis et al., 1991

La peroxydation des lipides est un sérieux problème pour les matériaux biologiques contenant des acides gras insaturés. Les animaux aquatiques sont caractérisés par une plus grande richesse en acides gras longs polyinsaturés et en particulier ceux de la série n-3 (Corraze, 2001 in Figueiredo-Silva et al., 2005), ce qui les rend plus vulnérables à la peroxydation (Mourente et al., 2002 in Figueiredo-Silva et al., 2005). L'utilisation d'huiles végétales permet une réduction de la peroxydation des lipides musculaires des mammifères (Lopez-Bote et al., 1997) et de certaines espèces de poissons (Alvarrez et al., 1998 cités par Figueiredo-Silva et al., 2005). De plus, les huiles végétales, dans la plupart des pays, sont plus disponibles et moins coûteuses que les huiles de poisson (Figueiredo-Silva et al., 2005).

4. Stéroïdes sexuels et protéines impliqués dans le processus de reproduction

La maturation sexuelle chez le poisson-chat africain commence par la différenciation des testicules à l'âge de 6 semaines. La première apparition de spermatocytes dans les testicules se fait aux alentours de 12 semaines et marque le début de la puberté (Dubois et al., 2001).
Les principaux composants du système reproducteur sont les gonades et le système endocrine qui régule l'activité des gonades. Les stéroïdes sexuels stimulent le développement de l'axe cerveau-hypophyse-gonade. Chez les téléostéens, on distingue deux types de gonadotropines dans la glande pituitaire. La GTH 1 comparable à la FSH (Follicle stimulating hormone) et la GTH 2 comparable à la LH (Luteinizing hormone). Ces gonadotropines stimulent la spermatogenèse chez les téléostéens. Les testicules produisent à la fois les spermatozoïdes et les stéroïdes sexuels. Les stéroïdes sexuels sont requis à la fois pour exercer un feedback négatif sur le cerveau et la glande pituitaire mais aussi au niveau de la gonade pour le développement des cellules germinales (Schulz et Goos, 1999).

4.1. Testostérone

Contrairement aux mammifères, la testostérone n'est pas l'hormone principale du processus de reproduction chez les téléostéens. Ce stéroïde est présent aussi bien chez les mâles que chez les femelles, étant donné son rôle de précurseur de la 11-kétotestostérone et de l'oestradiol. La thèque du follicule ovarien produit la testostérone qui diffuse à travers la granulosa pour être aromatisée en oestradiol. Aussi, la testostérone peut atteindre des concentrations plus élevées chez les femelles que chez les mâles, surtout en fin de vitellogenèse, alors que la testostérone n'est plus convertie en oestradiol (Schulz et Goos, 1999).

4.2. 11-Ketotestostérone

Les androgènes 11-oxygénés tels que la 11-Kétotestostérone sont les stéroïdes dominants d'un point de vue quantitatif au niveau du testicule chez les téléostéens. La 11-KT est produite par les cellules de Leydig à partir d'une conversion de la 11β-hydroxyandrostenedione dans le foie. Elle stimule la spermatogenèse au niveau des cellules de Sertoli (Dubois et al., 2001). La 11 ketotestostérone effectue en fait, la régulation de la spermatogenèse et de la spermiogenèse.

La testostérone, la 11-Kétotestostérone, de même que la 11β-hydroxyandrostenedione stimulent le développement des caractéristiques sexuelles secondaires (Schulz et Goos, 1999).

Tableau 5 : La durée de la motilité des spermatozoïdes [s] de différentes espèces de poissons.

Espèces	Durée de motilité [s]	Références
Cyprinus carpio	30-40	Billard et al., 1995b
	60	Billard et al., 1995a
	<120	Toth, P.G. et al, 1997
Oncorhynchus mykiss	20-25	Billard et al., 1995a
	<60	Toth, P.G. et al, 1997
	31- 43	Wagner et al., 2002
Silurus glanis	79-106	Billard et al., 1997
.	100-180	Billard et al., 1997
Dicentrarchus labrax	40	Fauvel et al., 1999
	42 à 174	Sorbera et al., 1996
Heterobranchus longifilis	60-70	Otémé et al;, 1996
Clarias gariepinus	40	Mansour et al., 2003
Acipenser fulvescens	1800	Toth, P.G. et al, 1997

Tableau 6 : La vitesse de nage des spermatozoïdes [µm/s] de plusieurs espèces de poissons.

Espèces	Vitesse de nage des spermatozoïdes [µm/s]	Références
Cyprinus carpio	130	Billard et al., 1995b
	100-160	Christ et al., 1996
	100-160	Perchec Poupard et al., 1998
Onchorhynchus mykiss	105 ±18,8	Lahnsteiner et al., 1999
Psetta maxima	230	Dreanno et al., 1998
Chalcalburnus chalcoides	84,6 ±17,4	Lahnsteiner et al., 1999
Perca fluviatilis	122±22	Lahnsteiner et al., 1995
Silurus glanis	125±10	Billard et al., 1997

Tableau 7 : La concentration en adénosine triphosphate dans les spermatozoïdes de poissons en général et chez deux espèces en particulier [nmol ATP/10^8 Spz].

Espèces	nmol ATP /10^8 Spz	Références
Sperme de poisson en général	6 à 24	Zietara et al., 2004
Cyprinus carpio	10	Rurangwa et al., 2002
	12	Billard et al., 1995b
	12	Perchec et al., 1995
	9,0 ± 0,2	Perchec Poupard et al., 1998
	15,24	Perchec et al., 1995
Dicentrarchus labrax	7,45 ± 3,3	Dreanno : thèse
	11,48	Perchec et al., 1995
Scophtalmus maximus	26,0 ± 3,8	Dreanno et al., 1997
Silurus glanis	12 - 14	Jeulin et Billard, 1995

4.3. Oestradiol

La thèque du follicule ovarien contribue à la synthèse des oestrogènes en fournissant des androgènes à la granulosa où ils subissent leur aromatisation. L'oestradiol stimule la synthèse de vitellogénine par le foie et permet la croissance des ovocytes mais ne joue aucun rôle dans la maturation finale (Yaron, 1995). Chez les téléostéens mâles adultes, les oestrogènes inhibent, dans la plupart des cas, la spermatogenèse, vraisemblablement par rétroaction négative sur le système hypothalamohypophysaire.

D'autres stéroïdes sexuels influencent la reproduction. Ainsi, l'acquisition de la motilité par les spermatozoïdes requiert la stimulation des canaux spermatiques par la 17α-20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (17, 20-P) qui est produite par les spermatozoïdes à partir de la 17 α-hydroxy-progestérone (17-0H-P) (Yaron, 1995).

4.4. Vitellogénine

La vitellogenèse est un moment crucial dans la période reproductive des femelles caractérisée par la plus grande phase de croissance des ovocytes. Cette glyco-lipo-phosphoprotéine de haut poids moléculaire est synthétisée par le foie sous contrôle oestrogénique et transportée jusqu'aux ovaires par le système circulatoire où elle est progressivement engrangée dans les ovocytes en croissance. Une fois séquestrée, la vitellogénine est stockée sous forme de vitellus et constitue les réserves nutritionnelles pour les développements embryonnaire et larvaire (Bon et al., 1997). La synthèse de la vitellogénine est régulée par l'oestradiol en synergisme avec des hormones de croissance. En effet, la 17β-estradiol circulante régule l'expression de plusieurs gènes de synthèse de la vitellogenèse dans les hépatocytes. Aussi, les androgènes peuvent induire la vitellogenèse hépatique, probablement grâce à leur conversion en oestrogènes par l'aromatase hépatique (Yaron, 1995). Les phytoestrogènes présents dans l'alimentation peuvent également induire un effet vitellogénique chez les poissons (Pelissero et al., 1991 a, b).

5. Caractéristiques du sperme de poisson

5.1. La production de la semence

Les phases de différenciation cellulaire des cellules germinales sont appelées spermatogenèse et spermiogenèse. Elles sont suivies par la phase de spermiation durant laquelle les spermatozoïdes acquièrent la motilité. Le stéroïde 17α, 20β-dihydroxy progestérone (17α20βP) joue un rôle dans le processus de spermiation et peut induire une élévation du pH du liquide séminal responsable de l'acquisition de la motilité par les spermatozoïdes (Miura et al., 1992). La spermiation correspond à la libération des spermatozoïdes, après la rupture des parois des cystes séminifères, dans la lumière des tubules. L'ensemble des spermatozoïdes est différencié avant la mise en place d'un autre cycle gamétogénique (Billard, 1986 in Dreanno, 1997).

5.2. La spermatogenèse

En comparaison avec le cycle de l'ovogenèse, la spermatogenèse reprend son cours rapidement de manière à ce que le sperme soit de nouveau présent plusieurs mois avant la prochaine saison de frai (Rideout et Burton, 2000 in Rideout et al., 2004). On observe une augmentation de la densité du sperme tard dans la période de reproduction qui résulte

Tableau 8 : Le rapport sperme/oeuf optimum [Spz/oeuf] pour différentes espèces de poissons.

Espèces	Rapport sperme/oeuf optimum [Spz/oeuf]	Références
Cyprinus carpio	300 000 13 000 5 000	Koldras et Mejza, 1983 Marcel, 1981 Lubzens et al., 1997
Clarias macrocephalus	4 000 - 8000	Tambassen-Cheong et al., 1995
Poecelia reticulata	50 000 - 100 000	Billard, 1966
Oncorhynchus mykiss	30 000 000 300 000 20 000	Dabrowski et al., 2001 Billard, 1975 Billard et Carpentier, 1973
Esox lucius	700 000 26 000	Marcel, 1981 Erdhal et Graham, 1987
Scophtalmus maximus	6 000	Suquet et al., 1995
Perca fluviatilis	735 000	Rougeot et al., 2004
Salmo trutta	43 000	Erdhal et Graham, 1987
Silurus glanis.	40 000	Redonto et al., 1989
Dicentrarchus labrax	66 000	Fauvel et al., 1999
Micropogonias undulatus	1 000	Gwo et al., 1991
Clarias gariepinus	15 000 1 500	Rurangwa et al., 1998 Kime et Nash, 1999
Thymallus thymallus	$1,2 - 1,6.10^6$	Lahnsteiner et al., 1996
Petromyzon marinus	50 000	Rinchard et al., 2000
Hucho hucho	$4,3 - 5,5 .10^6$	Lahnsteiner et al., 1996

probablement d'une réduction de la dilution de la semence plutôt que d'une augmentation de la production du sperme (Shangguan et Crim, 1999 in Rideout et al., 2004). En effet, la spermatogenèse est hautement synchrone et habituellement terminée longtemps avant la saison de reproduction, ce qui rend improbable une production additionnelle de sperme durant la saison de frai (Rideout et Burton, 2000 in Rideout et al., 2004). La production du sperme est sous le contrôle de divers androgènes, la 11-ketotestostérone (11-KT) et la testostérone étant généralement considérées comme les principaux stéroïdes sexuels impliqués dans la spermatogenèse et la spermiation chez les poissons (Yaron, 1995). La 17-β oestradiol (E2), une hormone considérée comme typiquement femelle, joue un rôle important dans la reproduction des mâles en induisant la division mitotique des spermatogonies (Miura et al., 1999).

5.3. Particularités générales des spermatozoïdes de poisson

Un acrosome est présent chez les agnathes et chez tous les autres groupes de poissons excepté les téléostéens. Chez ces derniers, des structures ressemblant à des acrosomes ont néanmoins été rapportées, notamment chez le porte-écuelle à barbillons, *Lepadogaster lepadogaster*, la truite arc-en-ciel et la gambusie ou guppy sauvage, *Gambusia affinis* (Mattei et Mattei, 1978; Billard, 1983; Jamieson, 1991, respectivement cités par Billard et al., 1995a). L'acrosome n'est pas indispensable à la fertilisation chez les téléostéens puisque le micropyle est présent (Billard et al., 1995a). Le signal par lequel le sperme de poisson localise le micropyle n'est pas encore clair. Pour les poissons, la trajectoire des spermatozoïdes est généralement plus courbée que celle des spermatozoïdes des mammifères. Contrairement aux mammifères pour lesquels le sperme est motile pendant plusieurs heures après éjaculation, le sperme de poisson cesse tout mouvement après 1 à 2 minutes (Billard et Cosson, 1992 in Kime et al., 1996). Parce que la vitesse des spermatozoïdes diminue rapidement avec le temps, la durée du mouvement progressif aura une influence significative sur la capacité de fertilisation du sperme. Pour les œufs larges comme ceux des salmonidés, la durée de la motilité ne permet même pas aux spermatozoïdes de faire la moitié du tour de l'œuf. C'est pourquoi une diminution même mineure de la motilité du sperme peut avoir un effet important sur la capacité de fertilisation (Kime et al., 2001). La proportion de spermatozoïdes nageant en ligne droite, tout comme la proportion de spermatozoïdes ayant tendance à vibrer ont la capacité de fertiliser les œufs (Trippel et Neilson, 1992 in Rideout et al., 2004). Différents paramètres liés à la qualité du sperme et de la reproduction sont synthétisés pour plusieurs espèces de poissons et présentés comme suit; tableau 2 : la densité du sperme, tableau 3 : le rapport gonadosomatique (RGS), tableau 4 : le pH du liquide séminal, tableau 5 : la durée de la motilité, tableau 6 : la vitesse de nage des spermatozoïdes, le tableau 7 : la concentration en adénosine triphosphate (ATP) et enfin le tableau 8 : le ratio sperme/œufs optimum.

5.4. La motilité des spermatozoïdes de poisson

Le sperme de poisson est immotile dans les testicules et les spermiductes. La motilité est atteinte après la décharge du sperme dans le milieu aquatique ou après dilution dans de l'eau dont l'osmolarité et les concentrations ioniques correspondent à l'espèce en question (Billard et Cosson, 1992 in Kime et al., 1996). Les spermatozoïdes des téléostéens qui fraient en eau douce restent motiles durant moins d'une minute après activation alors que les spermatozoïdes des chondrostéens tel que l'esturgeon, *Acipenser*, restent motiles et gardent leur capacité de fertilisation durant plusieurs heures après activation (Detlaff et al., 1993 in Toth et al., 1997). Le type de nage des spermatozoïdes peut également être spécifique de l'espèce et différentes caractéristiques ont été observées dans plusieurs familles de poissons d'eau douce ou de poissons marins (Lahnsteiner et al., 1998). Cela dépend également du

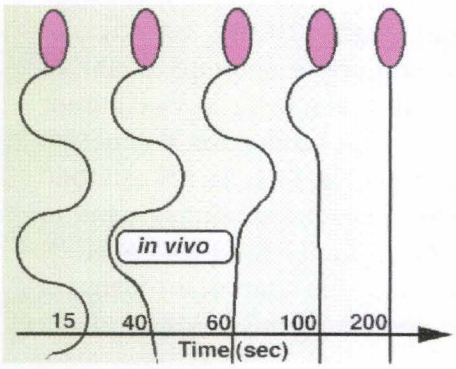


Figure 1 : Les étapes successives de nage des spermatozoïdes de poissons sont représentées sur cette figure (Cosson et al., 1997b).

De gauche à droite:

- ondes de mouvements très développées le long de tout le flagelle
- l'extrémité distale du flagelle est rigide
- majeure partie de la longueur du flagelle sans ondulation
- aucune onde de mouvement, arrêt du mouvement

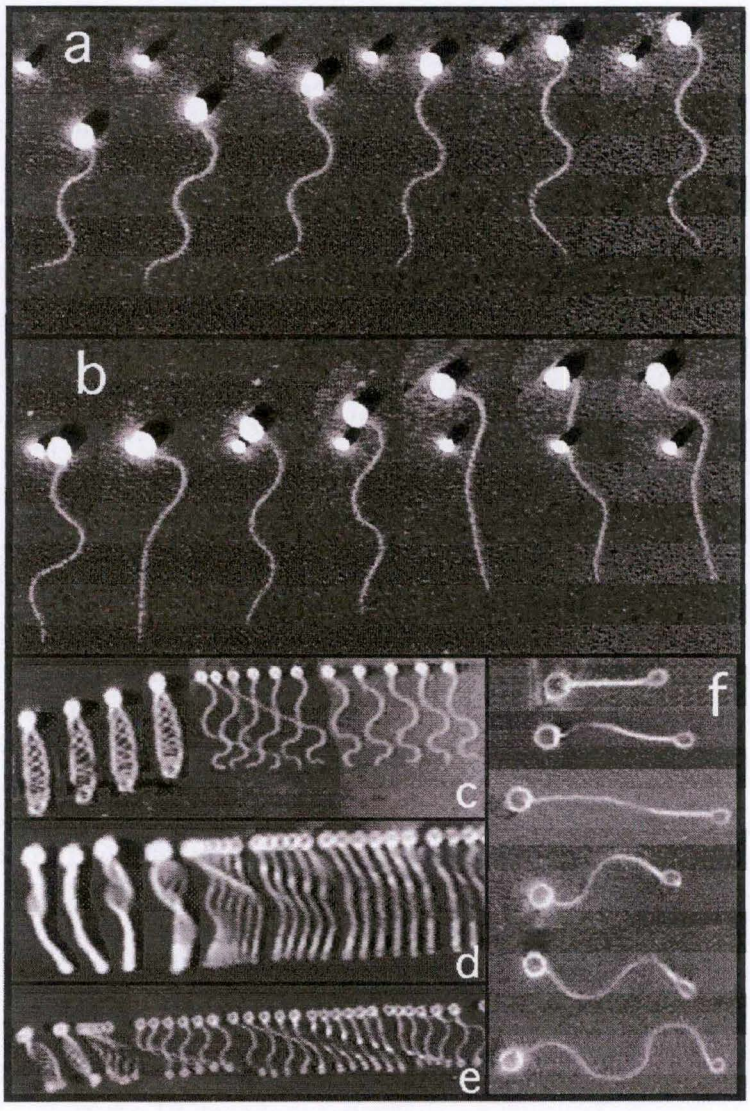


Figure 2 : Enregistrements vidéo de positions successives de spermatozoïdes de *Silurus glanis* en mouvement (toutes les 0,003s) (Cosson et al., 1997b). Les photos ont été prises à 12 et 20s après activation dans le milieu d'activation de la motilité (a et b respectivement) ; à 6, 24 et 44s après activation dans de l'eau distillée (c, d et e respectivement) et f est une image détaillée du processus de curling.

moyen d'activation (Lahnsteiner et al., 1996). Peu après l'activation, le sperme de poisson montre une diminution non seulement de la fréquence de battement mais également de l'amplitude du mouvement ondulatoire dans la proportion distale du flagelle. Les ondes de mouvements se présentent dans une partie de plus en plus restreinte de l'extrémité du flagelle, proximale à la tête du spermatozoïde, alors que la partie distale devient inactive et raide (Cossson et al., 1997). Ce phénomène est illustré par la figure 1. Dans le cas du sperme du poisson-chat européen, *Silurus glanis*, cette paralysie locale est parallèle à un processus de curling semblable à celui observé pour les spermatozoïdes de carpe (Perchec et al., 1996 in Cosson et al., 1997). L'apparition d'une telle courbure distale du flagelle contribue à une rapide décroissance de motilité jusqu'à l'arrêt définitif du spermatozoïde. Une représentation du curling se trouve à la figure 2. Si ce phénomène se produit dans les cinq premières secondes post-activation, cela indique une contamination du sperme par l'urine correspondant à un choc osmotique semblable à celui de l'activation dans de l'eau distillée (Perchec et al., 1995 in Cosson et al., 1997). La rigidité des spermatozoïdes en fin de phase de motilité, de même que le phénomène de curling sont réversibles dans un milieu pour lequel la pression osmotique est rétablie. Une telle hypothèse de restauration de la réserve d'énergie initiale a été confirmée par une mesure directe de concentration en adénosine triphosphate (ATP). La réversibilité du processus de curling est plus probablement liée à la restauration de l'arrangement normal des microtubules de l'axonème après la rééquilibration osmotique comme cela a été démontré pour le sperme de carpe, *Cyprinus Carpio* (Perchec et al., 1996 in Cosson et al., 1997). La raideur de l'axonème est, quant à elle, probablement liée à la distribution de l'énergie dans le flagelle à la fin de la période de motilité (Cosson et al., 1997). Un déclin saisonnier de la motilité du sperme est observé chez plusieurs espèces incluant le bar européen, la truite arc-en-ciel et l'halibut atlantique, *Hippoglossus hippoglossus* (Billard et al., 1977; Büyükhatipoglu et Holtz, 1984; Metheven et Crim, 1991, respectivement cités par Rideout et al., 2004). Les changements de motilité peuvent être corrélés aux changements morphologiques des cellules spermatiques en fin de saison de frai. Plus particulièrement, la dégénérescence de la membrane cellulaire rapportée chez le turbot entraîne une diminution de la motilité des spermatozoïdes (Suquet et al., 1998). Le mode d'inhibition de la motilité du sperme le plus commun chez les téléostéens consiste en une solution de plus de 200 mosmol kg-1. L'osmolalité contrôle la motilité chez plusieurs poissons d'eau douce, comme par exemple les Cyprinidés, les Percidés et les poissons marins tels que les Mugilidés, les Scophthalmidés, les Sparidés, les Mullidés, les Carangidés et les Siganidés (Morisawa, 1983; Lahnsteiner et al., 1995; Lee et al., 1992; Geffen et Frayer, 1993; Lahnsteiner et Patzner, 1998; Lahnsteiner et Patzer, 1999, respectivement cités par Alavi et Cosson, 2006). Deux facteurs importants contrôlent la motilité du sperme et permettent l'initiation de ce dernier. Il s'agit de la concentration en K^+ chez les salmonidés (Stoss, 1983 cités par Alavi et Cosson, 2006) et les esturgeons (Alavi et Cosson, 2005), et de l'osmolalité chez les cyprinidés (Perchec et al., 1995 in Cosson et al., 1997) et les poissons marins (Krasznai et al., 2003).

5.5. Le liquide séminal

Pour augmenter l'efficience d'une reproduction artificielle, la composition du diluant du sperme doit imiter au mieux la composition spécifique du liquide séminal de l'espèce (Alavi et al., 2004; Rurangwa et al., 2004). La littérature révèle une large variabilité inter et intra spécifique dans la composition ionique du plasma séminal et du sperme, suggérant des différences significatives de sécrétions testiculaires (Billard et al., 1995a) et impliquant des différences dans les mécanismes d'initiation de la motilité. L'étude menée par Alavi et Cosson en 2006 a permis de conclure que les ions Na^+, K^+, et Cl^- prédominent dans le plasma séminal, que la composition ionique de celui-ci peut changer durant la saison de reproduction et que ces mêmes ions sont en concentration plus faible chez les esturgeons que chez les

Tableau 9 : Composition du liquide séminal en fonction de l'espèce de poisson

Composition du plasma séminal	P [mM]	K [mM]	Ca [mM]	Mg [mM]	Na [mM]	Zn [µM]	Cl [mM]	OSMOLARITE [mosM/kg]	pH	Références
Acipenser fulvescens	3,02	5,78	0,16	0,21	25,6	0,76	5,41		8,0	Toth, P.G. et al, 1997
Acipenser beari		2,5			28			38	8,2	Gallis et al., 1991
Oncorhynchus mykiss					140		150			Morisawa et Morisawa, 1988
Scophtalmus maximus					133		129			Suquet et al., 1993
		3,8								Suquet et al., 1994
Cyprinus carpio		72								Emri et al., 1998
		65,2	12,5	0,02	91,3					Clemens et Grant, 1965
		82,4 ± 3,3	2 ± 0,18	0,8 ± 0,04	75 ± 3,2					Morisawa et al., 1983
		43,5	0,7	0,27	51,3				7,96 ± 0,01	Plouidy and Billard, 1982
		77 ± 10			74 ± 24			392 ± 5,4		Gatty, JL, unpublished
								286 ± 10		Kruger et al, 1984
		79 ± 3,7	2,7 ± 0,1		71 ± 3,6			346 ± 19	7,53 ± 0,3	hiver, Billard et al., 1995b
		73 ± 3,5	2,9 ± 0,2		59 ± 3,2			290 ± 6	7,67 ± 0,1	Début printemps, Billard et al, 1995b
		76 ± 4,6	2,1 ± 0,7		58 ± 5,3			298 ± 14	7,59 ± 0,04	Fin printemps, Billard et al, 1995b
								300		Perchec Poupard et al., 1998
Macrozoarces americanus		10-20								Yao et al., 1999
Acipenser persicus					62,44 ± 6,82			80		Alavi et al., 2004
Salmonidés		20-66			103-140		135			Billard et al., 1995
Cyprinidés		96-110			94-107		39-78			Billard et al., 1995
Polyodon spathula									7,0-8,0	Cosson et Linhart, 1996

cyprinidés et les salmonidés. Le rapport Na^+/K^+ est plus faible chez les cyprinidés que chez les acipensérídés et les salmonidés. La plupart de ces ions sont impliqués dans la régulation de la motilité du sperme en contribuant à la composition ionique intracellulaire ou par leur osmolalité (Billard et Cosson, 1992 in Alavi et Cosson, 2006). La corrélation entre la composition du plasma séminal et la motilité du sperme a seulement été étudiée chez quelques espèces (Lahnsteiner et al., 1996) et ces auteurs concluent que les niveaux de Na^+ et K^+ont des relations statistiques significatives, respectivement positives et négatives, avec le pourcentage de spermatozoïdes motiles (Hwang et Idler, 1969 in Alavi et Cosson, 2006).

Une bonne connaissance des particularités de la semence de poisson laisse entrevoir un meilleur rendement de production aquacole de cet organisme. Par exemple, chez le turbot dont la reproduction en captivité est obtenue principalement par insémination artificielle, une relation positive entre les caractéristiques du sperme et les performances biologiques a été établie (Suquet et al., 1995). La composition du liquide séminal chez différentes espèces de poissons est présentée au tableau 9.

6. Biologie du modèle d'étude: *Clarias gariepinus*

6.1. Intérêt en aquaculture

Les poissons-chats Clariidae (*Clarias* et *Heterobranchus*) sont des poissons de haute valeur alimentaire en Afrique et constituent des espèces commerciales largement développées en aquaculture africaine, principalement dans des systèmes d'élevages semi intensifs de niveau de production moyen de 40 MT/ha/an (Hecht, 1996 in Fagbenro, 1999a). Le poisson-chat africain, *Clarias gariepinus*, est résistant aux conditions environnementales et aux maladies. Cette espèce de poisson est représentée à la figure 3. Aussi, sa croissance rapide, même à haute densité, sa capacité de respiration aérienne grâce à son appareil suprabranchial, sa résistance à une eau de pauvre qualité et sa chair savoureuse en font une espèce adaptée pour l'élevage (Appelbaum et Kamler, 2000). Les mâles de poisson-chat africain produisent du sperme tout au long de l'année en captivité, mais l'ovulation des femelles ne se produit pas spontanément et doit être induite par injection hormonale. Les œufs des poissons-chats se développent rapidement après fertilisation et éclosent endéans 24h à 28°C (Rurangwa et al., 1998). Les larves de *Clarias gariepinus* ont un taux de croissance élevé (36,4 à 141 % du poids corporel sec /jour) et une efficacité de conversion alimentaire élevée (70,6 à 95,2 % de matière sèche) en comparaison avec les larves d'autres espèces (Rombough, 1994 in Conceição et al., 1998). Ce poisson omnivore peut être élevé en cages placées dans un lac ou un étang. C'est d'ailleurs pour une densité de stockage la plus élevée que se produit la meilleure biomasse (Hengsawat et al., 1997). Toutes ces caractéristiques encouragent sa production commerciale à l'échelle de plusieurs pays partout dans le monde (Mansour et al., 2002).

