

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane M - Bejaia -

Faculté : des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : des Sciences Biologiques et de l'Environnement

En vue de l'obtention du diplôme de Master II en
Reproduction et Biotechnologies Animales

Thème

Optimisation de la conservation du sperme de poisson

***Barbus barbus callensis* (Valenciennes, 1842)**

Réalisé par :

M^r : Khaled Ferhat

M^{elle} : Kehoul Habiba

Membre de jury:

President M^{me} : Mouhoub C.

Promoteur M^r : Aberkane B.

Co-promoteur M^r : Iguer-Ouada M.

Examineur M^{me} : Belbachir A.

Examineur M^{elle} : Ourari M.

Remerciement

Louange à ALLAH, le miséricordieux qui nous a donné patience et courage, afin d'achever ce travail.

Nous remercions tout particulièrement notre Promoteur M^r: Aberkane B. pour l'honneur qu'il nous a fait en nous Encadrant.

Nous remercions notre Co-Promoteur M^r: Iguer-ouada M. pour ses remarques et ses conseils.

Nos remerciements s'adressent à M^{me}: Mouhoub C. d'avoir accepté de Présider cette soutenance.

Nous remercions M^{me}: Belbachir A et M^{elle}: Ourari M. qu'ont accepté d'examiner ce présent travail.

Nous remercions chaleureusement Mr: Fatmi S. du département de génie des procédés et pharmaceutiques pour leur aide.



Dédicaces

Ce modeste travail est dédié

A mes très chers parents

Je vous dois ce que je suis aujourd'hui grâce à votre
amour, à votre
patience et vos innombrables sacrifices.

Que ce modeste travail, soit pour vous une petite
compensation et
reconnaissance envers ce que vous avez fait
d'incroyable pour moi.

A mes frères et ma sœur

A ma binôme Habiba

Et sa famille

Et tous ceux qui me les aime et m'aiment

A toute la promotion de Reproduction et

Biotechnologie Animales

(Enseignants et étudiants)



Dédicaces

Ce modeste travail est dédié

A mes très chers parents

Je vous dois ce que je suis aujourd'hui grâce à votre
amour, à votre
patience et vos innombrables sacrifices.

Que ce modeste travail, soit pour vous une petite
compensation et
reconnaissance envers ce que vous avez fait
d'incroyable pour moi.

A ma très chère sœur

Yasmina

A mes très chers frères,

Mouhamed, katib, Sifadin, Said, Lotfi

A monbinôme Ferhat

Et sa famille

A toute la promotion de Reproduction et

Biotechnologie Animales

(Enseignants et étudiants)



I. Liste des abréviations

II. Liste des figures

III. Liste des tableaux

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Introduction.....	01
I. Description générale de Barbeau.....	03
I.1. Morphologie.....	03
I.2. Anatomie.....	03
I.3. Classification de genre <i>Barbus</i>	04
I.4. Ecologie de Barbeau.....	05
I.5. Reproduction de Barbeau.....	05
I.6. L’hermaphroditisme chez l’espèce <i>Barbus barbus callensis</i>	06
II. Le sperme.....	07
III. La pollution du l’eau.....	09
IV. Technologie de la conservation du sperme de poisson.....	11
IV.1. Conservation à court terme (Réfrigération).....	11
IV.2. Conservation à long terme (congélation).....	11
IV.3. Protocole de conservation du sperme des Cyprinidés.....	12
1. Facteurs influencent sur la conservation du sperme.....	23
VI. Avantages de conservation du sperme de poisson.....	23
Chapitre II : Matériel et méthodes	
I. Travail de terrain.....	24
I.1. Présentation des deux sites d’études.....	24
II. Travail de laboratoire.....	26
III. La conservation du sperme de <i>Barbus barbus callensis</i> par réfrigération.....	28
IV. Analyse statistique du sperme.....	30
Chapitre III : Résultats et discussions	
I. Evaluation des paramètres spermatiques.....	31
Conclusion	39

Références bibliographiques

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique.

ALH : Averag Lateral Head

ATP: Adénosine Triphosphate.

BCF: Beat Cross Frequency

CASA: Analyseur de sperme assisté par ordinateur (Computer Assisted Sperm Analysis).

cc: Canal Cytoplasmé d'un spermatozoïde.

CCME: Canadian Council of Ministers of the Environment.

CD : Cyclodextrines

DMSO : Diméthyl-sulfoxyde.

DMA : dimethylacetamide.

FAO : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

f : Flagelle d'un spermatozoïde.

h : Tête d'un spermatozoïde.

H : heure

Hz : hertz

IGS: Indice gonadosomatique.

m : Mitochondrie d'un spermatozoïde.

mi : Pièce intermédiaire d'un spermatozoïde.

MeOH : Méthanol.

min : minute.

mM : milimole.

µm : micromètre.

PEG : polyéthylène glycol.

s : seconde.

Spz : Spermatozoïdes.

Tris: Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane.

UICN: Union international pour la conservation de la Nature.

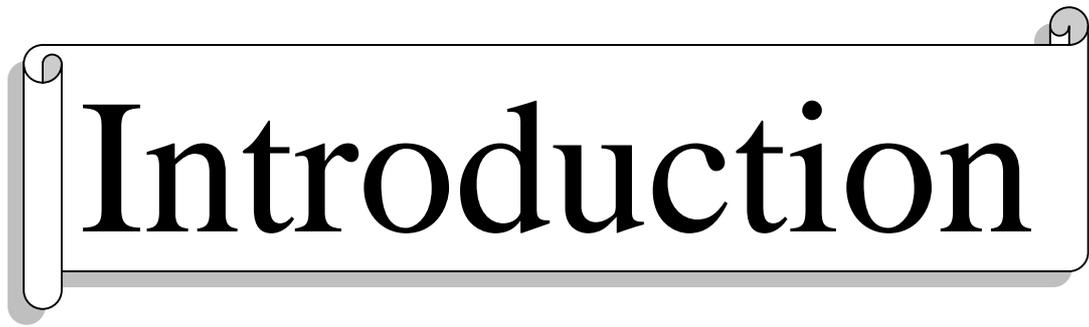
VAP: Velocity Averag Path.

VCL : Velocity Curvilinear.

VSL : Velocity Straight Line.

Figure :	page
Figure 01 : Morphologie du <i>Barbus barbuis callensis</i>	03
Figure 02 : Schéma de la chaîne physiologique de la reproduction chez le Barbeau.....	06
Figure 03 : Spermatozoïde des cyprinidés.....	08
Figure 04 : l'événement physique produit pendant la conservation d'une cellule.....	11
Figure 05: Technique d'extraction manuelle de la laitance de poisson.....	12
Figure 06 : Arrangement de mouvement des spermatozoïdes.....	13
Figure 07: Schéma représente le réseau principal et affluent de la Soummam.....	24
Figure 08 : L'espèce <i>Barbus barbuis callensis</i>	27
Figure 09 : Echantillon de sperme.....	27
Figure 10 : Analyseur informatique du sperme (CASA).....	27
Figure 11.a : Histogramme de variation de la durée de la motilité spermatique (DM en secondes) en fonction de poisson de deux rivières (Aguerioun et Soummam).....	32
Figure 11.b : Histogramme de variation de la durée de la mobilité spermatique (DM en secondes) en fonction de poissons et de l'eau des deux rivières (Aguerioun et Soummam).....	32
Figure 12.a : Histogramme des variations de la concentration spermatique (en milliard /ml) en fonction de poisson des deux rivières Aguerioun et Soummam.....	34
Figure 12.b : Histogramme des variations de la concentration spermatique (en milliards /ml) en fonction de poisson et de l'eau des deux rivières (Aguerioun et Soummam).....	34
Figure 13.a: Histogramme de variation des vitesses spermatique (en micromètre/seconde) en fonction des poissons des deux rivières (Aguerioun et Soummam) pendant trois périodes différentes.....	35
Figure 13.b : Variation de la VSL, VAP et VCL en fonction du poisson et de l'eau des deux rivières (Aguerioun et Soummam).....	36
Figure 14 : Histogramme de variation de BCF (en Hz) en fonction de poisson et de l'eau des deux rivières (Aguerioun et Soummam) pendant trois périodes différentes.....	37
Figure 15 : Histogramme de variation d'ALH spermatique (en micromètre) en fonction de poisson et de l'eau des deux rivières (Aguerioun et Soummam) pendant trois périodes différentes.....	38

Tableau :	page
Tableau 01 : Classification d'espèce <i>Barbus barbuis callensis</i>	04
Tableau 02: Echelle arbitraire pour exprimer la motilité des spermatozoïdes.....	14
Tableau 03 : Milieu de MOUNIB, 1980	15
Tableau 04 : Milieu de Billard et <i>al.</i> ,(1974) ;Trus-cottet et <i>al.</i> , (1968) ; Billard(1975).....	15
Tableau 05 : Nombre des sorties et des poissons pêchés au niveau de oued Aguerioun et oued Soummam.....	25
Tableau 06 : Milieux de conservation utilisé.....	29



Introduction

Introduction

Grâce à la reproduction, les espèces animales et végétales se maintiennent sur notre planète. Les poissons constituent une source de protéines importante (actuellement avec 20% de l'apport protéique), riche en oligo-éléments, vitamines et en acides gras longs polyinsaturés (AGLPI) (**Kaushik, 2004**). sur les 30 dernières années, la consommation des protéines animales d'origine aquatique a doublé dans les pays en développement, elle est passée de 6.3 à 13.8 kg par personne et par an (**Chevassus-au-Louis et Lazard, 2009**), et les poissons représentent une source régulière pour plus de 200 millions de personnes (**FAO, 2006**).

Le milieu aquatique constitue le réceptacle final de tous les déchets de notre planète (**Kime et al., 2001**) et plusieurs espèces sont menacées de disparition à cause de la dégradation de l'environnement (**UICN, 2006**). La sonnette d'alarme de l'état de l'environnement en général et le milieu aquatique en particulier causées par la pollution et l'apparition des nouvelles anomalies tels que l'hermaphrodisme chez l'espèce *barbus barbus callensis* (valenciennes, 1842) de la Soummam nous renseigne sur l'état de la biodiversité aquatique (**Djoudad-Kadji et al., 2012**).

Le caractère extensif et saisonnier de la reproduction des poissons est parmi les grandes particularités qui entravent l'approvisionnement du marché international, et la maîtrise de la reproduction artificielle est devenue ainsi un passage obligatoire dans l'optimisation des productions en aquaculture (**Legendre et Billard, 1980**).

La recherche dans le domaine de la conservation de sperme des poissons a une grandes avancées, réalisées depuis le premier réussi il y a 50 ans par l'utilisation des différents protocoles expérimentales (**Qinghua et al., 2006**), soit par la réfrigération pour des courtes durées à des températures entre 0 et 10° ou par la congélation à des très basses températures à long terme (-196°C) (**Lahnsteiner et al., 2000 ; Harvey et Hoar, 1980 ; François, 1946 ; Bakhach et al., 2007**).

Les protocoles de la conservation de sperme des poissons soit par réfrigération ou par congélation, sont développés pour quelques espèces; bien que plusieurs études existent sur la conservation de sperme des cyprinidés, mais la connaissance est toujours très fragmentaire,

car l'investigation détaillée sur les paramètres cryobiologique manquent toujours, et les protocoles de cryopreservation dérivent principalement des données empiriques (**Lahnsteiner et al.,2000**).

Nous avons fixé deux objectifs dans cette étude, la recherche d'un milieu adéquat de réfrigération et de congélation du sperme du barbeau le plus temps possible, et la comparaison des paramètres spermatiques des poissons des deux sites d'étude (oued Aguerioun et oued Soummam).



Chapitre I

I. Description générale de Barbeau

Le barbeau *Barbus barbus callensis* (Valenciennes, 1842), est une espèce caractéristique de l'Afrique du Nord (**Djemali, 2005**). Les noms communs de cette espèce sont *Boulbis* (arabe), Barbeau (français) et *Barbel* (anglais).

I.1. Morphologie

Selon **Bouhbouh (2002)**, le corps de poisson du genre *Barbus* est caractérisé par:

- La couleur du corps est brun jaunâtre,
- Un corps fusiforme, recouvert d'écailles cycloïdes,
- Une ligne latérale habituellement présente et complète,
- Une nageoire dorsale à dernier rayon simple osseux denticulé ou non,
- Des os pharyngiens bien développés et pourvus des dents,
- Un œil petit, une bouche bordée d'épaisses lèvres mobiles et, munies de deux paires de barbillons ; d'après **Bongiovanni et al.,(2005)**, les barbillons jouent un rôle dans la recherche de la nourriture (**figure 01**).



Figure 01 : Morphologie du *Barbus barbus callensis*

I.2. Anatomie

Les poissons du genre *Barbus* ont :

- Un squelette qui porte leurs nageoires,
- La partie inférieure du corps est composée d'organes internes : cœur, foie, estomac, ovaires et/ou testicules, vessie natatoire (**Arrignon, 1998**).

I.3. Classification de genre *Barbus*

Les différenciations génotypiques et phénotypiques révélées au sein des espèces appartenant au genre *Barbus*, ont posé plusieurs classifications.

I.3. Position systématique d'espèce *Barbus barbuis callensis*

D'après Nelson (1994), la position systématique d'espèce *Barbus barbuis callensis* est représentée dans le (tableau 01)

Tableau 01 : Classification du *Barbus barbuis callensis* (Nelson, 1994).

Phylum	Cordes
Classe	Osteichtyens
Sous-classe	Actinopterygiens
Super classe	Teleosteens
Ordre	Cypriniformes
Sous-ordre	Cyprinoïdes
Famille	Cyprinides
Genre	<i>Barbus</i>
Espèce	<i>Barbus barbuis callensis</i> (vallencienne, 1842)

I.4. Ecologie de Barbeau

Environ 10 ,000 espèces de poissons strictement d'eau douce sont reconnues dans le monde (**Bruclé et Quignard, 2004**). Le barbeau, répartis en majorité en Asie, en Europe et en Afrique. L'espèce *Barbus barbus callensis* est endémique à la partie nord-africaine, dont la faune des eaux douces est dominée par les Cyprinidés. Il peuple les cours d'eau tunisiens, algériens et marocains (**Chaouchi et Ben Hassine, 1998**).

I.4.1. L'habitat

L'habitat du poisson réunit : les frayères, les aires de croissance, d'alimentation et de migration, où le poisson accomplit ses processus vitaux (**Robert et al. 1986**). selon **Bongiovanni et al., (2005)** l'habitat de Barbeau est caractérisé par: rivières assez larges, courants rapides, eaux vives fraîches bien oxygénées, fonds rocheux caillouteux graveleux ou sableux, les individus les plus jeunes sont localisés dans les zones peu profondes et peu courantes, alors que les plus vieux fréquentent des eaux plus profondes à des températures varie entre 20 à 23°C en été.

I.4.2. Régime alimentaire

D'après **Cherghou et al.,(2002)**, le régime alimentaire de *Barbus callensis* suit un rythme saisonnier ; ce poisson a une activité alimentaire intense en été et en printemps, cependant durant l'automne et l'hiver son intensité alimentaire diminue. Le spectre alimentaire du barbeau est composé essentiellement de larves des diptères, d'éphéméroptères, de gammaridés et de matière végétale.

I.5. Reproduction de Barbeau

Les étapes de la reproduction chez le Barbeau est comme les autres vertébrés ; sont coordonnées par le système nerveux et endocrinien ; la maturation des gonades ainsi que le comportement reproducteur sont des réponses à des stimuli de l'environnement (**Harvey et Hoar, 1980**) (**figure 02**).

