

MEMOIRE

Présenté par: EECKHOUTTE Philippe

Spécialisation: Sciences et techniques des productions animales

**MAITRISE DE LA REPRODUCTION ARTIFICIELLE
DE DEUX POISSONS-CHATS
(*Pangasius bocourti* et *P. hypophthalmus*)
ELEVES EN CAGES FLOTTANTES DANS LE DELTA DU MEKONG
(VIETNAM).**

pour l'obtention du DIPLOME D'AGRONOMIE APPROFONDIE

sous le responsabilité de: LAZARD Jérôme

Maître de stage: CACOT Philippe

Enseignant responsable: MARIOJOULS Catherine

soutenu le 27 septembre 1996 à PARIS

MEMOIRE

Présenté par: EECKHOUTTE Philippe

Spécialisation: Sciences et techniques des productions animales

**MAITRISE DE LA REPRODUCTION ARTIFICIELLE
DE DEUX POISSONS-CHATS
(*Pangasius bocourti* et *P. hypophthalmus*)
ELEVES EN CAGES FLOTTANTES DANS LE DELTA DU MEKONG
(VIETNAM).**

pour l'obtention du DIPLOME D'AGRONOMIE APPROFONDIE

sous le responsabilité de: LAZARD Jérôme

Maître de stage: CACOT Philippe

Enseignant responsable: MARIOJOULS Catherine

soutenu le 27 septembre 1996 à PARIS

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION | 3 |
| CHAPITRE I : LA FILIERE « PANGASIUS » AU VIETNAM. | 4 |
| 1- Présentation du Vietnam. | 4 |
| 1.1- Généralités. | 4 |
| 1.2- Situation économique. | 5 |
| 1.3- Le secteur agricole. | 5 |
| 2. Le secteur aquacole au Vietnam. | 5 |
| 2.1- Production et potentiel. | 5 |
| 2.2- La pisciculture au Viet Nam. | 6 |
| 2.2.1- La rizipisciculture. | 6 |
| 2.2.2- La pisciculture en étangs. | 6 |
| 2.2.3- La pisciculture en cages flottantes. | 7 |
| 3- La filière « <i>Pangasius</i> ». | 7 |
| 3.1- Aperçu global de la filière. | 7 |
| 3.2- Point faible de la filière. | 9 |
| CHAPITRE II : LE PROGRAMME DE COOPERATION FRANCO-VIETNAMIEN. | 10 |
| 1- Historique du programme de coopération. | 10 |
| 2- Bilan du programme " <i>Pangasius</i>" en 1996. | 11 |
| 2.1- Partenaires et infrastructures. | 11 |
| 2.2- Bilan scientifique. | 12 |
| 3- La compagnie AGIFISH. | 12 |
| 3.1- Activités de la Compagnie AGIFISH. | 12 |
| 3.2- Les infrastructures de recherche dans la Compagnie AGIFISH. | 14 |
| CHAPITRE III : INTRODUCTION A L'EXPERIMENTATION. | 15 |
| 1- Quelques aspects de la biologie de <i>P. bocourti</i> et <i>hypophthalmus</i>. | 15 |
| 1.1- Caractéristiques biologiques. | 15 |
| 1.2- Cycle biologique. | 15 |
| 2- Reproduction artificielle de <i>Pangasius bocourti</i> et <i>hypophthalmus</i>. | 16 |
| 3- Objectifs du travail de stage. | 17 |
| CHAPITRE IV : STIMULATION HORMONALE DE LA SPERMIATION CHEZ PANGASIUS BOCOURTI ET HYPOPHTALMUS. | 18 |
| 1- Physiologie de la reproduction chez les Téléostéens. | 18 |
| 1.1- Endocrinologie de la reproduction chez les téléostéens. | 18 |
| 1.2- De la spermatogenèse jusqu'à la spermiation. | 19 |
| 2- Stimulation de la spermiation chez <i>Pangasius bocourti</i>. | 20 |
| 2.1- Problématique. | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2- Stimulation de la spermiation après une injection d'HCG. | 21 |
| 2.3- Stimulation de la spermiation après une injection de LHRH+Domperidone. | 23 |
| 3- Stimulation de la spermiation chez <i>Pangasius hypophtalmus</i>. | 25 |
| 3.1- Problématique. | 25 |
| 3.2- Induction par l'HCG. | 25 |
| 4- L'induction de la spermiation chez d'autres espèces de téléostéens. | 27 |
| | |
| CHAPITRE V : COLLECTE ET CONSERVATION A COURT TERME DU SPERME DE <i>P. BOCOURTI</i> ET <i>HYPOPHTALMUS</i>. | 29 |
| | |
| 1- Problématique. | 29 |
| 1.1- Rappel sur l'activation du sperme. | 29 |
| 1.2- Pollution du sperme par l'urine. | 29 |
| 2- Motilité du sperme de <i>Pangasius bocourti</i> et <i>hypophtalmus</i>. | 30 |
| 3- Mise au point d'une solution de conservation pour <i>P. hypophtalmus</i>. | 33 |
| 3.1- Détermination d'un dilueur de conservation du sperme : effet de l'osmolarité. | 33 |
| 3.2- Effet du taux de dilution du sperme dans le liquide de conservation. | 34 |
| 4- Conservation à court terme du sperme de <i>P. bocourti</i>. | 36 |
| 5- Les solutions de conservation à court terme chez d'autres espèces. | 38 |
| | |
| CHAPITRE VI : OPTIMISATION DE LA REPRODUCTION ARTIFICIELLE. | 40 |
| | |
| 1- Définition de la dilution optimale de la laitance lors de l'insémination artificielle. | 40 |
| 1.1- Problématique | 40 |
| 1.2- Chez <i>P. hypophtalmus</i> . | 40 |
| 1.3- Chez <i>P. bocourti</i> . | 42 |
| 1.4- Discussion. et comparaison avec d'autres espèces. | 43 |
| 1.5- Suite de la recherche. | 44 |
| 2- Mise au point d'un dilueur d'activation pour le sperme de <i>P. hypophtalmus</i> et <i>bocourti</i>. | 44 |
| 2.1- Problématique. | 44 |
| 2.2- Influence de l'osmolarité du dilueur d'activation sur la motilité du sperme de <i>P. hypophtalmus</i> . | 45 |
| 2.3- Définition d'un dilueur d'insémination pour <i>P. hypophtalmus</i> : effet de la pression osmotique et du pH. | 46 |
| 2.4- Comparaison de deux solutions d'activation chez <i>P. bocourti</i> . | 48 |
| 2.5- Comparaison des compositions des dilueurs d'activation avec d'autres espèces. | 49 |
| | |
| CONCLUSION | 51 |
| | |
| ANNEXES | 52 |
| | |
| LISTE DES TABLEAUX | 65 |
| | |
| LISTE DES FIGURES | 66 |