6.2. Ecologie

Clarias gariepinus est une espèce native des eaux douces tropicales et sub-tropicales. Il a largement été élevé dans des eaux chaudes en dehors de sa répartition naturelle. Il se reproduit en saison des pluies dans les zones inondées et on compte un maximum de géniteurs gravides durant les mois de mars et avril (Nguenga et al., 2004). La transition du stade de larve au stade de juvénile se produit environ 7 à 8 jours après la fertilisation, ce qui correspond à un changement de croissance et de métabolisme (Appelbaum et Kamler, 2000). Les poissons-chats Clariidae se répartissent au sud ouest de l'Asie et la plus grande diversité est représentée sur le continent africain où 14 genres ont été rapportés par Teugels en 1986

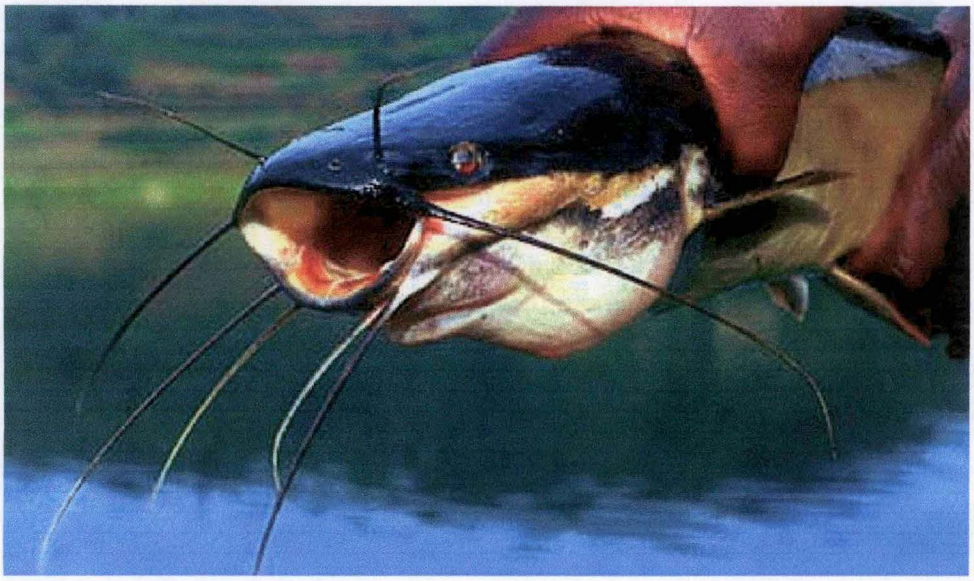


Figure 3 : Photo du poisson-chat africain *Clarias gariepinus* provenant du site internet : clarias_gariepinus_x.jpg

(Legendre et al., 1992). Le poisson-chat africain est omnivore et passe, à un stade encore précoce, d'une préférence pour le zooplancton à un régime piscivore. Une étude de Munro en 1967 décrit le contenu stomacal de petits *Clarias gariepinus* de 0,02 à 4g en milieu naturel: larves de Chironomidae, Cladocère, Copépodes, Ostracodes, etc. Alors que des Clarias de 7g peuvent déjà effectuer un contrôle de la prolifération du tilapia du Nil (De Graaf et al., 1996). Ce poisson-chat est tolérant à une large gamme de températures, à une faible teneur en oxygène et à une valeur élevée de salinité (Bovendeur et al., 1987 in Hengsawat, et al., 1997). Le poisson-chat africain augmente son comportement territorial et le nombre de ses actes agressifs lorsqu'il est soumis à une réduction graduelle de la disponibilité de sa nourriture (Hecht et Pienaar, 1993 in Almazán-Rueda et al., 2004). La famille des Clariidae se caractérise par un corps allongé et une tête aplatie dorsoventralement terminée par quatre paires de barbillons entourant une large bouche subterminale (Teugels, 1996). Cet animal est photophobique et vit dans des habitats couverts sur les bords des lacs et des rivières. Le comportement photophobique est initié peu après l'éclosion (Appelbaum et Kalmer, 2000). Cela démontre que les yeux de cette espèce sont moins importants pour la capture des proies que le cercle oral de barbillons. Contrairement à de nombreuses espèces, *C. gariepinus* est tactile et se présente comme un prédateur chémorécepteur plutôt que prédateur visuel (Hecht et Appelbaum, 1988 in Appelbaum et Kalmer, 2000). Le cannibalisme chez cette espèce fait partie de la catégorie de cannibalisme « fraternel » intra cohorte des stades post-éclosion (Smith et Reay, 1991 in Appelbaum et Kalmer, 2000). Le cannibalisme semble contribuer pour 70 à 83 % de la mortalité totale accumulée durant 46-50 jours d'élevage (Appelbaum et Van Damme, 1988 in Appelbaum et Kalmer, 2000). Les variations de croissance de *Clarias gariepinus* aussi bien en élevage qu'en milieu naturel semblent être dues à des différences de comportements alimentaires. La distribution de tailles n'affecte pas sa performance de croissance alors que le comportement alimentaire semble être un facteur important car les poissons les plus gros exhibent une nage plus active, mangent plus vite et passent plus de temps dans la zone de nourrissage (Martins et al., 2005).

7. Reproduction et spécificités du sperme du poisson-chat africain *Clarias gariepinus*

7.1. Généralités

Clarias gariepinus (Burchell, 1822) est un bon modèle puisqu'il est rapidement mature en captivité et que des mâles spermiants peuvent être obtenus tout au long de l'année (Kime et al., 1996). Malheureusement, la biologie de sa reproduction n'est pas bien connue et cela restreint les techniques de fertilisation artificielle de cette espèce (Mansour et al., 2002). La saison de frai correspond aux périodes de pluies maximales et une poussée de LH se produit au moins une fois durant cette période (Van Oordt et al., 1987 in Viveiros et al., 2002). Le frai se produit habituellement après la pluie, dans les zones fraîchement inondées (Viveiros et al., 2002). En captivité, les poissons-chats sont gardés sous conditions environnementales constantes et leur glande pituitaire contient des granules denses et larges de gonadotrophines toute l'année, stockant de grandes quantités de LH (De Leeuw et al., 1987 in Viveiros et al., 2002). Leurs gonades montrent un cycle continu avec de nombreuses cellules spermatiques mûres à toutes saisons (Richter et al., 1987 in Viveiros et al., 2002). Cependant, la glande pituitaire ne libère pas le pic de LH qui est censé précéder le frai et les mâles ne libèrent pas spontanément le sperme.

Tableau 10 : Libération du sperme et qualité du fluide après pression abdominale chez le poisson-chat africain traité avec: une suspension pituitaire de *Clarias* (PS), carp-PS, mGnRHa, mGnRHa plus pimozide (mGnRHa-PIM) ou Ovaprim, et échantillonné après 12- ou 24-h de temps de latence (LT) (traduit d'après Viveiros et al., 2002).

Expérience	Traitement	LT (h)	Poissons traités (n)	Poissons spermiant (n)	Volume (ml)	Spermatocrite (%)	Celluless/ml (10^9)	Motilité (0-4)a
1	Clarias-PS	24	5	0				
	mGnRHa	24	5	0				
	mGnRHa-PIM	24	5	0				
	Contrôle	24	5	0				
2	Clarias-PS	24	5	1	1.3	11.5	N	0
	Carp-PS	24	5	0				
	mGnRHa	24	5	0				
	Ovaprim 0.5 ml	24	5	2	0.7 +/- 0.3	11.5 +/- 10.1	N	0
	Ovaprim 1.0 ml	24	5	3	1.0 +/- 0.6	10.3 +/- 8.9	N	0
	Contrôle	24	5	0				
3	PS–PSb	12	5	4	0.9 +/- 0.8	2.0 +/- 2.1	0.55+/-0.36	0.8+/-0.5
	PS–PSb	24	5	0				
	Contrôle	12/24	6	0				
4	PS–PS– ovpc	12	6	4	1.5 +/- 0.9	5.8 +/- 4.1 0.	69+/-0.13	0.3+/-0.5
	PS–PS– ovpc	24	6	3	1.7 +/- 1.2	8.3 +/- 4.5 1.	60+/-0.87	0.7+/-0.6
	PS– ovp–ovpd	12	6	2	1.7 +/- 1.1	3.7 +/- 4.2	0.94+/-0.23	0.5+/-0.5
	PS– ovp–ovpd	24	6	4	1.1 +/- 0.3	5.6 +/- 1.5	0.72+/-0.34	0.5+/-0.5
	Contrôle	12/24	6	0				

L'Ovaprim contient de la GnRHa de saumon et du domperidone.
N—Paramètres non mesurés en raison de l'absence de spermatozoïdes motiles.
a Motilité estimée: 0 (aucun mouvement cellulaire), 1 (1–25%), 2 (25– 50%), 3 (50–75%) et 4 (plus de 75% de cellules spermatiques en mouvement).
b Deux injections carp-PS à 48-h d'intervalle.
c Deux injections carp-PS à 48-h d'intervalle, plus une injection d'Ovaprim (ovp) 24 h plus tard.
d Une injection carp-PS, après 48-h d'intervalle, deux injections d'Ovaprim données avec 24-h d'intervalle.

7.2. La récolte du sperme

Pour obtenir la semence de *Clarias gariepinus*, il faut préalablement tuer les mâles par décapitation et collecter le sperme intratesticulaire car ce poisson-chat ne libère pas le sperme par pression abdominale. Le sperme est alors conservé à 4°C (Kime et al., 1996). Des traitements hormonaux ont été testés afin d'induire efficacement une reproduction artificielle toute l'année, mais les résultats étaient assez décevants. Les traitements avec une suspension pituitaire de carpe (Hogendoorn, 1979 in Viveiros et al., 2002), un homogénat pituitaire de *Clarias* ou des gonadotrophines chorioniques humaines (Hecht et al., 1982 in Viveiros et al., 2002) ne permettaient pas d'induire la libération du sperme par pression abdominale chez ce poisson-chat. Les traitements avec de la GnRHa induisaient l'évacuation de quelques gouttes de sperme chez le poisson-chat bleu *Ictalurus furcatus*, mais le sperme perdait sa capacité de fertilisation 5 minutes après la collecte (Dunham, 1993 in Viveiros et al., 2002). Pour tenter d'optimiser l'utilisation de chaque mâle, des techniques pour enlever chirurgicalement une partie des testicules ont été décrites pour plusieurs espèces de poissons-chats; *Ictalurus punctatus* et *furcatus* (Bart et Dunham, 1990 in Viveiros et al., 2002) et *Heterobranchus longifilis* (Nguenga et al., 1996), mais cela implique des coûts vétérinaires onéreux. La reproduction artificielle entraînant le sacrifice des mâles, les tentatives de sélections sont compromises (Viveiros et al., 2002). Le fait que le poisson-chat africain ne puisse pas libérer de sperme par pression abdominale peut être dû à un blocage anatomique. En effet, les spermiductes de celui-ci sont entourés par plus de 50 extensions digitées de la vésicule séminale qui peuvent retenir le sperme quand on applique une pression sur l'abdomen du mâle (Richter, 1976 in Viveiros et al., 2002). L'analyse de plusieurs types d'induction hormonale sur la libération du sperme par *Clarias gariepinus* réalisée par Viveiros et al., (2002) est illustrée par le tableau 10.

7.3. Les états de maturation du sperme

Chez les poissons-chats, différents états de maturation des testicules ont été observés, et ce, non seulement entre mâles, mais aussi pour les testicules d'un même mâle durant la saison naturelle de frai (Otémé et al.1996 in Mansour et al., 2005). Deux types de sperme ont été distingués d'après le stade de maturation testiculaire de *Clarias gariepinus*. Il s'agit du sperme de type I dérivé des mâles avec les testicules matures, blancs et le sperme de type II dérivé des mâles avec les testicules partiellement matures, gris. Une étude précédente de Mansour et al. (2005) a montré que le sperme de type I contenait une densité de sperme plus élevée et un faible nombre de spermatides et par conséquent, était considéré comme à un état plus mature que le sperme de type II qui contenait, entres autres des spermatozoïdes, de nombreux cystes germinaux avec un nombre plus élevé de spermatides. L'étude menée par Mansour et al. (2005) a démontré que le volume du sperme, la concentration des cellules spermatiques et le pH du plasma séminal étaient significativement plus élevés pour le sperme de type I, alors que la motilité du sperme était similaire pour les deux types de sperme. Des pourcentages de fertilisation semblables ont également été obtenus avec les deux types de sperme. Cependant, dans le cas du sperme de type I, le pourcentage d'éclosion était plus élevé et le pourcentage de larves déformées était plus faible. Chez le poisson-chat africain, le pourcentage élevé de larves malformées obtenu après la fertilisation avec le sperme de type II peut être expliqué par l'immaturité des spermatozoïdes. La présence de larves déformées avec une faible chance de survie est un dénouement courant dans les écloseries de poissons-chats (Haylor, 1993 in Mansour et al., 2004). La raison exacte de ce phénomène est incertaine mais l'occurrence de larves déformées augmente quand seulement du sperme partiellement mature est utilisé ou encore lorsqu'il y a un état de malnutrition des géniteurs

Tableau 11 : Différences entre le sperme de type I et de type II chez le poisson-chat africain, *Clarias gariepinus* (Mansour et al., 2005).

Type de sperme	Type I	Type II
Evaluation grossière du sperme		
Volume sperme/testicules (ml)	1,7 ± 0,2*	1,1 ± 0,1□
Consistance du sperme	Visqueux	Aqueux
Couleur du sperme	crème, blanche	grisâtre
pH plasma séminal	8,5 ± 0,21*	7,8 ± 0,18□
Evaluation microscopique du sperme		
Concentration des cellules spermatiques*10^9	7,5 ± 2,0*	3,2 ± 1,1□
Taux de motilité (%)	77,9 ± 5,2*	79,6 ± 6,1*
Vitesse de nage (mms^{-1})	128 ± 21*	119 ± 25*

Géniteurs de poisson-chat de IBAU à Potsdam (Allemagne) analysés à l'université de Salzburg.
*, □ Valeurs (mean ± SD, n=10) souscrites par le même symbole ne sont pas significativement différentes, P>0.05.

Tableau 12 : Paramètres du sperme, fertilisation, taux d'éclosion et taux de larves déformées du poisson-chat africain, *Clarias gariepinus* (Mansour et al., 2005).

Type de sperme	Type I	Type II
Paramètres du sperme		
Volume sperme/testicules (ml)	2,2 ± 0,4*	1,3 ± 0,2□
pH plasma séminal	8,4 ± 0,31*	7,5 ± 0,17□
Concentration des cellules spermatiques *10^9	8,4 ± 1,9*	3,6 ± 1,3□
Estimation du taux de motilité (%)	79,3 ± 9,8*	74,7 ± 10,9*
Paramètres de fertilité		
Fertilisation (%)	90,3 ± 5,8*	87.5 ± 7,3*
Eclosions (%)	77,8 ± 4,9*	61.1 ± 5,1□
Éclosions déformées (%)	18,7 ± 7,4*	40.6 ± 6,6□

Géniteurs de poisson-chat de Kafr El-Sheikh (Egypt) analysés à l'université de Tanta (Egypte).
*, □ Valeurs (mean ± SD, n=8) souscrites par le même symbole ne sont pas significativement différentes, P>0.05.

(Adebayo, 2001, in Mansour et al., 2004). Les résultats de l'étude de Mansour et al. (2005) sont présentés dans les tableaux 11 et 12.

7.4. Structure des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes du poisson-chat africain *Clarias gariepinus* sont organisés comme, typiquement, ceux des téléostéens à fertilisation externe avec un noyau ovoïde et une petite pièce centrale (Jamieson, 1991 in Mansour et al., 2002). Ils révèlent des caractéristiques très uniques: le canal cytoplasmique est manquant, les mitochondries forment une structure complexe, ils n'ont pas d'acrosome et l'arrangement des complexes centriolaires est spécifique de l'espèce (Mansour et al., 2002). L'absence de canal cytoplasmique est atypique et seulement connu chez les spermatozoïdes des Pomacentridae marins (Lahnsteiner et Patzner, 1997 in Mansour et al., 2002). La présence de mitochondries fusionnées dans la structure du sperme des téléostéens est uniquement connue chez les Salmonidés (Lahnsteiner et al., 1991 in Mansour et al., 2002) alors que chez les autres espèces, les mitochondries sont sphériques ou ovoïdes (Jamieson, 1991 in Mansour et al., 2002). Chez les autres espèces de Siluriformes, seules les cellules spermatiques de *Ictalurus punctatus* ont été étudiées en détail. Elles sont biflagellées et présentent d'autres caractéristiques qui les différencient des cellules spermatiques de *Clarias gariepinus* (Poirier et Nicholson, 1982 in Mansour et al., 2002). L'illustration, issue de Mansour et al., (2002), de la structure des spermatozoïdes de *Clarias gariepinus* est proposée à la figure 4.

7.5. La motilité

La motilité initiale du sperme de *Clarias gariepinus* est dans une gamme similaire à ceux des autres téléostéens (Billard et al., 1996 in Mansour et al., 2002) indiquant une qualité comparable de la semence testiculaire. Le sperme possède un taux de motilité initial (70–90 %) et des vitesses de nage élevées (120–140 $\mu m\ s^{-1}$). Les spermatozoïdes du poisson-chat africain contiennent trois fois moins d'adénosine triphosphate (ATP) que les spermatozoïdes de carpe. Cela peut expliquer pourquoi les spermatozoïdes du poisson-chat africain sont moins motiles que les spermatozoïdes de carpe ainsi que plus sensibles aux effets toxiques du tributyltin (Rurangwa et al., 2002). La nage principale est de type linéaire. Un pH entre 7,0 et 9,0 n'a pas d'effet sur les paramètres de motilité du sperme. La motilité est complètement et réversiblement supprimée dans des solutions avec ou sans électrolytes dont l'osmolalité dépasse 200 $mosmol\ kg^{-1}$. Durant le stockage, la viabilité du sperme encore immotile est influencée par l'osmolarité, le niveau de potassium du support de stockage, la température et enfin la dilution (Mansour et al., 2002). La durée de motilité du poisson-chat africain est très courte, elle persiste seulement pendant 30s dans l'eau. Le mouvement de masse progressif (quand plus de 50 % des spermatozoïdes arrêtent de bouger) se termine en moins de 20s. La faible durée de motilité du sperme de ce poisson ne peut pas être prolongée dans une solution saline fournissant des apports osmotiques et ioniques, donc cela doit être dû à une réserve d'énergie inadéquate. C'est une différence par rapport aux autres téléostéens dont la durée de motilité est significativement prolongée dans des solutions salines de composition ionique appropriée comme le montrent les études réalisées avec le chabot, *Cottus gobio* ou la truite arc-en-ciel et de substrats énergétiques appropriés, comme avec l'Ablette des lacs, *Chalcalburnus chalcoides* (Lahnsteiner et al., 1997, 1999 in Mansour et al., 2002). Toutefois, un milieu contenant à la fois du lactate et du pyruvate est le plus favorable aux spermatozoïdes du poisson-chat africain (Zietara et al., 2004) et la littérature indique que les spermatozoïdes de ce dernier supportent assez bien les changements de composition de leur milieu de nage et sont généralement très résistants aux variations de la qualité de l'eau (Mansour et al., 2005).

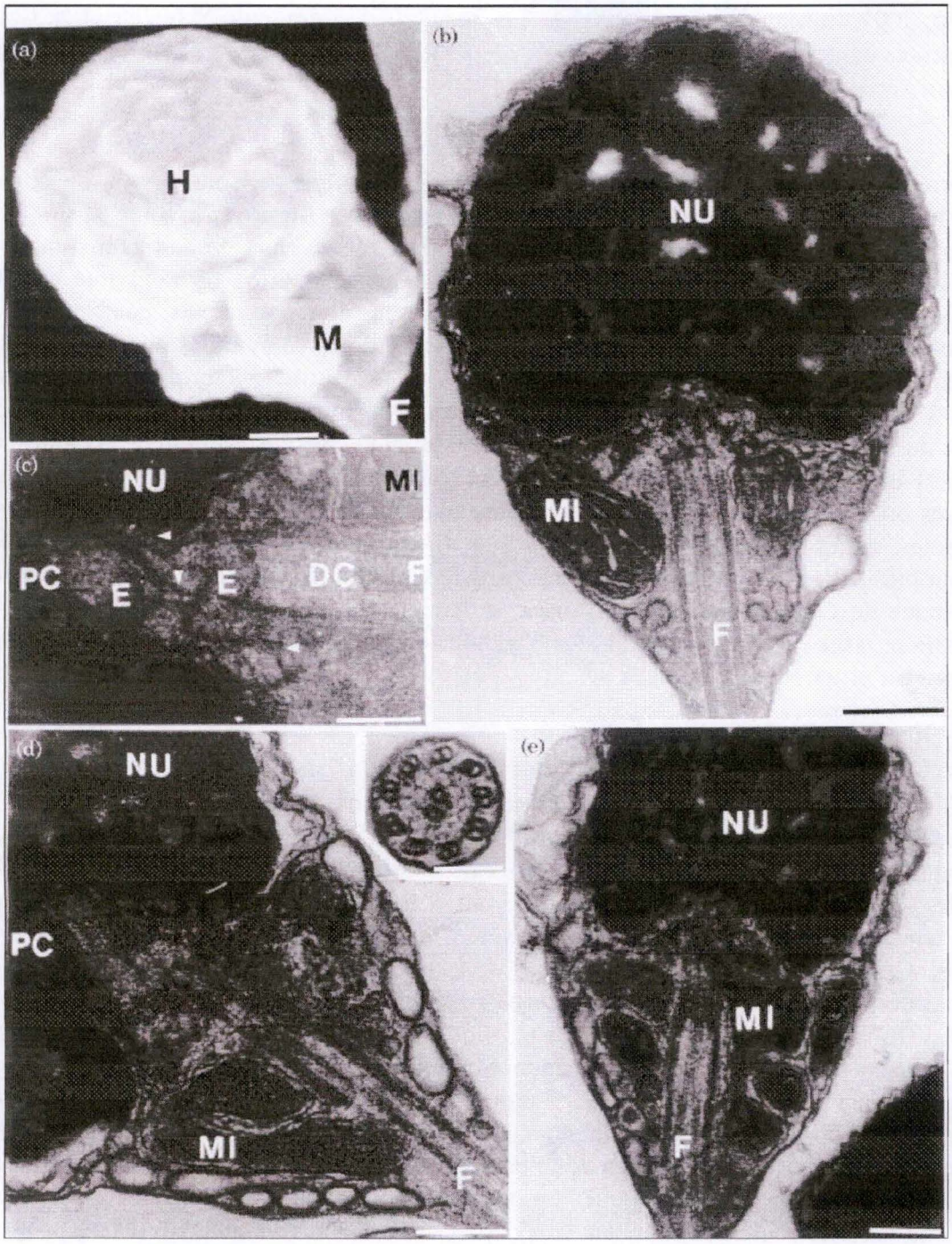


Figure 4 : Organisation structurale des spermatozoïdes de *Clarias gariepinus* (Mansour et al., 2002):

(a) Vue générale au microscope électronique à balayage (SEM); échelle: bar = 0,35 µm

(b) Vue générale au microscope électronique à transmission (TEM); échelle: bar = 0,3 µm

(c) Le complexe centriolaire, (TEM), interconnections des microfibrilles du centriole distal avec le centriole proximal et avec l'enveloppe nucléaire; échelle: bar = 0,15 µm

(d) La pièce moyenne, (TEM), forme irrégulière de la mitochondrie; échelle: bar = 0,2 µm; section à travers le flagelle; échelle: bar = 0,1 µm

(e) Vue générale de l'arrangement irrégulier des mitochondries, (TEM); échelle: bar = 0,3 µm

DC, centriole distal; E, disque dense d'électrons; F, flagelle; H, tête; M, pièce moyenne; MI, mitochondrie; NU, noyau; PC, centriole proximal.

8. Evaluation de la qualité des gamètes mâles

8.1. Différentes méthodes pour évaluer la qualité du sperme

Jusque récemment, la méthode habituelle d'évaluation de la qualité du sperme consistait simplement à mélanger les oeufs avec le sperme et à mesurer les taux de fertilisation et d'éclosion (Kime et al., 2001). **La capacité de fertilisation** est une mesure indirecte de la qualité du sperme. En effet, elle dépend de la variabilité rencontrée dans les ovaires, du nombre de spermatozoïdes par œuf, de la durée de contact entre les gamètes ou du protocole de fertilisation employé. Cette méthode peut néanmoins valider les autres mesures d'estimation de la qualité du sperme (Suquet et al., 1995) si on utilise la même femelle afin d'éviter des variations inter-femelles (Kime et al., 2001). La **densité du sperme** peut se mesurer de plusieurs façons. Il y a la méthode standard qui consiste à compter les cellules spermatiques par ml de sperme via un haemocytomètre ou une chambre de comptage similaire. Mais cette technique prend du temps (Buyukhatipoglu et Holtz, 1984 in Rurangwa et al., 2004) et il arrive que des agrégations de cellules spermatiques se produisent et engendrent des erreurs de comptage. De plus, il existe un manque de standardisation des unités puisque la concentration du sperme est calculée en nombre de cellules spermatiques collectées par kg de poisson, par gramme de testicule ou par poisson. Bien que le nombre de spermatozoïdes par ml de sperme soit le plus approprié, il doit être complété par le volume total de sperme (Rurangwa et al., 2004). La concentration du sperme peut se calculer par une mesure d'absorbance à 420 ηm (Suquet et al., 1995). On peut également réaliser une centrifugation pour déterminer le **spermatocrite** c'est-à-dire, le rapport entre le volume de spermatozoïdes et le volume total de la semence que l'on multiplie par 100. Le spermatocrite représente une technique rapide et simple d'estimation de la densité du sperme dont la connaissance est importante pour déterminer le rapport optimal de spermatozoïdes par ovule pour une fertilisation artificielle (Billard et al., 1995a). La spectrophotométrie peut également être employée pour déterminer la densité optique de la semence (Rurangwa et al., 2004).

Les **constituants du plasma séminal** ainsi que la **concentration en ATP** donnent une vue globale de la qualité du sperme mais ne décrivent pas la capacité potentielle de fertilisation individuelle des spermatozoïdes (Rurangwa et al., 2004). Des biomarqueurs de la qualité du sperme tels que les inhibiteurs de la protéinase, ou la présence d'acide urique dans le plasma séminal n'ont encore été que partiellement documentés jusqu'à présent (Grzyb et al., 2003). Quant au **pH du plasma séminal**, celui-ci est particulièrement utile pour déterminer la qualité du sperme chez le poisson-chat africain. Un résultat similaire a d'ailleurs été rapporté pour la truite arc-en ciel où une corrélation positive entre la fertilité du sperme et le pH du plasma séminal a été démontrée (Lahnsteiner et al., 1998). La viabilité du sperme et **l'intégrité membranaire** de ce dernier nécessitent des protocoles utilisant des colorants fluorescents, de la cytométrie de flux et des observations sous un microscope confocal. Parmi les colorants habituellement utilisés, SYBR 14 dye est un colorant qui pénètre la membrane des acides nucléiques et le propidium iodide est un colorant conventionnel des cellules mortes (Segovia et al., 2000; Grzyb et al., 2003). Quand le sperme est incubé avec ces deux colorants, les spermatozoïdes ayant leurs membranes intactes se colorent en vert et les cellules avec les membranes endommagées se colorent en rouge. SBYR 14 peut pénétrer la membrane cellulaire de la tête du spermatozoïde et colorer l'ADN nucléaire des cellules spermatiques viables. Tandis que le propodium iodide n'est pas capable de pénétrer la membrane cellulaire de cellules spermatiques viables et colorent uniquement l'ADN de cellules dégénérées ou mortes. La Rhodamine 123 est capable de colorer les mitochondries fonctionnelles des cellules spermatiques vivantes (Segovia et al., 2000). Le sperme peut aussi être coloré avec du trypan bleu qui pénètre les cellules spermatiques endommagées. Ce colorant beaucoup

Tableau 13 : Différentes études utilisant la méthode d'évaluation de la qualité du sperme assistée par ordinateur.

Etudes	Variables	Résultats	Références
Effet de la cryoconservation et d'un traitement à la theophylline sur la motilité des spermatozoïdes de *Acipenser fulvescens*, l'esturgeon fluviatile.	Motilité (MOT, VCl, VSL, ALH, LIN) et activité « acrosin-like »	Diminution du pourcentage de spermatozoïdes motiles, mais les autres paramètres de motilité restent inchangés. Les spermatozoïdes congelés conservent une activité acrosin-like. Un traitement à la theophilline améliore les paramètres de motilité Lin et VSL des spermatozoïdes congelés.	Ciereszko et al., 1996.
Evaluation des effets de pollutions aux métaux lourds (cadmium et zinc) sur la motilité des spermatozoïdes de *Clarias gariepinus*.	VAP, VCL, VSL après 24h et 48h de stockage, après exposition à 100 ppm de cadmium ou à 2000 ppm de zinc durant 24h ou après une exposition directe à 1000 ppm de cadmium ou à 2000 ppm de zinc ou après exposition simultanée à des concentrations égales en zinc et cadmium.	La motilité n'est pas affectée par un simple stockage de 24h mais diminue après exposition durant 24h à 100ppm de cadmium ou 2000 ppm de zinc. Une exposition directe à 2000 ppm de zinc ou 1000 ppm de cadmium n'a pas d'effet sur la motilité des spermatozoïdes. La toxicité du cadmium était significativement diminuée en présence d'une quantité égale de zinc.	Kime, et al., 1996.
Evaluation de la qualité du sperme cryoconservé du turbot, *Scophtalmus maximus*.	Différents cryoprotectants et différents tampons de dilution sont testés. Capacité de fertilisation, métabolisme (ATP, respiration) et caractéristiques de motilité du sperme (MOT, VCL).	Les meilleurs résultats ont été obtenus pour le tampon de dilution Mounib extender modifié avec 10% BSA (albumine de sérum de bovin) et 10% de dimethyl sulphoxide (DMSO). MOT diminue significativement après congélation par rapport au sperme frais tandis que la vitesse et le taux de respiration du sperme restent inchangés. Le processus de cryopreservation diminue significativement la concentration intracellulaire en ATP ainsi que le taux de fertilisation mais ce dernier peut ré-augmenter avec la concentration du sperme.	Dreanno et al., 1997.
Analyse objective de la durée de motilité du sperme de l'esturgeon *Acipenser fulvescens*, sur deux années (1993 et 1994).	Le pourcentage de spermatozoïdes motiles, leur vitesse (VCL, SLV) dans un tampon Tris/Glycine pH 9,0 puis après ajout de 10mM de Na^+ou de 0,5mM K^+.	Résultats inchangés après ajout de Na^+ 10 mM. Pourcentage de cellules spermatiques motiles réduit de 50% après ajout de 0,5 mM K^+	Toth, G.P. et al., 1997.
Initiation de la motilité des spermatozoïdes de carpe et la réduction de la concentration en ATP après une contamination du sperme par l'urine.	Incorporation d'urine de 0,5 à 7,5 % du volume total. Paramètres de motilité des spermatozoïdes (MOT, VCL, BCF), concentration en ATP.	Contamination de 7,5% durant 1h réduit la concentration en ATP de 8-9 à 4-5 ηmol /10^8 Spz, la vitesse curvilinéaire de 100-160 à 30–100 µm/s et une fréquence de battement de tête de 30-50 Hz à 10-30 Hz. Le pourcentage de spermatozoïdes motiles diminue de 90 ± 3% à 30 ± 3%.	Perchec Poupard et al., 1998
Détermination du rapport spermatozoïde-ovocytes minimum pour une insémination artificielle et les effets du mercure sur la motilité et la capacité de fertilisation des spermatozoïdes de *Clarias gariepinus*.	Taux de fertilisation, taux d'éclosion, motilité des spermatozoïdes (VAP).	Le rapport spermatozoïdes-ovocytes optimal (15000-1) donne un taux de fertilisation et d'éclosion de 80 et 67% respectivement. En dessous d'un rapport 3000-1 et au-delà de 15000-1, le succès de fertilisation diminue significativement et partiellement respectivement. La motilité du sperme est significativement diminuée par 0,001mg/l Hg^{2+} tel que $HgCl_2$ mais l'effet sur la fertilisation est dépendante du rapport spermatozoïdes-ovocyte. Le meilleur rapport pour voir un effet de polluants étant 1500-1.	Rurangwa, E. et al, 1998

utilisé pour évaluer les dommages des spermatozoïdes de mammifères permet de compter sous microscope le pourcentage de spermatozoïdes intacts (non colorés) et endommagés (colorés en rouge) (Lubzens et al., 1997; Rurangwa et al., 2002). Mais de telles mesures ne peuvent justement être utilisées que pour indiquer l'intégrité des membranes du sperme. L'étude de Lubzens et al, (1997) précise qu'une fertilisation artificielle peut être réalisée avec des échantillons de sperme assez bien marqué par le trypan bleu indiquant soit que des dommages membranaires ne sont pas une barrière au succès d'une fertilisation in vitro soit que cette méthode est de pauvre résolution pour identifier les dommages cellulaires. Une mesure de **l'activité enzymatique de l'acrosine**, enzyme localisée au niveau de l'acrosome, peut être révélatrice de l'intégrité structurale du spermatozoïde et donc de la qualité du sperme (Ciereszko et al., 1996 in Rurangwa et al., 2004). **L'analyse morphologique** des spermatozoïdes, aussi bien de poissons que de mammifères, requière différentes méthodes manuelles mais celles-ci sont subjectives, prennent du temps, donnent souvent des résultats variables et il est difficile de les employer de façon uniforme. On peut citer la microscopie électronique à transmission (TEM) et la microscopie électronique à balayage (SEM) qui permettent l'étude de l'ultrastructure cellulaire. De nouveaux systèmes d'analyse d'imagerie plus faciles à utiliser et permettant l'évaluation d'un grand nombre de spermatozoïdes ont été créés pour mesurer plusieurs paramètres morphologiques des spermatozoïdes. L'étude de la morphométrie de la tête des spermatozoïdes peut être une méthode d'évaluation de la qualité de ceux-ci. L'analyse automatique de la morphologie du sperme (**ASMA** pour Automatic sperm morphology analysis) mesure plusieurs paramètres tels que la longueur, la largeur, l'aire et le périmètre de la tête du spermatozoïde. Cependant, une telle analyse isolée se révèle être difficile à interpréter car il existe une grande variabilité de tous ces paramètres au fur et à mesure du temps démontrant une croissance cinétique complexe du spermatozoïde de poisson. La taille globale de la tête du spermatozoïde est estimée par application de l'analyse des composantes principales (ACP). A partir de ce type d'étude, on peut essayer d'interpréter les changements morphologiques cellulaires au cours du temps (Asturiano et al., 2006).