Chez le barbeau la maturité sexuelle est tardive, les femelles sont pubères entre 5 et 6 ans, les mâles entre 2 et 3 ans. La ponte se déroule en mai - juin dès que la température de l'eau atteint 13,5°C (**Chaouchi et Ben Hassine, 1998**) dans des zones peu profondes (<30cm), à courant relativement rapide (25-75cm/se), ou le substrat est constitué d'un mélange de graviers fins et grossiers (2 à 5cm) de diamètre (**Poncin, 1993**).

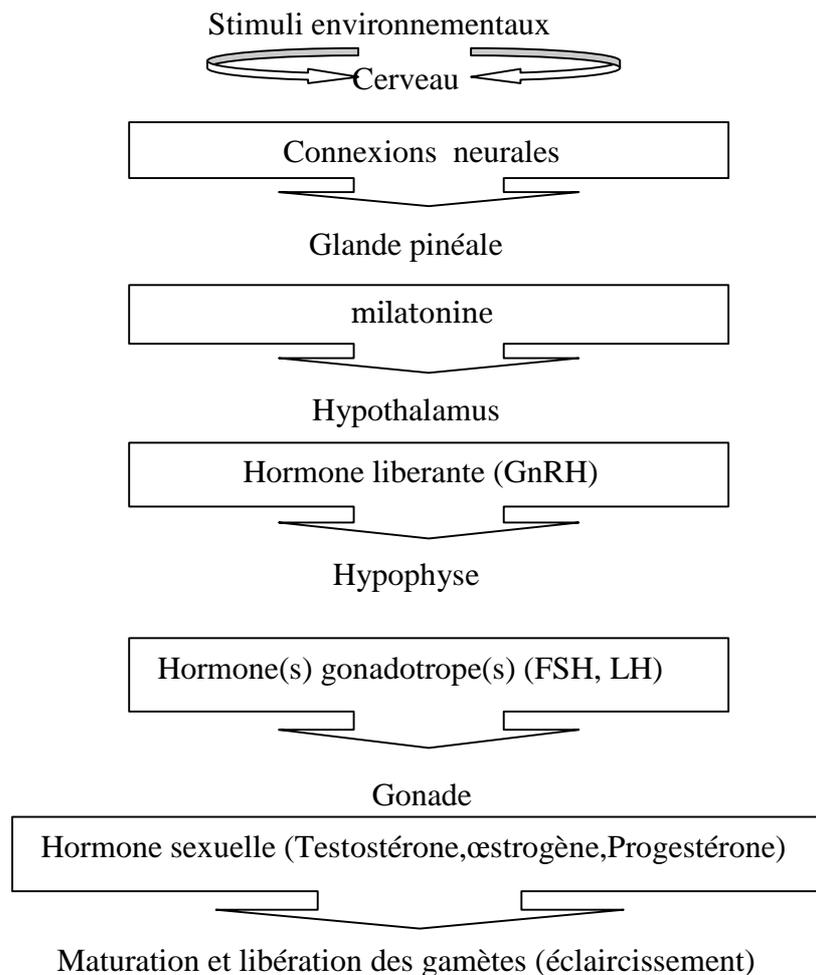


Figure 02 : Schéma de la chaîne physiologique de la reproduction chez le Barbeau (Cherghou *et al.*, 2002).

Le suivi mensuel de l'indice gonadosomatique (IGS) et du facteur de condition (K) révèle que l'espèce *Barbus barbus callensis* est adaptée aux eaux bien oxygénées où apparaissent les alevins en période sèche. (Ould Rouis *et al.*, 2012).

1.6. L'hermaphrodisme chez l'espèce *Barbus barbus callensis*

Dans le cadre d'une étude portant sur le cycle sexuel de *Barbus barbus callensis* d'oued Soummam, il a été constaté, chez certains individus, des cas d'hermaphrodisme synchrone (Djoudad-Kadji *et al.*, 2012). L'hermaphrodisme ou le changement de sexes dû aux plusieurs facteurs parmi lesquelles la pollution.

II. Le sperme

D'après **Bernard et al., (2011)** le mot sperme provient de grec *sperma*, *spermatos*, qui signifie semence ou laitance.

II.1. Définition

Selon **Dussault (2009)**, le sperme est un liquide biologique animal, qui est expulsé du corps lors de l'éjaculation, contenant les spermatozoïdes, sécrétés par les organes sexuels mâles après leurs maturation ; où est une combinaison de plusieurs fluides, dans lequel les spermatozoïdes sont maintenus en vie.

II.2. Physiologie du sperme des cyprinidés

D'après **Maisse (1990)**,

- Le sperme est un liquide blanc laiteux,
- Le volume d'un éjaculat, obtenu par pression des flancs d'un mâle mature, varie avec la taille de l'individu et avec l'avancement de la période de spermiation,
- Le nombre des spermatozoïdes par millilitre d'éjaculat varie de 10^9 à 30×10^9 spz,
- Le fluide séminal, dans lequel baignent les spermatozoïdes, représente plus de 80 % du volume du sperme,
- Le pH varie entre 7,3 à 8,3,
- L'osmolarité est variable d'un éjaculat à l'autre pour le même animal (de moins de 100 à plus de 300 mOsmoles,
- Les principaux ions sont : **Na, K, Ca, Mg et Cl.**

II.3. Caractéristiques générales des spermatozoïdes des cyprinidés

Selon **Sonja et al., (2009) et Maisse (1990)**, le spermatozoïde des cyprinidés déférant de celle des vertébrés de point de vue morphologique et anatomique est caractérisé par :

- La tête qui est sans acrosome et ovoïde,
- La pièce intermédiaire est d'environ de forme cylindrique, imprégné par la voie cytoplasmique, qui est une invagination de plasmalemme, comme elle contient des mitochondries, qui sont sphériques, ovoïdes, ou en forme de «C» contient aussi des vacuoles,
- Uni-flagellé et asymétrique, comme ils se composent de neuf périphérique et une paire centrale de microtubules, latéralement inséré au noyau,
- Noyau de forme ovoïde,

- Une double membrane qui manque de pores nucléaires,
- L'immobilité dans le liquide séminal liée à la présence de certains ions (K^+ , Ca^{2+} ...etc.) est la première condition de l'activation,
- Faible durée de la motilité qui est due à l'incapacité de la mitochondrie à compenser rapidement les pertes en ATP,
- Les spermatozoïdes des poissons d'eau douce sont immobiles dans le tractus génital et le liquide séminal, ne deviennent mobiles qu'après leur libération dans le milieu externe (**Poupard et al., 1998 ; Billard, 1986**)(figure 03).

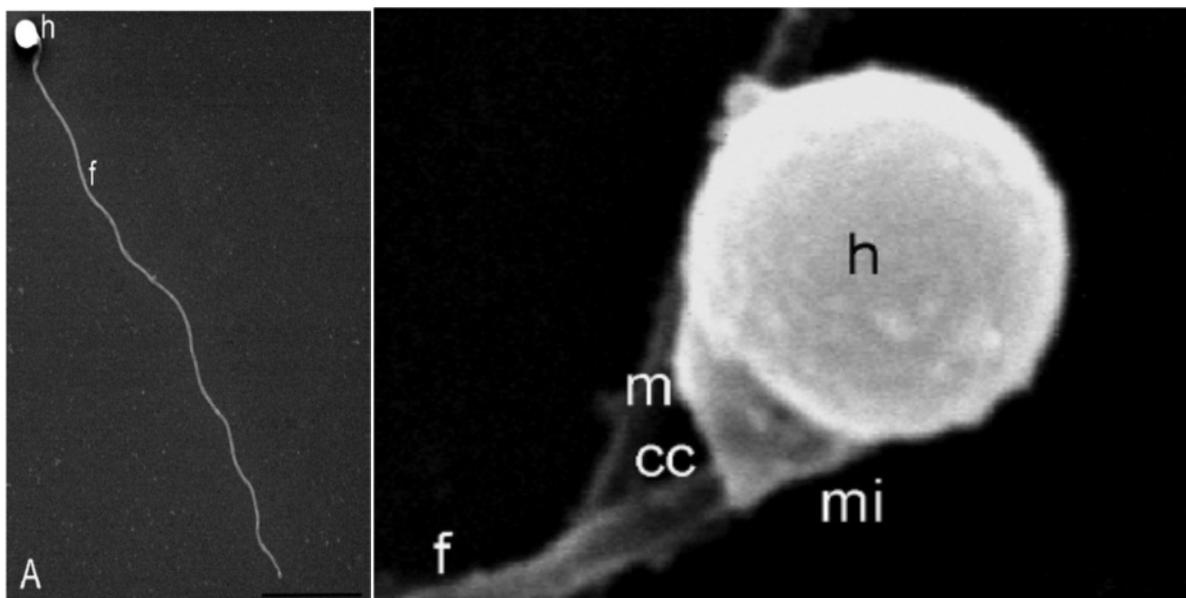


Figure 03 : Spermatozoïde des cyprinidés h : tête, f : flagelle, mi : pièce intermédiaire, m : mitochondrie, cc : canal cytoplasmique (**Sonja et al., 2009**)

II.4. La mobilité spermatique

Chez les poissons marins, c'est le passage dans un milieu hyperosmotique (> 300 mOs-moles) qui provoque la mise en mouvement des spermatozoïdes ; par contre le passage dans un milieu hypoosmotique qui provoque l'activation des spermatozoïdes des poissons d'eau douce comme la carpe, le barbeau...etc. (**Maise, 1990**).

Ces caractéristiques entraînent un certain nombre de recommandations au niveau de la pratique piscicole, et la mise au point des dilueurs de fécondation, de conservation à court terme et de congélation.

III. La pollution de l'eau

D'après **Ursula (2003)**, la pollution est devenue la grande menace qui détruit l'environnement. Particulièrement, la pollution aquatique est la cause majeure de l'infertilité chez les poissons. Il s'est ainsi avéré que des toxines avaient un impact direct sur le flagelle des spermatozoïdes. Selon **Kime et al.(1996)**, les Polluants ont une influence sur la reproduction des poissons où ils modifient la motilité et la qualité des spermatozoïdes durant leurs maturations, stockage, et l'éjaculation, ainsi **Kime (2000)**, a éprouvé qu'en biotechnologie la présence des polluants dans le milieu de conservation réduire les performances des spermatozoïdes.

III.1. Effets de quelques types des polluants sur le sperme des poissons

Plusieurs types des polluants qui affectent l'environnement aquatique et l'exposition directe du sperme aux contaminants, par l'activation du sperme dans l'eau polluée a montré des ruptures qui sont en grande partie inconnus mais peuvent provoquer des dommages au plasma membranaire, et à l'axonome de sperme, et la consommation rapide d'ATP. (**Ethan 2014**).

a. Les Métaux lourds

D'après **Kayalto (2009)**, le plomb, cadmium, zinc, et le mercure sont les métaux lourds considérés des produits toxiques les plus dangereux qui altèrent la cellule spermatique.

➤ le plomb

D'après **Ebrahimi et al., (2009)**, le plomb peut causer quelques effets nuisibles sur la santé, la reproduction et la fécondité des populations de poissons, indirectement par l'intermédiaire de l'accumulation des organes reproducteurs induire des changements histologiques et pathologiques ou directement par l'action sur le sperme diminuant leur qualité par exemple :

- La baisse des hormones sexuelles,
- La baisse des paramètres spermatiques,
- Une augmentation du délai à concevoir,
- Une baisse du taux de fécondité; un taux plasmatique du plomb > 45 µg/l implique une altération du sperme et de la fertilité.

➤ **Le cadmium**

- Un taux élevé de cadmium était corrélé à la baisse de la mobilité, de la concentration, et une modification de la morphologie des spermatozoïdes (**Kayalto, 2009**).
- Dans les poissons traités avec Cadmium, il y avait une réduction significative de la taille du locus spermatique une fois comparé à la commande, ces changements sont plus cruciaux dans des concentrations plus élevées (**Yathiender et al., 2013**).
- Le cadmium peut mener quelques dommages pathophysiologies des gonades qu'ont une influence sur la spermatogenèse (**Annabi et al., 2013**).

➤ **Le mercure**

D'après **Abascal, et al., (2007)**, son attachement aux enzymes sulfhydrylique-dépendantes impliquées dans la motilité de sperme pourrait causer la rupture ou le vrillage du flagelle, ou pourrait interférer le glissement de microtubule et l'affaiblissement de la production énergétique mitochondrique et une diminution des paramètres de motilité à des concentrations très petites. L'autre cible de mercure pourrait être la protéine de canal de l'eau, ces protéines de transmembranaires pourraient être directement responsables du rajustement osmotique qui a lieu quand des spermatozoïdes sont livrés dans le milieu environnant ceci mènerait au rétrécissement de la membrane de flagelle.

➤ **Le zinc**

- Ce métal lourd était moins nocif sur les vitesses spermatiques et peut éliminer les ions de calcium des accepteurs spécifiques dans le sperme, d'ailleurs, l'analyse assistée par ordinateur a démontré que le zinc a eu l'influence inhibitrice plus forte sur VSL (velocity straight line), suggérant la possibilité de son impact négatif sur le taux de fertilisation. (**Jarostaw, 2000**).

b. Sels et éléments organique

Schoenfuss et al. (2008), ont trouvé un déclin marqué dans l'activation et à la motilité de sperme suspendu dans divers solutions isotoniques composées de NaCl et de KCl, indiquant que les concentrations accrues en potassium augmentent réellement la motilité de sperme. d'après **Cosson(2004)**, l'hypermotilité des spermatozoïdes des poissons déclenchés dans un environnement à des concentrations ioniques élevées est exprimée par une brève

fréquence élevée de battement, une vitesse élevée et par conséquent une consommation d'énergie rapide, il existe aussi des composants organiques xenobiotiques expérimentés par **Monia et al., (2014)**, qui sont composé des produits chimiques tel qu'une drogue ou un pesticide qui affectent la fertilisation, le développement embryonnaire, la différenciation sexuel, la spermatogenèse, la maturation finale, ovulation ou spermiation, et pour cela **Abascal et al., (2007)**, ont déclaré qu'il est de plus grande importance de définir avec précision les conditions en lesquelles le sperme est activé.

IV. Technologie de la conservation du sperme de poisson

IV.1. Conservation à court terme (Réfrigération)

La conservation à court terme est une opération relativement simple, comportant le maintien de la laitance sur la glace ou dans un réfrigérateur, à des températures entre 0 et 10°C (**Harvey et Hoar, 1980**). Les spermatozoïdes peuvent supporter un refroidissement de courte durée, à quelques degrés au-dessous de zéro. La meilleure température pour la conservation du sperme paraît être (3-5°C) au-dessus de (0°C) (**François, 1946**), prenant en considération que la qualité de sperme jauger par leur durée de motilité et l'aptitude à se mettre en mouvement après stockage à 4°C (**Billard et al., 1977**).

IV.2. Conservation à long terme (congélation)

D'après **Legendre et Billard (1980)** et **Bakhach et al., (2007)**, la conservation à des très basses températures, souvent dans l'azote liquide à (-196°C) ou carboglace à (-79°C), dans laquelle toutes les réactions chimiques, les processus biologiques et les interactions physiques intra et extracellulaires sont figés (**figure 04**).