INTRODUCTION

Ce travail réalisé au Vietnam du 20 avril au 4 septembre 1996 s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche en coopération franco-vietnamien, mené par le Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD). Ce programme a pour objectif la maîtrise de l'élevage de deux poissons-chats, de la famille des Pangasidés, *Pangasius bocourti* et *hypophthalmus*, élevés en cages flottantes sur le Mékong. Ce stage s'est déroulé sous la direction de Philippe Cacot, attaché de recherche au CIRAD, initiateur et « moteur » de ce programme. Cette étude a été réalisée dans les structures de développement et de recherche d'une société vietnamienne, AGIFISH, partenaire du projet du fait de son rôle central dans la filière.

La production de *Pangasius* en cages flottantes est entièrement dépendante de la capture de juvéniles dans le milieu naturel. Le prix d'achats de ces alevins représente jusqu'à 50% des charges d'exploitation des entreprises de production. Ainsi, la maîtrise de la reproduction en conditions contrôlées de *P. bocourti* et *hypophthalmus*, principales espèces élevées en cages flottantes, est-elle apparue comme une priorité dans le développement de la filière.

En avril 1995, Philippe Cacot réussissait la première reproduction artificielle de *P. bocourti*, et à maîtriser en totalité le cycle de développement larvaire de *P. hypophthalmus*.

Or, le fonctionnement de l'appareil reproducteur mâle était très mal connu ce qui conduisait les inséminateurs à sacrifier les géniteurs mâles lors de la reproduction. Deux causes, différentes selon les espèces, expliquent ces actes : pour *P. bocourti*, c'était essentiellement un problème d'induction hormonale. Même injecté, ce poisson ne donnait pas de résultats satisfaisants. Pour *P. hypophthalmus*, c'était un problème de conservation du sperme, qui était contaminé par l'urine lors du massage abdominal.