La **motilité** est un des paramètres les plus importants de viabilité du sperme de poisson. En effet, cette caractéristique de la semence est étroitement corrélée à la fertilité (Lahnsteiner et al., 1998). On distingue trois méthodes de mesure de la motilité du sperme. Premièrement, les méthodes subjectives estiment le pourcentage de cellules spermatiques motiles (Levandusky et Cloud, 1988 in Rurangwa et al., 2004), la durée totale du mouvement (Duplinsky, 1982 in Rurangwa et al., 2004), ou encore une combinaison de ces deux paramètres (Baynes et al., 1981 in Rurangwa et al., 2004). Mais ces formulations correspondent à des échelles non linéaires et arbitraires qui ne peuvent pas être utilisées pour des analyses statistiques. Deuxièmement, les méthodes semi-quantitatives permettent de compter les spermatozoïdes individuellement sur base de leur motilité. Cela consiste en un enregistrement vidéo des mouvements des spermatozoïdes via un microscope et ensuite à rejouer la cassette, cadre par cadre, pendant que chaque position des spermatozoïdes est marquée sur un film d'acétate fixé sur le moniteur vidéo. Cela requiert deux observateurs indépendants ou plus. A partir de la mesure de la longueur du tracé en fonction du temps et d'une connaissance de la vitesse d'enregistrement vidéo, il est possible de calculer la vitesse des spermatozoïdes. Seuls les mouvements vers l'avant sont jugés comme motiles, les simples vibrations ou rotations autour d'un axe sont considérées comme immotiles. La durée totale de la motilité est mesurée par un chronomètre en considérant le temps pour lequel 50% et 95% des spermatozoïdes cessent de bouger (Aas et al., 1991 in Rurangwa et al., 2004). Ces méthodes ne prennent pas énormément de temps, mais il y a quand même un élément de subjectivité dans le choix des spermatozoïdes à suivre.

C'est précis d'un point de vue quantitatif mais si on veut vraiment réaliser une évaluation individuelle des spermatozoïdes et des mesures de vitesses, ces techniques sont longues et

Suite du tableau 13

Etudes	Variables	Résultats	Références
Effet d'une contamination par l'urine sur la qualité du sperme du turbot, *Psetta maxima*. Comparaison de 2 méthodes de collecte du sperme (cathéter et stripping).	Contamination par l'urine de 10, 30 et 50% avec des durées d'incubations croissantes. MOT, VCL, taux de fertilisation, pH, osmolalité, concentration en ATP.	Une contamination avec 30% d'urine diminue significativement la vitesse de nage des spermatozoïdes (230 à 160 µm/s) et une addition de 10% diminue le pourcentage de cellules motiles (83,4 à 54,2%). Une contamination de 10% suffit à diminuer significativement les réserves intracellulaires d'ATP. L'intensité de la contamination par l'urine affecte proportionnellement le taux de fertilisation. Mot diminuait avec la durée et l'intensité de contamination	Dreanno et al., 1998
Détermination de la qualité de la semence de la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* en établissant une corrélation entre la capacité de fertilisation de la semence et la motilité du sperme, la composition et le pH du plasma séminal et le métabolisme du via de simples modèles de régression.	La motilité du sperme: vitesse de nage totale et taux de motilité. La composition du sperme: activité de la β-D-glucuronidase, teneur en lipide totale. Le pH du plasma séminal et le métabolisme du sperme: activité de la malate déshydrogénase, la respiration, l'activité de l'aspartate aminotransferase, le niveau total de lipide.	Un sperme de bonne qualité pour la truite arc-en-ciel (soit un taux de fertilisation de >80%) correspond à un taux de motilité ≥75%, une vitesse de nage moyenne de 100 à 120 µm/s, une composition ionique du fluide séminal optimale: pH 8,0 à 8,2, respiration ≤ 5 µmol/min/100mg protéine, activité de la malate déshydrogénase ≤ 2,5 µmol/min/100mg protéine, une teneur totale en lipide de 20 à 60 mg/100 ml et une teneur spermatique totale en lipide de 100-400 µmol/100 mg protéines, une faible activité lytique du liquide séminal (β-D-glucuronidase ≤ 0,4 µmol/min/l).	Lahnsteiner et al., 1998
Etude de la qualité de quatre cryodiluents (solutions contenant du dimethyl sulphoxide (DMSO) ou du glycérol) pour la cryopreservation du sperme de *Clarias gariepinus*.	La motilité (VCL, VSL, VAP), la viabilité et la capacité de fertilisation du sperme frai, du sperme stocké à 4°C durant deux jours, du sperme stocké à -196°C durant 5 mois et 10 mois.	Les paramètres de motilité sont hautement corrélés aux taux d'éclosion. Après deux jours, la motilité des spermatozoïdes congelés avec le DMSO est moins déteriorée que la motilité de ceux stockés à 4°C. Le taux d'éclosion suit la viabilité du sperme elle-même dépendante du cryodiluent employé pour cryoconserver le sperme durant 5 mois. Après 10 mois, le pourcentage de motilité du sperme congelé est plus élevé dans un tampon de 8% de DMSO. Ce cryodiluent fournit la meilleure cryoprotection des spermatozoïdes pour tous les paramètres de qualité du sperme et pour toutes les durées de congélation testées.	Rurangwa et al., 2001
L'effet de tributyltin (TBT) sur le métabolisme énergétique et la motilité des spermatozoïdes de *Clarias gariepinus* et de *Cyprinus carpio*.	Concentration en adénylate. Concentration des enzymes impliquées dans la génération d'NADH, NADPH, bicarbonate et ATP. Motilité (14 paramètres via CASA mais principalement VCL), viabilité (Trypan bleu) des spermatozoïdes des deux espèces de poissons.	Une diminution significative de la durée et de l'intensité de motilité a été observée pour les spermatozoïdes de *Clarias gariepinus* exposés à 0,27 µg/l TBT durant 24h. La viabilité du sperme a légèrement diminué au cours de l'exposition. Chez la carpe, aucune concentration étudiée n'a été affectée par une exposition au TBT. Mais une exposition à 2,7 µg/l TBT réduit significativement la motilité du sperme chez *Cyprinus carpio*. Les spermatozoïdes du poisson-chat sont plus sensibles au TBT que ceux de la carpe.	Rurangwa et al., 2002

laborieuses et nécessitent des observateurs indépendants (Rurangwa et al., 2004). De plus, de telles méthodes sont difficilement traitées statistiquement (Kime et al., 2001).

Troisièmement, les méthodes quantitatives assistées par ordinateur ont pour leur part un grand nombre de qualités parmi lesquelles: reproductibilité, qualité des résultats, précision, fiabilité, de nombreux paramètres mesurés simultanément, rapidité et de nombreuses applications dans différents domaines. Elles comprennent un enregistrement vidéo suivi d'une numérisation et d'une analyse via un logiciel adéquat. Le coût élevé de l'équipement constitue le principal aspect négatif (Kime et al., 2001). Comme pour toute manipulation, il y a toujours un risque de contamination, d'artefact, si l'échantillon ne contient pas uniquement des spermatozoïdes. Pour minimiser le risque possible de contamination, les testicules ne sont pas pressés mais seulement incisés. De plus, le logiciel pour l'analyse de motilité ajuste ses paramètres de reconnaissance à la taille exacte des spermatozoïdes du poisson à étudier (Mansour et al., 2005).

Finalement, les deux paramètres les plus utiles pour estimer la qualité du sperme, en dehors de la capacité de fertilisation, sont la motilité - mouvement progressif - et la durée du mouvement (Kime et al., 2001).

8.2. Computer assisted sperm analysis (C.A.S.A.)

Puisque la qualité du sperme est un facteur important contribuant au succès de production des larves de poissons, la mesure de sa motilité pourrait constituer un bioindicateur sensible et précis de la valeur de ce dernier. Des études analysant différents impacts environnementaux sur l'état du sperme requièrent une évaluation rapide et quantitative de la motilité des spermatozoïdes (Kime et al., 1996). Une avance majeure a été réalisée avec l'utilisation, dans les cliniques humaines de fertilité, d'analyses d'imagerie sophistiquées d'évaluation de la motilité des spermatozoïdes, rapides et objectives. Bien que ces méthodes étaient largement employées pour les mammifères, il a fallu quelques adaptations avant de pouvoir les utiliser pour le sperme de poisson qui n'est généralement motile que pendant moins de 2 minutes (Kime et al., 2001). Etant donné la courte durée de motilité, il est essentiel que les dilutions soient rapides et que les observations commencent à un temps régulier après celles-ci (Billard et Cosson (1992) in Kime et al., 1996). Aussi, une évaluation quantitative et précise de la motilité requiert que tout le sperme soit simultanément activé. Puisqu'une haute dilution (plus de 1000 fois) est requise pour induire une motilité synchronisée de 100% des spermatozoïdes, une procédure en deux étapes est nécessaire, avec une dilution initiale de 1 sur 100 dans un support qui garde les spermatozoïdes immotiles et permet un bon mélange du sperme visqueux. La composition de ce tampon est fonction de l'espèce étudiée. Dans le cas du poisson-chat, ce tampon est composé de NaCl (5,52 g l^{-1}), KCl (2 g l^{-1}), Tris-HCl (2,42 g l^{-1}), glycine (3,75 g l^{-1}) et eau distillée. Le tout est ajusté à un pH de 7,5. La seconde dilution (1µl de la première dilution dans 19 µl d'eau) constitue la solution activante et peut être faite directement sous le microscope (Billard et Cosson, 1992 in Rurangwa et al., 2004). Il est également très important d'éviter des mouvements de fluide sur la lame, car ils peuvent être interprétés par le traceur comme des mouvements cellulaires même si ce n'est pas le cas. La stabilisation du fluide est peut-être le problème technique le plus difficile à résoudre puisqu'il se produit précisément au moment le plus intéressant de la période de motilité, juste après l'activation (Kime et al., 2001). Puisque la motilité du sperme de poisson diminue très rapidement après mélange avec l'eau, il est essentiel d'obtenir une image stable le plus vite possible, idéalement, approximativement 5s après l'induction de la motilité. Les enregistrements peuvent alors être analysés à 5-20, 20-35, 35-50 s, etc. après l'initiation de la motilité, le premier intervalle de temps 5-20 fournissant les meilleures données (Kime et al., 2001). L'emploi d'un enregistrement vidéo plutôt que des observations directes et subjectives

Suite du tableau 13

Etudes	Variables	Résultats	Références
Etude comparative des caractéristiques reproductives des mâles XY et des mâles de sexe inversé (de façon hormonale) XX de *Perca fluviatilis*.	Concentration et motilité du sperme (VCL, VSL, VAP, LIN, %MOT, MOC), rapport gonadosomatique (RGS), taux de fertilisation, concentrations des stéroïdes sexuels plasmatiques (T, 17β-estradiol, E_2, 11-KT).	Pas de différence significative pour les capacités reproductives entre les mâles XY et XX de *Perca fluviatilis*.	Rougeot et al., 2004
Impact d'une exposition à du 4-nonylphenol sur la qualité du sperme, la viabilité des gamètes, le succès de fertilisation et la survie des embryons et des larves chez les truites arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*.	Exposition à des concentrations de 4-nonylphenol (130, 280 et 750 ng/l) durant 60 jours. Production, densité, motilité (Computer assisted cell motility analysis: %immotile, % localement motile, % motile, % linéairement motile, %non linéairement motile, VAP, l'indexe de linéarité (LI), la trajectoire de nage en ligne droite (SL)) et capacité de fertilisation du sperme. Proportion d'embryons et de larves à la fin du stade du sac de vitellus	Une exposition à ≥ 130 ng/l diminue la quantité de la semence et une exposition à ≥ 280 ng/l diminue le pourcentage de survie des œufs. Une exposition à 750 ng/l inhibe complètement la production du sperme alors que des expositions à des concentrations de 130 ng/l et 280 ng/l réduisent de façon significative la production du sperme. La densité, motilité et fertilité du sperme, la fertilité des œufs, le processus de fertilisation (contact entre sperme et œufs) ne sont pas affectés.	Lahnsteiner et al., 2005
Analyse comparative de la croissance et de la motilité du sperme entre des mâles *Dicentrarchus labrax* précoces ou non.	Performances de croissance: longueur, largeur, poids, RGS, indexe hépatosomatique [poids du foie/pois corporel], indexe de graisse viscéral [poids de graisse viscérale/poids corporel], indexe de la carcasse [poids de l'animal vidé/poids corporel]. Volume, concentration spermatique, motilité des spermatozoïdes (VCL, VSL, VAP, ALH, BCF).	Les mâles précoces grossissent 18% de moins et grandissent 5% de moins que les mâles dits normaux lors de la deuxième année de leur cycle de vie. Des différences significatives ont été observées pour le volume, la concentration, et plusieurs paramètres de motilité (VCl, VSL, VAP, BCF) entre des jeunes jugés précoces et des adultes. Néanmoins, la motilité était comparable pour les mâles précoces ou non durant la deuxième année de leur cycle de vie. Cela suggère un même succès de reproduction pour les deux types de mâles âgés d'environ deux ans.	Felip et al., 2006

comme utilisées par le passé, permet un enregistrement durable pour une analyse ultérieure par ordinateur. Une telle méthode est facilement utilisable aussi bien sur le terrain qu'en laboratoire puisque l'équipement d'enregistrement est transportable et relativement peu coûteux tandis que les logiciels et hardwares d'interprétation coûteux peuvent rester dans une installation centrale (Kime et al., 1996). Un nombre de traceurs de sperme de degrés de sophistication variable ont été utilisés pour l'analyse assistée par ordinateur du sperme de poisson (Toth et al., 1997), chacun différant en des détails particuliers, avantages et désavantages spécifiques, mais, dans tous les cas, une adaptation de sa forme primaire, conçue pour les mammifères, a dû être réalisée. Pour exemple, l'Hobson Sperm Tracker peut suivre simultanément jusque 200 spermatozoïdes en temps réel et générer 14 paramètres de mouvement (Kime et al., 1996; Kime et al., 2001). Ces paramètres sont par exemple, le pourcentage de spermatozoïdes motiles (%MOT), la vitesse linéaire (VSL), la vitesse curvilinéaire (VCL) et la vitesse angulaire (VAP) des spermatozoïdes, la morphométrie de la tête du spermatozoïde (ARE) ou encore la linéarité du chemin parcouru par les spermatozoïdes (LIN) (Rurangwa et al., 2004). Les 14 paramètres sont explicités plus en détail dans la partie « matériel et méthodes » de ce travail. L'Hobson sperm tracker ne peut pas calculer le pourcentage de sperme motile pour des intervalles de temps d'une durée de moins de 15s (Kime et al., 2001). Pour les espèces d'eau chaude, une température de 20-25°C pour la pièce d'enregistrement est adéquate, mais pour les salmonidés et autres espèces d'eau froide, la pièce, voire même le vidéomicroscope, doivent être refroidis (Kime et al., 2001). Un autre problème fréquemment rencontré réside dans le fait que le sperme peut coller à la lame. Cela peut être contré par un traitement préalable de la lame par immersion dans de l'albumine de sérum de bovin 1% (Billard et al., 1995b) ou dans de l'alcool de polyvinyl suivi d'un rinçage à l'eau distillée (Perchec et al., 1995 in Kime et al., 2001).

L'étude menée par Kime et al. (1996) montre que le système CASA peut fournir un outil précieux pour déterminer les effets de polluants sur la motilité des spermatozoïdes et, à partir de là, sur le taux de fertilisation et la production de larves viables.

Une étude sur le marmouset commun, *Callithrix jacchus*, montre une différence entre deux méthodes de comptage des spermatozoïdes, à savoir un comptage via CASA ou via un observateur et une chambre de comptage. L'auteur présente trois hypothèses de réponses pour expliquer ces différences. La première étant que l'observateur peut discriminer les cellules de ce qui n'en est pas, contrairement à l'ordinateur, mais celui-ci peut compter des cellules de tailles trop petites pour être reconnues par l'observateur. La deuxième étant que l'ordinateur se focalise sur une plage donnée durant un temps précis. Or, les spermatozoïdes sont constamment mobiles et donc la concentration calculée va dépendre du nombre de cellules passant à travers cette plage. Enfin, la troisième étant l'usage de pipettes et de tips auxquels les cellules spermatiques peuvent adhérer (Morrell, 1997).

Différentes études utilisant la méthode d'évaluation de la qualité du sperme assistée par ordinateur sont illustrées au tableau 13.

En fin de compte, cette méthode semble être la plus appropriée d'après la littérature mais elle ne doit pas être employée seule pour conclure quant à la qualité du sperme analysé.

Tableau 14 : Ingrédients et formulation des cinq régimes expérimentaux de l'expérience de Nyina-Wamwiza, L. 2003. Le régime 1 correspond au régime commercial de Coppens International. « R » signifie régime et les valeurs sont exprimées en g/kg de matière première.

Ingrédients [g /kg de matière première]	R2 Contrôle	R3 Tournesol	R4 Arachide	R5 Soja	R6 Haricot
Farine de poisson	**500**	**260**	**250**	**260**	**260**
Sang d'abattoir	70	90	80	90	100
Viscères de poulet		100	100	100	180
Tourteau de tournesol		**440**			
Tourteau d'arachide			**260**		
Tourteau de soja				**400**	
Farine de haricot					**340**
Farine de maïs	200		200		
Huile de poisson	60	25	25	25	30
Huile de tournesol	60	25	25	25	30
Cellulose	30			40	
Prémix végétaux	30	30	30	30	30
Prémix vitaminés	30	30	30	30	30
Carboxyméthylcellulose	20				
Protéines brutes [%]	39,7	39,3	39,8	39,4	38,7
Energie brutes [MJ]	18,8	19,1	18,7	19,6	18,9

Tableau 15 : Ingrédients et formulation des 6 régimes expérimentaux testés pour la deuxième expérience de Nyina-Wamwiza L., 2004. « R » signifie régime et les valeurs sont exprimées en g/kg de matière première.

- **R1 : tourteau de tournesol non décortiqué (TTND)**
- **R2 : tourteau de tournesol non décortiqué trempé (TTNDT)**
- **R3 : tourteau de tournesol non décortiqué + farine de haricot (TTND + H)**
- **R4 : tourteau de tournesol décortiqué + farine de haricot (TTD + H)**
- **R5 : tourteau de tournesol non décortiqué trempé + farine de haricot + tourteau d'arachide (TTND + A + H)**
- **R6 : tourteau de tournesol décortiqué + farine de haricot + tourteau d'arachide (TTD + A + H)**

Ingrédients [g /kg de matière première]	R1 TTND	R2 TTNDT	R3 TTND + H	R4 TTD + H	R5 TTND + A + H	R6 TTD + A + H
Farine de poisson	257	257	257	149		
Sang d'abattoir	89	89	89	99	99	99
Viscères de poulet	99	99	99	99	99	99
Tourteau de tournesol	**436**	**436**	**248**	**426**	**218**	**297**
Tourteau d'arachide					**396**	**317**
Farine de haricot			**198**	**139**	**99**	**99**
Huile de poisson	25	25	25	20	20	20
Huile de tournesol	25	25	25	20	20	20
Prémix minéraux	30	30	25	20	20	20
Prémix vitaminés	30	30	25	20	20	20
Carboxyméthylcellulose	10	10	10	10	10	10
Protéines brutes [%]	38,89	38,89	38,37	37,78	37,76	37,88
Energie brutes [MJ]	18,98	18,98	18,72	20,85	19,06	20,87

9. Résultats de la recherche doctorale de Nyina-Wamwiza Laetitia

Les objectifs de cette thèse sont de déterminer la capacité de substitution de la farine de poisson par des matières premières d'origine végétale dans l'alimentation de *Clarias gariepinus* et d'évaluer les effets sur les performances de croissance et de reproduction de cette espèce.

Pour cela, il a fallu dans un premier temps identifier les sous-produits agro-industriels disponibles et capables de substituer la farine de poisson dans la pisciculture au Rwanda. Après enquête, une dizaine de sous-produits ont été collectés sur tout le pays et analysés au point de vue biochimique (énergie et protéines). Une sélection a été réalisée en fonction de la disponibilité, du coût et de l'apport protéique. A partir de ces ingrédients, des formulations alimentaires ont été établies et cinq régimes isoprotéiques et isoénergétiques ont été formulés et comparés avec un aliment commercial pour Clarias fourni par la société Néerlandaise Coppens International. Ces régimes sont présentés au tableau 14. L'effet de ces régimes expérimentaux a ensuite été évalué sur les performances zootechniques, les niveaux de rétention protéique et énergétique. Les résultats de ces analyses montrent que le gain de poids tout comme la croissance, les taux d'efficacité alimentaire et de rétention des nutriments sont maximum pour le régime contenant 50% de farine de poisson mais ne sont pas statistiquement différents de ceux obtenus avec les régimes substituant à 50% la farine de poisson par le tourteau d'arachide ou la farine de haricot. Seuls les régimes contenant le tourteau de tournesol ont entraîné de faibles croissances.

Suite à cette première étape, de nouvelles formulations ont été réalisées via une co-supplémentation entre les tourteaux afin de remplacer au maximum la farine de poisson. Ces régimes sont présentés au tableau 15. Les besoins en acides aminés de cette espèce sont remplis tant par le régime contrôle que par les régimes formulés. La valorisation du tourteau de tournesol n'a pas été abandonnée, il a même servi de contrôle lors de la deuxième expérience. Lors de celle-ci, différentes techniques de pré-traitements sensées augmenter la digestibilité de ce tourteau et en diminuer les composés antinutritionnels ont été testées. La farine de poisson est cette fois substituée progressivement et passe de 25 à 15 puis 0%. Les poissons nourris avec les régimes les plus dépourvus en farine de poisson consommaient plus d'aliments proportionnellement à leur poids, acceptaient ces ingrédients et les convertissaient en biomasses corporelles. Aucune différence significative n'a été observée pour le gain de poids, le taux de croissance spécifique ou encore l'efficacité alimentaire entre les régimes 1, 2, 4 et 6. Il ressort de cette expérience que le décorticage du tournesol serait le meilleur traitement si on veut améliorer sa valeur nutritionnelle vis-à-vis des exigences de *Clarias gariepinus*. En troisième étape, le dosage de certains facteurs antinutritionnels a été effectué. Les concentrations en facteurs antitrypsiques et en phytates dans les différents tourteaux de tournesols sont plus élevées que dans les autres ingrédients utilisés. Les tannins sont plus concentrés dans le tourteau de tournesol décortiqué par rapport au non décortiqué, ils seraient concentrés au niveau de la partie interne de la graine. Cela dit, les facteurs antinutritionnels analysés n'ont pas d'influence remarquable sur la digestibilité des protéines ou des acides aminés et ne semblent pas responsables, dans cette étude, des moindres performances de croissance observées avec les régimes privés de farine de poisson.

Pour terminer, aucun effet significatif de ces régimes n'a été constaté sur l'histologie des gonades ou sur l'état hormonal au cours de la saison de frai des poissons, à la fois mâles et femelles, de *Clarias gariepinus* (Defreyne, 2005).

10. Conclusion de cette synthèse bibliographique

Développer l'aquaculture permettra de combler le fossé grandissant entre la demande d'une population sans cesse croissante et l'offre des milieux aquatiques naturels. La résolution de nombreux problèmes techniques liés à l'élevage de certaines espèces, le développement de nouvelles technologies et surtout des améliorations de la nutrition des poissons sont nécessaires à l'augmentation des capacités de production en milieux artificiels.

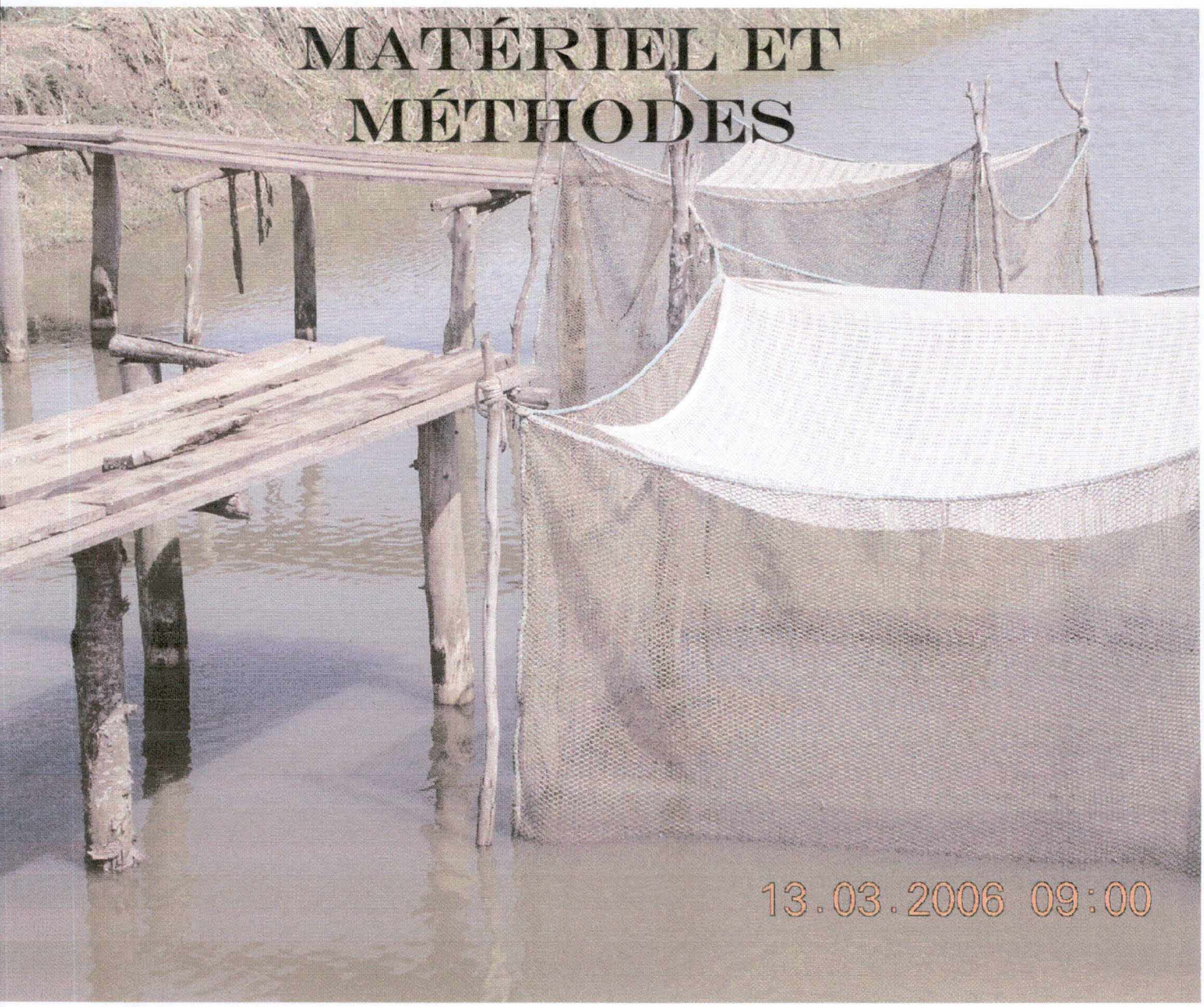
La mise en place d'aliments pour poissons à base de sous-produits et dérivés végétaux est un enjeu de taille puisqu'il s'agit à la fois de réduire les coûts liés à l'élevage et de produire un effet environnemental positif en améliorant l'utilisation alimentaire et en réduisant les déchets, le tout, en faisant croître les capacités de production aquacole (Hardy, 1999).