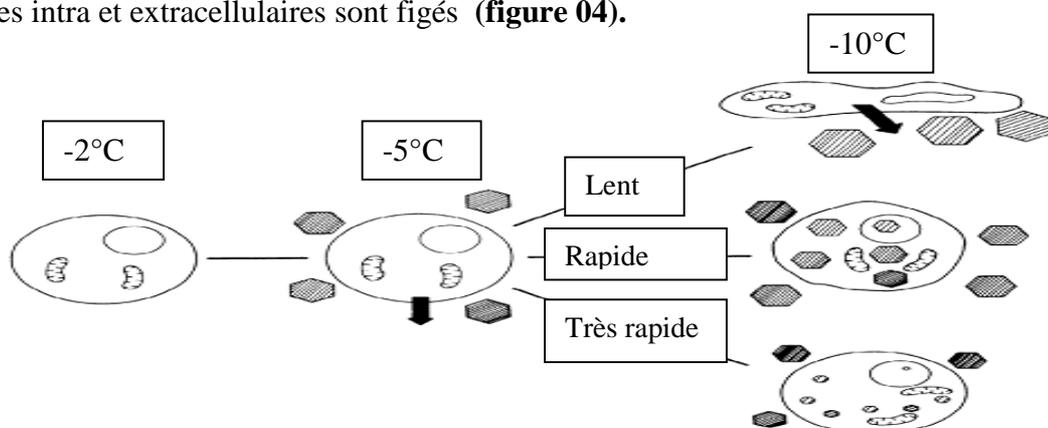


Figure04 : Événement physique produit pendant la conservation d'une cellule (**Bakhach et al., (2007)**).

IV.3. Protocole de conservation du sperme des Cyprinidés :

D'après **Brizard et al., (2004)** et **Rimet (2012)**, la technique de conservation du sperme suppose sur la maîtrise des différentes étapes suivantes :

- 1) Préparation des reproducteurs,
- 2) Collecte de la laitance,
- 3) Evaluation de la qualité de la semence prélevée,
- 4) Dilution de la semence dans un diluant,
- 5) Conservation du sperme soit : par la réfrigération ou par la congélation.

IV.3.1. Préparation des reproducteurs

Les géniteurs en provenance des piscicultures, ou par la pêche au niveau des rivières, sont stockés au laboratoire, dans un circuit fermé d'eau recyclée et certaines variables doivent être mesurées sur le terrain, de même qu'en laboratoire, la température, la concentration d'oxygène dissous, le pH, la conductivité spécifique...etc. (**CCME, 2011**).

IV.3.2. Collecte de la laitance

Legendre et Billard(1980) ont proposé une méthode pour la collecte de la laitance où la papille génitale de poisson vivant est séchée, pour éviter la contamination de la semence par l'urine ou par l'eau, et la laitance émis par pression abdominale est recueilli dans le tube à essai (**figure 05**).

- Le prélèvement de la semence sur le poisson vivant (**Robeck et al., 1994**),
- Les semences récoltées sont soit mélangées par groupes, soit individuel et maintenues à une température ambiante jusqu'à le traitement (**Sanchez et Billaard. 1977**).

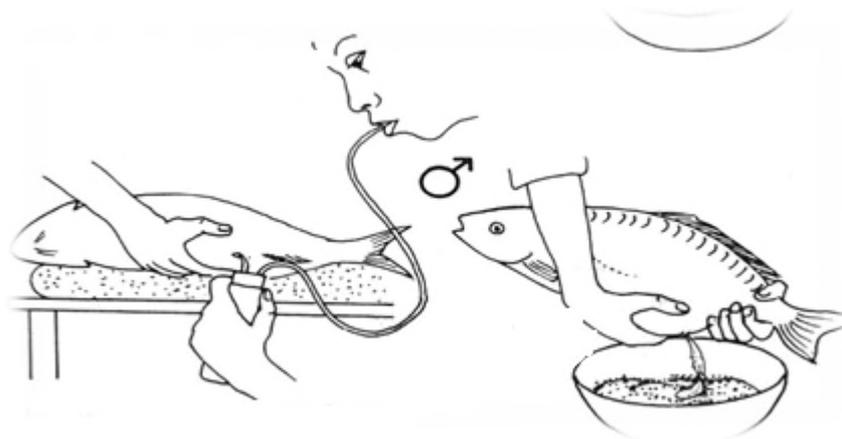


Figure 05: Technique d'extraction manuelle de la laitance de poisson (**FAO, 1981**)

IV.3.3. Evaluation de la qualité de la semence prélevée

D'après **Robeck et O'brien (2004)**, l'évaluation qualitative de la semence doit être effectuée dans les 30 minutes suivant la collecte. Les méthodes sont standardisées, pour évaluer le volume et le pH de l'éjaculat, sa concentration, la morphologie et la motilité des spermatozoïdes, ainsi que leurs viabilités. Selon **Kalbassi et al., (2012)**, la caractéristique qualitative la plus importante des spermatozoïdes est la **motilité**, c'est pourquoi depuis 1990, les chercheurs ont employé la méthode d'analyse de qualité de sperme et d'évaluation par l'ordinateur (CASA) pour évaluer différents paramètres de mouvement des spermatozoïdes (**figure 06**).

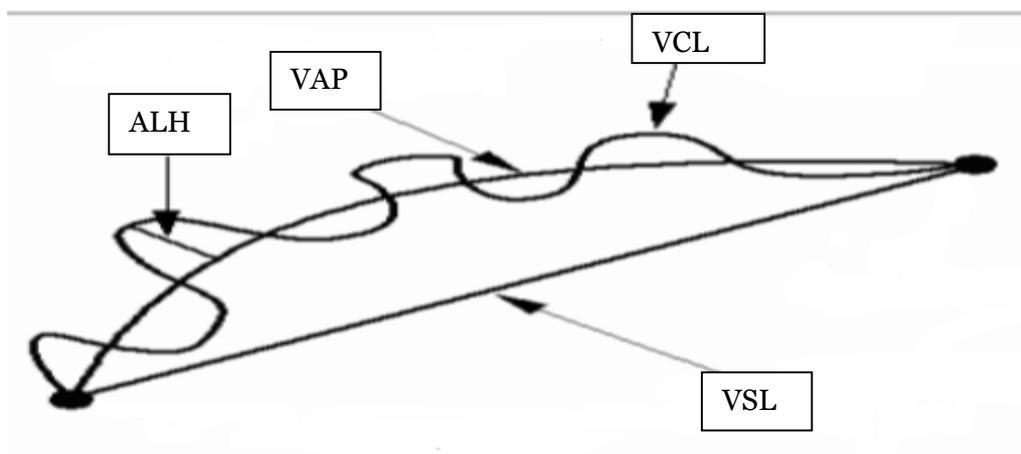


Figure 06 : Arrangement de mouvement des spermatozoïdes (**Kalbassi et al., (2012)**).

VSL (Velocity Straight Line) : C'est la vitesse progressive en $\mu\text{m/s}$ qui correspond à la distance parcourue par le spermatozoïde du point de départ au point d'arrivée (en traçant une ligne rectiligne) pendant un temps donné et qui est le même que celui considéré pour le VCL.

VCL (Velocity Curvilinear) : C'est la vitesse curvilinéaire calculée en $\mu\text{m/s}$ considérant la distance totale parcourue par la tête spermatique pendant un temps déterminé.

VAP (Velocity Averag Path) : C'est la vitesse selon la trajectoire moyenne calculée à partir du trajet de la VCL.

BCF (Beat Cross Frequency) : C'est la fréquence de rotation de la tête du spermatozoïde (fréquence de battement). Moyenne de la fréquence (dans le temps) à laquelle la trajectoire curviligne croise la trajectoire moyenne en Hz.

ALH (Averag Lateral Head) : Amplitude moyenne du mouvement latéral de la tête (μm). C'est l'impotence du déplacement latéral de la tête par rapport à sa trajectoire moyenne, il s'exprime comme déplacement moyen.

Selon **Brizard et al.,(2004)**, la lecture de motilité est variable selon les auteurs et l'échelle de Legendre et Billard 1980 (**tableau 02**) est le plus utilisée.

Tableau 02 : Echelle arbitraire pour exprimer la motilité des spermatozoïdes (**Brizard et al., 2004**).

Valeur	Observations
5	Tous les spermatozoïdes se déplacent vigoureusement: impossible de fixer la vue sur aucun d'entre eux.
4	La majorité des spermatozoïdes se déplace encore rapidement : seuls quelques-uns sont visibles du fait de leur déplacement plus lent
3	Les spermatozoïdes présentent trois comportements(en nombre égal) <ul style="list-style-type: none"> - soit ils se déplacent vigoureusement, - soit ils se déplacent lentement. - soit ils sont immobiles.
2	Peu de spermatozoïdes se déplacent rapidement : quelques-uns se déplacent lentement. La majorité des spermatozoïdes sont immobile.
1	Seuls quelques spermatozoïdes ont une légère agitation.
0	Tous les spermatozoïdes sont immobiles.

IV.3.4. Dilution de la semence

Différents dilueurs de la laitance de poisson d'eau douce ont été proposés pour les utiliser dans la conservation qui permet la protection des spermatozoïdes contre les chocs thermiques et les phénomènes de cristallisation. De plus, les diluants sont une source d'énergie pour les cellules et permettent le maintien d'un milieu de survie temporaire pour les spermatozoïdes (**Purdy, 2006**).

➤ Dilueurs proposé pour la conservation du sperme des poissons d'eau douce

Selon **Legendre et Billard, (1980)** ; **Sanchez et Billard, (1977)**, différents dilueurs du sperme de poisson d'eau douce ont été proposés (**Tableau 03 et 04**).

Tableau 03 : Milieu de MOUNIB, 1980 en (mM/l)

Saccharose	125 mM/l
Glutathion réduit	6.5 mM/l
Bicarbonate de potassium	100 mM/l
pH	7,57 mM/l

Tableau 04 : Milieu de Billard et *al.*,(1974) ; Trus-cottet et *al.*, (1968) ; Billard(1975)

Dilueurs	(Billard et al., 1974)	(Trus-cottet et al., 1968)	(Billard, 1975)
NaCl	5,775 g/l	1,88 g/l	5,55g/l
CaCl ₂ .H ₂ O	0,237 g/l	0,23 g/l	0,06 g/l
KCl	1,886 g/l	7,20 g/l	2,236 g/l
NaH ₂ P ₀₄ .H ₂ O		0,41 g/l	
NaHC ₀₃		1,00 g/l	
MgS ₀₄ .7H ₂ O	0,243g/l	0,23 g/l	0,06 g/l
Glucose		1,00 g/l	
Tampon (nature et volume)	glycocolle 0,02 M Tris 0,02 M 10 %	Glycolle 0,02 M Tris 0,02 M 10 %	Hepès-NaOH 0,04 M5 %
Pression osmotique finale	255 mOsmole	261 mOsmole	250 mOsmole
pH	9,0	9,0	9,0

Des essais de développer une méthode uniforme de la cryoconservation du sperme pour quatre espèces de poissons cyprinidés (le gardon, la brème, la brème argent, et le barbeau), le sperme a été congelé dans la vapeur d'azote liquide, en présence de cinq agents dans le diluants : 1) fructose ; 2) glucose ; 3) saccharose ; 4) KCL, plus le Tris pour chaque'un de ces diluants à PH 8,0 ; 5) l'agent d'allongement de modification Kurokura. Avec deux cryoprotecteurs : 10% de méthanol (MeOH) et 10% de diméthyl-sulfoxyde (DMSO), La maximale motilité après décongélation est le gardon ($77 \pm 6\%$), la brème ($77 \pm 6\%$), la brème argent ($67 \pm 5\%$), et le barbeau ($75 \pm 6\%$) (**Horvath et al, 2006**).

D'après **Lahnsteiner et al. (2000)**, les spermatozoïdes de l'ablette, *Chalcoides Chalcalburnus*, ont été utilisés comme modèle de base pour décrire : la toxicité et les effets cryoprotectrices des cryoprotectants internes et externes, de leurs efficacités, et des combinaisons de concentration, les conditions de congélation et de décongélation, ainsi que les effets d'équilibration, pour élaborer un protocole de conservation de sperme de barbeau.

Pour toutes les espèces étudiées, la composition optimale d'extension était:

- Un tampon,
- Solution saline de la motilité des spermatozoïdes,
- L'inhibition physiologique contenant 10% de DMSO et 0,5 % glycine,
- La période d'équilibrage optimal de spermatozoïde dans l'agent d'allongement était de 55 min,
- La Congélation était effectuée dans un boîtier isolé dans la vapeur de l'azote liquide et il est optimal de 4 à 5 cm au-dessus de la surface du l'azote liquide,
- Le dégel était optimal à 25 °C,
- Le temps de décongélation de 15 à 45 seconds,
- Le temps de congélation et décongélation lié à l'espèce utilisé.

Généralement, les diluants de conservation de la semence sont composés des cryoprotectants non pénétrants et pénétrants, d'un tampon, d'un ou plusieurs sucres, de sels et d'antibiotiques.

a) Cryoprotectants

Les diluants de conservation de la semence sont composés des cryoprotectants pénétrants et non pénétrants tels que, Polyéthylène glycol (PEG), Cholestérol, diméthylsulfoxyde, éthylène-glycol ou glycerolméthanol (MeOH), propylène glycol, jaune d'œuf, lait...etc. (**Evans et Maxwell, 1987**). Il faut prendre en considération le choix de type et la concentration optimale de cryoprotecteur utilisé, car ils sont souvent toxiques pour les cellules (**Chiang et AbdRashid, 2012**).

a.1) Cryoprotectants pénétrants

D'après **Tselutin et al., (1999)**, l'une des étapes les plus critiques dans la conservation du sperme, est le choix du cryoprotectant pénétrant et de son utilisation pendant le processus. le polyéthylène glycol (PEG), Choléstérol, diméthylsulfoxyde (DMSO), glycérol, et dimethylacetamide (DMA), ont été employées comme cryoprotectant pour obtenir des niveaux acceptables de fertilité.

- **Diméthylsulfoxyde ou DMSO** : le DMSO est un liquide organique peu volatil, incolore et inodore, au goût doux-amer,
 - Le DMSO est un agent de conservation à basse température des composés biologiques sensibles à la congélation, qui sont altérés par la formation des cristaux de glace,
 - Il permet, en pénétrant et en désorganisant ces cristaux de conserver ces matériaux sous 0° C sans les dégrader (**Denis et al., 2002**),
 - Il produit les meilleurs résultats, avec des concentrations optimum de l'ordre de 8 à 10 % (**Zell et al., 1979 ; Iwata et al., 1989 ; Bougrier et Rabenomanana, 1986 ; Kurokura et al., 1990 ; Yankson et Moyse, 1991 ; Chao et Liao, 2001**),
 - Le DMSO a été plus efficace, et sa pénétration rapide dans les cellules, limite la durée d'équilibration immédiatement après dilution du sperme (**Legendre et Billard, 1980**).
- **Polyéthylène glycol ou PEG** : Sont des polyéthers linéaires de faible masse molaire fabriqués à partir de monomères d'éthylène glycol, et soluble dans l'eau, le toluène, le dichlorométhane, l'alcool et l'acétone mais n'est pas soluble dans les hydrocarbures aliphatiques comme l'hexane, le cyclohexane ou le diéthyléther,
 - Leurs propriétés hydrosolubles en font des produits utilisés dans un grand nombre d'industries (médical, cosmétique...etc.),

- Il n'est pas biodégradable mais bioéliminable par filtration rénale, c'est un produit dont les effets de toxicités à des concentrations très élevées.
- **Cholestérol** : est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus. Une relation existait entre le cholestérol et le phospholipide du spermatozoïde (CHO/PL) :
- c'est un composant majeur des membranes cellulaires animales qui contribue à leur stabilité et au maintien de leurs structures en s'intercalant entre les phospholipides (formant la bicouche de la membrane).
- Il rigidifie la membrane car il empêche sa gélification en évitant la cristallisation des acides gras, et diminue la perméabilité membranaire aux molécules hydrosolubles.
- Il a un rôle de « tampon thermique » : à 37°, il limite le mouvement des phospholipides, donc la fluidité membranaire diminue ; à des températures plus basses, il empêche l'entassement des phospholipides....

a.2) Cryoprotectants non pénétrants

Les cryoprotectants non pénétrants tel que le jaune d'œuf et le lait, ne traversent pas la membrane plasmique du spermatozoïde. Ils enrobent les cristaux de glace formés par la congélation à l'extérieur de la cellule, et protègent les spermatozoïdes des déformations et lésions cellulaires. La présence des cryoprotectants non pénétrants augmente la concentration ionique du milieu extracellulaire et crée un gradient de concentration qui favorise la déshydratation du spermatozoïde ce qui retarde la formation de glace intracellulaire (**Purdy, 2006**).

b) les Sucres

Le glucose et le fructose sont des sucres simples, monosaccharides, qui peuvent traverser la membrane plasmique du spermatozoïde (**Purdy, 2006**). Le type de sucres et sa concentration dans le diluant vont faire grandement varier l'osmolarité du milieu (de 6 à 375 mM) (**Salamon et Ritar, 1982**).

c) les Sels

Le choix des solutions minérales (NaCl, CaCl₂, H₂O, KCl, MgSO₄·7H₂O, NaH₂PO₄·H₂O...etc.) à la base des sels les plus adaptés avec la composition minérale du fluide séminal de l'espèce étudiée (**Stein et Bayle, 1978**), les sels contribuent au maintien d'un milieu osmotique favorable pour les cellules et pour éviter la déshydratation.

d) Les lipoprotéines

Elles se lient à la membrane plasmique et en assurent une meilleure stabilité pendant la congélation-décongélation du sperme (**Harvey, 1983**), comme le cas de jaune d'œuf.

e) Les tampons

L'ajout de composés tamponnés dans les diluants a un impact sur la qualité de la semence. La solution prolongateur est un tampon de sel équilibrée de pH spécifique et de la force osmotique dont la nature de leur effet est de contrôler le pH, la concentration des sels et la fourniture d'énergie (**Chiang et AbdRashid, 2012**).

f) Les antibiotiques

Les cryoprotectants permettent non seulement la conservation des Cellules, mais aussi de les protéger des bactéries. il est donc nécessaire d'ajouter des antibiotiques au diluant de la semence pour freiner la propagation des bactéries (**Geneviève, 2012**). Nous distinguons plusieurs types d'antibiotiques, pénicilline, gentamicine, ciprofloxacil, ... (**Mohammedi, 2012**).

g) Les antioxydants

Plusieurs types d'antioxydants sont ajoutés aux milieux de conservation pour tenter de limiter les dommages de stress oxydants lié à la conservation de sperme (**Grignard, 2005**). parmi ces dernières, Catalase, Glutathion peroxydase, Superoxyde dismutase, Taurine, l'ergothionéine, vitamine E. (**Catherine et al., 2003**).

- Vitamine E est un antioxydant qui favorise la diminution de peroxydation des lipides membranaires insaturés des spermatozoïdes lors de la conservation (**Labbé et al., 2003**).

h) Le cyclodextrines

Sont des oligosaccharides cycliques composés d'unités de glucose ; il se comporte comme un cryoprotecteurs dans le milieu de conservation. les cyclodextrines (CD) peuvent former des complexes d'inclusion hydrosolubles avec les lipophiles insolubles dans l'eau comme la vitamine E (**Sergey et al., 2011**).

IV.3.5. Conservation du sperme

IV.3.5.1. Conservation du sperme par la réfrigération

La différence dans cette méthode par rapport à la méthode de congélation c'est qu'elle présente un double avantage d'être aisément accessible et réalisable et qu'elle ne nécessite par les méthodes complexes et reste peu coûteuse. Le principal inconvénient de cette technique c'est qu'elle ne permet qu'une conservation de la semence à court ou moyen terme, contrairement à la congélation qui permet de conserver indéfiniment la semence (**Levillan, 2005**).

Selon **Sanchez et Billard (1977)** ; **Paméla et Virginie (2008)** la réfrigération se déroule en ces étapes :

- Le sperme prélevé est transporté en chambre froide (+2°C) pour l'équilibrage de température,
- Après équilibration de la température on effectue les dilutions avec les différents milieux tamponnés par exemple à pH 9.0 et 5 % de cryoprotecteur, soit : 2,5 ml de sperme + 0,25 ml de cryoprotecteur,
- Le mélange est laissé une heure à 2°C puis il est placé dans un réfrigérateur au -4°C.

IV.3.5.2. Conservation du sperme par la congélation

Généralement la congélation de sperme se déroule en trois phases :

a) phase de refroidissement

D'après **Réviers et Sauveur (1988)** :

- Le sperme ainsi dilué et placé à l'obscurité à -4° C à l'état non congelé,
- pendant cette phase la pénétration des cryoprotecteurs dans les spermatozoïdes permet d'évacuer l'eau de l'intérieur des cellules vers l'extérieur, ce qui empêche la formation des cristaux volumineux pendant la congélation,

Taux de refroidissement : d'après **Robeck et al.,(2011)**, trois taux de refroidissements sont proposés :

- ❖ Refroidissement lent : $-10,70^{\circ}\text{C. min}^{-1}$. Les paillettes sont maintenues pendant 10 minutes à une hauteur de 13,5 cm au-dessus de la cuve d'azote liquide puis immergées.
- ❖ Refroidissement moyen : $-14,62^{\circ}\text{C. min}^{-1}$. Les paillettes sont maintenues pendant 5 minutes à une hauteur de 13,5 cm au-dessus de la cuve d'azote liquide, puis 5 minutes à une hauteur de 4,5 cm avant d'être immergées.
- ❖ Refroidissement rapide : $-15,20^{\circ}\text{C. min}^{-1}$. Les paillettes sont maintenues pendant 10 minutes à une hauteur de 4,5 cm au-dessus de la cuve d'azote liquide puis immergées.

b) La phase de conditionnement

Le but de conditionnement est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable.

- La méthode de congélation avec les paillettes dans l'azote liquide peut s'effectuer de façon manuelle sur les vapeurs d'azote liquide ou avec une machine qui contrôle le taux de refroidissement,
- Après avoir rempli les paillettes avec la semence, il faut former une bulle d'air à l'intérieur des paillettes pour éviter leur éclatement lors de la décongélation
- Les paillettes sont placées sur un support à 5-7 cm au-dessus de la vapeur d'azote liquide,
- Lorsque la température, qui ainsi mesurée reste proche de celle du sperme, atteint -30°C . le plateau supportant les paillettes est immergé dans l'azote liquide (-196°C),
- Le taux de diminution de la température devrait être assez lent pour permettre à l'eau de quitter la cellule, mais assez rapide pour empêcher la formation des cristaux intracellulaires (**Legendre et Billard , 1980**).

c) La phase de congélation

Les paillettes sont placées dans un congélateur conditionné pour les congeler de 5 à -35°C (**Tselutin et al., 1999**).

d) Le stockage du sperme congelé

- Une fois congelé, les paillettes sont rapidement groupées par des lots expérimentaux dans des tubes à hémolyse préalablement refroidis par contact avec la carboglace, placés en canister puis immédiatement immergés dans l'azote liquide.
- Les paillettes sont également placées en canister et transférées dans une bonbonne de stockage, le niveau d'azote liquide dans la bonbonne est régulièrement complété (tous les 15 jours) (**Legendre et Billard, 1980**).

e) La décongélation de la semence

Le processus de décongélation de la semence en paillettes s'effectue dans le Bain-marie. Cependant, la température et la durée de décongélation diffèrent selon les chercheurs, ainsi, la décongélation de la semence en paillettes à 37°C pendant 12 à 30 secondes permettrait une meilleure motilité qu'une décongélation à 5°C pendant 2 minutes, dans le même ordre. Une décongélation à 70°C pendant 7 secondes donnerait de meilleurs résultats de motilité et d'intégrité membranaire qu'une décongélation à 37°C pendant 2 minutes, ou 40°C pendant 20 secondes (**Tuli et al., 1991**).

V. Facteurs influencent sur la conservation du sperme

1. Stress osmotique

Au cours de la congélation des spermatozoïdes, la formation de cristaux extracellulaires augmente l'osmolarité de l'eau intracellulaire et provoque sa sortie et la déshydratation de la cellule. Les cryoprotectants sont très importants pour empêcher la formation de cristaux intra et extracellulaires (**Medeiros et al., 2002**).

2. Chocs thermiques

On appelle chocs thermiques les changements rapides de température allant essentiellement de 35 à 15° C et de 0 à -80° C (**Bakhach et al., 2007**). Ces variations de température créent des changements de l'arrangement des constituants lipidiques membranaires et mènent à l'altération des fonctions métaboliques du spermatozoïde, il s'ensuit d'une perte de motilité et de perméabilité sélective de la membrane au calcium (**Medeiros et al., 2002 ; Bakhach et al., 2007**).

3. Stress oxydant :

La cryoconservation induit un stress oxydant qui entraîne une altération de la membrane plasmique par lipoperoxydation ainsi que la fragmentation d'ADN (**Grignard, 2005**).

4. Effet de choix et de la concentration des dilueurs

Le sperme représente une sensibilité envers les types des dilueurs utilisés ces derniers peuvent jouer un rôle négatif sur la viabilité des spermatozoïdes, l'incubation du sperme dans différents diluants montre qu'ont un effet significatif sur la motilité et la vitesse des spermatozoïdes (**Ian et al., 2013**).

VI. Avantages de conservation du sperme de poisson

Le développement des programmes de sélection génétique en pisciculture et la protection de la biodiversité de l'ichtyofaune sauvage justifient la création de cryobanques de sperme et d'embryons de poissons (**Maisse et al., 2011**). La conservation de sperme de poisson offre de nombreux avantages tant du point de vue de l'expérimentation que de la pratique piscicole : transport du sperme, croisement et hybridation, simplification du travail des opérations d'insémination...etc. (**Sanchez et Billard, 1977**).



Chapitre II

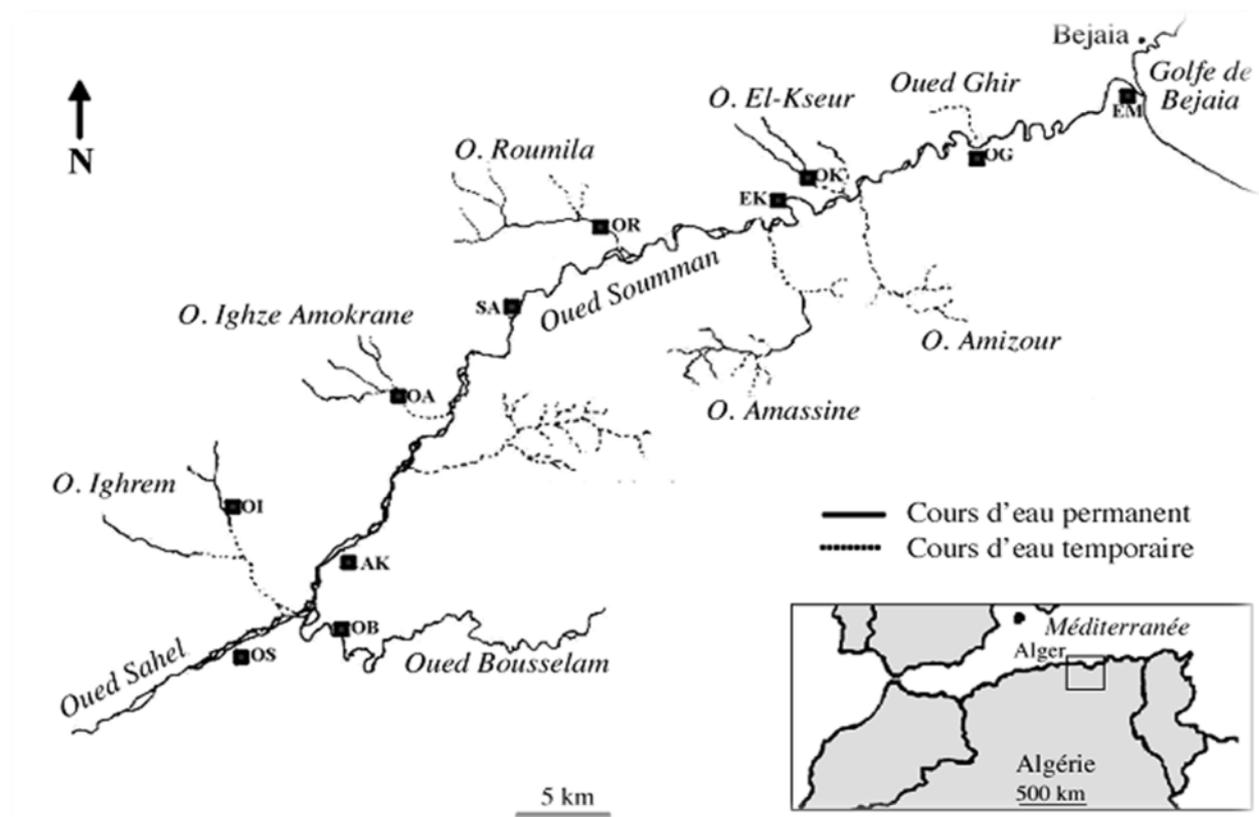
Dans ce chapitre nous allons présenter notre approche expérimentale et le matériel utilisé, notre travail a été effectué dans deux sites différents (Oued Aguerioun et Oued Soummam) sur un poisson d'eau douce ; le barbeau (*Barbus barbuis callensis*). Nous avons partagé notre travail à deux parties, travail de terrain et de laboratoire.

I. Travail de terrain

I.1. Présentation des deux sites d'études

I.1.1. Oued Soummam

Le bassin de la Soummam se trouve au nord de l'Algérie. Caractérise par la présence de deux plateaux (Bouira et Sétif), limité au nord par les montagnes de la grande Kabylie (massif du djurdjura), par la mer méditerranée et les chaînes côtières de la petite Kabylie. Au Sud, il est limité par les monts de Hodna, il fait partie des bassins versants tributaires de la méditerranée (**figure 07**), compose de 10 sous bassins versant, et s'étend dans la direction est-ouest, descendant dans la région du Sétif un peu vers le Sud. (Zouggaghe et al., 2014).



cybium2007,31(3)

Figure 07:Schéma représente le réseau principal et affluent de la Soummam (cybium2007).

I.1.2. Oued Aguerioun

L'oued Aguerioun traverse le tell Algérien selon les méridiens de kherrata. il est formé par la réunion de trois affluents : l'oued El Berain, l'oued Atteba, l'oued Embarak. il franchit la chaîne des Babors dans les gorges dites Chaàbat lakhra, par un trajet sud-nord perdant en 10 Km près de 400 m d'altitude afin de gagner le golfe de Bougie au niveau de la commune de Souk el tenine.

I.1.3. Echantillonnage

Une sortie par semaine a été effectuée pour chaque site d'étude. la pêche a été effectuée pendant la période de reproduction de *Barbus barbuis callensis* dès le 23/04/2014 au niveau des deux rivières, Oued Aguerioun et Oued Soummam.

Pour la pêche, nous avons utilisé un filet transparent d'une maille de 2 cm² et comme appât nous avons utilisé une pâte de semoule positionnée à l'extrémité fermée du filet puis nous effectuons des lancements. Nous avons constaté que le premier lancement est toujours fructueux avec un ou plusieurs individus pêchés et cela dès le contact du filet avec l'eau, cependant à partir de ce premier lancement la pêche devient de plus en plus difficile. Les individus pêchés sont mis dans un bidon en plastique rempli d'eau de l'oued avec des renouvellements de cette eau toutes les heures pour maintenir les individus vivants jusqu'à l'arrivée au laboratoire.