Cependant, cette recherche bibliographique montre que la nutrition peut bel et bien avoir un impact sur la reproduction des poissons. Cela, d'autant plus que les aliments sont à base de dérivés végétaux puisqu'ils peuvent contenir un nombre variable de facteurs antinutritionnels dont les saponines qui peut affecter la qualité du sperme (Dabrowski et al., 2001), de nombreux phytoestrogènes et certaines substances toxiques (Ulloa et al., 2004). De même, la teneur en acides gras joue un rôle important dans le maintien de la qualité des spermatozoïdes (Pérez et al., 2000).

Les phytoestrogènes sont des molécules ayant une analogie de structure chimique avec le 17β-oestradiol pouvant être à l'origine de perturbations du système endocrinien (Gerber et al., 2006). Ces substances peuvent stimuler la production de vitellogénine et de protéines se liant aux stéroïdes, ces dernières entraînant une accumulation de stéroïdes. De cette manière, les substances « steroid-like » semblent affecter le développement du système reproducteur et la croissance (Pelissero et Sumpter, 1992).

Le sperme de poisson présente quelques spécificités par rapport au sperme mieux connu des mammifères. Il n'acquiert sa capacité de motilité qu'une fois éjecté dans le milieu aquatique naturel et n'est motile que pour au maximum quelques minutes (Billard et Cosson, 1992 in Kime et al., 1996). De ce fait, pour l'analyse de la qualité de la laitance de ces animaux, des techniques appropriées à ces caractéristiques ont dû être mises au point. Parmi celles-ci, la méthode assistée par ordinateur semble la plus appropriée pour un rapport qualité, rapidité supérieur et la possibilité de réaliser ces analyses peu importe l'accessibilité au matériel de pointe sur le terrain (Kime et al., 1996; Rurangwa et al., 2004). Il est malgré tout important de ne pas se limiter à un seul type d'analyse, le taux de fertilisation, par exemple, reste une excellente mesure d'évaluation de la qualité des gamètes (Chereguini et al., 1999 in Rurangwa et al., 2004).

Enfin, le choix du modèle semble assez bien ajusté à cette étude puisque le poisson-chat africain grossit malgré une densité d'élevage élevée, il s'adapte à des conditions environnementales peu optimales, il est omnivore et souvent comparé à un cochon aquatique. Il représente finalement une espèce adaptée à l'élevage en cage (Appelbaum et Kamler, 2000; Hengsawat et al., 1997). On peut néanmoins regretter le fait que les mâles ne puissent pas libérer leur semence par pression abdominale, ceci entraînant leur sacrifice lors de reproductions artificielles ou de simples analyses de qualité du sperme et compromettant les tentatives de sélections (Viveiros et al., 2002).


MATÉRIEL ET
MÉTHODES
13.03.2006 09:00

Matériel et méthodes

1. Infrastructure expérimentale et poissons

Une partie de l'expérience (du 11 février au 13 mai 2006) s'est déroulée au Rwanda. Les poissons expérimentaux se trouvaient à la Station Piscicole de Rwasave (SPIR) de l'Université Nationale du Rwanda (UNR).

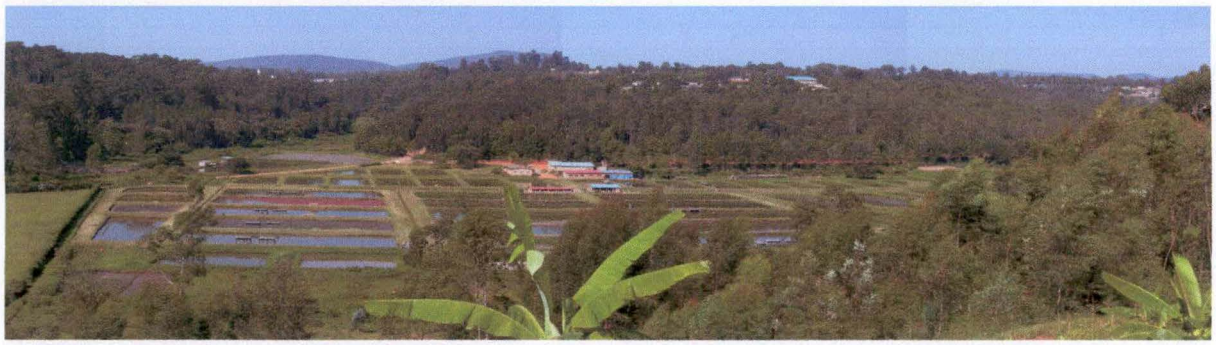
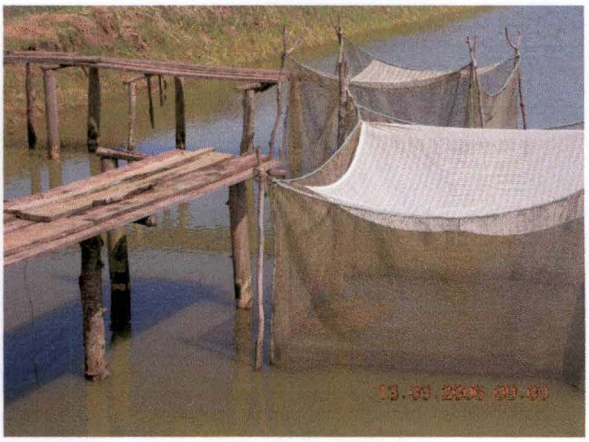


Photo 1 : Vue globale de la Station Piscicole de Rwasave (SPIR) de l'Université Nationale du Rwanda, située à Butare.

Les poissons d'étude sont répartis dans quatre cages flottantes, constituées de filets en nylon soutenus par 4 poteaux de bois, à raison de 45 à 61 poissons par cage. Les quatre cages sont disposées dans un même étang de la SPIR. Chacune de celles-ci représente un volume de 2,56 m³ (1,60 m x 1,60 m x 1m de profondeur). L'eau de la rivière Rwasave est captée par la SPIR.



Photos 2 et 2' : Vue générale et vue détaillée des cages situées dans un étang de la SPIR.

Les géniteurs de *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sont élevés à la SPIR depuis le stade de l'éclosion. Ils reçoivent les mêmes aliments à base de sous-produits agroindustriels locaux depuis qu'ils ont atteint un poids de 3g. Le poids moyen individuel varie entre 383 et 462 g en début d'expérience.

2. Conditions expérimentales

Quatre régimes expérimentaux sont fournis aux poissons. L'expérience s'est déroulée en saison des pluies avec une première pêche de contrôle réalisée le 27 février 2006. Lors des

pêches de contrôle, la longueur, le poids et le sexe de chaque individu sont répertoriés. Des prises de sang sont réalisées sur dix poissons par cage. On emploie un anesthésiant, le 3-aminobenzoïc-acide-éthyle, à raison de 1,2 g pour 10 l d'eau, afin de diminuer le stress des animaux.

Tableau 16 : Différentes variables zootechniques mesurées au cours de l'expérience qui s'est déroulée du 27/02 au 02/05/2006.

Variables	Régime 1	Régime 2	Régime 3	Régime 4
Biomasse [kg/m³]	8,48	7,18	9,13	8,74
Poids moyen [g]	462 ± 110,15	408 ± 103,13	383 ± 97,43	457 ± 117,33
Longueur moyenne [cm]	38,5 ± 4,35	37,5 ± 3,72	37 ± 3,68	39 ± 4,17
Nombre de poissons	47	45	61	49
Nombre de femelles	25	28	40	27
Nombre de mâles	22	17	21	22
Ammoniaque [mg/l]	0,19 ± 0,19	0,20 ± 0,19	0,13 ± 0,14	0,22 ± 0,24
Nitrite [mg/l]	0,044 ± 0,013	0,043 ± 0,012	0,043 ± 0,012	0,043 ± 0,014
Nitrate [mg/l]	0,25 ± 0,10	0,25 ± 0,08	0,24 ± 0,12	0,25 ± 0,11
Oxygène dissous [mg/l]	4,42 ± 1,92	4,42 ± 1,94	4,44 ± 1,94	4,43 ± 1,94

Des mesures de température et de concentration en oxygène dissous sont effectuées tous les jours. La température de l'eau au niveau des cages a varié entre 19,2 et 27,4°C, avec une moyenne générale de 23,2 ± 2,24 °C. La concentration en oxygène dissous, mesurée quotidiennement avec un oxymètre WTW, modèle OXI 325, a varié entre 1,6 et 10,6 mg O_2/l (moyenne de 4,4 ± 1,94). Une fois par semaine, les matières azotées (nitrates, nitrites et ammoniaque) sont contrôlées.

Photo 3 : Le système Kjeldhal pour mesurer le taux d'ammoniaque de l'eau échantillonnée.

3. Régimes expérimentaux

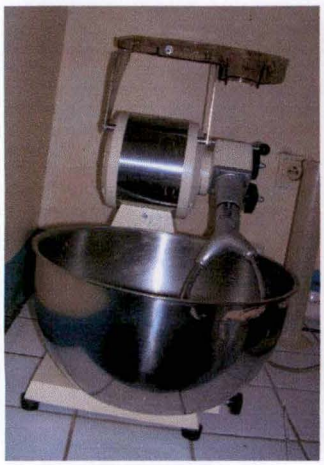
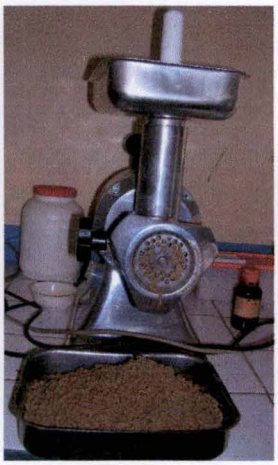
Quatre régimes isoprotéiques et isoénergétiques ont été constitués de manière à tester le remplacement de la farine de poisson par des dérivés animaux et végétaux. A savoir, un premier régime contenant 50% de farine de poisson, un second régime contenant 25,7 % de farine de poisson, un troisième régime à base de 12,5% de farine de poisson et enfin le quatrième régime dénué de farine de poisson. Exceptés la farine de poisson et les adjuvants, tous les ingrédients de ces régimes proviennent du Rwanda. Les tourteaux d'arachide et de tournesol, ainsi que l'huile de tournesol proviennent de l'association NOZA à Butare. Les tourteaux, décortiqués ou non, sont cuits, puis séchés au soleil. Le sang d'abattoir est acheté dans un marché non loin de Butare. Le maïs et les haricots sont obtenus au marché de Butare. La farine de maïs est produite à la SPIR. On cuit le maïs, on le fait sécher puis on le moud. Les viscères de poulet sont collectés dans un hôtel local de Butare (hôtel Credo), ainsi que dans un élevage de poulets dans un centre pour jeunes sourds et muets de Butare. La farine de poisson provient de la société néerlandaise Coppens International. Les prémix minéraux et

vitaminiques, le carboxylméthylcellulose employé comme liant, l'huile de foie de morue et enfin l'antioxydant ethoxyquine, proviennent de la société Sigma-Aldrich.

Tableau 17 : Formulations des régimes expérimentaux

Ingrédients (% g)	Régime R1 (% g)	R2 (% g)	R3 (% g)	R4 (% g)
Farine de poisson	**50.0**	**25.74**	**12.50**	**0.00**
Sang d'abattoir	5.00	8.90	9.90	9.90
Viscères de poulet	0.00	9.90	9.90	9.90
T. de tournesol non décortiqué	0.00	**24.80**	**30.0**	0.00
T. de tournesol décortiqué	0.00	0.00	0.00	**29.70**
Tourteau d'arachide	0.00	0.00	**16.29**	**31.68**
Farine de haricot	0.00	**19.80**	**12.50**	**9.90**
Farine de mais	**22.00**	0.00	0.00	0.00
Huile de poisson	6.00	2.00	1.98	1.98
Huile de tournesol	6.00	2.00	1.98	1.98
Prémix minéraux	2.00	2.20	1.98	1.98
Prémix vitaminés	2.00	2.20	1.98	1.98
Carboxyméthylcellulose	2.00	1.00	0.99	0.99
Cellulose	5.00	1.80	0.00	0.00
Protéines brutes (%)	**38.4**	**38.4**	**37.8**	**37.9**
Protéines animales (%)	37.1 (96.6 % PB)	27.1 (70.6 % PB)	19.0 (50.3% PB)	10.6 (30.0% PB)
Protéines végétales (%)	1.3 (3.4% PB)	11.3 (29.4% PB)	18.8 (49.3% PB)	27.3 (70.0 % PB)
Energie brute ($MJ.Kg^{-1}$)	**18.9**	**18.4**	**18.9**	**20.0**

Pour chaque régime, les sous-produits sont cuits individuellement. On les pèse puis on les mélange ensuite avec un mixeur de marque Kenwood. On commence par l'ingrédient ayant le volume le plus important du régime. L'huile est ajoutée en dernier lieu après lui avoir incorporé l'antioxydant. On termine en ajoutant l'eau (environ 600 à 800 ml/kg) qui donnera la consistance à l'aliment. On réalise des spaghettis grâce à un hachoir à viande. Ces spaghettis sont étalés sur des grilles et séchés au soleil. Ensuite, on les coupe manuellement pour qu'ils acquièrent la taille souhaitée. Quotidiennement, les aliments sont pesés et distribués manuellement aux poissons deux fois par jour (9 h et 16 h) en fonction d'une table de rationnement qui prend en compte le poids des poissons et la température de l'eau (voir tableau 18: Table de rationnement de Hecht et al., 1988).

Photos 4, 4'et 4'' : respectivement: un mixeur, un hachoir à viande pour réaliser les spaghettis et des grilles pour le séchage au soleil des aliments pour poissons.

Tableau 18 : Table de rationnement de *Clarias gariepinus* selon Hecht et al. (1988) exprimée en pourcentage du poids moyen

	Poids moyen [g]					
Température [°C]	1-10	10-25	25-50	50-100	100-300	300-800
20	5,0	3,0	2,0	1,5	1,2	1,0
22	6,8	4,5	3,0	2,4	2,0	1,7
24	8,1	6,0	4,0	3,0	2,5	2,2
26	9,5	6,6	5,1	3,6	3,2	2,8
28	10,0	7,0	5,5	4,0	3,5	3,1
30	9,8	6,8	5,5	3,7	3,2	2,9
32	9,5	6,5	5,0	3,5	3,0	2,8

4. Evaluation de la qualité du sperme

a. Collecte du sperme

Cette expérience s'est déroulée du 28 mars au 2 mai 2006 inclus. Sur les 202 poissons de l'expérience, douze mâles par cage ont été tués pour la récolte des testicules et l'obtention du sperme. Une pêche est réalisée le matin à la SPIR afin de sélectionner les plus gros mâles de *Clarias gariepinus*. Les poissons tués sont calibrés de manière à avoir un poids initial relativement similaire (606,23 ± 32,73 g). Le mâle est pesé, un prélèvement de sang est effectué puis il est tué par une section au niveau cervical. Ses testicules sont prélevés. Les testicules sont séchés dans du papier essuie-tout puis pesés. Le rapport gonadosomatique se mesure par le rapport du poids des testicules sur le poids total du poisson, multiplié par cent. Le sperme est extrait des testicules en veillant à ne pas récolter du sang ou autre contaminant de la semence. Le sperme est directement conservé dans une glacière (4°C).

b. Mesure du pH du liquide séminal

Le pH du liquide séminal est mesuré via un pHmètre. Lorsque la quantité de liquide séminal est trop faible pour entrer en contact avec l'électrode du pHmètre, une dilution est réalisée avec deux ml d'eau distillée puis le pH réel du liquide séminal est calculé en fonction de cette dilution.

c. Enregistrement de la motilité des spermatozoïdes

L'enregistrement de la motilité du sperme commence par une dilution en deux étapes selon la méthode de Billard et Cosson (1992). Le tampon de dilution de pH 7,5 dont les réactifs sont: 552 mg NaCl (ucb), 200mg KCl (Chem-lab), glycine 375mg (Sigma 99%TLC), Trizma-HCl 242mg (Sigma reagent grade minimum 99% redox titration), inhibant la motilité des spermatozoïdes et un colorant à base de ce tampon, le Trypan bleu 0,4% (Sigma) utilisé pour la mesure de l'intégrité membranaire, sont préparés quotidiennement.
Premièrement, 1µl de sperme est disposé dans 99µl de tampon. Puis de ce mélange, 1µl est prélevé et dilué dans 19µl d'eau, ce qui active le sperme. La deuxième dilution peut se réaliser directement sur microscope. Les lames multitests, des lames ICN à 12 puits, ont été employées. Au total, le sperme est dilué 2000 fois. Lorsque le volume d'eau n'est pas optimum, une activation asynchrone du sperme est observée. Les cinq premières secondes d'enregistrement correspondent à la phase de motilité la plus importante pour la fécondation. Le grossissement du microscope est de 40x.

La technique utilisée pour l'enregistrement et l'observation des caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes du poisson-chat africain est celle de Cosson et al., (1985) adaptée aux spermatozoïdes de poissons. Les spermatozoïdes sont observés au microscope photonique (Carl Zeiss, Axiospop 40) en fond clair. Ce système est connecté à un système vidéo constitué d'une caméra (MC-1009/S, AVT HORN), d'un adaptateur (AA-P700, AVT HORN) d'un moniteur vidéo (Sony, Model NO PVM-20M2E, Trinitron) et d'un magnétoscope (JVC, SR-L900E).

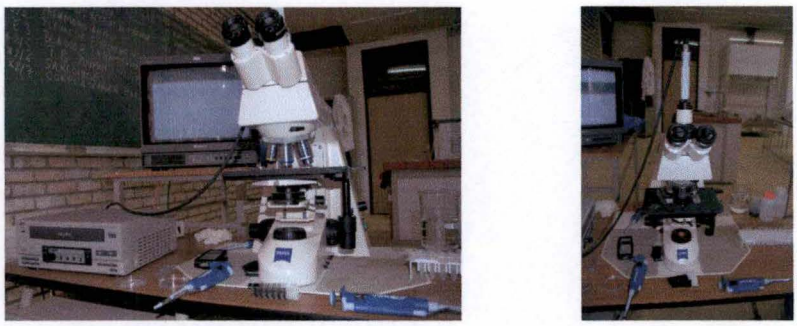


Photo 5 et 5' : Matériel pour l'enregistrement vidéo de la motilité des spermatozoïdes. Microscope, magnétoscope, adaptateur, écran (photo de gauche) et la caméra reliée au microscope (photo de droite).

Les séquences vidéo sont ensuite analysées image par image sur le moniteur vidéo. Le temps de latence entre l'initiation du mouvement et le début de l'enregistrement est d'environ 5s.
Une dizaine d'enregistrements vidéo par poisson, d'une durée de deux minutes chacun, sont réalisés. Ensuite, les meilleurs enregistrements (absence de mouvements d'eau, concentration de spermatozoïdes optimale, contraste acceptable) sont sélectionnés et envoyés à l'Institut de Zoologie de Londres pour examen via le logiciel d'analyse automatique des trajectoires, le système CASA (Computer Assisted Sperm Analysis, Modcell®) adapté aux caractéristiques des spermatozoïdes du poisson-chat africain, *Clarias gariepinus*.

Longueur de la tête du spermatozoïde: 2,3 µm
Largeur de la tête du spermatozoïde: 2,6 µm
Longueur de la pièce moyenne: 1,6 µm
Longueur du flagelle: 40,0 µm
Largeur du flagelle: 1,6 µm

Le système CASA utilisé par l'institut londonien est l'Hobson Sperm Tracker (HST) qui peut suivre simultanément et en temps réel jusque 256 objets en mouvements.

Photo 6 : Le système CASA (Computer Assisted sperm Analysis) constitué par l'Hobson Sperm Tracker.

L'Hobson Sperm Tracker peut mesurer quatorze paramètres liés à la qualité de motilité du sperme :

- VCL, la vitesse curvilinéaire [µm s^{-1}], la somme des distances de mouvements incrémentielles pour chaque étape de mouvement le long du chemin échantillonné divisée par le temps total du déplacement.
- VSL, la vitesse linéaire [µm s^{-1}], la distance en ligne droite entre le début et la fin du chemin divisée par le temps du déplacement.
- PFT, la variation ou pause de la vitesse linéaire (VSL) [µm/s], une mesure du changement de mouvements d'un spermatozoïde le long de son parcours.
- VAP, la vitesse angulaire [µm s^{-1}], un chemin dérivé et lissé calculé à partir de cinq points successifs et divisé par le temps du déplacement.
- %MOT, le pourcentage de spermatozoïdes motiles [%].
- MOC, la concentration de spermatozoïdes motiles [millions ml^{-1}].
- ARE, la morphométrie de la tête du spermatozoïde [µm²]. La valeur moyenne de la largeur x la hauteur (dérivée de la morphométrie linéaire, LIM) c'est-à-dire l'aire de la tête spermatique.
- Lin, la linéarité [%], le rapport entre la vitesse linéaire et la vitesse curvilinéaire [(VSL/VCL) x100].
- MAD, le déplacement angulaire moyen [°] de la tête du spermatozoïde d'un point à un autre, c'est-à-dire le changement moyen de direction de la tête spermatique.
- STR, l'indice de rectitude [%], la vitesse linéaire divisée par la vitesse angulaire [(VSL/VAP) x100].
- ALH, l'amplitude du déplacement latéral de la tête du spermatozoïde [µm]. La déviation moyenne du chemin lissé, basée sur la différence de linéarité entre le chemin lissé et le chemin réel.
- DMN [µm], l'amplitude du déplacement latéral de la tête du spermatozoïde (ALH) divisée par sa linéarité (Lin).
- BCF, la fréquence des battements flagellaires mesurée à partir de la fréquence des battements croisés de la tête du spermatozoïde [Hz] avec le chemin lissé.
- LIM ou Lin MOR, la morphométrie linéaire [µm], c'est à dire le diamètre de chaque tête de spermatozoïde.

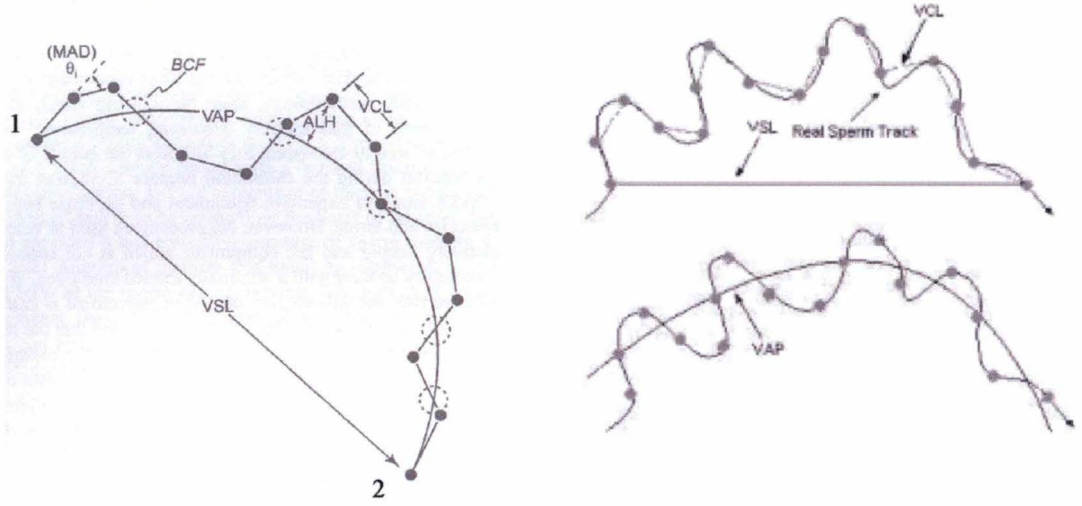


Figure 5 et 5' : Représentations schématiques de certains des paramètres de motilité analysés par le système CASA. Les points noirs représentent des positions successives de la tête du spermatozoïde en mouvement. Les abréviations n'ont pas été traduites de l'anglais vers le français. A gauche, une illustration tirée de Boyer et al., 1989 in Rurangwa et al., 2004 où la distance linéaire est représentée par la distance entre les points 1 et 2. A droite, une représentation de Katebi et al., 2005.

Au final, un enregistrement par poisson a été traité pour un temps total de 1 min 30s. Et ce pour 11 poissons pour les régimes 1, 2 et 3 et pour 12 poissons pour le régime 4. La différence de taille des échantillons est due à la présence de poissons sans testicules pour le régime 1 et à la présence de poissons aux développements testiculaires anormaux pour les régimes 2 et 3. Les différents paramètres de motilité ont été mesurés toutes les 15s sur quatre périodes de temps : 0-15, 16-30, 31-45 et 46-60 s. L'intervalle de temps restant a été mis de côté car les spermatozoïdes étaient déjà quasiment tous immobiles au-delà d'une minute. Les paramètres DMN, STR, LIM et MAD n'ont pas été analysés, faute de références littéraires.

d. Spermatocrite

Une partie du sperme est centrifugée à 4 000 rpm durant 20 min. La séparation entre le liquide séminal et les spermatozoïdes permet de mesurer le spermatocrite, c'est-à-dire le rapport, multiplié par cent, de la quantité de spermatozoïdes sur la quantité totale de la laitance [%].

e. Intégrité membranaire des spermatozoïdes

Le test de viabilité du sperme consiste en une première dilution 100 fois (1 µl de sperme mélangé à 99 µl de tampon) dont on prélève 10µl que l'on mélange dans 90 µl de colorant, le Trypan bleu 0,4%. Au final, c'est une dilution 1 :1000 qui est réalisée. Une lamelle est placée sur la cellule de comptage (cellule de Thomas, lame Marienfeld superior Germany, 0,0025mm² et 0,1mm de profondeur). Dix µl de ce mélange sont pipetés et injectés sur la cellule de Thomas. Le fluide pénètre par capillarité. On laisse reposer quelques minutes pour la stabilisation du liquide. Le Trypan bleu colore les cellules spermatiques endommagées, les cellules intactes restent blanches.

Calcul de la viabilité des spermatozoïdes:

Cela correspond au pourcentage de spermatozoïdes intacts. C'est le rapport entre le nombre de spermatozoïdes blancs, c'est-à-dire intacts, sur le nombre total de spermatozoïdes dénombrés, multiplié par cent. La mesure a été réalisée en duplicat.

Calcul de la densité du sperme :

L'aire centrale de comptage de la cellule de Thomas contient 25 carreaux. Chacun de ces 25 grands carrés contient 16 carrés de plus petites tailles. Parmi les 25 grands cadres, cinq d'entre eux sont pris en compte. Pour éviter de compter plusieurs fois les mêmes spermatozoïdes, on prend seulement en compte ceux se trouvant sur deux lignes aux extrémités d'un grand carré. On multiplie le nombre de cellules spermatiques obtenues par 5 afin de prendre en compte la totalité de la chambre de comptage. Le volume de l'aire centrale de comptage mesure 0,1mm³ ou 0,1 µl. On multiplie le nombre moyen de cellules spermatiques par 10 000 pour obtenir le nombre de spermatozoïdes par ml de l'échantillon dilué. Ensuite, on multiplie le résultat obtenu par le facteur de dilution. Deux chambres de comptage sont réalisées pour chaque échantillon de sperme.

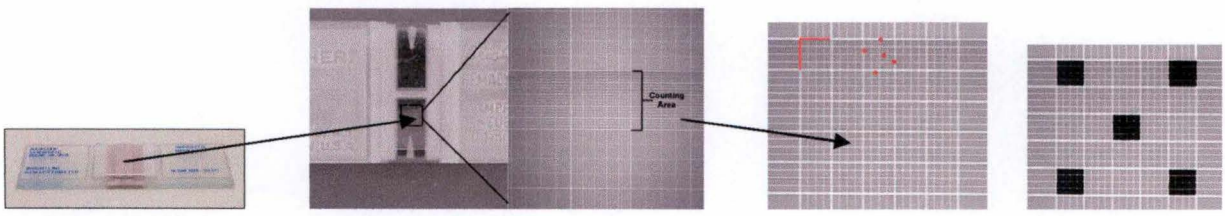


Figure 6 : Illustrations de la cellule de Thomas provenant du site Internet :
http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html

5. Dosage des stéroïdes sexuels : Testostérone, Estradiol, 11 Keto-testostérone par Radio Immuno Assay (RIA)

La méthode indirecte du dosage de la vitellogénine, « l'alkali labile phosphate assay », dose les phosphates relâchés par cette protéine soumise à un traitement alcalin.

➢ Les prélèvements

Le sang est prélevé et stocké avec de l'anticoagulant, du citrate de sodium (1g/10ml de plasma). Une centrifugation à 4 000 rpm durant 20 min est réalisée, le plasma sanguin est récolté et conservé à -20°C.

Photo 7 : Obtention du plasma sanguin et du plasma séminal après centrifugation.

➢ Phase d'extraction

Un volume de 50 µl de plasma sanguin en duplicat est mélangé avec 1 ml de cyclohexane-éthylacétate, vortexé durant 1 minute puis congelé à -20°C durant au moins une heure. Le surnageant est prélevé et l'opération est répétée une seconde fois. L'addition des deux surnageants est alors centrifugée sous vide jusqu'à évaporation totale.

➢ Phase de compétition - incubation

Principe :

Un anticorps spécifique (cfr laboratoire d'hormonologie de Marloie, CER) de l'hormone cible est ajouté dans les échantillons et la courbe standard. La compétition est réalisée par l'addition d'une hormone radioactive (Amersham) dans la solution et, après activation à 35-37°C, un équilibre s'établit entre les deux complexes et l'hormone radioactive libre dans la solution.