Tableau 05 : Nombre des sorties et des poissons pêchés au niveau d'oued Aguerioun et oued Soummam en 2014.

Sortie	Dat	Rivière	N.de males pêchés
1	23/04/2014	Aguerioun	01
2	24/04/2014	Soummam	01
3	30/04/2014	Soummam	02
4	01/05/2014	Aguerioun	01
5	06/05/2014	Soummam	02
6	12/05/2014	Soummam	01
7	19/05/2014	Aguerioun	01

I.1.4. Matériels utilisés

- Un filet transparent d'une maille de 2 cm².
- Une pâte de la semoule.
- Un bidon en plastique pour ramener le poisson vivant au laboratoire.

II. Travail de laboratoire

Dans cette partie nous avons analysé la semence récupéré par un analyseur informatique (CASA, Computer assisted sperm analysis).

Aujourd'hui, plusieurs analyseurs informatique sont disponible dans le marché, chaque analyseurs (CASA) différent d'un autre, soit par le mode de fonctionnement ou bien par la capacité à détecter et à mesurer la motilité des spermatozoïdes de différentes espèces (**Tijerina, et al, 2009 ; Wilson-Leedy et Ingermann, 2009**). Les systèmes CASA sont en mesure de déterminer une série de variables avec une évaluation objective de la qualité du sperme (quinze paramètres) (**Verstegen et al, 2002 ; Tijerina, et al, 2009**). Dans cette étude, nous s'intéressons seulement à la VSL, VAP, VCL, BCF et ALH.

La VSL (Velocity Straight Line) : C'est la vitesse progressive en $\mu\text{m/s}$ qui correspond à la distance parcourue par le spermatozoïde du point de départ au point d'arrivé (en traçant une ligne rectiligne) pendant un temps donné et qui est le même que celui considéré pour le VCL.

La VCL (Velocity Curvilinear) : C'est la vitesse curvilinéaire en $\mu\text{m/s}$ est calculée en considérant la distance totale parcourue par la tête spermatique pendant un temps déterminé.

La VAP (Velocity Averag Path): C'est la vitesse selon la trajectoire moyenne calculée à partie du trajet de la VCL (en $\mu\text{m/s}$).

La BCF (Beat Cross Frequency): C'est la fréquence de rotation de la tête du spermatozoïde (fréquence de battement) en (Hz). Moyenne de la fréquence (dans le temps) à laquelle la trajectoire curviligne croise la trajectoire moyenne.

L'ALH (Averag Lateral Head): Amplitude moyenne du mouvement latéral de la tête (μm). C'est l'impotence du déplacement latéral de la tête par rapport à sa trajectoire moyenne. il s'exprime comme déplacement moyenne.

II.1. La semence

Nous avons utilisé durant notre étude. Le sperme de poisson d'espèce *Barbus callensis* pêché des deux rivières, Aguerioun et Soummam. Dans notre cas le poisson est mis dans un circuit fermé d'eau douce recyclée au laboratoire de biologie animale (**figure 08, 09**). La semence a été récupérée par des massages abdominaux doux (**Gallego et al., 2013**).

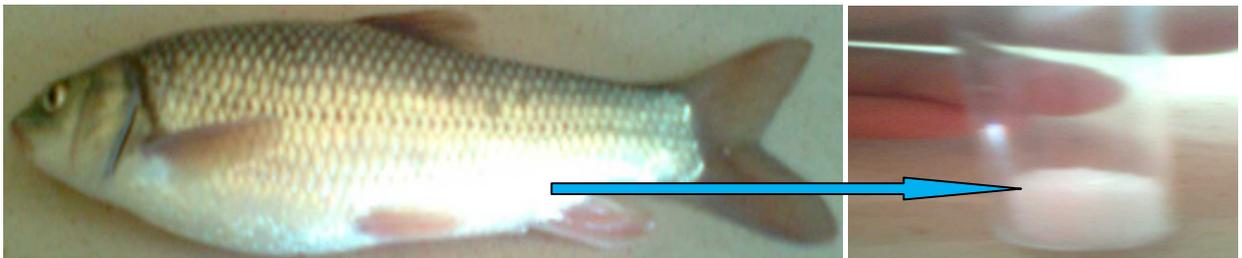


Figure 08 : L'espèce *Barbus barbus callensis*

Figure 09 : Echantillon de sperme

II.2. Le matériel utilisé

- Circuit fermé d'eau douce
- Tubes à essai
- Cellule de MAKLER
- Micropipette
- Microscope optique
- Chronomètre pour (la durée de la mobilité)
- Analyseur informatique du sperme (CASA)



Figure 10 : Analyseur informatique du sperme (CASA).

II.3. Analyse du sperme

La papille génitale de poisson vivant est séchée, les prélèvements ne doivent pas contaminer par l'urine ou par l'eau, et la laitance émise par pression abdominale est recueillie dans un tube à essai,

Nous avons préparé trois tubes, le premier pour le sperme de barbus, le deuxième pour l'eau d'oued Agueriou et le troisième pour l'eau d'oued Soummam,

- Puis nous avons disposé une goutte de sperme sur la cellule de MAKLER par la Micropipette puis, nous avons ajouté une goutte d'eau douce d'oued Agueriou sur le sperme disposée sur la lamelle de MAKLER,
- Ensuite nous avons analysés le sperme dilué sous un microscope optique par le système de CASA (Computer assisted sperm analysis),
- Les mêmes étapes sont répétées avec l'eau d'oued Soummam,
- Après nous avons calculé la moyenne de la durée de motilité des spermatozoïdes du sperme de poisson des deux rivières, Agueriou et Soummam,
- En fin nous avons comparé la concentration, la vitesse et la durée de motilité des spermatozoïdes pour les poissons des deux rivières Agueriou et Soummam à des périodes différentes pendant 10 s, 30 s, et 50 s.

III. La conservation du sperme de *Barbus barbuis callensis* par réfrigération

Au but d'optimisation de la conservation de sperme de barbeau, nous avons utilisé cinq milieux qui sont proposés pour la conservation de sperme bovin, mais nous avons utilisé la solution de NaCl (0.9%) comme diluant.

III.1. Le matériel utilisé

L'équipement utilisé pour la conservation de la semence de *Barbus* est composé, d'une centrifugeuse, un réfrigérateur.

III.2. La méthode de conservation

Nous avons préparé cinq milieux que nous avons comparés ces dernier à un témoin qu'est la vitamine E dilué dans 50 ml de solution NaCl,

Pour la préparation de ces mesures (1,2 mg vitamine E, 20 mg Cholestérol, 12 mg PEG/vitamine E, 200 mg PEG/Cholestérol, 180 mg PEG), nous avons utilisé une balance, puis nous avons dilué ces quantités dans la solution NaCl (0.9%).

Les composants des différents milieux sont présentés dans le (**Tableau06**) :

Tableau 06 : Milieux de conservation utilisé

Milieu	Contenus	NaCl (ml)
1 ^{re} milieu (contrôle)	1,2 mg vitamine E	50 ml NaCl
2 ^{eme} milieu	20 mg Cholestérol	5 ml NaCl
3 ^{eme} milieu	12 mg PEG/ vitamine E	10 ml NaCl
4 ^{eme} milieu	200 mg PEG/Cholestérol	5 ml NaCl
5 ^{eme} milieu	180 mg PEG	5 ml NaCl

Ensuite nous avons ajouté un barreau magnétique à chaque une de ces milieux, et mettant ces derniers sur un mélangeur (pour mélanger les composants des différents milieux) qu'est réglé à une vitesse entre 3 et 4 tours/seconde.

Après l'agitation pendant 90 heures, nous avons analysé la semence par l'analyseur de CASA après que nous avons:

- récolté la semence de l'espèce *barbus callensis*,
- testé la motilité des spermatozoïdes avec l'eau des deux rivières, activé 0.5µl de sperme par 500 µl d'eau, où nous avons observé les spermatozoïdes mobile,
- dilué 1µl du sperme dans 1 ml de chaque milieu,
- agité les tubes manuellement pour mélanger le sperme avec le milieu,

- posé 0.5µl de sperme dilué sur la lamelle de Makler et nous ajoutons 500 µl d'eau douce, où nous avons observé que les spermatozoïdes sont immobile dans les différents milieux,
- le sperme est centrifugé pendant 15 min (X 700g), pour séparer les spermatozoïdes, plus denses du plasma séminal.
- nous avons aussi augmenté la concentration spermatique dans les milieux de la conservation
- le sperme est analysé par le système CASA.
- après 24 heures à 4°C, malgré l'échec, nous avons répété l'analyse.
- Analyse de sperme par l'analyseur CASA.

IV. Analyse statistique du sperme

Les résultats obtenus par l'analyseur CASA sont analysé par un logiciel de statistique STATVIEW version 4.55 pour le traitement des données brutes. L'analyse de la variance est utilisée pour comparer les valeurs des différents paramètres spermatiques pour les poissons des deux rivières Aguerioun et Soummam.



Chapitre III

I. Evaluation des paramètres spermatiques

Pour l'optimisation de la conservation du sperme de poisson *Barbus barbus callensis*, nous avons commencé par l'analyse des paramètres spermatiques à l'état frais à l'aide d'un analyseur CASA qu'est en mesure de déterminer une série de variables avec une évaluation objective de la qualité du sperme. Cette étape est très importante car elle nous indique sur la qualité de sperme que nous voulons le conserver. Les paramètres que nous avons considérés sont la durée de motilité, la concentration spermatique et les différentes vitesses de la mobilité des spermatozoïdes.

I.1. La durée de motilité

Sur les **figures 11.a et 11.b**, nous avons présenté les durées de motilité des spermatozoïdes de barbeau activées dans l'eau des deux rivières (Aguerioun et Soummam).

Nous pouvons observer que la durée de motilité des spermatozoïdes de barbeau de la Soummam est plus importante que celle d'Aguerioun (52 et 40 seconds, respectivement).

D'autre part, nous pouvons observer que la durée de la mobilité de poisson d'Aguerioun diminue dans l'eau de la Soummam (42 à 38s). Par contre la durée de la mobilité des spermatozoïdes de poisson de la Soummam est plus importante dans l'eau de la Soummam qu'Aguerioun (**Figure 11.b**). Cette différence pourrait être due à la composition ionique dans les deux sites.

Chez les poissons téléostéens, le sperme est immobile dans les gonades, la motilité spermatique est induite par le contact de l'eau, cette dernière varie de quelques secondes à 1 h (**Billard et Cosson, 1989**). Chez les poissons d'eau douce la durée de la motilité est très courte (30-40s) selon les espèces (**Billard et al., 1995**). La mobilité progressive et la durée de la mobilité sont les deux paramètres les plus importants dans l'évaluation de la qualité du sperme chez les poissons (**Kime et al., 2001**).

Nos résultats sont proches aux résultats obtenus par **Abascal et al., (2007)** ; **Alavi et al., (2010)**, sur le loup de mer (*anarhichas lupus*); la carpe commune (*Cyprinus carpio*) et la perche fluviatile (*Perca fluviatilis*) (50s et 60s, respectivement). Supérieur à la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (20-25s) (**Billard et Cosson, 1989**); très faible par rapport à l'esturgeon (plusieurs heures) (**Toth et al., 1997**). Pour d'autres espèces la durée de la mobilité peut atteindre plusieurs minutes; chez le turbot (*Scophthalmus maximus*) elle varie de 1 à 17 min (**Sequet et al., 1994**), pour le tilapia (*Oreochromis mossambicus*) elle dépasse 30min

(Morita et al., 2003) et chez le maskinongé (*Esox masquinongy*) elle peut atteindre 120 min (Lin et Dabrowski, 1996).

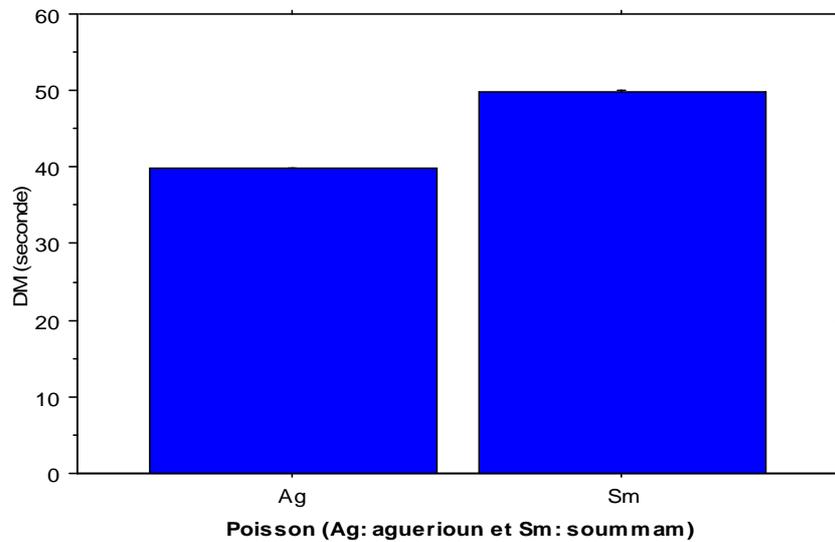


Figure 11.a : Histogramme de variation de la durée de la motilité spermatique (DM en secondes) en fonction de poisson de deux rivières (Aguerioun et Soummam): **Ag** (barbeau Aguerioun), **Sm** (barbeau Soummam).

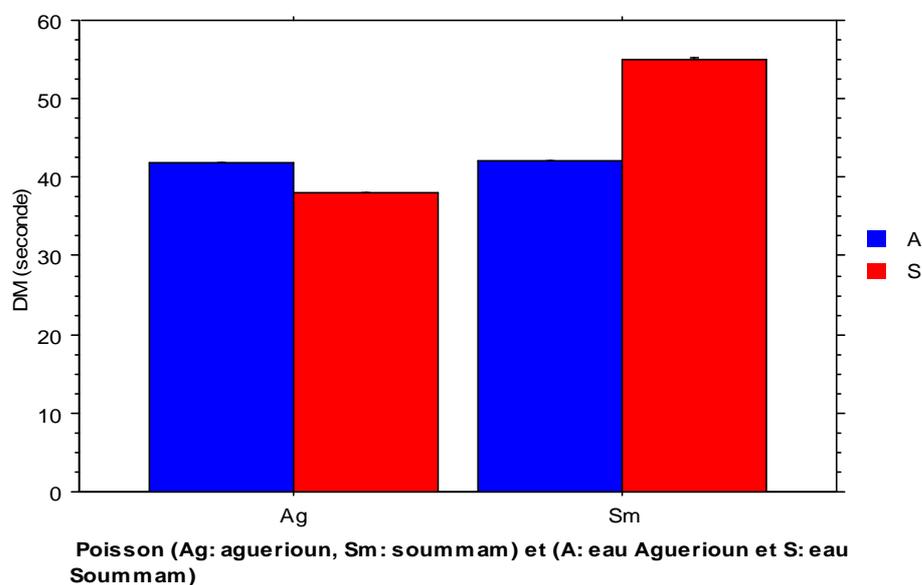


Figure 11.b : Histogramme de variation de la durée de la mobilité spermatique (DM en secondes) en fonction de poissons et de l'eau des deux rivières (Aguerioun et Soummam): **Ag** (barbeau Aguerioun), **Sm** (barbeau Soummam), **A** (l'eau Aguerioun), **S** (l'eau Soummam)

I. 2. La concentration spermatique

Sur les **figures 12.a et 12.b**, nous avons présenté les différentes concentrations spermatiques de barbeau (*Barbus barbus callensis*) des deux rivières (Aguerioun et Soummam). A partir des deux figures nous pouvons observer que la moyenne de la concentration spermatique des poissons d'Aguerioun est plus importante que les poissons de la Soummam (37 et 25×10^9 spz.ml⁻¹). Notre résultat est supérieur au résultat rapportées par **Alavi et al., (2008b)** pour le barbeau fluviatile (*Barbus barbus*) où les concentrations varient entre $12,45 \times 10^9$ à $18,81 \times 10^9$ spz.ml⁻¹. chez d'autre cyprinidae la perche (*perca fluviatilis*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), tilapia sp, la tanche et le barbot la concentration varie entre $3,3$ à $43,9 \times 10^9$ spz.ml⁻¹; $10-25 \times 10^9$ spz.ml⁻¹, $0,8-27,4 \times 10^9$ spz.ml⁻¹; $4,2-34,6 \times 10^9$ spz.ml⁻¹ et $23,3-59,3 \times 10^9$ spz.ml⁻¹ (**Alavi et al., 2010 ; Billard et al., 1971 ; Chao et al., 1987 ; Linhart et Krasnicka, 1992 ; Piironen et Hyvarinen, 1983**), respectivement.

Notre résultats sont proche à certain poisson d'eau de mer tels que le flétan atlantique (*hippoglossus hippoglossus*) et le croaker de l'atlantique (*micropogonias undulatus*) ($11,9-37,2$ et $23,4-36,4 \times 10^9$ spz.ml⁻¹) (**Gwoet et al., 1991**). la concentration spermatique chez notre espèce est élevée par rapport à certain salmonidae, tels que le saumon Atlantique (*Salmo salar.*) ($13,8-16,5 \times 10^9$ spz.ml⁻¹) et l'esturgeon ($0,05-0,5 \times 10^9$ spz.ml⁻¹) (**Fauvel et al., 1993**), respectivement.

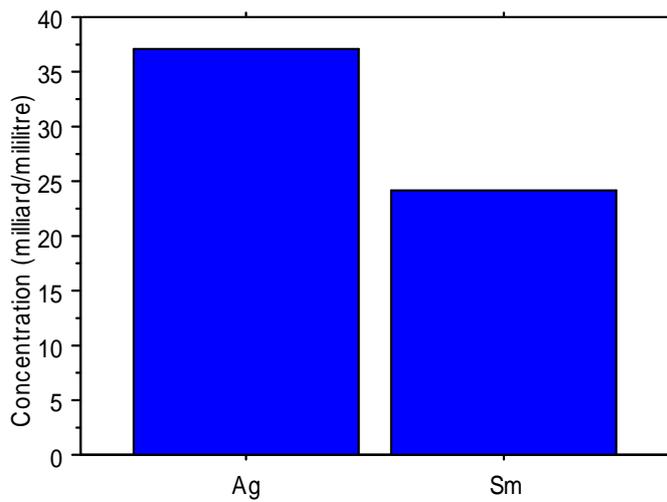


Figure 12.a : Histogramme des variations de la concentration spermatique (en milliard /ml) en fonction de poisson des deux rivières Aguerioun et Soummam : **Ag** (barbeau Aguerioun), **Sm** (barbeau Soummam).

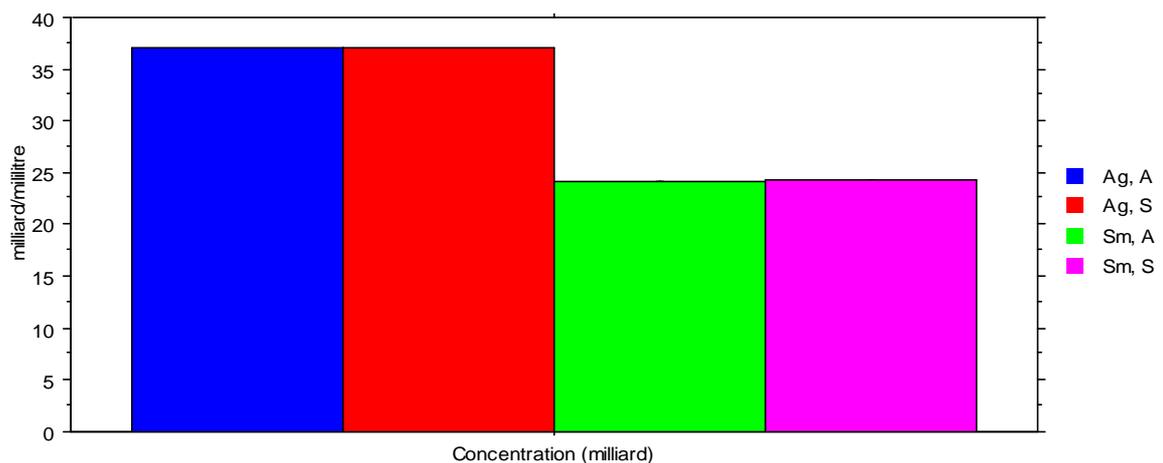


Figure 12.b : Histogramme des variations de la concentration spermatique (en milliards /ml) en fonction de poisson et de l'eau des deux rivières Aguerioun et Soummam : **Ag** (barbeau Aguerioun), **Sm** (barbeau Soummam), **A** (l'eau Aguerioun), **S** (l'eau Soummam).

I.3. Les vitesses spermatiques : la vitesse progressive (VSL), la vitesse moyenne (VAP) et la vitesse curviligne (VCL)

Nous pouvons observer sur la **figure 13.a** qui représente la variation des vitesses spermatiques (VSL, VAP et VCL) en fonction des poissons des deux rivières (Aguerioun et Soummam) pendant trois temps différents T_1 (après 10s), T_2 (après 30s) et à T_3 (après 50s) que les différentes vitesses pendant les trois temps sont plus importantes dans le poisson de la Soummam que Aguerioun. nous pouvons voir que les différentes vitesses égales à $25\mu\text{m/s}$ et $28\mu\text{m/s}$ pour la VSL, $42\mu\text{m/s}$ et $45\mu\text{m/s}$ pour la VAP et $60\mu\text{m/s}$ et $65\mu\text{m/s}$ pour la VCL dans le poisson d'Aguerioun et Soummam, respectivement. Même conclusion à retenir pendant les différents temps, à 10s, les différentes vitesses sont plus importantes, puis diminuent progressivement avec le temps (T_2 et T_3), sachant que même à 30s et 50s les vitesses de poisson de la Soummam sont toujours plus élevées qu'Aguerioun. Cette différence de vitesse de la même espèce dans les deux sites pourrait être due à la présence de certains éléments (substance chimique) dans la Soummam et à l'œil nu nous pouvons observer une grande différence entre les deux sites. la région d'Aguerioun est très propre par rapport à la Soummam.

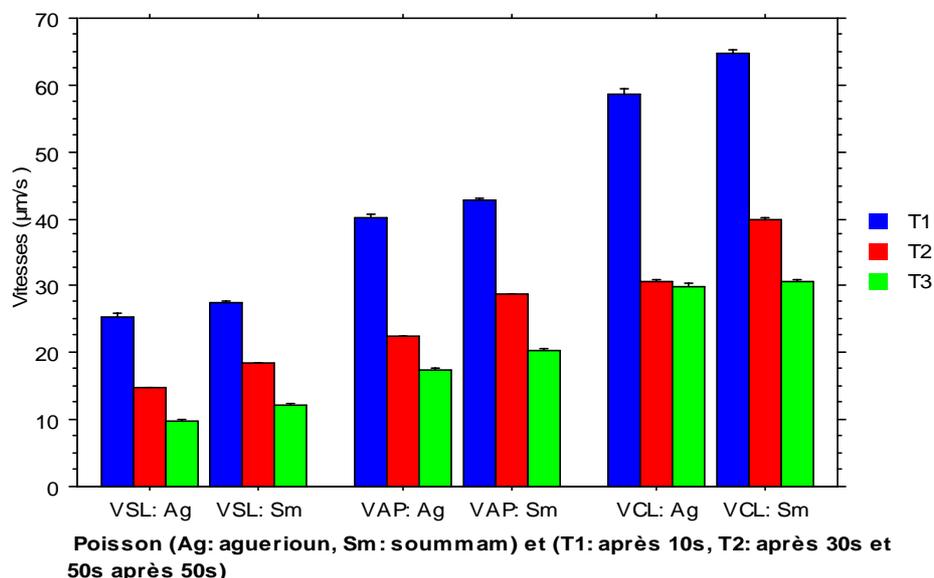
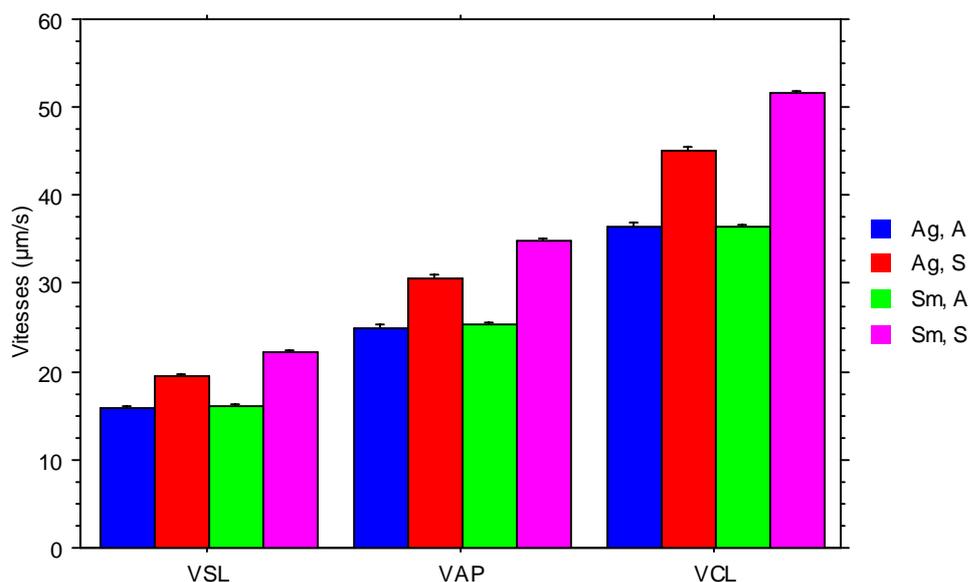


Figure 13.a: Histogramme de variation des vitesses spermatique (en micromètre/seconde) en fonction des poissons des deux rivières (Aguerioun et Soummam) pendant trois périodes différentes : T_1 (Après 10s), T_2 (Après 30s), T_3 (Après 50s), **Ag** (barbeau Aguerioun), **Sm** (barbeau Soummam).

Les vitesses spermatiques de notre espèce est faible par rapport à la carpe commune (*Cyprinus carpio*), la VSL et la VCL égale à 130 $\mu\text{m/s}$ et à 210 $\mu\text{m/s}$ (Toth et al., 1997). Chez les salmonidé, esturgeon de Sibérie (*Acipenser baeri*), Siczynski et al., (2012) a démontré que la VSL=82,5, VAP=97,6, et VCL=121.9 $\mu\text{m/s}$. cependant, chez les poissons marins, nos résultats sont proche à l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) de VSL=12, VAP=16 et VCL=40 $\mu\text{m/s}$ (Asturiano et al. , 2004).

La **figure 13.b**, représente les variations des vitesses spermatiques en fonction de poisson et de l'eau des deux rivières (Aguerioun et Soummam) pendant trois périodes différentes T1 (après 10s), T2 (après 30s), T3 (après 50s).

Même conclusion à retenir pour les différentes vitesses spermatiques, toujours les vitesses spermatiques de la Soummam sont plus importante qu'Aguerioun, sur cette figure nous pouvons observer qu'il y a une augmentation de la vitesse spermatique de poisson d'Aguerioun activée dans l'eau de la Soummam. Mais il y a une diminution de la vitesse spermatique de poisson de la Soummam activée dans l'eau d'Aguerioun. Cette figure nous confirme le résultat obtenu ci-dessus.



Poissons (Ag: poisson Aguerioun et Sm: poisson Soummam), et Eau (A: eau Aguerioun et S: eau Soummam).

Figure 13.b : Variation de la VSL, VAP et VCL en fonction du poisson et de l'eau des deux rivières (Aguerioun et Soummam) : **Ag** (barbeau Aguerioun), **Sm** (barbeau Soummam), **A** (l'eau Aguerioun), **S** (l'eau Soummam).

I.3.2. La fréquence de battement de la tête de spermatozoïde (BCF)

La **figure 14** représente la variation de BCF (Hz) en fonction de poisson et de l'eau, nous pouvons voir que les valeurs maximales de la BCF sont enregistrées dans les poissons de la Soummam qui varie entre 4-4,5Hz. par contre les valeurs minimales de la BCF sont enregistrées dans les poissons d'Aguerioun qui varie entre 2,5 à 3,5Hz.

Les valeurs de BCF obtenus varient entre 3,4 et 4,2 Hz sont plus proche à 6,2 Hz reconnu chez l'espèce lavaret (*Coregonus lavaretus*) par **nynca et al. (2012)**, et 7.7 Hz chez l'espèce bonite à dos rayé (*sarda sarda*) déclaré par **sara et al., (2011)**, par contre les valeurs 11,4 Hz tenus par **Beata et al . (2013)**, chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*), et 25 Hz obtenus par **Elizabeth et al. (2011)**, chez l'espèce poisson-chat (*Phractocephalus hemiliopterus*), sont plus loin.

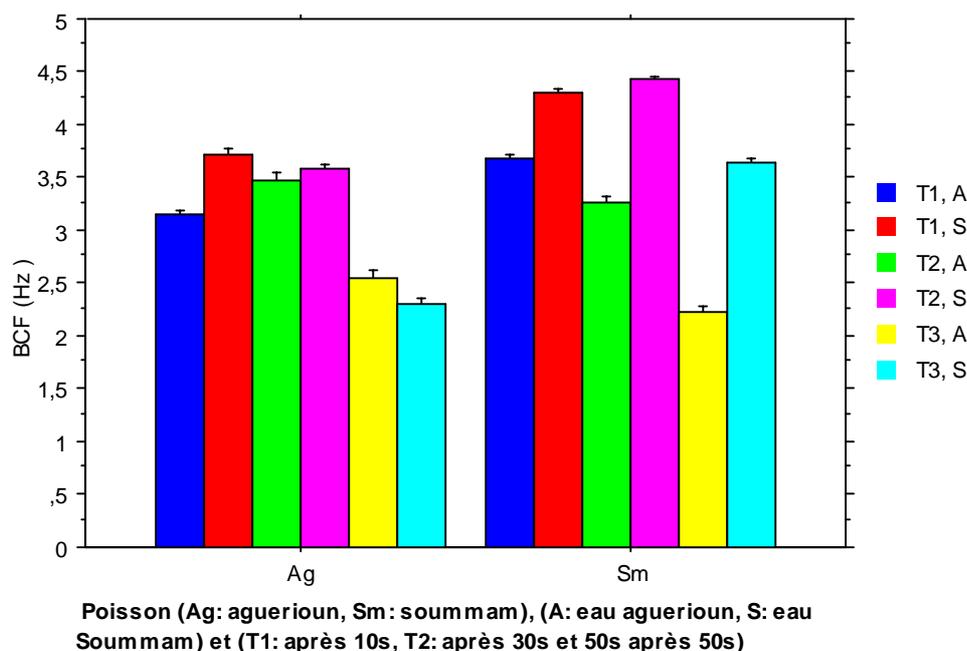


Figure 14 : Histogramme de variation de BCF (en Hz) en fonction de poisson et de l'eau des deux rivières (Aguerioun et Soummam) pendant trois périodes différentes : **T₁** (Après 10s), **T₂** (Après 30s), **T₃** (Après 50s) , **Ag** (barbeau Aguerioun), **Sm** (barbeau Soummam), **A** (l'eau Aguerioun), **S** (l'eau Soummam).