Manipulations :

Une courbe standard est réalisée pour chaque stéroïde avec des concentrations croissantes de l'hormone pure cible selon le tableau suivant :
Solution mère (M): 100µg/ml dans éthanol absolu à -20°C
Solution A: 100µl de M porté à volume 10ml avec du TPG
Solution B: 1 ml de A porté à volume 10ml avec du TPG
Solution C: 1 ml de B porté à volume 10ml avec du TPG
Solution D: 1 ml de C porté à volume 10ml avec du TPG

Tableau 19 : Volumes des différentes solutions pour la réalisation de la courbe standard

Dose [pg]	Volume TPG [µl]	Volume de la solution B [µl]	Volume de la solution C [µl]	Volume de la solution D [µl]
3000	700	300	-	-
1800	820	180	-	-
1100	890	110	-	-
650	350	-	650	-
400	600	-	400	-
250	750	-	250	-
150	850	-	150	-
90	100	-	-	900
55	450	-	-	550
35	650	-	-	350
20	800	-	-	200
12	880	-	-	120
8	920	-	-	80
5	950	-	-	50
0	1000	-	-	-

Un volume de 300µl de TPG (1g de gélatine par litre de tampon phosphate pH 7,25) est ajouté dans les échantillons extraits, le tout est vortexé. Un volume de 100µl est pipeté en duplicat de chaque échantillon et point de la courbe standard. Dans tous les tubes des échantillons et de la courbe standard, 100µl d'anticorps puis 100µl de traceur (H*), c'est-à-dire l'hormone radioactive marquée au ^{3}H, sont ajoutés. Le mélange est vortexé et incubé à 37°C pendant une heure puis à 4°C pendant 2h. Deux ml de polyéthylène glycol (PEG) 25% sont additionnés puis la solution incube une nuit (12h) à 4°C. Centrifugation à 3200g (4200t/mn) pendant 30 min à 10°C. Elimination du surnageant par retournement des tubes et ajout de 2 ml de PEG 25%. Nouvelle centrifugation à 3200g pendant 20min à 10°C et le surnageant est éliminé par retournement puis éventuellement par aspiration pour nettoyer le culot. Reprendre par 100µl d'éthanol absolu et agiter. Ajouter 2 à 2,5 ml de liquide scintillant, boucher les tubes et agiter vigoureusement pendant une minute. Les tubes sont passés au compteur à scintillation (BECKMAN LS 6000IC), un compteur β pour le ^{3}H, qui mesure la radioactivité émise par chacun des tubes [cpm]. Un système de calcul permet de transformer les valeurs, exprimées en cpm, en valeurs exprimées en pg/tube. Deux tubes supplémentaires sont préparés afin de mesurer la radioactivité résiduelle (200µl TPG et 100µl H*) et la radioactivité totale (100 µl H*).

6. Dosage de l'ALP (Alkali-labile phosphate assay)

Du trichloroacétate (TCA) 20% est préparé. Un volume de 30 µl de plasma sanguin en duplicat est dégelé et déposé dans des eppendorfs préalablement numérotés. Les protéines contenues dans le plasma sanguin sont précipitées avec 1 ml de TCA 20%. On vortex et on laisse reposer à température ambiante durant 15 minutes. Une centrifugation à 4°C, 3300 rpm durant 10 minutes est réalisée. Le surnageant est soustrait et le culot est nettoyé avec 1 ml de différents solvants afin d'enlever la fraction lipidique. Ces solvants sont dans l'ordre :

- de l'éthanol: laisser reposer 10 min dans un bain à 60°C
- un mélange: chloroforme – diéthyléther – éthanol (1 :2 :2): laisser reposer 5 minutes à température ambiante
- de l'acétone: laisser reposer 5 minutes à température ambiante
- du diéthyléther: laisser reposer 5 minutes à température ambiante

Après chaque addition de ces solvants, les échantillons sont vortexés puis centrifugés à 4°C, 8000 rpm durant 2 minutes. Le surnageant est soustrait après chaque centrifugation.
On laisse les échantillons s'évaporer sous une hotte durant 1 heure. Un volume de 500 µl de NaOH 2N est ajouté dans chaque échantillon que l'on place dans un bain marie de 100°C durant 15 min. On laisse refroidir les échantillons puis on leur ajoute 500 µl de HCL 2N.

Le dosage est réalisé selon le tableau suivant :

	Echantillons	Standard phosphore	Eau distillée	Heptate molybdate d'ammonium	Reducer	Volume total
Echantillon	400	-	400	200	50	1050
Standard						
Blanc	-	-	800	200	50	1050
0,2 µg/ml	-	10	790	200	50	1050
0,5 µg/ml	-	25	775	200	50	1050
1 µg/ml	-	50	750	200	50	1050
2 µg/ml	-	100	700	200	50	1050
4 µg/ml	-	200	600	200	50	1050
6 µg/ml	-	300	500	200	50	1050

L'absorbance est mesurée à 660 ηm après 10 minutes de mise en contact des différents réactifs. Deux corrections sont apportées aux calculs, la concentration de l'échantillon est multipliée par 87,5 (1000/30µl x 1050/400 µl) afin d'obtenir le nombre de µg d'ALP par ml de plasma.

7. Analyse Statistique

L'analyse statistique a été réalisée selon les méthodes standard de l'analyse de variance à un critère (ANOVA 1), l'effet du régime, en utilisant les programmes informatiques du logiciel Statistica® et le dossier à disposition des étudiants sur le site du Webcampus. Une vérification préalable de la normalité des données a été effectuée. Un test de Bartlett a permis de tester l'homogénéité des variances. Lorsque celle-ci n'est pas observée, une transformation logarithmique est réalisée. Lorsque l'homoscédasticité n'est toujours pas obtenue, un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis est effectué sur les données. Quand l'analyse de variances, (ANOVA 1), a conduit à un rejet de l'égalité des moyennes, c'est-à-dire lorsqu'une différence est observée entre les quatre régimes, un test LSD de Fisher ou test de la plus petite différence significative entre les moyennes a été effectué. Les différences sont considérées significatives lorsque le seuil de probabilité P est inférieur à 0,05.

Présentation des résultats

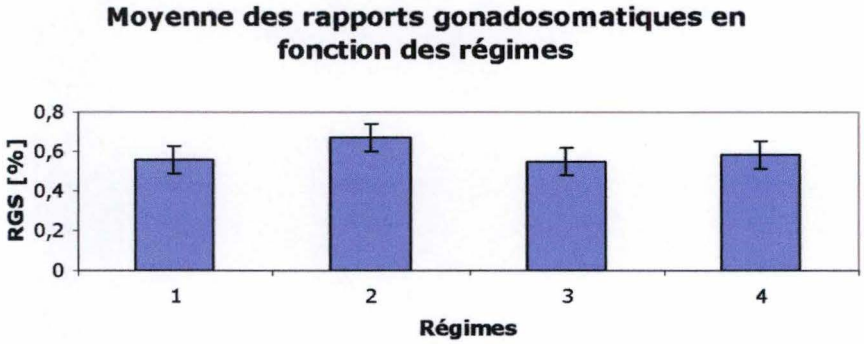
Présentation des résultats

1. Etat général des poissons

Les poissons-chats africains *Clarias gariepinus* âgés de deux ans, mâles et femelles confondus, présentent un poids moyen en début d'expérience variant de 383 g pour le régime 3 à 457 g pour le régime 4. Aucun cas de mortalité ou d'anomalie dans l'état morphologique général des poissons n'a été constaté tout au long de l'expérience. Pour rappel, les pourcentages de farine de poisson dans les différents régimes sont pour le régime 1 de 50%, le régime 2 de 25,7%, le régime 3 de 12,5% et enfin le régime 4 de 0%.
Pour chacun des régimes, douze plus gros mâles ont été choisis, leur poids moyen allant de 490 g pour le régime 3 à 577 g pour le régime 4. L'analyse des variances (ANOVA 1) ne montre aucun effet du régime sur les poids moyens des poissons ($P>0,05$).
La période d'échantillonnage s'est déroulée du 28 mars au 2 mai inclus, période durant laquelle les mâles ont été disséqués pour la collecte de leurs gonades et la récolte de la laitance. Parmi les douze mâles sélectionnés par régime, un poisson sans gonade a été observé pour le régime 1 et un poisson avec des testicules au développement anormal a été constaté pour les régimes 2 et 3. Ces poissons n'ont pas été pris en compte dans les diverses analyses présentées.

2. Rapports gonadosomatiques

Les rapports gonadosomatiques sont calculés à partir du poids du poisson avant dissection. Ils varient de 0,55 % pour le régime 3 à 0,67 % pour le régime 2. L'analyse statistique (ANOVA 1) ne révèle aucune influence des régimes sur les rapports gonadosomatiques moyens des poissons ($P>0,05$). En considérant les valeurs individuelles de chaque poisson, le RGS minimum est de 0,39 % (R1) et le RGS maximum observé est de 0,98 % (R2).



R1: 0,56% ± 0,11 où n = 11
R2: 0,67% ± 0,14 où n = 11
R3: 0,55% ± 0,11 où n = 11
R4: 0,58% ± 0,09 où n = 12

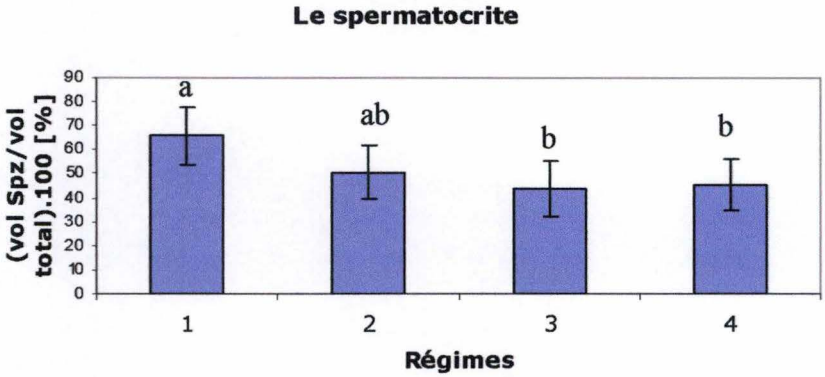
(R pour régime et n pour le nombre d'individus).

Graphe 1 : Moyenne des rapports gonadosomatiques [%] en fonction des régimes. Les barres représentent les écarts-types.

3. Spermatocrite et densité du sperme

Les valeurs moyennes de spermatocrite passent de 43 % pour le régime 3 à 65 % pour le régime 1. L'analyse statistique (ANOVA 1) montre une différence significative du spermatocrite entre les régimes ($P< 0,05$). Le test LSD de Fisher a pu mettre en évidence les régimes présentant des différences de moyenne entre eux. Il s'agit du régime 1 qui présente

une valeur moyenne de spermatocrite (65,7%) significativement supérieure à celles des régimes 3 (43,7%) et 4 (45,7%).

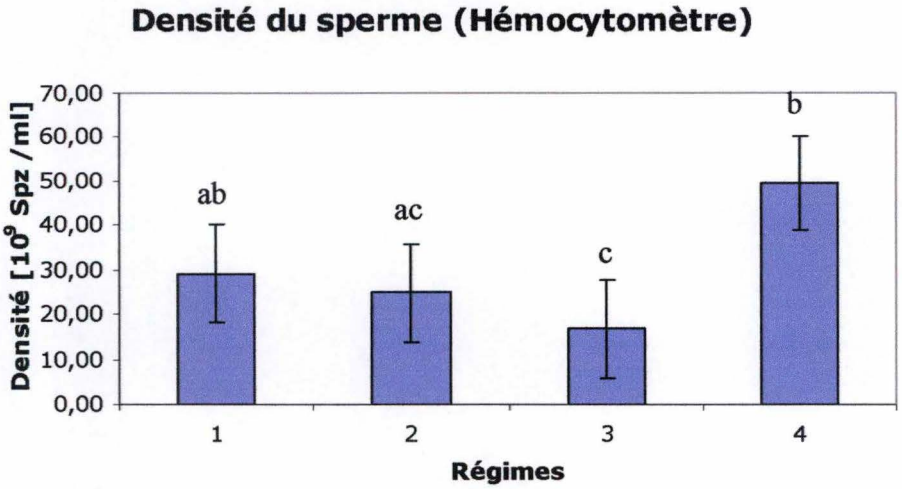


R1: 65,72% ± 21,74 où n = 10
R2: 50,57% ± 21,63 où n = 11
R3: 43,71% ± 11,17 où n = 11
R4: 45,73% ± 17,55 où n = 12

(R pour régime et n pour le nombre d'individus).

Graphe 2 : La valeur moyenne de spermatocrite [%] en fonction des régimes. Les lettres, situées au-dessus des barres représentant les écarts-types, correspondent aux différences significatives observées d'après le test LSD entre les différents régimes.

La densité du sperme mesurée via l'hémocytomètre ou cellule de Thomas présente des valeurs moyennes allant de $16{,}9.10^9$ Spz/ml pour le régime 3 à $49{,}5.10^9$ Spz/ml pour le régime 4. L'analyse statistique (ANOVA 1) a pu être effectuée après transformation logarithmique des données. L'ANOVA 1 pose un seuil de probabilité $P<0{,}01$, autrement dit, une différence très significative entre les régimes. Le test LSD démontre que le régime 4 est supérieur aux régimes 2 et 3 de manière hautement significative ($P<0{,}001$) mais n'est pas significativement supérieur au régime 1.



R1: 29,1 ± 15,0 x10^9Spz/ml où n=11
R2: 20,5 ± 11,3 x10^9Spz/ml où n=11
R3: 16,9 ± 86,7 x10^9Spz/ml où n=11
R4: 49,5 ± 27,7 x10^9Spz/ml où n=12

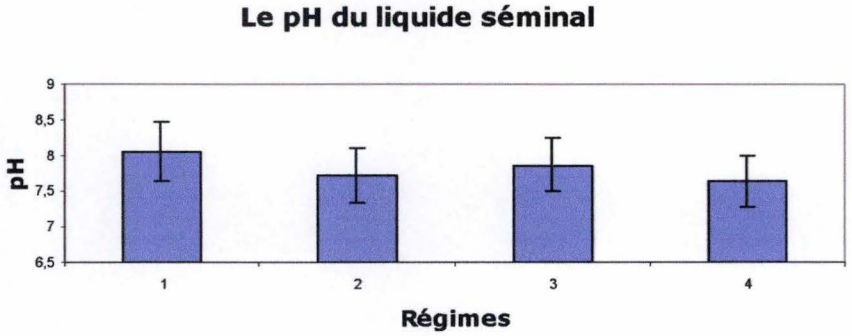
(R pour régime et n pour le nombre d'individus).

Graphe 3 : Densité moyenne du sperme [Spz/ml] mesurée via un hémocytomètre. Les lettres, situées au-dessus des barres représentant les écarts-types, correspondent aux différences significatives observées d'après le test LSD entre les différents régimes.

4. Le pH du liquide séminal

Le pH du liquide séminal des Clarias varie dans une gamme de pH assez étroite, de l'ordre de 7,6 pour le régime 4 (0% de farine de poisson) à 8 pour le régime 1 (50% de farine de

poisson). Malgré une transformation logarithmique des valeurs de pH, l'hétérogénéité des variances persiste et empêche une analyse statistique de type ANOVA. Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a donc été réalisé sur les données mais aucune différence entre les quatre régimes n'a pu être établie.



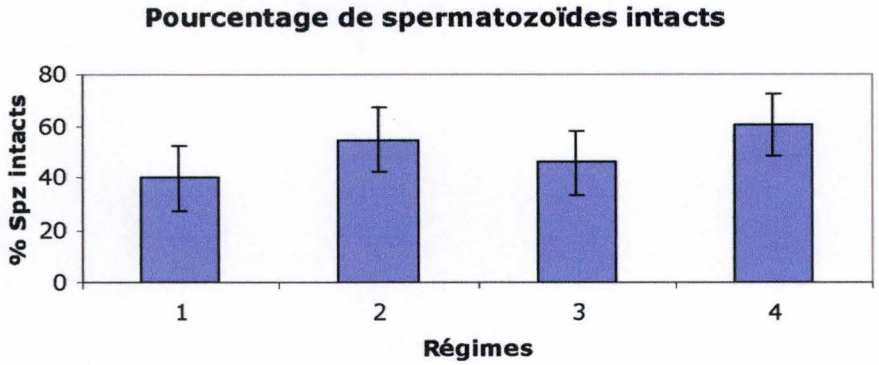
R1: 8,05 ± 1,13 où n = 9
R2: 7,72 ± 0,53 où n = 10
R3: 7,87 ± 0,34 où n = 11
R4: 7,64 ± 0,28 où n = 12

(R pour régime et n pour le nombre d'individus).

Graphe 4 : Les valeurs moyennes de pH du liquide séminal en fonction du régime. Les barres représentent les écarts-types.

5. Intégrité membranaire des spermatozoïdes

Le pourcentage moyen de spermatozoïdes à la membrane cellulaire intacte oscille entre 39,9 % pour le régime 1 et 60 % pour le régime 4. Aucune influence des régimes n'a pu être mise en évidence sur ce paramètre. L'ANOVA 1 donne un seuil de probabilité P>0,05 et les écarts-types sont grands, de l'ordre de 20%.

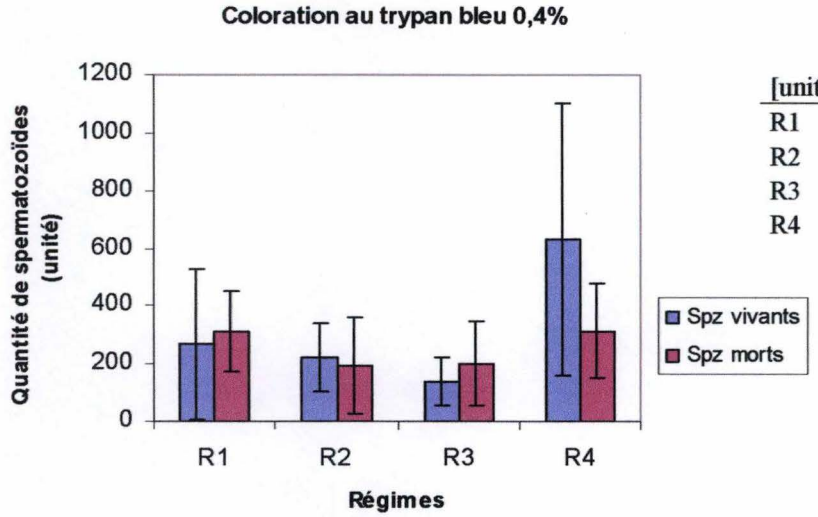


R1: 39,90% ± 25,94 où n = 11
R2: 54,50% ± 14,23 où n = 11
R3: 45,73% ± 20,56 où n = 11
R4: 60,37% ± 19,35 où n = 12

(R pour régime et n pour le nombre d'individus)).

Graphe 5 : Pourcentage moyen de spermatozoïdes à la membrane cellulaire intacte [%] en fonction du régime. Les barres représentent les écarts-types.

Un graphe complémentaire (graphe 6) est présenté afin de visualiser différemment le nombre de spermatozoïdes à la membrane intacte ou non en fonction du régime. Les spermatozoïdes ayant une membrane cellulaire endommagée et donc colorée par le trypan bleu sont considérés comme morts. Cette représentation permet de mettre en évidence un nombre bien plus important de spermatozoïdes comptés dans l'hémocytomètre pour le régime 4 dépourvu en farine de poisson. Néanmoins, comme déjà citée précédemment, l'analyse statistique (ANOVA 1) ne montre aucune différence significative entre les régimes (P>0,05).



[unité]	Spz vivants	Spz morts
R1	269,36 ± 259,05	312,04 ± 142,01
R2	218,59 ± 117,89	191,59 ± 166,63
R3	137,86 ± 84,86	200 ± 146,05
R4	630,45 ± 470,33	315,08 ± 165,32

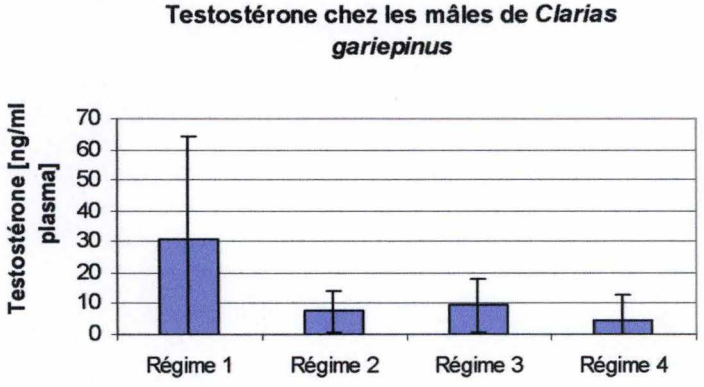
Graphe 6 : Ce graphe est un complément du graphe 5, il représente le nombre moyen de spermatozoïdes vivants et morts en fonction des régimes [unité]. Les barres représentent les écarts-types.

6. Dosage des stéroïdes sexuels

Afin d'évaluer l'état hormonal de nos poissons, les stéroïdes sexuels ont été dosés sur les plasmas sanguins prélevés chaque fois avant dissection des poissons au cours de l'expérience. Au total, douze échantillons par régime ont été collectés mais les plasmas sanguins appartenant aux poissons dépourvus de testicules ou ayant des gonades immatures ou anormalement formées ont été écartés afin de ne pas influencer les résultats.

➢ Testostérone

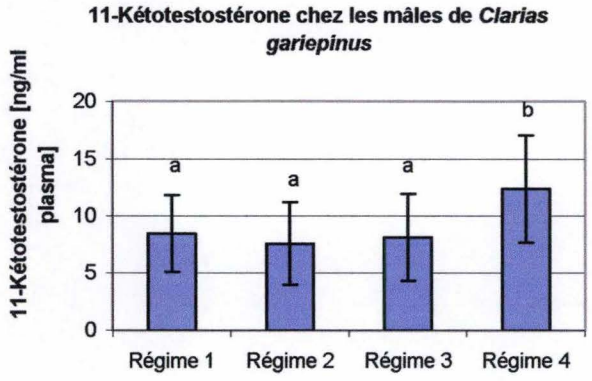
Les concentrations moyennes en testostérone varient de 4,7 ηg/ml plasma pour le régime 4 (dépourvu en farine de poisson) à 31 ηg/ml plasma pour le régime 1 (contenant 50% de farine de poisson). Les écarts-types sont très élevés et malgré une transformation logarithmique, l'hétérogénéité de variances persiste. Un test de Kruskal-Wallis a été effectué sur ces données mais n'a mis en évidence aucune différence entre les quatre régimes.



Graphe 7: Concentrations en testostérone [ηg/ml plasma] dans les plasmas sanguins des mâles de *Clarias gariepinus*. Les barres représentent les écarts-types.

➢ 11-kétotestostérone

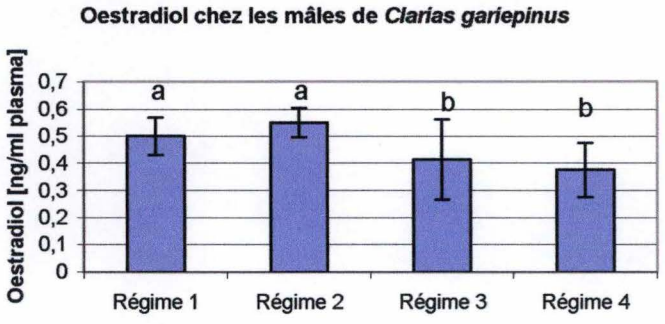
Les teneurs moyennes en 11-KT varient de 7,5 ηg/ml plasma pour le régime 2 à 12 ηg/ml plasma pour le régime 4. L'analyse statistique (ANOVA 1) montre une différence significative ($P<0,05$) entre les régimes. Un test LSD met en évidence que le taux de 11KT dans le plasma sanguin des poissons nourris avec le régime 4 dépourvu en farine de poisson est significativement plus élevé que ceux des régimes 1 et 3 ($P<0,05$) et très significativement plus élevé que celui du régime 2 ($P<0,01$).



Graphe 8: Concentrations en 11-kétotestostérone [ηg/ml plasma] dans les plasmas sanguins des mâles de *Clarias gariepinus*. Les lettres, situées au-dessus des barres représentant les écarts-types, correspondent aux différences significatives observées d'après le test LSD entre les différents régimes.

➢ Oestradiol

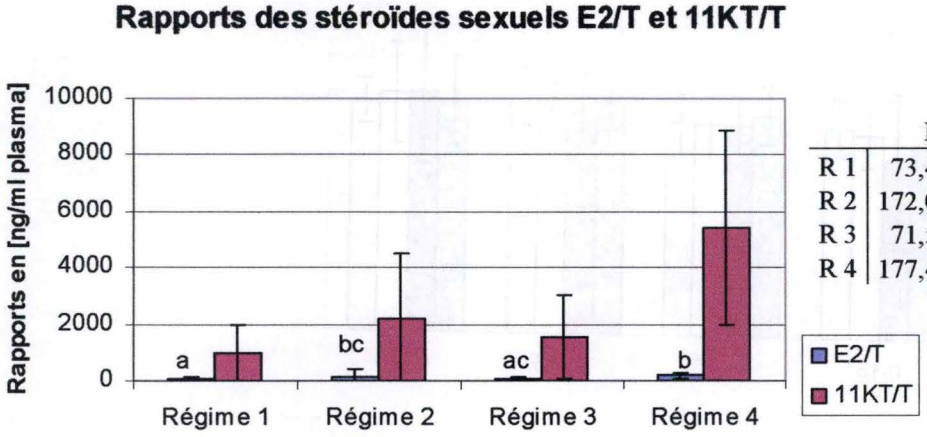
Les concentrations moyennes en oestradiol s'étalent de 0,37 ηg/ml plasma pour le régime 4 à 0,55 ηg/ml plasma pour le régime 2. Il ressort de l'analyse statistique (ANOVA 1) que la concentration en oestradiol est significativement plus élevée dans les plasmas sanguins des poissons nourris avec les régimes 1 et 2 contenant plus de farine de poisson que les régimes 3 et 4 ($P<0,05$).



Graphe 9: Concentrations en oestradiol [ηg/ml plasma] dans les plasmas sanguins des mâles de *Clarias gariepinus*. Les lettres, situées au-dessus des barres représentant les écarts-types, correspondent aux différences significatives observées d'après le test LSD entre les différents régimes.

➢ Rapports E2/T et 11-KT/T

Le rapport en stéroïdes sexuels E_2/T varie de 71,5 pour le régime 3 à 177,4 ηg /ml plasma pour le régime 4 et pour le rapport 11KT/T, de 974,7 pour le régime 1 à 5396,8 ηg /ml plasma pour le régime 4. Il ressort de l'analyse statistique (ANOVA 1) que le rapport des concentrations en E_2 et T est très significativement supérieur ($P<0,01$) pour le régime 4 par rapport au régime 1. Pour le rapport de la 11-KT sur la T, l'hétérogénéité des variances est élevée et le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis n'a rien pu mettre en évidence.



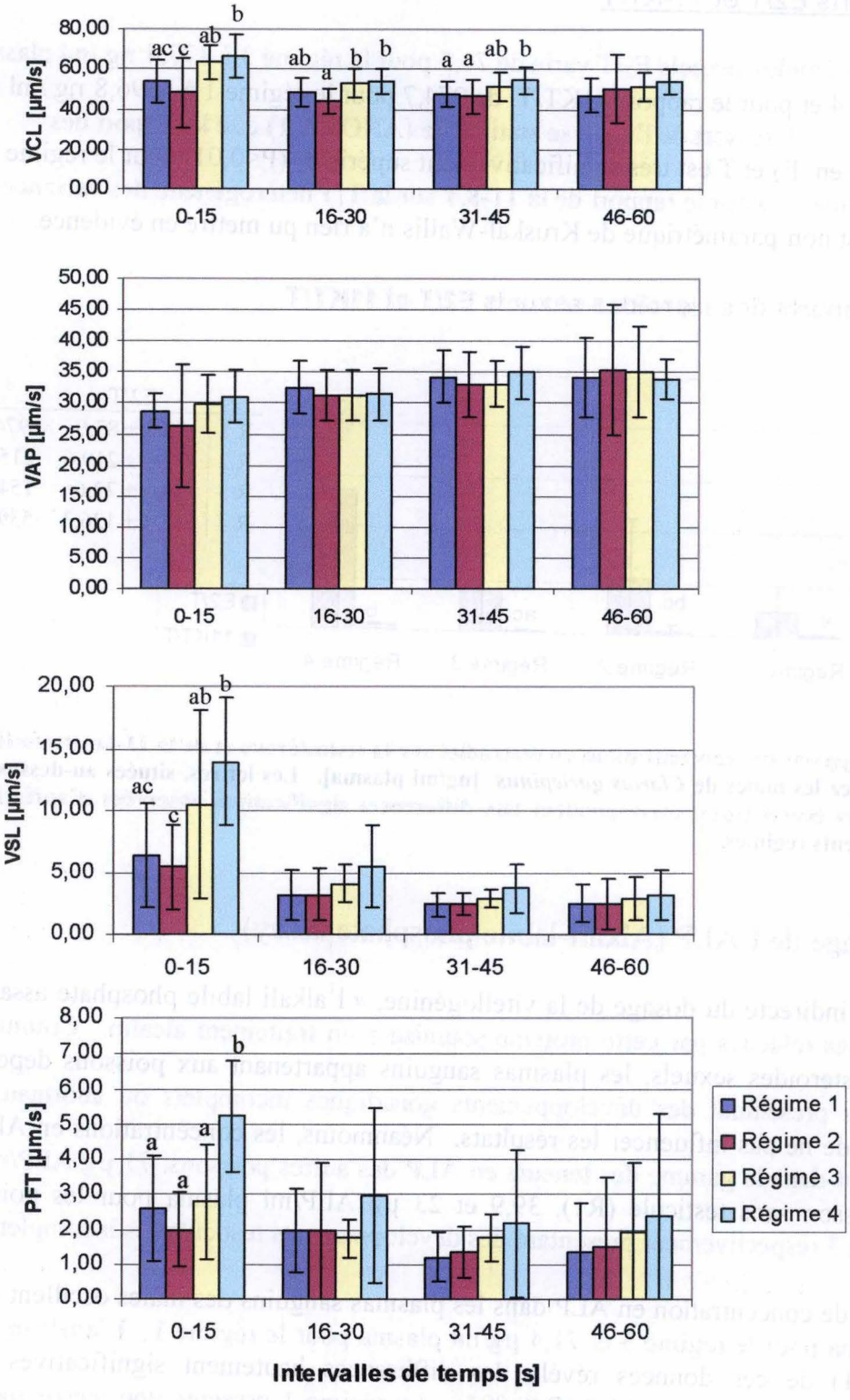
	E2/T	11KT/T
R 1	73,4 ± 83,0	974,7 ± 1011,0
R 2	172,0 ± 219,6	2152,2 ± 2354,5
R 3	71,5 ± 72,6	1543,9 ± 1490,1
R 4	177,4 ± 126,3	5396,8 ± 3441,4

Graphe 10: Rapports des concentrations en oestradiol sur la testostérone et de la 11-kétotestostérone sur la testostérone chez les mâles de *Clarias gariepinus* [ng/ml plasma]. Les lettres, situées au-dessus des barres représentant les écarts-types, correspondent aux différences significatives observées d'après le test LSD entre les différents régimes.

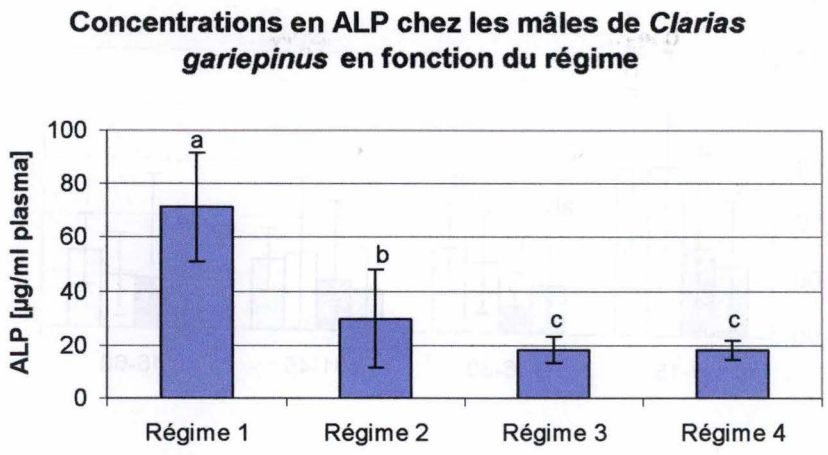
7. Dosage de l'ALP (Alkali-labile phosphate assay)

La méthode indirecte du dosage de la vitellogénine, « l'alkali labile phosphate assay », dose les phosphates relâchés par cette protéine soumise à un traitement alcalin. Comme pour le dosage des stéroïdes sexuels, les plasmas sanguins appartenant aux poissons dépourvus de testicules ou présentant des développements gonadiques incomplets ou anormaux ont été écartés afin de ne pas influencer les résultats. Néanmoins, les concentrations en ALP de ces poissons sont dans la gamme des teneurs en ALP des autres poissons: 71 µg ALP/ml plasma pour le poisson sans testicule (R1), 39,9 et 23 µg ALP/ml plasma pour les poissons des régimes 2 et 3 respectivement présentant des développements testiculaires incomplets.

Les valeurs de concentration en ALP dans les plasmas sanguins des mâles oscillent entre 18,2 µg/ml plasma pour le régime 3 et 71,4 µg/ml plasma pour le régime 1. L'analyse statistique (ANOVA 1) de ces données révèle des différences hautement significatives entre les concentrations moyennes en ALP ($P<0,001$). Le régime 1 présente une teneur moyenne en ALP hautement plus élevée que les teneurs des trois autres régimes et la teneur correspondant au régime 2 est significativement plus grande que celle des régimes 3 et 4 ($P<0,05$).



Graphe 12: Paramètres de motilité des spermatozoïdes de *Clarias gariepinus* mesurés par le système CASA sur quatre intervalles de temps : de 0 à 15s ; de 16 à 30s ; de 31 à 45s et de 46 à 60s. Vitesse curvilinéaire (VCL) [µm/s], vitesse angulaire (VAP) [µm/s], vitesse linéaire (VSL) [µm/s] et la variation de la vitesse linéaire (PFT) [µm/s] sont comparées pour les quatre régimes expérimentaux. Les lettres, situées au-dessus des barres représentant les écarts-types, correspondent aux différences significatives observées d'après le test LSD entre les différents régimes. Les intervalles de temps ne sont pas comparés entre eux.



Graphe 11: Concentrations en ALP [µg/ml plasma] chez les mâles de *Clarias gariepinus* en fonction du régime. Les lettres, situées au-dessus des barres représentant les écarts-types, correspondent aux différences significatives observées d'après le test LSD entre les différents régimes.

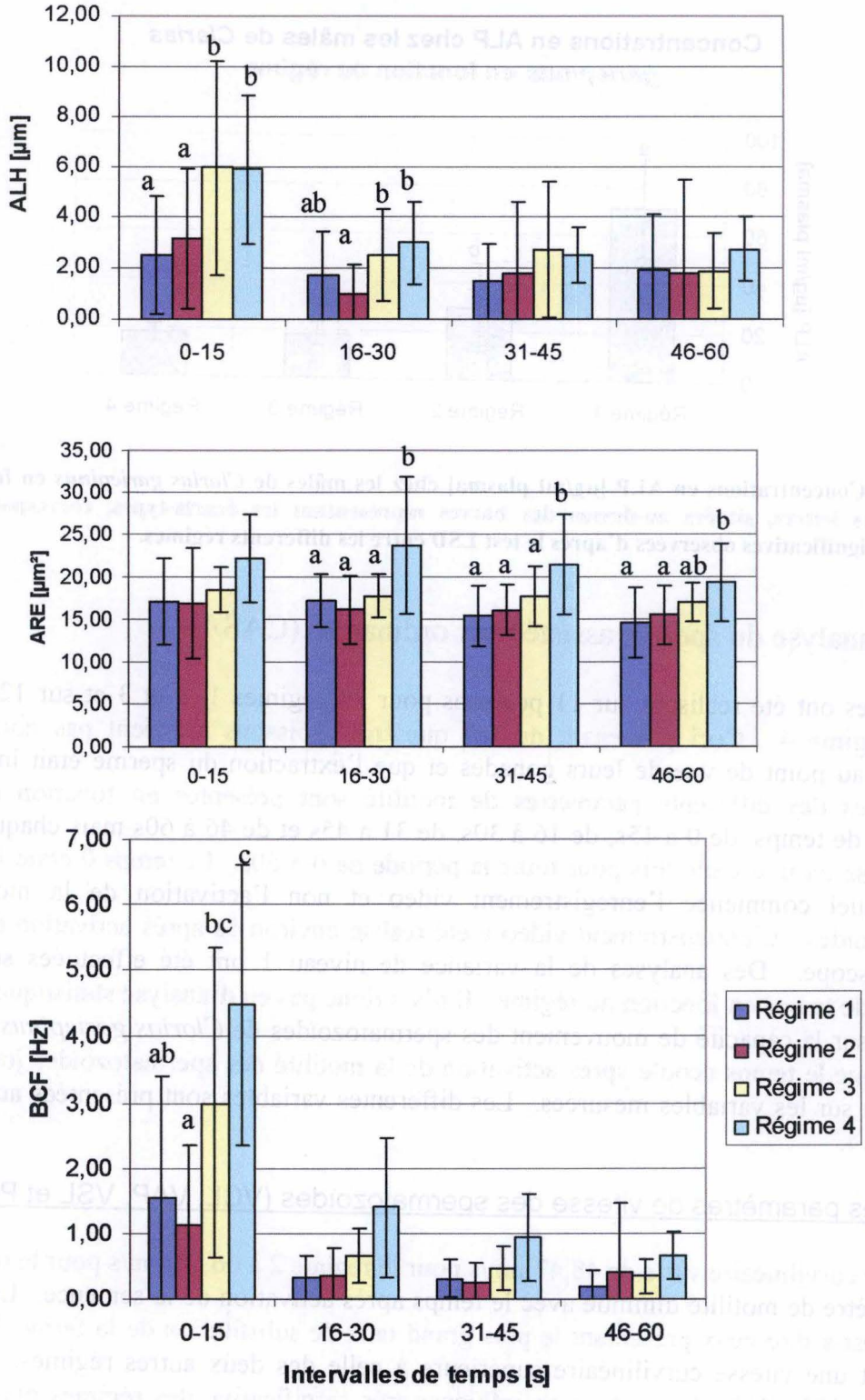
8. L'analyse du sperme assistée par ordinateur (CASA)

Les mesures ont été réalisées sur 11 poissons pour les régimes 1, 2 et 3 et sur 12 poissons pour le régime 4. Ceci provenant du fait que trois poissons n'étaient pas normalement constitués au point de vue de leurs gonades et que l'extraction du sperme était impossible. Les graphes des différents paramètres de motilité sont présentés en fonction de quatre intervalles de temps: de 0 à 15s, de 16 à 30s, de 31 à 45s et de 46 à 60s mais chaque mesure n'a été prise qu'une seule fois pour toute la période de 0 à 60s. Le temps 0 étant le temps à partir duquel commence l'enregistrement vidéo et non l'activation de la motilité des spermatozoïdes. L'enregistrement vidéo a été réalisé environ 5s après activation du sperme sur microscope. Des analyses de la variance de niveau 1 ont été effectuées sur chaque intervalle de temps en fonction du régime. Il n'y a donc pas eu d'analyse statistique de l'effet du temps sur la capacité de mouvement des spermatozoïdes de *Clarias gariepinus*. On sait, en effet, que le temps écoulé après activation de la motilité des spermatozoïdes joue un rôle primordial sur les variables mesurées. Les différentes variables sont présentées aux graphes 12, 13 et 14.

➢ Les paramètres de vitesse des spermatozoïdes (VCL, VAP, VSL et PFT)

La vitesse curvilinéaire varie de 48,47 µm/s pour le régime 2 à 66,64 µm/s pour le régime 4. Ce paramètre de motilité diminue avec le temps après activation de la semence. Les régimes 3 et 4, c'est-à-dire ceux présentant le plus grand taux de substitution de la farine de poisson, présentent une vitesse curvilinéaire supérieure à celle des deux autres régimes. L'analyse statistique, (ANOVA 1), montre une influence très significative des régimes pour les deux premiers intervalles de temps ($P<0,01$) et une influence significative des régimes pour l'intervalle de temps de 31 à 45s ($P<0,05$) sur la vitesse curvilinéaire des spermatozoïdes. Pour le dernier intervalle de temps, après une transformation logarithmique afin d'homogénéiser les variances, aucune différence significative n'a été mise en évidence.

La vitesse angulaire ne diminue pas en fonction du temps, bien au contraire, elle a tendance à augmenter. Aucune valeur ne s'écarte pour un régime par rapport aux autres. Elle varie entre



Graphe 13: Paramètres de motilité des spermatozoïdes de *Clarias gariepinus* mesurés par le système CASA sur quatre intervalles de temps : de 0 à 15s ; de 16 à 30s ; de 31 à 45s et de 46 à 60s. L'amplitude du déplacement latéral de la tête du spermatozoïde (ALH) [µm], la morphométrie de la tête du spermatozoïde (ARE) [µm²] et la fréquence des battements croisés (BCF) [Hz] sont comparées pour les quatre régimes expérimentaux. Les lettres, situées au-dessus des barres représentant les écarts-types, correspondent aux différences significatives observées d'après le test LSD entre les différents régimes. Les intervalles de temps ne sont pas comparés entre eux.

26,3 µm/s pour le régime 2 et 31,1 µm/s pour le régime 4. Aucune différence n'a pu être mise en évidence de manière statistique. La variance de ces résultats est assez élevée. Le test non paramètrique de Kruskal-Wallis a été réalisé pour les intervalles de temps de 0 à 15s et de 46 à 60s mais n'a pas permis de mettre une différence de vitesse angulaire en évidence. Pour les deux autres périodes de temps, l'ANOVA 1 n'a décelé aucune différence entre les moyennes des quatre régimes expérimentaux.

La vitesse linéaire présente une gamme de valeurs moyennes allant de 5,43 µm/s pour le régime 2 à 13, 96 µm/s pour le régime 4 et diminue fortement en fonction du temps après activation de la motilité des spermatozoïdes. Dès l'intervalle de temps de 16 à 30s, elle est fortement réduite et ne présente plus aucune différence significative entre les régimes. Pour ce qui est de la période de 0 à 15s, la vitesse linéaire du régime 4 est statistiquement (ANOVA 1) plus élevée que celle des régimes 1 ($P<0,01$) et 2 ($P< 0,001$) mais n'est pas supérieure de manière significative au régime 3.

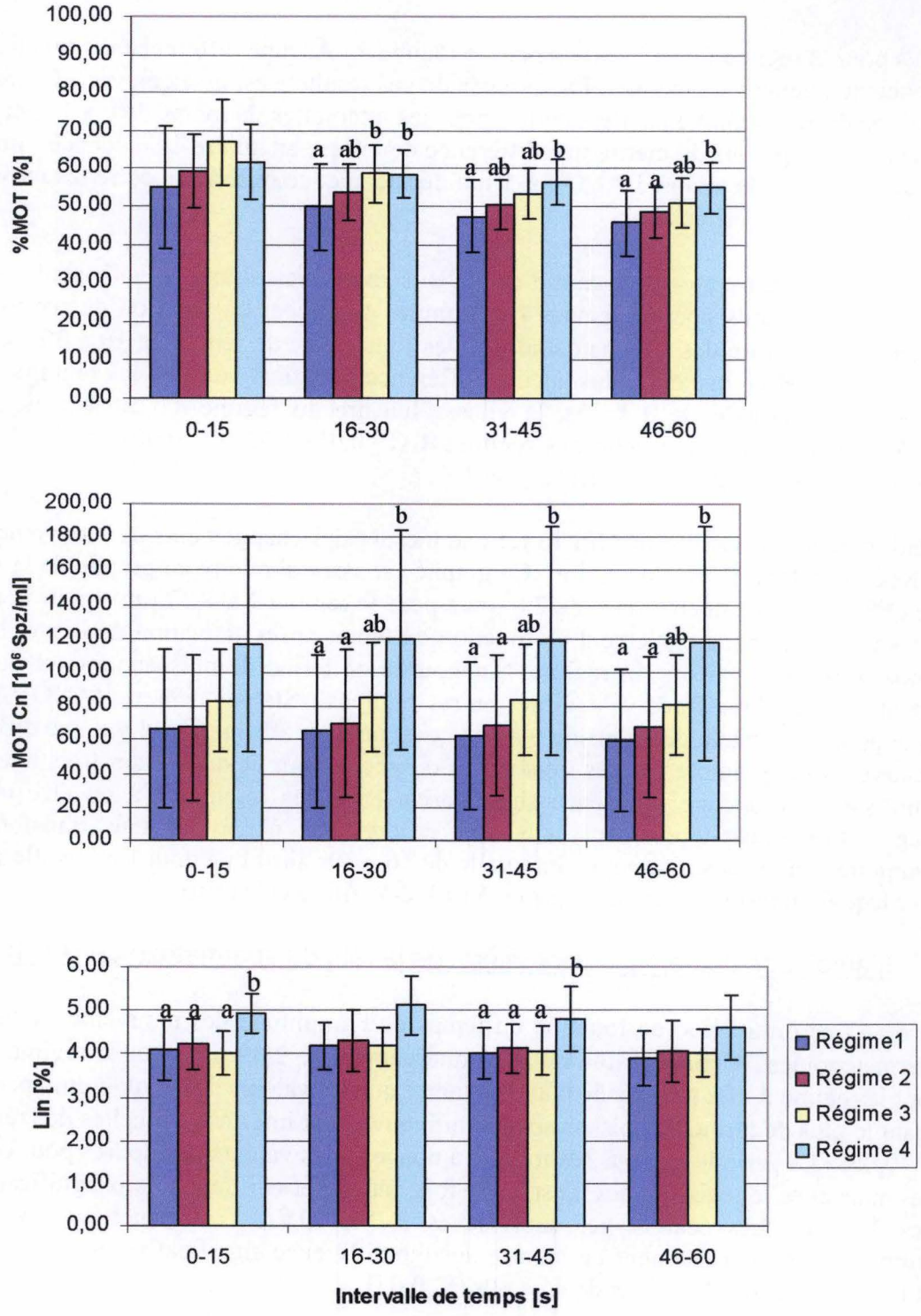
La variation de la vitesse linéaire (PFT) est une mesure des changements de mouvements du spermatozoïde le long de sa trajectoire. Ce graphe est assez similaire au graphe de la vitesse linéaire (VSL). Ce paramètre varie de 2,0 µm/s pour le régime 2 à 5,22 µm/s pour le régime 4. Ce paramètre diminue également en fonction du temps après activation de la motilité des spermatozoïdes. Les valeurs du régime 4, dépourvu en farine de poisson, sortent du lot et s'affichent bien au-dessus des valeurs des autres régimes. Statistiquement, (ANOVA 1), il n'y a que pour l'intervalle de temps de 0 à 15s que l'on peut affirmer qu'il y a une différence significative entre le régime 4 et les trois autres régimes. Pour ce qui est des trois intervalles de temps suivants, aucune différence significative entre les régimes n'a pu être mise en évidence. Les écarts-types sont une fois encore très élevés et une transformation logarithmique a été nécessaire pour l'intervalle de 16 à 30s ainsi que pour l'intervalle de 31 à 45s pour lequel un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été réalisé.

- L'amplitude du déplacement latéral de la tête du spermatozoïde (ALH)

On observe une diminution en fonction du temps de l'amplitude des mouvements de la tête des spermatozoïdes. Cette variable est dans une gamme de 2,49 µm pour le régime 1 à 5,9 µm pour le régime 3. La période de 0 à 15s montre que les valeurs des deux premiers régimes contenant le plus de farine de poisson sont significativement inférieures à celles des régimes 3 et 4 ($P<0,05$). La période de 16 à 30s montre à nouveau des valeurs inférieures pour ces deux régimes mais avec le régime 2 qui n'est, cette fois, plus inférieur de manière significative aux régimes 3 et 4. Les écarts-types sont élevés et l'ANOVA 1 effectuée sur les valeurs transformées logarithmiquement ne montre aucune différence significative entre les régimes durant les périodes de 30 à 45s et de 46 à 60s ($P>0,05$).

- L'aire de la tête du spermatozoïde (ARE)

Pour les quatre intervalles de temps, les valeurs moyennes du régime 4 sont les plus grandes. Les valeurs moyennes des trois autres régimes sont assez proches entre elles. L'aire de la tête spermatique varie entre 16,87 µm² pour le régime 2 et 22, 18 µm² pour le régime 4. L'analyse statistique (ANOVA 1) confirme ces observations pour les intervalles de temps de 16 à 30 et de 31 à 45s avec un seuil de probabilité $P<0,01$. Pour la période finale de 46 à 60s, le régime 3 contenant 12,5 % de farine de poisson, oscille entre les valeurs moyennes des autres régimes et ne s'en écarte pas significativement. On ne peut rien observer de significatif pour l'intervalle de 0 à 15s.



Graphe 14: Paramètres de motilité des spermatozoïdes de *Clarias gariepinus* mesurés par le système CASA sur quatre intervalles de temps : de 0 à 15s ; de 16 à 30s ; de 31 à 45s et de 46 à 60s. Le pourcentage de spermatozoïdes motiles (%MOT) [%], la concentration de spermatozoïdes motiles (MOTCn) [10^6 Spz/ml] et la linéarité (Lin) [%] sont comparés pour les quatre régimes expérimentaux. Les lettres, situées au-dessus des barres représentant les écarts-types, correspondent aux différences significatives observées d'après le test LSD entre les différents régimes. Les intervalles de temps ne sont pas comparés entre eux.

- La fréquence des battements flagellaires (BCF)

La fréquence des battements flagellaires est de 1,12 Hz pour le régime 2 et 4,47 Hz pour le régime 4. Une diminution en fonction du temps est très marquée entre l'intervalle de temps de 0 à 15s et les autres périodes. La valeur moyenne pour le régime 4 se distingue des valeurs des autres régimes. Statistiquement, (ANOVA 1), le régime 4 présente un BCF très significativement supérieur à ceux des régimes 1 et 2 ($P<0,001$). Les écarts-types sont importants. Une transformation logarithmique a été nécessaire avant l'ANOVA 1, pour les trois intervalles de temps suivants, et aucune différence n'a pu être mise en évidence.

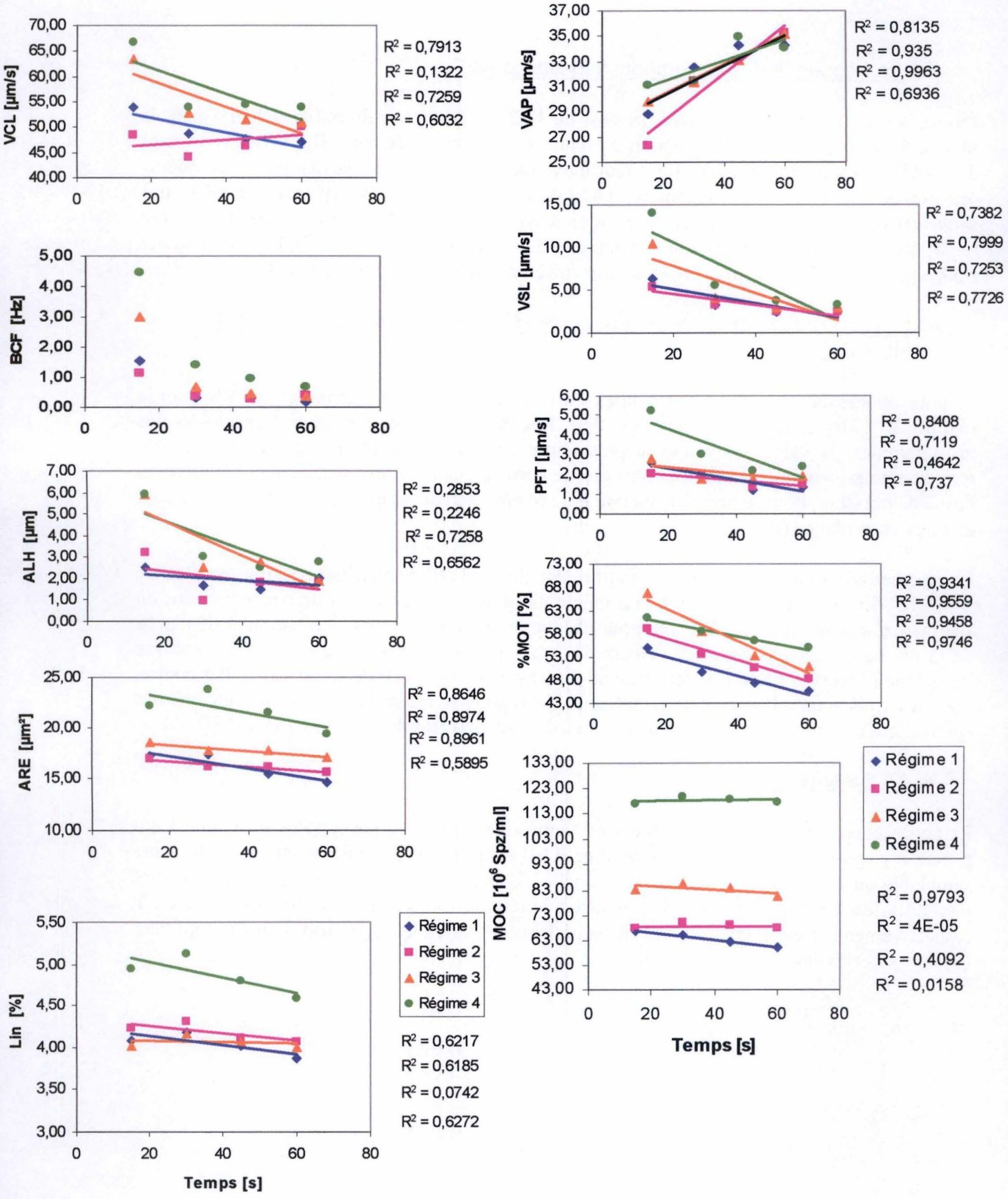
- Le pourcentage et la concentration de spermatozoïdes motiles (%MOT et MOT Cn)

Le pourcentage de spermatozoïdes motiles varie entre 55% pour le régime 1 et 66,9% pour le régime 3. Mis à par l'intervalle de 0 à 15s, on remarque que pour l'ensemble des histogrammes, la valeur moyenne la plus faible correspond au régime contenant 50% de farine de poisson et que la valeur la plus élevée correspond au régime totalement dépourvu en farine de poisson. Pour le premier intervalle de temps, rien de significatif (ANOVA 1) n'a pu être mis en évidence ($P>0,05$).

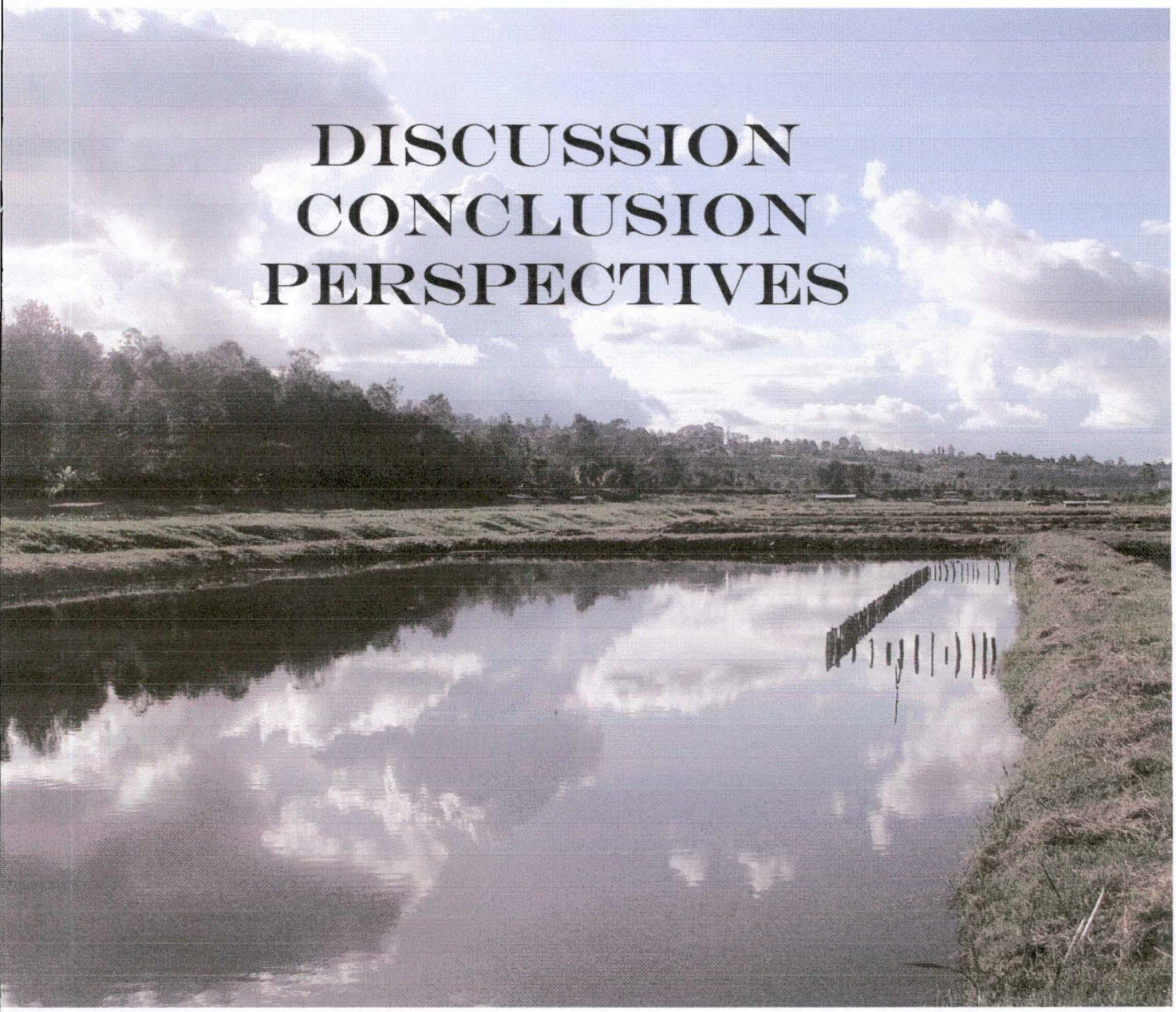
La concentration en spermatozoïdes motiles est de $66,5.10^6$ Spz/ml pour le régime 1 et de $116,9.10^6$ Spz/ml pour le régime 4. La même allure des histogrammes de concentrations en spermatozoïdes motiles est observée pour chaque intervalle de temps. Le régime 4 dépourvu de farine de poisson dépasse les valeurs des trois autres régimes. Curieusement, l'analyse statistique (ANOVA 1) pour l'intervalle de 0 à 15s ne montre rien de significatif. Par contre, pour les trois intervalles de temps suivants, le régime 4 présente une densité en cellules spermatiques motiles significativement supérieure aux densités des régimes 1 et 2 ($P<0,05$).

- La linéarité (Lin)

Le pourcentage de linéarité du régime 4 est le plus élevé (4,94%) par rapport au régime 3 qui présente le pourcentage le plus faible avec 4,01%. L'allure des histogrammes reste assez semblable au cours des intervalles de temps. L'analyse statistique (ANOVA 1) pour les intervalles de 0 à 15s et de 31 à 45s montre que le pourcentage de linéarité du régime 4 est, respectivement, très significativement supérieur ($P<0,01$) et significativement supérieur ($P<0,05$) à celui des trois autres régimes.