I.3.3. Variation de l'amplitude moyenne de mouvement latéral de la tête d'un spermatozoïde (ALH)

La **figure 15** représente la variation d'ALH spermatique en fonction de poisson et de l'eau, nous avons obtenus les valeurs d'ALH suivantes : pour les spermatozoïdes de barbeau d'oued Soummam activé par l'eau de leur rivière est 2.5 μm , et 1.9 μm pour le sperme de barbeau d'oued Soummam activé par l'eau d'oued Aguerioun, 1.8 μm pour le sperme de barbeau d'oued Aguerioun activé par l'eau de ce dernier, et les spermatozoïdes de barbeau d'oued Aguerioun activé par l'eau de la Soummam ont 2.3 μm .

En conclusion l'ALH des spermatozoïdes de barbeau activé par l'eau d'oued Soummam est plus élevé que celle des spermatozoïdes de barbeau activé par l'eau d'oued Aguerioun, où nous remarquons que l'eau a une influence sur l'ALH des spermatozoïdes.

Les valeurs d'ALH de notre poisson varient entre 1,8 et 2,5 μm , sont légèrement proche à 1,5 μm rapporté par **Beata et al. (2013)** chez l'espèce carpe commune (*Cyprinus carpio*), et 3.6 μm rapporté par **sara et al., (2011)** chez la bonite à dos rayé (*sarda sarda*), et très éloigné par rapport à la valeur 20,1 μm rapportée par **nynca et al. (2012)**, chez l'espèce lavaret (*Coregonus lavaretus*).

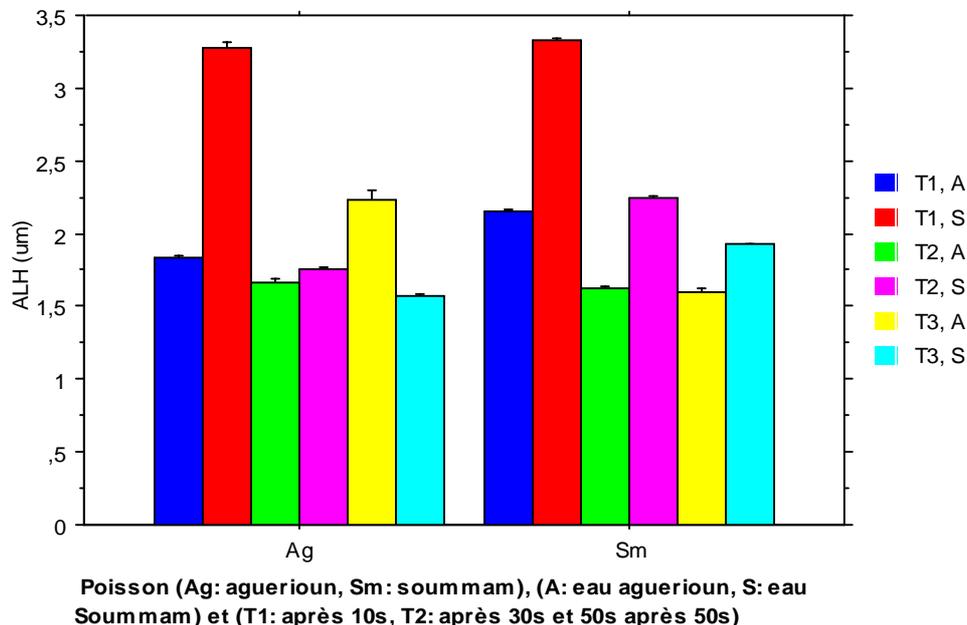
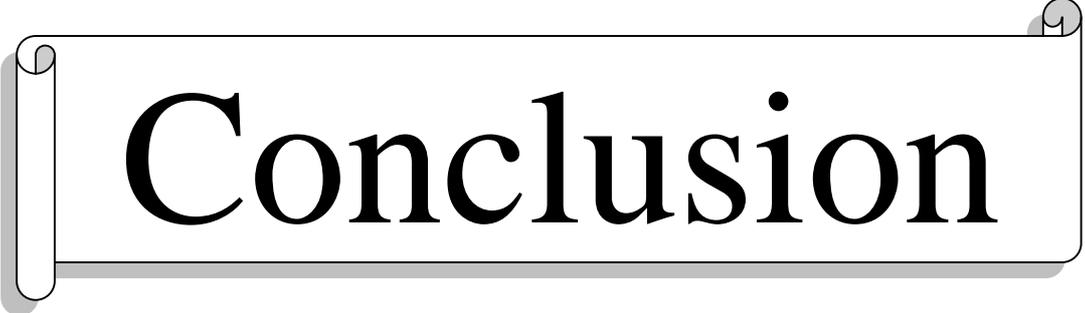


Figure 15 : Histogramme de variation d'ALH spermatique (en micromètre) en fonction de poisson et de l'eau des deux rivières (Aguerioun et Soummam) pendant trois périodes différentes : **T₁** (Après 10s), **T₂** (Après 30s), **T₃** (Après 50s), **Ag** (barbeau Aguerioun), **Sm** (barbeau Soummam), **A** (eau Aguerioun), **S** (eau Soummam).



Conclusion

Conclusion

Le présent travail est une étude comparative menée sur la variation des paramètres spermatiques de l'espèce *barbus barbus callensis* dans deux sites différents, l'oued Aguerioun et l'oued Soummam.

Les paramètres spermatiques qui nous avons considérés dans cette étude sont la durée de la mobilité, la concentration spermatiques et les différentes vitesses (VSL, VAP, VCL, BCF et ALH).

Sur la base des résultats obtenus, la concentration spermatique du barbeau d'oued Aguerioun est plus importante que celle de barbeau d'oued Soummam (37 milliard/millilitre et 26 milliard/millilitre). Par contre tous les autres paramètres (la durée de mobilité, la VSL, la VAP, la VCL, la BCF et l'ALH) sont plus important chez les poissons de la Soummam qu'Aguerioun.

L'activation de la cellule spermatique de poisson d'Aguerioun dans l'eau de la Soummam augmente les différentes vitesses spermatiques par contre l'activation de la cellule spermatique de poissons d'oued Soummam dans l'eau d'oued Aguerioun diminue leur vitesses spermatiques.

La durée de motilité (DM) des spermatozoïdes de barbeau d'oued Soummam est plus élevée que celle de barbeau d'oued Aguerioun (55 et 42 secondes), ainsi l'activation de sperme de poisson de la Soummam provoque la diminution de la durée de mobilité (44 à 38 secondes). A partir de ses résultats nous pouvons conclure que la qualité de l'eau a une influence directe sur les paramètres spermatiques.

En perspective, il serait très intéressant de s'orienter vers l'analyse physico-chimique de l'eau, l'histologie des gonades pour bien comprendre l'effet de la pollution sur la spermiogénèse et l'ovogenèse, le statut oxydatif pour la comparaison entre les deux cellules et l'utilisation de la cellule spermatique comme bio indicatrice de l'état de l'environnement (pollution aquatique).

Enfin, il est important la maîtrise des techniques de la biotechnologie dans le domaine de la reproduction assisté comme la technique de la conservation de sperme par la congélation et la réfrigération, et l'insémination artificielle pourrait être une des voies à explorer pour bien protéger et restaurer la biodiversité, et apporter un appoint à la production de poissons à intérêt économique.

Références bibliographiques



- Abascal F, J., Cosson J., and Fauvel C., 2008.** Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *Journal of Fish Biology*. p.509-522.
- Alavi S. M. H., Psenicka M., Policar T., Rodina M., Kozak P., and Linhart O. 2008b.** Sperm characteristics in *Barbus barbus* as a function of nutrition throughout the reproductive season. *Cybium*, 32(2) : p.200-201.
- Alavi S. M. H., Rodina M., Viveiros A.T.M., Cosson J., Gela D., Boryshpolets S. et Linhart O. 2010.** Effects of os-molality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius L.*). *Theriogenology*. 72 : p.32–43.
- Annabi A., Said K. and Messaoudi I. 2013.** Cadmium: Bioaccumulation, Histopathology and Detoxifying Mechanisms in Fish. *American Journal of Research Communication*. 1 (4): p.60-79
- Arrignon J. 1998.** Aménagement Piscicole des Eaux Douces. 5^{ème} Edition : *Tec et Doc*. p.589.
- Asturiano J.F. , Pérez L., Pérez-navarro F.J., Garzon D.L. , Martinez S. , Tomas A., Marco J.F., Vicente J.S. and Jover M. 2004.** Optimization trial of methods for induction of spermiation in european (*anguilla anguilla*) and test of differant sperm activation media in aquaculture europe 04. *Biotechnologie for quality*. Barcelona, spain.
- Bakhach J., Casoli V. and Guimberteau J. C. 2007.** La cryopréservation de tissus composites : principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. *Ann. Chir. Plas. Est.* 52: p.531-547.
- Beata I. C., Slawomir K., Sylwia J., Beata S., Mariola D., Dariusz K. and Radosław K. K. 2013.** Sperm quality and selected biochemical markers of seminal plasma at the beginning of the reproductive period of common carp, *Cyprinus carpio L.* *AquacultInt*. 22: p.111–122
- Bernard G., Dromard A. et Lycée X. B. 2011.** Livret d'étymologie et de terminologie médicale. p.3-34.
- Billard R. 1986.** Spermatogenesis and Spermatology of Some Teleost fish Species. *Reprod. Nutr. Dévelpo*. 26(4) : p.877-920.
- Billard R., Dupont J. et Barnabe G. 1977.** Diminution de la Motilité et de la Durée de Conservation du sperme de *Dicentrarchus Labrax L.* (Poisson, Téléostéen) Pendant la période de Spermmiation. *Aquaculture*. 11: p.363-367.
- Billard R. et cosson J. 1989.** Measurement of sperm motility in trout and carp. In aquaculture a biotechnology in progress, N. De pauw, E. Jaspers, H. Ackefors & N. Wilkins (Eds). *Europen Aquaculture Society*, Bredene, Belgium. p.449-503.

- Billard R., Cosson J., Percec G. and Linhart O. 1995.** Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*. 129 : p. 95-112.
- Bongiovanni A., Demet M., Dubois A., Evrard C., Frenoy F., Jacques A., Lizée C., Louvrier A., Sulon L. et Vannieuwenborgh L. 2005.** La vi(II)e dans la vi(II)e. Dossier de l'enseignant Les poissons d'Eau douce. *aquarium-Muséum de l'université de Liège*.
- Bougrier S. and Rabenomanana L. D. 1986.** Cryopreservation of spermatozoa of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 58 : p.277-280.
- Bouhbouh S. 2002.** Bio-Écologie de *barbus callensis* (Valencienne 1842) et *Barbus fritschii* (Gunther 1874) au niveau du Reservoir Allal el fassi (Maroc). Thèse de Doctorat : Science de l'Eau et de l'Environnement, Spécialité : Hydrobiologie. p.1-197.
- Brizard R., Bernardi M., Boudry P., Haffray P., Labbé C., Maise M.E., Robert R et Roger J.L. 2004.** Optimisation, Standardisation et Validation de la Congélation de Laitance d'Huitre Creuse *Crassostrea Gigas* à des Fins de Conservation et de Diffusion Génétique. *Ifermer*. p.1-76.
- Bruslé J. et Quignard J. P. 2004.** Les poissons et leur environnement: écophysiologie et comportement adaptatifs. *Paris: Eds Tec et Doc*. p.14-75.
- Catherine L., Elisabeth B., Bernarde L., Alain M., Philippe G., Guisepppe S.T. et Michèle M. 2003.** Technologie de la conservation du sperme chez plusieurs vertébrés domestiques : protection des lipides membranaires, intégrité du noyau et élargissement des méthocondes. 3^{ème} International Workshop on the Biology of Fish Gametes. *Diamond congress Ltd*. Budapest, Hungary. p.143-157.
- CCME: Canadian Council of Ministers of the Environment. 2011.** Manuel des Protocoles d'Echantillonnage pour l'Analyse de la Qualité de l'Eau au Canada. p.1-219.
- Chao N. H. and Liao I. C. 2001.** Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*. 197: p.161-189.
- Chao N. H., W. C. Chao, K. C. Liu, I. C. and Liao. 1987.** The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J. Fish. Biol.* 30 : p.107-118.
- Chaouchi B. et Ben Hassine O.K. 1998.** Le Barbeau, *Barbus Callensis*, Valenciennes, 1842 (Poisson, Teleosteen) de la Lagune de l'ichkeul. *Archs. Inst. Pasteur Tunis*. 75 (3/4) : p.211-218.
- Cherghou S., Khodari M., Yaâkoubi F., Benabid M. et Badri, A. 2002.** Contribution à l'étude du régime alimentaire du barbeau (*Barbus barbus callensis* Valenciennes, 1842) d'un cours d'eau du Moyen-Atlas (Maroc) : Oued Bouferkrane. *Rev. Sci. Eau*. p.153-163.

- Chevassus-au-Louis B. et Lazard J. 2009.** Situation et perspectives de la pisciculture dans le monde : consommation et production. *Cah Agric.* vol 18, n° 2-3: p.82-90.
- Chiang C. et Abd Rashid Z. 2012 .** Sperm Cryopreservation of Some Freshwater Fish Species in Malaysia. *freshwater fisheries research division.* FRI Glami Lemi, Jebebu, negri Sembilan, Malaysia. p.270 - 292.
- Cosson J. 1996.** A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biology International.* Vol. 20, No. 2: p. 83-94.
- Denis B., Jérôme L. et Michel G. 2002.** La substitution des solvants par le diméthyl sulfoxyde. Irsst. *Direction des communication 505,* boul. de maisonneuve ouest montréal (québec). p.1-88.
- Djemali I. 2005.** Evaluation de la biomasse piscicole dans les plan d'eau douce Tunisiens : approches analytique et acoustique. Thèse de doctorat en Science Agronomique. *Halientique.* p.1-32.
- Djoudad K. H., BenSlimane S., Chevalier C., Kadji B., Exbrayat J.M. et Iguer-Ouada M. 2012.** First Observation of Intersex in Barbel *Barbus callensis*, Valenciennes, 1842) Collected in Soummam River (Algeria). *Cybium* .36(4): p.531-538.
- Dussault J. 2009.** Le Spermogramme. Volume 16, n° 2 .
- Ebrahimi M. et Taherianfard M. 2009.** The effects of heavy metals exposure on reproductive systems of cyprinid fish from Kor River. *Iranian journal of fisheries science.* 10(1): p.13-24.
- Elizabeth R., Eduardo A. S., Renan Y. O., Cesar P. R.T., Giovano N., Danilo C. et Robie A. B. 2011.** Sperm quality of endemic catfish, steindachneridionparahybae (*siluriformes, pimelodidae*) critically and angered In Brazil. 3^{eme} International Workshop on the Biology of Fish Gametes. *Diamond congress Ltd, H-1255,* Budapes,POB48 , Hungary. p29
- Ethan D., Clotfelter., Hannah K. and Gendelman. 2014.** Exposure to Environmentally Relevant Concentrations of Genistein during Activation Does Not Affect Sperm Motility in the Fighting Fish *Betta splendens*. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International,* Article ID 865741, 5 pages.
- Evans G. and Maxwell W. M. C. 1987.** Salamon's artificial insemination of sheep and goats. *Butterworths, Sydney.* p.200.
- FAO: Horvath L. et Woynarovich E. 1981.** La Reproduction Artificielle des Poissons en Eaux Chaudes.
- FAO, 2006.** Situation de l'aquaculture mondiale. p.48-52.