Graphe 15: Ce graphe est complémentaire aux graphes 12, 13 et 14 présentés précédemment. Représentation de l'évolution des divers paramètres de motilité des spermatozoïdes de *Clarias gariepinus* mesurés par le système CASA en fonction du temps post-activation sous forme de régressions linéaires.


DISCUSSION
CONCLUSION
PERSPECTIVES

Discussion

Dans cette partie, nous discuterons des résultats de notre étude en les confrontant à d'autres données de la littérature et en discutant de l'influence éventuelle de la méthodologie utilisée et des conditions expérimentales. En effet, pour rappel, les poissons, mâles et femelles confondus, de *Clarias gariepinus* sont élevés, dans des cages flottantes, en étang et ils ne sont donc pas stimulés de la même façon qu'en milieu naturel. Le sex-ratio mâles/femelles dans les différentes cages pourrait influencer l'état de maturité sexuelle des poissons. L'échantillonnage des gonades et de la laitance s'est réalisé à presqu'un mois d'intervalle entre le régime 1 (29/03:1er poisson disséqué) et le régime 4 (27/04: dernier poisson disséqué). Il est à noter que la saison de frai du poisson-chat africain varie en fonction de l'endroit et elle est fortement régulée par la température, la photopériode et le régime alimentaire. En effet, le stimulus provoquant le frai est associé à des changements chimiques de l'eau, des changements de pH, de température, d'ensoleillement et d'accès aux substrats de frai (De Graaf et Janssen, 1996 in Rurangwa, 1999). Le Rwanda ne répond pas aux exigences de température du poisson-chat africain qui requiert, en conditions optimales de reproduction, une température de 28 à 32°C (Nyina-Wamwiza, 2003). De plus, *Clarias gariepinus* ne libère pas sa semence suite à une pression abdominale, on ne peut extraire le sperme sans sacrifice de l'animal et ceci peut conduire à la collecte d'un sperme intratesticulaire immature (Cabrita et al., 2001 in Rurangwa et al., 2004).

1. Etat hormonal des mâles avant récolte du sperme et effet du régime

Les résultats se basent sur un seul prélèvement sanguin qui peut être influencé par divers facteurs tels que le stress des géniteurs et la période du prélèvement sanguin (Kime et Nash, 1999; Rougeot et al., 2004). Les valeurs de testostérone obtenues, de 4,7 à 31 ηg/ml plasma, sont de l'ordre des données de la littérature pour les mâles: de 5 à 60 ηg/ml plasma chez la truite arc-en-ciel (Bennetau-Pelissero et al., 2001), de 6 à 8 ηg/ml plasma pour *Clarias gariepinus* d'environ 200g (Swapna et al., 2006), de 4 à 12 ηg/ml plasma pour l'halibut atlantique (Vermeirssen et al., 2004) et proches des concentrations moyennes obtenues l'année dernière sur des poissons soumis aux mêmes régimes alimentaires, de 3 à 17,5 ηg/ml plasma (Defreyne, 2005). Les concentrations en 11-kétotestostérone observées varient de 7,5 à 12 ηg/ml plasma, ce qui est supérieur aux teneurs observées par Defreyne (2005), de 2,1 à 4,8 ηg/ml plasma, mais qui restent dans la norme pour les mâles: de 10 à 130 ηg/ml plasma pour la truite arc-en-ciel (Bennetau-Pelissero et al., 2001), de 3 ηg/ml plasma pour la perche commune (Rougeot et al., 2004) et de 12 ηg/ml plasma pour *Clarias gariepinus* de 200g (Swapna et al., 2006). Enfin, l'oestradiol, largement accepté comme une hormone femelle, est présente et ses récepteurs sont exprimés dans les organes reproducteurs de certains vertébrés mâles. L'oestradiol est impliqué dans la régulation de la spermatogenèse par la médiation des cellules de Sertoli (Miura et al., 1999). Les concentrations obtenues, de 0,37 à 0,55 ηg/ml plasma, sont proches des valeurs de 0,53 à 1,16 ηg/ml plasma obtenues sur des poissons soumis aux mêmes régimes alimentaires par Defreyne (2005), légèrement inférieures aux concentrations de 0,5 à 3,5 ηg/ml plasma obtenues pour la truite arc-en-ciel (Bennetau-Pelissero et al., 2001) et de 3,5 ηg/ml plasma pour la perche commune (Rougeot et al., 2004). Pour terminer, les concentrations en ALP mesurées sur ces poissons soumis aux régimes expérimentaux ne présentent pas de valeurs excessivement élevées pour des mâles. L'ALP, entre 18,2 et 71,4 µg/ml plasma, correspond aux valeurs de Defreyne (2005), 15,8 à 68,8 µg/ml plasma. Le dosage direct de la vitellogénine par Kime et Nash (1999) donne des

valeurs allant de 25 µg/ml plasma pour les mâles à 850 µg/ml plasma pour les femelles des poissons zébres, *Danio rerio*. Finalement, nos poissons présentent des concentrations en stéroïdes sexuels et ALP plasmatiques normales pour des mâles matures en période de frai.

L'impact éventuel de phytoestrogènes contenus dans les aliments végétaux des différents régimes est néanmoins à prendre en considération, bien que leur présence dans nos aliments n'ait pas été confirmée par un dosage. Par exemple, les saponines sont, entre autres, présentes dans le tournesol (Francis et al., 2001) qui est l'un de nos ingrédients expérimentaux. Aussi, une étude de Kemal (in press) qui analyse l'effet d'une herbe, *Tribulus terrestris*, contenant des saponines dont la protodioscine, responsable de l'augmentation de la production de testostérone, montre que les extraits de cette plante produisent, à différentes doses (0,1g/l à 0,3g/l), des populations de mâles, augmentent la spermatogenèse et améliorent les performances de croissance des cichlidés, *Cichlosoma nigrofasciatum*. On peut se permettre d'exclure un tel effet sur nos résultats de concentrations en testostérone chez nos poissons puisque les concentrations moyennes obtenues sont plus faibles pour les régimes à base de sous-produits végétaux.

La tendance des concentrations en ALP en fonction des régimes suit la même allure que les concentrations en oestradiol (graphes 9 et 11), ce qui semble logique puisque la synthèse de vitellogénine par le foie est régulée par l'oestradiol en synergisme avec des hormones de croissance (Yaron, 1995). Les teneurs en oestradiol et en ALP, obtenues lors de notre étude, sont plus faibles pour les régimes possédant plus de dérivés végétaux (R4 et R3) par rapport aux régimes 1 et 2. On peut donc écarter l'effet de phytoestrogènes sur ces concentrations, même si ceux-ci n'ont pas été dosés dans nos aliments expérimentaux, puisque ce type d'agents perturbateurs tels que la génistéine, entre en compétition avec la 17β-oestradiol pour la liaison au récepteur des mammifères, des poissons et des humains, ce qui entraîne la synthèse de vitellogénine (Martin et al., 1978; Latonnelle et al., 1999 in Bennetau-Pelissero et al., 2001).

Par ailleurs, la génistéine a également été corrélée à l'augmentation de la synthèse hépatique des globulines se liant aux hormones sexuelles. Ceci entraînant une diminution des oestrogènes libres circulants. Cette molécule a donc un effet agoniste et un effet antagoniste de l'E_2. Si la concentration d'oestradiol endogène est élevée, la présence de phytoestrogènes ne perturbera guère l'activité oestrogénique. Chez les mâles comme chez les femelles, un tel agent entraîne une augmentation de la production d'oestradiol et une diminution de la synthèse de testostérone, cette fois, seulement chez les mâles (Zhang et al., 2002). La concentration en testostérone de nos poissons est effectivement inférieure pour les régimes contenant beaucoup de dérivés végétaux (R3 et R4) par rapport aux régimes 1 et 2 mais l'augmentation de la concentration en oestradiol pour ces mêmes régimes (R3, R4) n'est pas observée. Toutefois, la présence de génistéine dans nos ingrédients expérimentaux n'est pas connue.

Il a été intéressant de calculer des rapports en stéroïdes sexuels (graphe 10) puisque la testostérone est un précurseur pour la formation aussi bien de l'oestradiol que de la 11-kétotestostérone. Il est normal en travaillant sur des mâles que le rapport 11K/T (de 974 à 5396 ηg/ml plasma) soit supérieur au rapport de E_2/T (de 71 à 177 ηg/ml plasma). Si les rapports en E_2/T sont supérieurs pour les régimes R2, R3 et R4 par rapport au régime R1, ceci reste vrai pour le rapport 11KT/T. Ce qui nous fait penser qu'il n'y aurait pas d'effet marqué d'un perturbateur sur ces rapports de concentrations en stéroïdes via les régimes alimentaires testés.

Rappelons néanmoins que les gammes de concentrations en stéroïdes et en ALP de notre étude restent dans une gamme de valeurs normales, pour des poissons mâles, telles que présentées dans la littérature.

Finalement, plusieurs études démontrent que les phytoestrogènes produisent des réponses oestrogéniques chez les poissons. Cela dit, elles montrent aussi la complexité de la caractérisation de cette réponse oestrogénique et la production de vitellogénine comme biomarqueur d'une telle influence n'est pas un indicateur sensible de l'exposition à des phytoestrogène (Zhang et al., 2002).

D'autres facteurs peuvent également influencer l'état hormonal des poissons. Par exemple, le stress de confinement entraîne, entre autres, une diminution de testostérone et de 11-KT (Kubokawa et al., 1999 in Rurangwa et al., 2004).

2. Qualité du sperme

Aucun effet du régime sur le rapport gonadosomatique n'a été mis en évidence et les valeurs moyennes obtenues pour chaque régime sont très proches les unes des autres (0,55 à 0,67 %). Ces valeurs sont également dans la gamme des valeurs obtenues par Legendre et al. (1992) (RGS de 0,49%) chez *Clarias gariepinus* âgé de 28 mois et pesant en moyenne 400g et par Viveiros et al. (2002) (RGS de 0,57%) chez *Clarias gariepinus* âgé de 9 mois et pesant 1,5kg.

Le fait qu'un poisson sans testicule et que deux poissons avec des gonades au développement anormal pour le régime 1 et pour les régimes 2 et 3 respectivement ait été constaté, laisse perplexe. Etat de coïncidence dans le choix aléatoire des mâles les plus gros ou effet des régimes ? Il semblerait plus logique que le régime 4 ne contenant aucune trace de farine de poisson présente ces anomalies d'état de maturation des gonades puisqu'il est le plus susceptible de contenir des phytoestrogènes capables d'agir sur le développement gonadique. Ces observations semblent donc dues au hasard et non à un impact des régimes. Néanmoins, elles restent importantes puisque des variations de l'état de maturation des testicules affectent la consistance, le volume, la densité du sperme et le pH du plasma séminal mais pas les paramètres de motilité (Mansour et al., 2002). A deux ans, les poissons de notre expérience sont sexuellement matures. En effet, la maturation sexuelle est atteinte à l'âge de 10 à 11 mois pour Legendre et al. (1992) et à 12 mois pour Schulz et al. (1997). Déjà précédemment, les analyses histoglogiques réalisées sur certains poissons de cette expérience soumis aux mêmes régimes alimentaires, ont montrées que les mâles étaient tous spermiants (Defreyne, 2005).

Le spermatocrite est supérieure pour le régime 1 (65,7%) par rapport aux autres régimes (43,7% pour R3). Nos valeurs de spermatocrite sont supérieures à celles présentées dans la littérature, par exemple pour la même espèce de poisson, 24,2 % (Rurangwa, 1999), 27 % (Steyn et Van Vuren, 1987) et 42,8 % (Viveiros et al., 2002).

La mesure de la densité du sperme contredit les résultats obtenus pour le spermatocrite, elle est en effet plus importante pour le régime 4. Même si les unités ne sont pas les mêmes, ces deux types de mesures correspondent au nombre de cellules spermatiques en fonction du volume de la laitance. Cette contradiction serait peut-être due à l'estimation des volumes pour le spermatocrite. De plus, le spermatocrite tout comme la viscosité du sperme varient entre mâles d'une même espèce, entre espèces, et au cours de la saison de reproduction (Christ et al., 1996; Rakitin et al., 1999 in Rurangwa et al., 2004). Dans le même sens, Rideout et al. (2004) et Rurangwa et al. (2001) suggèrent que la variabilité rencontrée dans la mesure du spermatocrite rend ce paramètre, seul, insuffisant pour déterminer la qualité du sperme. La densité spermatique serait plus fiable car les valeurs obtenues (de 16,9 à 49,5.10^9 Spz/ml) sont proches à celles de la littérature pour *Clarias gariepinus*: 7,5.10^9 Spz/ml (Mansour et al., 2005), 8,5.10^9 Spz/ml (Viveiros et al., 2002), 18,5.10^9 Spz/ml (Rurangwa et al., 1998; 2002) et enfin de 15 à 34.10^9 Spz/ml (Rurangwa, 1999). Toutefois, la concentration en spermatozoïdes n'est pas stable, elle varie au cours de la période de reproduction. Par

Tableau 20 : Paramètres de motilité étudiés via le système CASA pour plusieurs espèces de poissons comparés aux valeurs obtenues lors de cette étude pour les quatre régimes sur l'intervalle de temps de 0 à 15s.

Etudes	VCL [µm/s]	VAP [µm/s]	VSL [µm/s]	PFT [µm/s]	ALH [µm]	ARE [µm²]	BCF [Hz]	%MOT [%]	MOT Cn [10^6 Spz/ ml]	Lin [%]	Références
Régime1	53,97	28,78	6,37	2,6	2,49	17,1	1,55	55,18	66,5	4,08	
Régime2	48,47	26,35	5,43	2,0	3,18	16,87	1,12	59,09	67,59	4,21	Notre étude
Régime3	63,37	29,80	10,48	2,79	5,9	18,46	2,99	66,90	83,40	4,01	
Régime4	66,64	31,13	13,96	5,22	5,89	22,18	4,47	61,66	116,91	4,94	
Clarias gariepinus	50 – 60 30 – 40 55 - 60	20 – 30 40 – 50 34 – 36	25 – 30 35 – 40					74,6 95 - 100 77,9			Mansour et al., 2002 Rurangwa et al., 2002 Kime et al., 1996 Rurangwa et al., 2001 Rurangwa et al., 1998 Mansour et al., 2005
Acipenser fulvescens	310-320 336,1		120-130 106,5		5,2 5,2		40 - 60	50 - 79 45,9		28 - 38 32,5	Toth et al., 1997 Ciereszko et al., 1996
Oncorhynchus mykiss	250 98,1		99,5					52,7			Redondo-Müller et al., 1991 Lahnsteiner et al., 1998
Dicentrarchus labrax	124,59 141,8	100,04	69,82		4,88	14,26	4,65 60	94,4			Felip et al., 2006 Dreanno, 1997
Psetta maxima	230							83,4			Dreanno et al., 1998
Cyprinus carpio	100-160 60-70						30-50	90			Perchec- Poupard et al., 1998 Rurangwa et al., 2002
Hipoglossus hipoglossus	130-170										Vermeirssen et al., 2004
Perca fluviatilis			4,7 (après 30s)					87	75,9	21,2	Rougeot et al., 2004
Le rat					30 - 35		8,3 – 8,6	60		2,5	Kaneto et Kishi, 2003

exemple, pour la carpe et la truite arc-en-ciel, la densité spermatique diminue au fil de la saison du frai (Christ et al., 1996 in Rurangwa et al., 2004).

Le pH du liquide séminal est un paramètre important de la qualité des gamètes mâles chez le poisson. Généralement, chez les téléostéens, le pH du sperme influence la dépolarisation membranaire et l'initiation de la motilité du sperme. Le pH est donc un facteur majeur de l'activation du sperme, ce qui a déjà été prouvé chez le mulet, *Mugil auratus*, le turbot et l'halibut (Billard et al., 1995a). Le pH du liquide séminal affecte également la maturation finale des spermatozoïdes (Billard et al., 1995b). On sait également que le pH optimum du tampon de dilution du sperme qui doit ressembler au mieux à la composition du liquide séminal pour maintenir les spermatozoïdes immotiles est de 7,5 (Rurangwa et al., 2004). Dans notre cas, le régime contenant 50% de farine de poisson (R1) présente un pH moyen plus élevé (8,05) mais aucune différence significative par rapport aux autres régimes (R2: 7,72; R3: 7,87 et R4: 7,64) n'a été mise en évidence et les valeurs obtenues sont dans la gamme de pH présentés dans la littérature pour *Clarias gariepinus* comme pour les siluridés en général. *Clarias gariepinus* présente une gamme de pH de liquide séminal de 7,5 à 8,5 (Rurangwa, 1999), *Clarias macrocephalus* de 6,4 à 9,4 (Josefa et al., 1999; Tan-Fermin et al., 1999) et *Ictalurus punctatus* de 6,5 à 8,5 (Bates et al., 1996).

3. Caractéristiques des spermatozoïdes

L'analyse de la qualité du sperme assistée par ordinateur (CASA) serait la meilleure méthode pour l'estimation de la capacité fécondante des spermatozoïdes puisque le pourcentage de spermatozoïdes motiles et la vitesse sont des paramètres prédictifs de la fertilité (Rurangwa et al., 2001). Plus particulièrement, des études employant CASA ont montré que pour le poisson-chat africain, les mesures de vitesse, VCL, VAP et VSL sont les paramètres de mouvement les plus corrélés aux taux de fertilisation (Toth et al., 1997; Kime et al., 2001; Rurangwa et al., 2001). Les résultats d'analyses de la qualité du sperme via la méthode assistée par ordinateur pour diverses espèces de poissons sont présentés au tableau 20. La période de 0 à 15s post-activation est la plus importante pour l'analyse de motilité des spermatozoïdes et les valeurs présentées dans ce tableau pour nos régimes expérimentaux correspondent à cet intervalle de temps. Les valeurs de VCL, VAP et ARE obtenues lors de notre étude sont dans la gamme de résultats exposés pour *Clarias gariepinus*. Par contre, pour ce qui est des paramètres VSL et %MOT, les données sont légèrement inférieures à ce qu'on aurait pu attendre pour cette espèce. Ceci pourrait être dû au déroulement de l'expérience. En effet, l'enregistrement de motilité des spermatozoïdes n'a pas été réalisé directement après la collecte du sperme mais parfois quelques heures après l'échantillonnage.

Les paramètres de motilité sont tous influencés par le moment de prélèvement de la laitance, au cours de la période du frai, puisqu'il a été démontré notamment chez la carpe et le turbot que la production du sperme et sa qualité peuvent être plus faibles au début et à la fin de la saison de reproduction (Christ et al., 1996 in Rurangwa et al., 2004; Suquet et al., 1998). Un déclin saisonnier de la motilité en général a d'ailleurs été rapporté pour plusieurs espèces incluant le bar, la truite arc-en-ciel et l'halibut atlantique (Billard et al., 1977; Büyükhatipoglu et Holz, 1984; Metheven et Crim, 1991 in Rideout et al., 2004). Les changements de motilité peuvent être reliés à des changements morphologiques des cellules spermatiques en fin de saison de reproduction, particulièrement la dégénérescence des membranes cellulaires comme rapporté pour le turbot (Suquet et al., 1998).

A prendre également en compte, la présence éventuelle de phytoestrogènes dans les aliments expérimentaux, de même que les différents rapports en acides gras essentiels susceptibles d'influencer la qualité des spermatozoïdes.

La présence de stéroïdes sexuels intervenant en tant que phéromones lors de la reproduction interviendrait aussi au cours du processus de l'acquisition du potentiel de la motilité des spermatozoïdes. De ce fait, même si l'urine altère la qualité du sperme, il est possible qu'elle contribue au processus de fécondation. (Scott et al., 1991 in Dreanno, 1997).

- Les paramètres de vitesse VCL, VAP, VSL et PFT

La vitesse curvilinéaire (VCL) est significativement plus élevée pour le régime 4 et pour les trois premiers intervalles de temps, de 0 à 45s. La vitesse angulaire (VAP) est généralement moins utile chez les poissons car à la différence des spermatozoïdes de mammifères, les tracés sont généralement des courbes lisses de sorte que VAP soit identique à VCL (Rurangwa et al., 2004). A part pour l'intervalle de 0 à 15s, les histogrammes de la vitesse angulaire ne suivent pas l'allure des histogrammes de la vitesse curvilinéaire (graphe 12) mais la période de temps la plus importante se situe entre 0 et 15s puisqu'au-delà, les spermatozoïdes ont déjà plutôt tendance à vibrer. Alors que la vitesse linéaire (VSL) est l'indicateur de fertilité le plus fiable chez les mammifères, plusieurs études sur les poissons suggèrent que la trajectoire des spermatozoïdes de poissons est plus courbée que celle des mammifères car les spermatozoïdes se meuvent en trois dimensions dans le milieu aqueux (Kime et al., 2001). Dans notre étude, la vitesse linéaire est importante pour les poissons du régime 4 et diminue de façon très remarquable en fonction du temps post-activation de la motilité des spermatozoïdes (graphe 12). Il n'est pas encore connu comment la diminution de la motilité des spermatozoïdes peut être corrélée à la diminution de la fertilité mais il a été démontré que la capacité de fertilisation des spermatozoïdes de rats est liée au déclin de la vitesse linéaire (Moore et Akhondi, 1996 in Kime et al., 1996). Lorsque la trajectoire des spermatozoïdes est en ligne droite, alors VCL et VSL sont identiques (Rurangwa et al., 2004). Dans notre étude, l'analyse statistique met en évidence les mêmes tendances des histogrammes de VCL et VSL sur l'intervalle de temps de 0 à 15s pour les quatre régimes (graphe 12).

Lorsque l'on regarde les valeurs chiffrées, les valeurs de vitesses curvilinéaires sont bien plus élevées que celles de VSL. De plus, le pourcentage de linéarité des trajectoires des spermatozoïdes en fonction des divers régimes est faible pour chacun d'entre eux. Finalement, la trajectoire des spermatozoïdes de cette étude semble de nature courbée.

Les changements de mouvements des spermatozoïdes le long de leurs parcours (PFT), c'est-à-dire la variation de la vitesse linéaire, présentent une tendance assez similaire à celle de VSL, mis à part le fait que PFT présentent des valeurs plus faibles (graphe 12). Les spermatozoïdes des poissons nourris avec le régime 4 s'écartent plus de la vitesse linéaire que les spermatozoïdes des autres poissons.

Les spermatozoïdes issus des poissons nourris avec le régime 4 donnent les valeurs les plus élevées pour les quatre paramètres de vitesses (VCL, VAP, VSL et PFT).

- Amplitude du mouvement latéral de la tête spermatique, ALH

On observe une diminution en fonction du temps de l'amplitude des mouvements latéraux de la tête des spermatozoïdes. Cette diminution en fonction du temps pourrait s'expliquer par une déplétion en énergie. Une diminution considérable de la vitesse, de la fréquence des battements flagellaires, du pourcentage de spermatozoïdes motiles et du diamètre de la trajectoire peut être due à des changements des conditions ioniques cytoplasmiques et énergétiques des spermatozoïdes (Felip et al., 2006). Pour les deux périodes de 0 à 15s et de 16 à 30s, les valeurs des régimes 3 et 4, pour lesquels la substitution de la farine de poisson

est la plus importante, dépassent celles des deux premiers régimes. Ces mouvements latéraux doivent être les plus faibles possible pour une meilleure utilisation de l'énergie des spermatozoïdes et pour un gain de temps afin d'atteindre le point de destination le plus rapidement possible. Cependant, au vu des résultats de la fréquence des mouvements flagellaires et du pourcentage de linéarité sur le trajet total parcouru qui sont également plus élevés pour les spermatozoïdes correspondant au régime 4, ces derniers ont peut être la capacité de dépenser plus d'énergie sans pour autant perdre le cap de leur trajectoire.

- La morphométrie de la tête spermatique, ARE

Pour les quatre intervalles de temps, l'aire moyenne de la tête des spermatozoïdes (ARE) des poissons soumis au régime 4 est la plus élevée (graphe 13). Les valeurs moyennes des trois autres régimes restent assez proches les unes des autres.

Chez les poissons d'eau douce, des altérations importantes de la structure des spermatozoïdes au cours de la nage sont décrites, notamment, chez la carpe, lorsque les spermatozoïdes sont dilués dans l'eau distillée, le volume de la tête spermatique s'accroît, puis l'extrémité distale du flagelle se courbe progressivement pour former une boucle flagellaire (curling) (Perchec et al., 1996 in Dreanno, 1997) également observée chez *Clarias gariepinus* lors de notre étude.

D'importantes modifications structurales apparaissent également au cours de la nage des spermatozoïdes de bar. Notamment, le volume de la tête spermatique qui s'accroît, dû sans doute à l'augmentation de la taille du noyau induite par la décondensation de la chromatine. Processus qui se produit également pour les spermatozoïdes de médaka et d'oursin lors du processus de fécondation. Cette décondensation pourrait débuter dès l'initiation de la motilité et pourrait être le signe de dommages survenant lors des échanges d'eau extracellulaires (Dreanno, 1997). Ce phénomène ne doit donc pas se produire trop tôt dans l'étape de l'activation de la motilité des spermatozoïdes. En ce qui concerne les résultats de notre étude, la morphométrie de la tête des spermatozoïdes de Clarias, peu importe le régime auxquels ces poissons sont soumis, diminue légèrement en fonction du temps (Graphe 15). Donc cet accroissement du volume de la tête spermatique engendré par une décondensation de la chromatine n'est pas observé dans le cas présent. Par contre, on peut supposer que, au plus la tête spermatique est grosse, au plus le spermatozoïde a de la capacité cytoplasmique et donc il pourra engranger plus de réserves énergétiques. En effet, l'activation de la motilité des spermatozoïdes induit une déplétion rapide de l'ATP durant le mouvement et cela est dû à une faible phosphorylation oxydative mitochondriale (Rurangwa et al., 2002). Or les réserves d'ATP accumulées avant éjaculation sont la principale source d'énergie maintenant la nage des spermatozoïdes (Dreanno, 1997). De cette manière, la capacité reproductrice des poissons nourris avec les aliments du régime 4, présentant des valeurs supérieures pour l'aire de la tête de leurs spermatozoïdes, serait favorisée.

- La fréquence des battements flagellaires, BCF

La fréquence des battements flagellaires est corrélée avec la capacité de fertilisation des spermatozoïdes de poissons (Billard et Cosson, 1992 in Felip et al., 2006). La valeur moyenne pour le régime 4 se distingue des valeurs des autres régimes sur les quatre intervalles de temps (graphe 13). Une diminution en fonction du temps est très marquée entre l'intervalle de temps de 0 à 15s et les autres périodes (graphe 15). Cette diminution joue un rôle crucial sur la capacité d'avancement des spermatozoïdes puisque les battements du flagelle sont à l'origine des mouvements et des trajectoires observés. L'augmentation de la

courbure des trajectoires est liée au degré de symétrie des vagues flagellaires. L'amplitude et la longueur des vagues varient selon le temps post-activation. Puis au cours du temps, la partie distale du flagelle se raidit. Autrement dit, les poissons nourris avec les aliments du régime 4 sont avantagés puisqu'ils possèdent une fréquence de battements flagellaires supérieure. Leur trajectoire tend donc à se circulariser plus tard dans le temps, lorsque leurs battements flagellaires deviennent asymétriques. Cette fréquence de battements plus élevée pourrait compenser les déplacements latéraux supérieurs de la tête des spermatozoïdes des poissons correspondant à ce même régime. Notons que l'asymétrie des battements flagellaires est induite par une accumulation de calcium intracellulaire. Par exemple, lorsque la concentration en Ca^{2+} extracellulaire augmente dans le milieu de réactivation de spermatozoïdes démembranés de bar, la nage se circularise. Chez la truite arc-en-ciel et la carpe, la diminution de la fréquence des battements flagellaires et la courte durée de motilité ont été liées à une diminution progressive des réserves intracellulaires d'ATP du spermatozoïde (Dreanno, 1997).

- Le pourcentage et la concentration de spermatozoïdes motiles, %MOT et MOT Cn

On remarque que le pourcentage moyen de spermatozoïdes motiles le plus faible correspond au régime 1 et ce pour les quatre intervalles de temps. Pour ce qui est de la période de 0 à 15s, le régime 4 est en seconde position après le régime 3. Le critère du pourcentage de cellules motiles reste le critère le plus pertinent et le plus prédictif pour évaluer la fécondance des gamètes. La fécondation ne serait pas dépendante de la qualité du mouvement, mais uniquement du nombre de cellules viables (Dreanno, 1997). Si cela s'avère être aussi simple, alors la substitution de la farine de poisson pour *Clarias gariepinus* peut être mise en application sans peur de l'avenir reproducteur de ce poisson même si nos valeurs sont plus faibles que celles de la littérature. D'autant que lors du test au trypan bleu 0,4%, même si rien n'a été confirmé statistiquement, le pourcentage de spermatozoïdes à la membrane cellulaire intacte est également plus élevé pour le régime 4. On a obtenu 60,3 % pour le régime 4 par rapport à 39,9 % pour le régime 1 alors que Steyn et Van Vuren (1987) et Rurangwa (1999) ont obtenu un pourcentage de spermatozoïdes vivants de 87% et plus de 88%, respectivement. Le test de la coloration au trypan bleu révélant les spermatozoïdes ayant une membrane intacte ou non et considérés comme vivants ou morts, est à analyser avec précaution car si la membrane spermatique est endommagée, le spermatozoïde n'en est pas pour autant mort dans tous les cas. Une étude de Lubzens et al. (1997) précise qu'une fertilisation artificielle peut être réalisée avec des échantillons de sperme assez bien marqué par le trypan bleu, indiquant soit que des dommages membranaires ne sont pas une barrière au succès d'une fertilisation in vitro, soit que cette méthode est de pauvre résolution pour identifier les dommages cellulaires

Nos pourcentages de spermatozoïdes motiles (CASA) et de spermatozoïdes vivants (trypan bleu) sont plus faibles que les valeurs citées dans la littérature (tableau 20). Quoique les conditions expérimentales soient rarement les mêmes d'un auteur à l'autre, les raisons de cette plus faible motilité pourrait être recherchées dans la présence éventuelle de phytoestrogènes dans les aliments. En effet, une incorporation de génistéine dans les aliments de truites arc-en-ciel diminue de manière dose-dépendante la motilité et la concentration de leurs spermatozoïdes (Bennetau-Pelissero et al., 2001). Ces pourcentages plus bas peuvent également être dus aux teneurs en acides gras essentiels des aliments expérimentaux (Labbe et al., 1993 in Izquierdo et al., 2001). La composition en acides gras du sperme pourrait être un facteur qui détermine l'intégrité membranaire suite à une congélation de la semence (Izquierdo et al., 2001) mais peut-être aussi, suite au choc osmotique provoqué par l'activation de motilité dans de l'eau distillée. Les acides gras insaturés tel que l'acide

arachidonique, sont des composants structuraux et physiologiques importants des membranes cellulaires et jouent un rôle capital dans la perméabilité et l'activité enzymatique (Lee, 2001 in Li et al., 2005).