- Fauvel C., Omnes M. H., Suquet M. and Normant Y. 1993b.** Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement. *Aquaculture*. 117: p.107-113.
- François Y. 1946.** Quelques Aspects de la Reproduction chez les Poissons. *Bull. Fr. Piscic.*140: p.108-113.
- Gallego V., Pérez L., Asturiano J.F. and Yoshida M. 2013.** Study of puffer fish (*Takifugu niphobles*) sperm: development of methods for short-term storage, effect of different activation media and role of intracellular changes in Ca²⁺ and K⁺ in the initiation of sperm motility. *Aquaculture*. p.414–415, 82–91.
- Geneviève M. 2012.** Comparaison des Techniques de Cryoconservation de la Semence chez le Bouc et d'Insémination Artificielle chez la Chèvre. Mémoire de doctorat, *université laval*. p.14-115.
- Grignard E. 2005.** Analyse de Protéines Spermatiques Post-Testiculaires, et Développement d'Outils pour le Contrôle de la Fertilité de Différents Mammifères *Equus caballus, Bostaurus, Arvicolater. restris Scherman*. p.1-178.
- Gwo J. C., Strawn K., Longnecker M. T. and Arnold C. R. 1991.** Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture*. 94 : p.355-375.
- Harvey B. 1983.** Cryoconservation of Sarotherodon Mossambicus Spermatozoa. *Aquaculture*. 32 : p.313-320.
- Harvey B. J. et Hoar W. S. 1980.** Reproduction Provoquée chez les Poissons: Théorie et Pratique. *Aquaculture*. p.48.
- Horvath A., Mihalfy S., Miskolczi E., Urbanyi B., Szabo T. and Vranovics K. 2006.** Successful Fertilization and Hatching of Four European Cyprinide Species Using Cryopreserved Sperm. *animal reproduction science*. volume 136: p.133-138.
- Ian A. E. B., Ali M., Edward A. Trippel and Trevor E. P. 2013.** Development of a Sperm Cryopreservation Protocol for Reside Dace: Implications for Genome Resource Banking. Transaction of American fisheries Society. *american association for the study of liver diseases*. 142: p.671-680.
- Jarostaw C., David E., Tomasz M., Pawet S. and Piotr E. 2000.** The Influence of Zinc on Sperm Motility of Commun Carp - A Computer Assisted Studies. *Archives of Polish Fisheries*. Vol. 8 Fasc. p.1 5-14 .
- Kalbassi M. R., Lorestani R. and Ghafle M. J. 2012.** Analysis of Saline Activator Solution effects on Sperm Quality Indices of *Barbus Sharpeyiby* Image J Software. *Iranian jornal of science*. 12(2): p.357-377.

- Kaushik S. 2004.** Alimentation humaine, ressources halieutiques et avenir de l'aquaculture. *Aquaculture et environnement*. 26 : p. 20-25.
- Kayalto B. 2009.** Contribution à l'Evaluation de la Contamination par les Métaux Lourds, de trois Espèces de Poissons, des Sédiments et des Eaux de Lac Tchad. *Université de Ngaoundre*, Mémoire de doctorat. p.1-97 .
- Kime D. E. 2000.** Fish Sperm Viability as an Indicator of Environmental Pollution. *Science of the Total Environment*. 225(2): p.3–11p.
- Kime D. E., Ebrahimi E., Nysten K., Roelants I., Rurangwa E., Moore H. D. M. et Ollevier F. 1996.** 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: p.223-237.
- Kime D.E., Van Look K.J.M., McAllister B.G., Huyskens, G., Rurangwa E., and Ollevier F. 2001.** Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp. Biochem. Physiol., Part C*. 130: p.425-433.
- Kurokura H., Nal11ba K. and Ishikawa T. 1990.** Lesion of spermatozoa by cryopreservation in oyster *Crassostrea gigas*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 56 (11) : p.1803- 1806.
- Labbé C., Blesbois E., Leboeuf B., Martoriati A., Guillouet P., Stradaioli G. et Magistrini M. 2003.** Technologie de la Conservation du Sperme Chez Plusieurs Vertébrés Domestiques : Protection des Lipides Membranaires, Intégrité du Noyau et élargissement des Méthodes. *Les Actes du BRG*. 4 : p.143-157.
- Lahnsteiner F., Berger B., Horvath A., Urbanyi B. and Weismann T. 2000.** Cryopreservation of Spermatozoa in Cyprinid Fishes. Elsevier Science Inc. *Theriogenology*. 54: p.1477-1496.
- Legendre M. et Billard R. 1980.** Cryoconservation du Sperme de Truite Arc-En-Ciel (*Salmo gairdneri* R.). *Bulletin Français de Pisciculture Cinquante* .Troisième année N°278 3^{ème} Trimestre. p.12-23.
- Levillian P. N. M. 2005.** Essai d'optimisation de la conservation de la semence par réfrigération : Etude comparative de deux protocoles de réfrigération à 15°C et 5°C. *INRA* . p.53.
- Lin, F. et Dabrowski K. 1996.** Characteristics of Muskellunge Spermatozoa II: Effects of Ions and Osmolality on Sperm Motility. *Transactions of the American Fisheries Society*. 125: p.195-202.
- Linhart O. et Kvaniscka P. 1992.** Artificial insemination in tench, *Tinca tinca* L. *Aquac. Fish. Manage.*, 23: p.83-188.

- Lwata N., Kurokura H. et Hirano R. 1989.** Cryopreservation of pacific oyster, *crassostrea gigas*. *Suisanzoshoku*. 37: p.163.
- Maisse G. 1990.** Le sperme des salmonidés : le point sur les connaissances. applications à la salmoniculture. *INRA Prod .Anim*. 3 (3) : p.223-228.
- Maisse G., Labbé C., ogierdebaulny B., Leveronicaivi S. et Haffray P. 2011.** Cryoconservation du sperme et des embryons de poissons. *INRA Prod.,Anim*. 11(1) : p.57-65.
- Medeiros C.M.O., Forell F., Oliveira A.T.D. and Rodrigues J. L. 2002.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57: p.327-344.
- Mohammedi D. 2012.** Classification et mode d'action des Antibiotiques. *Médecine du Maghrebe*, n°9.
- Mona S. Z., Hammam A. M. and Nagwa S. A. 2014.** Xenobiotics as Stressful Factors in Aquatic System (in fish). *Life Science Journal*, 11(4).
- Morita Y., Nakamori S., and Takagi H. 2003.** L-proline accumulation and freeze tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the PRO1 gene encoding gamma-glutamyl kinase. *Appl Environ Microbiol*. 69(1): p.212-9.
- Nelson J. S. 1994.** Fiche of world.Ed. *John wileyson. New York ..*
- Nynca J., Dietrich G.J., Fopp-Bayat D., Dietrich M. A., Słowińska S., Liszewska1 E., Karol H., Martyniak A. and Ciereszko A. 2012.** Biochemical, physiological, and genetic characteristics of fresh and cryopreserved whitefish (*Coregonus lavaretus*) semen. *Jornal of applied Ichthyology*. 28: p.934-940.
- Ould Rouis S., OuldRouis A., Micha J.C. et Arab A. 2012.** Biologie de la Reproduction du Cyprinidae, *Barbus callensis* dans le lac de Barrage Hamiz (Algérie). *Tropicultura*. 30(2): p.88-93.
- Paméla et Virginie F. 2008.** Congélation de la semence de chien prealablement réfrigérée : Etude expérimentale. Thèse de doctorat, *faculté de medecine de creteil*. p.1 -94.
- Poncin P. 1993.** La Reproduction des Poisson de nos Rivières. *Cahiers d'Ethologie*. 13 (3) : p.317-342.
- Poupard G.P., Paxion C., Cosson J., Fierville F., and Billard R. 1998.** Initiation of Carp Spermatozoa Motility and Early ATP Reduction after milt Contamination by Urine. *Aquaculture*. 160. p.317-328.
- Purdy P. H. 2006.** A review on goat sperm cryopreservation. *Small. Ruminant. Res*. 63: p.215-225.

- Qinghua L., Jun L., Shicui Z., Fuhong D., Xizhang X., Zhizhong X., and Shihong X. 2006.** An Efficient Methodology for Cryopreservation of Spermatozoa of Seabream, *Pagrus major*, with 2-mL Cryovials. *Journal of the world aquaculture society*. 37: p.289-297.
- Réviers M. et Sauveur B. 1988.** Reproduction des volailles et production d'œufs. *INRA paris*. p.219-449.
- Rimet C. S. 2012.** Contribution à l'étude de la reproduction chez deux espèces de Cétacés, le grand dauphin (*Tursiops truncatus*) et l'orque (*Orcinus orca*) : Application à la procréation assistée. Thèse de doctorat. p.1-173.
- Robeck T. R., Curry B. E., Mc Bain J. F., and Kraemer D. C. 1994.** Reproductive Biology of the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) and the Potential Application of Advanced Reproductive Technologies. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 25 (3): p.321-336.
- Robeck T. R., Gearhart S. A., Steinman K. J., Katsumata E., Loureiro J. D. and O'Brien J. K. 2011.** In vitro sperm characterization and development of a sperm cryopreservation method using directional solidification in the killer whale (*Orcinus orca*). *Theriogenology*. 76 (2): p.267-279.
- Robeck T. R. and O'Brien J. K. 2004.** Effect of cryopreservation methods and precryopreservation storage on bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa. *Biology of reproduction*. 70 (5): p.1340.
- Robert G.T., Hester G. et Greg D. 1986.** Canada Île-du-Prince-Édouard Protocole D'entente sur le Gestion de l'Habitat du Poisson. *Ministère de la pêche et des océans*. Canada. P.2-9.
- Salamon S. and Ritar A. J. 1982.** Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 35: p.295-303.
- Sanchez R. M. et Billaard R. 1977.** Conservation de la Motilité et du Pouvoir Fécondation du Sperme de Poisson de Truite Arc En Ciel Maintenu a des Températures Voisines de 0°C. *Fr. Piscic France*. 265: p.144-152.
- Sara S., Fiammetta B., Valeria P., Valentina S., Giovanni G.L. and Salvatore N. C. 2011.** Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J of pineal res*. Doi:10.1111: p.1-9.
- Schoenfuss H. L., Levitt J. T., Rai R., Julius M. L. and Martinovic D. 2008.** Treated Wastewater Effluent Reduces Sperm Motility Along an Osmolality Gradient. *Arch Environ Contam Toxicol*. DOI 10.1007/s00244-008-9219-1.

- Serjey V., Kurkov., Elena V., Ukhatskaya et Thorsteinn L. 2011.** Drug/cyclodextrin: beyond inclusion complexation. *J. Incl Phenom Macrocycl Chem.* 69 : p.297-301.
- Sieczyński P., Glogowski J., Beata I. C. and Cezary G. 2012.** Characteristics of Siberian sturgeon and sterlet sperm motility parameters compared using CASA. *Arch. Pol. Fish.* 20: p.137-143.
- Sonja F., Franz L. and Robert A. P. 2009.** A fine Structural Review on the Spermatozoa of Cyprinidae with Attention to their Phylogenetic Implications. *Histol. Histopathol.* 24: p.1233-1244.
- Stein H. and Bayrle H. 1978.** Cryopreservation of the Sperm of Some Freshwater Teleosts. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18: p.1073-1076.
- Suquet M., Dorange G., Omnes M. H., Normant Y., Le Roux A. and Fauvel C.. 1994.** Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus L.*). *J. Fish. Biol.*, 42: p.509-516.
- Tijerina S.A., Innis S.M. and Kilts D.D. 2009.** Antioxydant capacity of human milk and its association with vitamins A and E and fatty acid composition. *Acta paediatrica*, 98: p.1793-1798.
- Toth G.P., Ciereszko A., Christ S.A. and Dobrowskiski K.K. 1997.** Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*): activation and inhibition conditions. *Aquaculture.* 154: p.337-348.
- Tselutin K., Seigneurin F. and Blesbois E. 1999.** Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. *Poultry Science.* 78: p.586–590.
- Tuli R. K., Schmidt B. R. and Holtz W. 1991.** Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Anim. Reprod. Sci.* 25: p.125-131.
- UICN. 2006 :** Union Mondiale pour la Nature, Statut UICN En danger
- Ursula H. 2003.** La pollution de l'eau. *Ressource Centre on Urban Agriculture and Forestry (RUAF).* 8: p.1-55.
- Verstegen, J.; Iguer-ouada M., et Onclin K. (2002).** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 57: p.149–179.
- Wilson-Leedy J.G., Kanuga M.K. and Ingermann R.L., 2009.** Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebra fish sperm motility. *Theriogenology.* 71: p.1054-1062.
- Yankson K. and Moyse J. 1991.** cryopreservation of the spermatozoa of *Crassas/rea /ulipa* and three other oysters. *Aquaculture.* 97: p.259-267.

Yathiender S. and Murthy P. S. 2013. Effect Of Heavy Metal Stress On The Seminal Vesicles of *Glosso gobius giuris* (HAM). *International Journal of Recent Scientific Research*. Volume 4, 4 : p.451 – 454.

Yuen Q. W. H., Brook F. M., Kinoshita R. E. and Ying M. T. C. 2009. Semen Collection and Ejaculate Characteristics in the Indo-Pacific Bottlenose Dolphin (*Tursiops aduncus*). *Journal of Andrology*. 30 (4): p.432–439.

Zell S. R., Bamford M. H. and Hidu H. 1979. Cryopreservation of spermatozoa of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Cryobiology*. 16: p.448-460.

Zouggaghe F., Mouni L. et Tafer M. 2014. Qualité Biologique du Réseau Hydrographique du Bassin Versant de la Soummam (nord de l'Algérie). *Larhyss Journal*. 17 : p. 21-33P.21-33.

Résumé : L'objectif principal du présent travail est l'optimisation de la conservation du sperme de poisson *Barbus barbuis callensis* et l'analyse des paramètres spermatiques de cette espèce au niveau des deux sites d'étude. Pour cela nous avons utilisé des nouveaux milieux de conservation qui sont : la vitamine E, le Cholestérol, le PEG (polyéthylène glycol) seule ou en association soit avec la vitamine E ou avec le Cholestérol. Les résultats obtenus sont négatifs pour tous les milieux utilisés. D'autre part l'analyse de sperme à l'état frais a montré des différentes variations des paramètres spermatiques en fonction de poisson et de l'eau. La durée de motilité plus longue et des vitesses spermatiques élevées pour le barbeau d'Oued Soummam en comparaison avec celles de barbeau d'Oued Agueriou qui a une concentration spermatique plus élevée.

Mots clé: Barbeau (*barbus barbuis callensis*), paramètres spermatiques, Oued Soummam, Oued Agueriou.

Summary: The main objective of this work is to optimize the conservation of fish sperm (*Barbus barbuis callensis*) and analysis of sperm parameters of this species at both study sites. For this we used new storage media which are: Vitamin E, Cholesterol, PEG (polyethylene glycol) alone or in combination with either vitamin E or Cholesterol. The results are negative for all the media used. On the other hand the analysis of fresh semen state showed different changes in sperm parameters based on fish and water. The duration of motility and velocity of spermatozoa were longer and faster for barbel Soummam river compared with those of barbel Agueriou's river which has a higher sperm concentration.

Key words: Barbel (*Barbus barbuis callensis*), sperm parameters, Soummam river, Agueriou river.