La concentration du sperme affecte significativement les paramètres de motilité des spermatozoïdes. En effet, une concentration élevée de spermatozoïdes augmente la fréquence des collisions et rend l'étude de motilité plus difficile pour les méthodes assistées par ordinateur (Morrel, 1997). Aussi, une faible dilution peut créer un artefact, une initiation progressive de la motilité du sperme dans l'échantillon (Billard et Cosson, 1992 in Fauvel et al., 1999). Ceci a été évité au maximum en réalisant une dilution en deux étapes selon Billard et Cosson 1992 (Rurangwa et al., 2004). La teneur en acides gras dans les régimes peut également intervenir sur la densité des spermatozoïdes puisque chez les humains, des niveaux élevés de DHA dans le sperme sont associés avec des spermatozoïdes de bonne qualité en terme de densité et de mobilité (Conquer et al., 1999 in Pérez et al., 2000) et ce, bien que les régimes suppléés en DHA n'aient pas d'effet sur la motilité du sperme (Conquer et al., 2000 in Pérez et al., 2000). La densité de spermatozoïdes motiles de notre étude est supérieure pour le régime 4 par rapport aux trois autres régimes. Nos valeurs sont proches de la densité de spermatozoïdes motiles de *Perca fluviatil* présentée par Rougeot et al. (2004) qui est de $75{,}9.10^6$ Spz/ml.

- La linéarité, Lin

La linéarité exprimée en pourcent [(VSL/VCL) x 100] ne varie guère en fonction du temps post-activation et l'allure des histogrammes reste assez semblable au cours des intervalles de temps. En effet, les deux paramètres de vitesse, VSL et VCL, diminuent. Le pourcentage de linéarité du régime 4 est le plus élevé. Ceci voudrait dire que les spermatozoïdes des Clarias nourris sans farine de poisson atteignent leur cible de manière plus directe.

La diminution de la linéarité ou l'augmentation des déplacements angulaires moyens de la tête du spermatozoïde (MAD) à un temps donné après activation peut indiquer un sperme vieilli et donc des spermatozoïdes qui se meuvent dans une trajectoire plus circulaire. (Rurangwa, 1999).

4. Effet des régimes sur la qualité du sperme

La source lipidique alimentaire peut modifier la composition du sperme et de la membrane des gamètes mâles (Labbé et al., 1995 in Dreanno, 1997). Des régimes riches en acides gras peuvent en effet influencer les profils en acides gras du sperme chez les poissons (Bell *et al.*, 1996 in Pérez et al., 2000). La composition en acide gras du sperme détermine l'intégrité membranaire et un rapport cholestérol-phospholipide faible est corrélé avec une meilleure résistance du sperme à la congélation (Labbe et Maisse, 1996 in Izquierdo et al., 2001). Les poissons nourris avec le régime 1 contenant 50% de farine de poisson devraient être avantagés car leur régime contient la teneur la plus élevée en huile de poisson or Asturiano et al. (2001) ont montré que des granulés commercials enrichis en huile de poisson et donc en acides gras polyinsaturés, améliorent les performances reproductives des mâles de bar européen, *Dicentrarchus labrax*. Ils ont une période de spermiation plus longue, des volumes de sperme et des concentrations en spermatozoïdes plus élevés, comparés aux témoins (Rurangwa et al., 2004). Les huiles végétales contiennent des taux élevés d'acides gras polyinsaturés mais manquent d'acides éicosapentaénoïques (EPA) et d'acides docosahexaénoïques (DHA) (Figueiredo-Silva et al., 2005), acides gras essentiels principalement pour les poissons marins.

Les acides gras essentiels que les régimes doivent fournir à *Clarias gariepinus* sont avant tout les acides linoléiques et linoléniques contenus en concentrations élevées, par exemple, dans les huiles végétales.

Parmi les phytoestrogènes, les isoflavonoides dont les isoflavones et les lignanes, sont entièrement restreints aux légumineuses ou *Fabaceae*. Il est donc possible qu'ils soient présents dans nos régimes expérimentaux via les haricots et les arachides. En effet, les arachides renfermeraient des phytoestrogènes qu'il ne faudrait pas négliger s'ils sont incorporés à des taux élevés dans les aliments (Liener, 1980 in Nyina-Wamwiza, 2003). Ils ont une activité oestrogénique suffisante pour sérieusement affecter la reproduction des animaux qui s'en nourrissent.

La génistéine est un phytoestrogène abondant, principalement présent dans le soja et bien d'autres végétaux (Zhang et al., 2002) dont peut être certains de nos ingrédients. La génistéine diminue la production de testostérone par les testicules et réduit le niveau de testostérone circulante (Bennetau-Pelissero et al., 2001). Elle accélère la spermatogenèse et une dégradation de la motilité spermatique ainsi qu'une augmentation de la concentration des spermatozoïdes peuvent être observées au moment du frai (Lahnsteiner et al., 1998).

Le régime 4 contient le plus de dérivés végétaux: farine de haricot, tourteau de tournesol décortiqué et tourteau d'arachide, alors que le régime 1 ne contient que de la farine de maïs. Ceci dit, il existe dans les végétaux d'autres perturbateurs de la reproduction. Ainsi, l'épi de maïs, uniquement inclus dans le régime contenant 50% de farine de poisson, contient un agent mitogène entraînant des perturbations du comportement sexuel et du cycle oestrogénique chez le rat (Markaverich et al., 2002).

Malgré l'absence de farine de poisson, le régime 4 présente une qualité de sperme meilleure que les autres régimes. Les régimes 2 et 3 diffèrent peut être du régime 4 par le fait que le tourteau de tournesol ne soit pas décortiqué dans ces deux régimes. Les tannins sont plus concentrés dans la partie interne de la graine de tournesol (Nyina-Wamwiza, 2003) mais il n'en est peut-être pas de même pour les saponines ou autres phytoestrogènes éventuellement présents dans ce tourteau.

D'autres nutriments ne sont pas négligeables pour la qualité des gamètes mâles. Ainsi, la fonction anti-oxydante des vitamines C et E peut jouer un rôle important de protection des cellules spermatiques durant la spermatogenèse jusqu'à l'étape de fertilisation, en réduisant les risques de peroxydation qui seraient nuisibles pour la motilité des spermatozoïdes (Izquierdo et al., 2001).

Conclusion et perspectives

Il y a un accroissement d'intérêt pour le remplacement de la nourriture pour poissons par des sous-produits et notamment par des sources protéiques d'origine végétale. Une attention toute particulière doit être portée aux effets potentiels à long terme de ce type de nutrition. En effet, des phytoestrogènes peuvent se trouver en concentration importante dans ce genre de nourriture alternative (Pelissero et al., 1991a, b). Aussi, l'impact de tels composés est difficile à mettre en évidence puisqu'ils dépendent de la concentration d'œstrogènes endogènes, de l'espèce de poisson et du stade du cycle reproducteur ainsi que d'interactions multiples possibles entre divers agents perturbateurs du système endocrinien contenus dans les aliments composants les régimes expérimentaux.

L'objectif de ce travail était d'étudier l'impact éventuel de sous-produits agro-industriels dans l'alimentation du poisson-chat sur la qualité du sperme.

Il ressort de notre expérience que le poisson-chat africain tolère ces aliments expérimentaux à base de dérivés animaux et végétaux. Une étude de Fagbenro (1999a) montrait déjà la tolérance de *Clarias gariepinus* pour l'incorporation à teneur élevée des haricots dans son alimentation, laissant suggérer qu'il n'y a pas de problème d'acceptation de ce type d'aliment. Il cite le haricot comme une alternative économique des aliments pour poissons-chats afin de résoudre le problème de future dépendance dans la disponibilité de la nourriture. De plus, la résistance du système reproducteur des poissons semble supérieure à celle des mammifères (Rinchard et al., 2000).

L'état hormonal des poissons au cours de la période d'échantillonnage était semblable à celui de poissons mâles matures en saison de frai. Les régimes n'ont pas influencé les valeurs de rapport gonadosomatique, de pH du liquide séminal, ni même de la concentration en spermatozoïdes présentant une membrane intacte. Par contre les valeurs de la densité spermatique et de l'analyse de la motilité des spermatozoïdes assistée par ordinateur ont montré qu'elles étaient supérieures pour les poissons soumis au régime 4 dépourvu en farine de poisson et contenant le plus de dérivés végétaux.

Au vu de nos résultats, nous n'avons pas pu constater de réel problème de ce type d'alimentation sur les divers paramètres de qualité du sperme étudiés. Bien au contraire, les variables de motilité des spermatozoïdes semblent meilleures pour les poissons soumis aux régimes les plus substitués en farine de poisson. La farine de poisson peut donc être partiellement, voire totalement remplacée par des sous-produits végétaux sans effets néfastes significatifs sur la qualité des gamètes mâles.

Bien des choses pourraient encore être réalisées pour confirmer l'état de qualité du sperme de *Clarias gariepinus* nourri à partir de sous-produits et de dérivés végétaux. La densité du sperme, la motilité des spermatozoïdes et les niveaux de stéroïdes sexuels durant la saison de frai peuvent se révéler très utiles pour évaluer les capacités reproductives des mâles. Mais ces paramètres ne sont pas exhaustifs et d'autres facteurs tels que la composition ionique du plasma séminal et la concentration en adénosine triphosphate pourraient être employés pour évaluer la qualité des gamètes mâles (Billard et al., 1997; Rougeot et al., 2004).

Les niveaux de lipides et de calcium sont également prédictifs de la qualité des spermatozoïdes s'ils sont corrélés avec la capacité de fertilisation (Lanhsteiner et al., 1998).

L'évolution des concentrations en adénosine triphosphate et en calcium au cours du temps post-activation corrélée à la durée de motilité des spermatozoïdes permettrait d'avoir une idée plus précise de la capacité de mouvements des gamètes. On sait en effet que les mouvements des spermatozoïdes se circularisent suite à une accumulation de calcium intracellulaire et que l'activation de la motilité induit une déplétion rapide de l'ATP durant le mouvement (Dreanno, 1997; Rurangwa et al., 2002).

On aurait également pu compléter cette analyse des performances des gamètes mâles par l'étude de la composition lipidique de la membrane plasmique et de sa perméabilité afin d'évaluer l'aptitude des spermatozoïdes à tolérer les chocs osmotiques (Gwo, 1995 in Dreanno, 1997). Le dosage des acides gras contenus dans les aliments expérimentaux permettrait, dans ce cas, une corrélation avec les teneurs lipidiques des gamètes mâles.

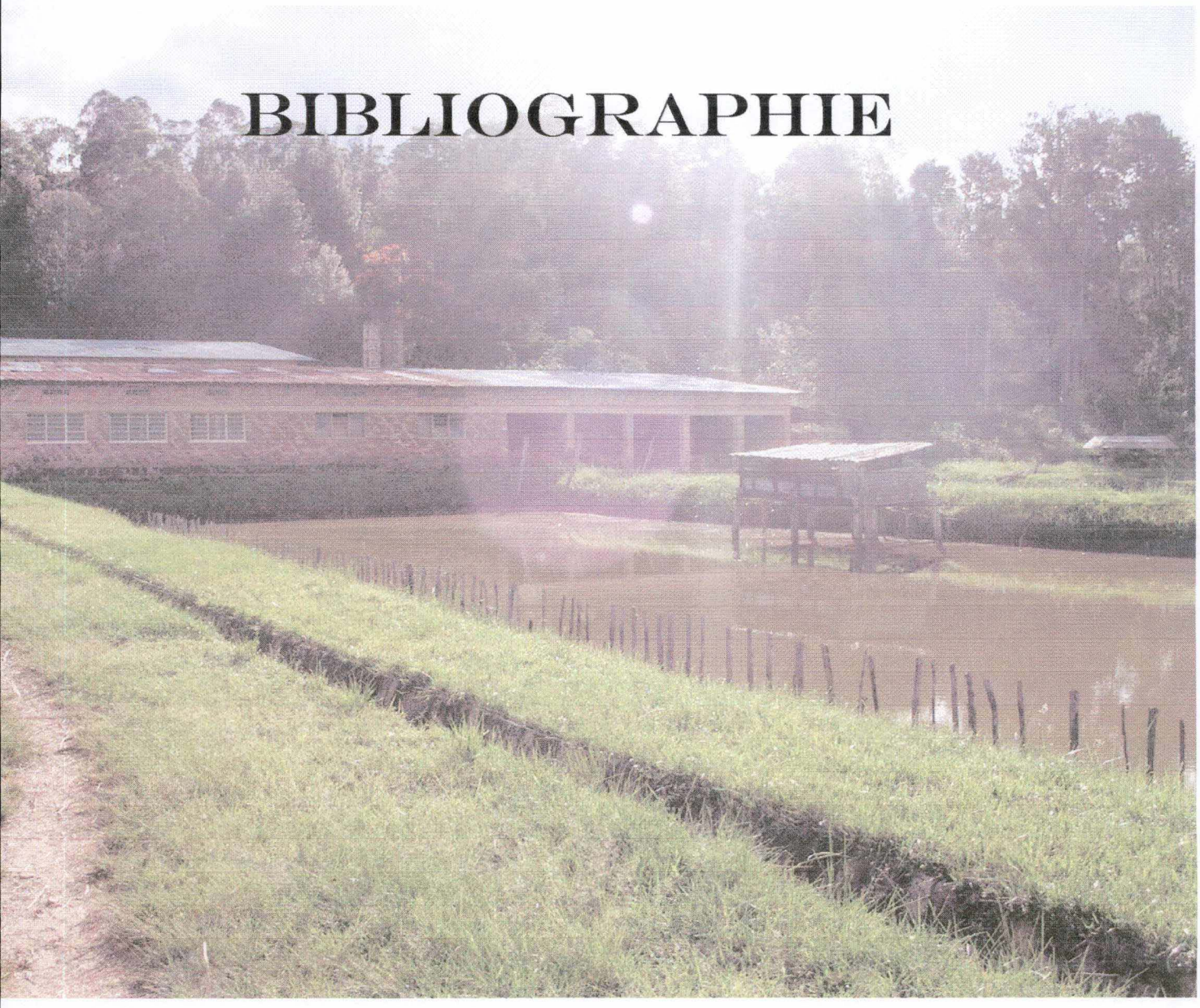
D'autres stéroïdes sexuels pourraient être dosés sur les plasmas sanguins des poissons. Vermeirssen et al. (2004) ont trouvé une corrélation positive entre les concentrations en 3β,17,20β-P-5β-S et la vitesse curvilinéaire (VCL) chez l'halibut atlantique et une corrélation positive entre les concentrations en 17,20β-P et le rapport sodium-potassium dans le liquide séminal de la truite arc-en-ciel. Des études indiquent également que les stéroïdes sexuels à 21 carbones, lorsqu'ils sont injectés aux poissons mâles, sont impliqués dans la régulation de la composition ionique et du pH du liquide séminal et influencent la fluidité du sperme (Scott et Baynes, 1982; Miura et al., 1991 in Vermeirssen et al., 2004).

La motilité des spermatozoïdes employée comme paramètre de viabilité des spermatozoïdes fournit une analyse rapide mais requiert une confirmation prudente afin de déterminer sa relation avec le succès de fertilisation (Rurangwa et al., 1998). La qualité des spermatozoïdes ne saurait être mieux confirmée que par la réalisation de reproductions artificielles à partir des mâles de Clarias soumis aux régimes expérimentaux et de femelles standards issues d'un autre étang. On obtiendrait alors les valeurs des taux de fécondation, d'éclosion et de survie larvaire. A partir de ces larves, la détermination du temps létal (TL50) pourrait être envisagée, de même que l'analyse de la qualité biochimique des larves, principalement via le dosage des acides gras.

La qualité des gamètes femelles des poissons soumis aux régimes expérimentaux devrait également être prise en compte.

Le dosage des phytoestrogènes présents dans les aliments permettrait de déterminer si certains effets sur le système reproducteur de *Clarias gariepinus* sont dus à ces facteurs d'origine alimentaire.

BIBLIOGRAPHIE



Références bibliographiques

Alavi, S.M.H. & Cosson, J. Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Aquaculture Research* **36**, 841-850 (2005).

Alavi, S.M.H. & Cosson, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International* **30**, 1-14 (2006).

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

Alavi, S.M.H., Cosson, J., Karami, M., Abdolhay, H. & Amiri, B.M. Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus* their physiological relationship with sperm motility. *Aquaculture Research* **35**, 1238-1243 (2004b).

Almazán-Rueda, P., Schrama, J.W. & Verreth, J.A.J. Behavioural responses under different feeding methods and light regimes of the African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. *Aquaculture* **231**, 347-359 (2004).

Appelbaum, S. & Kamler, E. Survival, growth, metabolism and behaviour of *Clarias gariepinus* (Burchelle 1822) early stages under different light conditions. *Aquaculture Engineering* **22**, 269-287 (2000).

Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Carillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Navarro, J.C. & Bromage, N. Reproductive performance in male European sea bass (*Diecentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture* **194**, 173-190 (2001).

Asturiano, J.F., Marco-Jiménez, F., Pérez, L., Balasch, S., Garzón, D.L., Peñaranda, D.S., Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P. & Jover, M. Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. *Theriogenology* in press (2006).

Bennetau-Pelissero, C., Bernard Breton, B., Bennetau, B., Corraze, G., Le Menn, F., Davail-Cuisset, B., Helou, C. & Kaushik., S.J. Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* **121**, 173-187 (2001).

Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W. & Suquet, M. Sperm physiology and quality. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* pp: 25-52 (1995a).

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

Billard, R., Linhart, O., Fierville, F. & Cosson, J. Motility of European catfish *Silurus glanis* spermatozoa in testes and in milt. Broodstock management and egg and larval quality. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*. **44**, 115-122 (1997).

Bon, E., Barbe, U., Rodriguez, J.N., Cuisset, B., Pelissero, C., Sumpter, J.P. & Le Menn, F. Plasma vitellogenin levels during the Annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): establishment and validation of an ELISA; *Comparative Biocheistry Physiology* **117**, 75-84 (1997).

Brzezinski, A. & Debi, A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators ? *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **85**, 47-51 (1999).

Chong, A.S.C., Ishak, S.D., Osman, Z. & Hashim, R. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of female swordtails *Xiphophorus helleri* (Poeciliidae). *Aquaculture* **234**, 381-392 (2004).

Ciereszko, A., Ottobre, J.S. & Glogowski, J. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Animal Reproduction Science* **64**, 89-96 (2000).

Conceição, L.E.C., Dersjant-Li, Y. & Verreth, J.A.J. Cost of growth in larval and juvenile African catfish (Clarias gariepinus) in relation to growth rate, food intake and oxygen consumption. *Aquaculture* **161**, 95-106 (1998).

Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dreanno, C., Linhart, O. & Suquet, M. Movements of Fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* **44**, 103-113 (1997).

Dabrowski, K., Lee, K-J., Rinchard, J., Ciereszko, A., Blom, J.H. & Ottobre, J.S. Gossypol isomers bind specifically to blood plasma proteins and spermatozoa of rainbow trout fed diets containing cottonseed meal. *Biochimica and Biophysica Acta* **1525**, 37-42 (2001).

De Graaf, G., Galemoni, F. & Banzoussi, B. Recruitment control of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* by the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), and the African snakehead, *Ophiocephalus obscursis*, I.A biologica analysis. *Aquaculture* **146**, 85-100 (1996).

Dreanno C. Régulation de la motilité des seprmatozoïdes de turbot (*Psetta maxima*) et de bar (*Dicentrarchus labrax*). Thèse de doctorat. Laboratoire d'Ichtyologie Générale et Appliquée. Université de Rennes (1997).

Dubois, E.A., Slob, S., Zandbergen, M.A., Peute, J. & Goos, H.J.Th. Gonadal steroids and the maturation of the species-specific gonadotropin-releasing hormone system in brain and pituitary of the male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comparative biochemistry and physiology* **129**, 381-387 (2001).

Fagbenro, O.A. Comparative evaluation of heat-processed Winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) meals as partial replacement for fish meal in diets for the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* **170**, 297-305 (1999a).

Fagbenro, O.A. Use of full-fat winged bean *Psophocarpus tetragonolobus* seed meal as a protein feedstuff in fish-meal free diets for African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Nutrition* **5**, 199-204 (1999b).

Felip, A., Zanuy, S. & Carrillo, M. Comparative analysis of growth performance and sperm motility between precocious and non-precocious males in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* **256**, 570-578 (2006).

Figueiredo-Silva, A., Rocha, E., Dias, J., Silva, P., Rema, P., Gomes, E. & Valente, L.M.P. Partial replacement of fish oil by soybean oil on lipid distribution and liver histology in european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture Nutrition* **11**, 147-155 (2005).

Francis, G., Makkar, H.P.S. & Becker, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* **199**, 197–227 (2001).

Grzyb, K., Rychlowski, M., Biegniewska, A. & Skorkowski, E. F. Quantitative determination of creatine kinase release from herring (*Clupea harengus*) spermatozoa induced by tributyltin. *Comparative Biochemistry and Physiology* **134**, 207-213 (2003).

Gutendorf, B. & Westendorf, J. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* **166**, 79-89 (2001).

Hardy, R.W. Collaborative opportunities between fish nutrition and other disciplines in aquaculture: an overview. *Aquaculture* **177**, 217-230 (1999).

Hengsawat, K., Ward, F.J. & Jaruratjamorn, P. The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. *Aquaculture* **152**, 67-76 (1997).

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

Kardinaal, A.F.M., Waalkens-Berendsen & Arts, C.J.M. Pseudo-oestrogens in the diet: Health benefits and safety concerns. *Trends in Food Science and technology* Vol **8** (1997).

Kime, D.E. & Nash, J.P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *The Science of the Total Environment* **233**, 123-129 (1999).

Kime, D.E., Ebrahimi, M., Nysten, K., Roelants, I., Rurangwa, E., Moore, H.D.M. & Ollevier, F.. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquatic Toxicology* **36**, 223-237 (1996).

Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E. & Ollevier, F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative biochemistry and Physiology* **130**, 425-433 (2001).

Krasznai, Z., Morisawa, M., Morisawa, S., Krasznai, Z.T., Trón, L., Gáspár, R. & Márián, T. Role of ion channels andd membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquatic Living Resources* **16**, 445-449 (2003).

Lahnsteiner, F., Weismann, T. & Patzner, R. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture* **144**, 265-274 (1996).

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. & Patzner, R.A. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture* **163**, 163-181 (1998).

Legendre, M., Teugels, G.G., Cauty, C. & Jalabert, B. A comparative study on morphology, growth rate and reproduction of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), *Heterobranchus longifilis*, Valenciennes, 1840, and their reciprocal hybrids (Pisces, Clariidae). *Journal of Fish Biology* **40**, 59-79 (1992).

Li, Y., Chen, W., Sun, Z., Chen, J. & Wu, K. Effect of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. *Aquaculture* **245**, 263-272 (2005).

Lubzens, E., Daube, N., Pekarsky, I., Magnus, Y., Cohen, A., Yusefovich, F. & Feigin, P. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks srategies in research and application. *Aquaculture* **155**, 13-30 (1997).

Mansour, N., Lahnsteiner, F. & Patzner, R. A. The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. *Journal of Fish Biology* **60**, 545-560 (2002).

Mansour, N., Lahnsteiner, F. & Berger, B. Metabolism of intratesticular spermatozoa of a tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **135**, 285-296 (2003).

Mansour, N., Ramoun, A. & Lahnsteiner, F. Quality of testicular semen of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and its relationship with fertilization and hatching success. *Aquaculture Research* **36**, 1422 – 1428 (2005).

Markaverich, Barry M., Alejandro, M.A., Markaverich, D., Zitzow, D., Casajuna, N., Camarao, N., Hill, J., Bhirdo, K., Faith, R., Turk, J. & Crowley, J.R. Identification of an

endocrine disrupting agent from corn with mitogenic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **291**, 692-700 (2002).

Martins, C.I.M., Aanyu, M., Schrama, J.W. & Verreth, J.A.J. Size distribution in African catfish (*Clarias gariepinus*) affects feeding behaviour but not growth. *Aquaculture* **250**, 300-307 (2005).

Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, Manal R., Todo, T. & Yamauchi, K. Estradiol-17β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **264**, 230-234 (1999).

Morrell, J.M. CASA as an aid to selecting sperm suspensions for artificial insemination in *Callithrix jacchus*. *International Journal of Andrology* **20,** 287-296 (1997).

Ng., WK., Lim, PK. & Boey, PL. Dietary lipid and palm oil source affects growth, fatty acid composition and muscle α-tocopherol concentration of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* **215**, 229-243 (2003).

Nguenga, D., Breine, Jan J., Teugels, Guy G. & Ollevier, F. Artificial propagation of the African catfish *Heterobranchus longifilis* (Siluroidei; Clariidae): Description of a simple technique to avoid sacrificing male broodfish fot the obtention of milt. *Aquaculture* **143**, 215-217 (1996).

Pelissero, C. & Sumpter, J.P. Steroids and "steroid-like" substances in fish diets. *Aquaculture* **107**, 283-301 (1992).

Pelissero, C., Le Menn, F. & Kaushick, S. Estrogenic effect of dietary soya bean meal on vitellogenesis in cultured siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *General and Comparative Endocrinology* **83**, 447-457 (1991a).

Pelissero, C., Bennetau, B., Babin, P., Le Menn, F. & Dunogues, J. The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular biology* **38**, 293-299 (1991b).

Pérez, L., Asturiano, J.F., Tomàs, A., Zegrari, S., Barrera, R., Espinos, F.J., Navarro, J.C. & Jover, M. Induction of maturation and spermiation in the male European eel: Assessment of sperm quality throughout treatment, *Journal of Fish Biology* **57**, 1488-1504 (2000).

Rideout, R. M., Trippel, E. A. & Litvak, M. K. Relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock. *Journal of Fish Biology* **65**, 319–332 (2004).

Rodríguez, C., Pérez, J.A., Badía, P., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H. & Hernández, A.L. The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (Sparus aurata L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. Aquaculture 169, 9-23 (1998).

Rougeot, C., Nicayenzi, F., Mandiki, S.N.M., Rurangwa, E., Kestemont, P. & Mélard C. Comparative study of the reproductive characteristics of XY male and hormonally sex-reversed XX male Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Theriogenology* **62**, 790-800 (2004).

Rurangwa, E. Heavy metal pollutant disruption of growth and reproduction in the African catfish, Clarias gariepinus. Thèse de doctorat. Université catholique de Leuven (1999).

Rurangwa, E., Roelants, I., Huyskens, G., Ebrahimi, M., Kime, D.E. & Ollevier, F. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Journal of fish biology* **53**, 402-413 (1998).

Rurangwa, E., Volckaert, F.A.M., Huyskens, G., Kime, D.E. & Ollevier, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA),

viable staining and standardized fertilization in afrian catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology* **55**, 751-769 (2001).

Rurangwa, E., Biegniewska, A., Slominska, E., Skorkowski, E.F. & Ollevier, F. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comparative Biochemistry and Physiology* **131**, 335-344 (2002).

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

Schulz, R.W. & Goos, H.J.T. Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* **177**, 5-12 (1999).

Segovia, M., Jenkins, J.A., Paniagua-Chavez, C. & Tiersch, T.R. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology* **53**, 1489-1499 (2000).

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

Suquet, M., Dreanno, C., Dorange, G., Normant, Y., Quemener, L., Gaignon, J.L. & Billard, R. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. *Journal of Fish Biology* **52**, 31-41 (1998).

Swapna, I., Rajasekhar, M., Supriya, A., Raghuveer, K., Sreenivasulu, G., Rasheeda, M.K., Majumdar, K.C., Kagawa, H., Tanaka, H., Dutta-Gupta, A. & Senthilkumaran, B. Thiourea-induced thyroid hormone depletion impairs testicular recrudescence in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **144**, 1-10 (2006).

Toth, G.P., Ciereszko, A., Christ, S.A. & Dabrowski, K. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions. *Aquaculture* **154**, 337-348 (1997).

Ulloa, J.B., Van Weerd, J.H., Huisman, E.A. & Verreth, J.A.J. Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: the Costa Rican situation. *Waste management* **24**, 87-97 (2004).

Vermeirssen, E.L.M., De Quero, C.M., Shields, R.J., Norberg, B., Kime, D.E. & Scott, A.P. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus, hipoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotrophin-releasing hormone agonist implant. *Aquaculture* **230**, 547-567 (2004).

Viveiros, A.T.M., Fessehaye, Y., ter Veld, M., Schulz, R.W. & Komen, J. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* **213**, 373-386 (2002).

Yaron Z. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture* **129**, 49-73 (1995).

Zhang, L., Khan, Ikhlas A. & Foran C.M. Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology* part C **132**, 203-211 (2002).