Nos efforts se sont donc portés sur la définition, d'une part, d'une méthode d'induction hormonale fiable de la spermiation, et, d'autre part, des modalités de collecte et de la mise au point d'une solution de conservation.

Enfin dans un souci de standardisation des méthodes de reproduction artificielle, nous nous sommes intéressés à la définition d'une solution d'activation et à la détermination d'une dilution finale du sperme lors de la fécondation.

CHAPITRE I : LA FILIERE « PANGASIUS » AU VIETNAM.

1- Présentation du Vietnam.

1.1- Généralités.

Etendu sur le flanc de la péninsule indochinoise, le Vietnam occupe 329 560 km² et compte 74 millions d'habitants (est. 1995), soit 220 hab./km². Les montagnes et les plateaux en altitude occupent les trois quarts du pays. Les plaines littorales et surtout les deltas du Fleuve Rouge au Nord et du Mékong au Sud constituent le quart du pays. L'essentiel de la population se concentre dans ces zones où la densité de population peut atteindre 700 hab./km².



Figure 1.- Carte du Vietnam (Pêche maritime, 1992,71, 1366).

Compte tenu de sa latitude, le pays bénéficie d'un climat tropical soumis au régime des moussons. Les variations climatiques annuelles sont plus marquées dans le nord du pays que dans le sud, où la température varie peu autour de 29°C durant l'année et où la mousson s'étend sur 6 mois de juin à novembre.

1.2- Situation économique.

Le pays sort d'une longue période de troubles qui l'a profondément marqué depuis son accès à l'indépendance en 1954. L'économie se libéralise depuis 1987, abandonnant le système socialiste de planification pour une économie de marché. Le secteur privé se développe à partir de la décollectivisation du secteur agricole mais aussi par des lois qui donne une reconnaissance légale aux entrepreneurs privés. Les effets de cette nouvelle politique (Doi Moi) se font sentir puisque le taux d'expansion économique ne cesse de monter (8.8% en 1994) et l'inflation baisse (14.4% en 1994). Néanmoins la balance commerciale reste déficitaire, malgré les exportations croissantes de riz et de pétrole. D'autres handicaps demeurent : poids de la bureaucratie, infrastructures inexistantes, démographie galopante (accroissement naturel 1.71% en 1995). Le chômage atteint 20% de la population et la dette extérieure de 4 milliards de dollars ne se résorbent pas.

1.3- Le secteur agricole.

Occupant 62% de la population active, l'agriculture joue un rôle majeur dans l'économie en dégageant 49% du PNB et 38% des exportations. Les deux deltas représentent l'essentiel de la surface agricole, elle-même occupée pour moitié par la culture de riz. La production de riz a été de 16.5 millions de tonnes en 1990 et place le Vietnam au 3^{ème} rang mondial des exportateurs de riz.

Les principales productions animales sont celles de porcs et de produits halieutiques qui représentent chacune 1 millions de tonnes en 1990.

2. Le secteur aquacole au Vietnam.

2.1- Production et potentiel.

La production aquacole en 1990 a été environ de 155 000 tonnes, ce qui représente 15% de la production annuelle du secteur halieutique.

La production aquacole se répartit comme suit :

| | |
|--------------------------|----------------|
| - poissons d'eau douce : | 115 000 tonnes |
| - crustacés : | 38 000 t. |
| - algues : | 2 000 t. |

Le Vietnam dispose d'un fort potentiel en sites favorables à l'aquaculture, tant continentale que marine, qui représente 1.3 millions d'ha. La pisciculture en eau continentale représente 74% de la production aquacole, en raison notamment de l'importance relative de la surface en eau douce qui constitue 76% du potentiel aménageable pour l'aquaculture. Le sud

du pays est abondamment irrigué par le Mékong, qui se sépare en 9 branches pour former un delta couvrant 50 000 km² sur 220 km, de la frontière cambodgienne à la mer de Chine. Cette région comprend 25% de la superficie en eau continentale, ce qui avec le régime de la mousson en fait un lieu de prédilection pour le développement de l'aquaculture. Ainsi le sud du pays représente le tiers des productions aquacoles, dont une partie fournit 45% des recettes d'exportation.

2.2- La pisciculture au Viet Nam.

La pisciculture au VietNam remonte à plusieurs centaines d'années avec l'apparition des systèmes de productions intégrées à l'agriculture. A l'heure actuelle, on dénombre 23 espèces élevées dans le Delta du Mékong, parmi lesquelles 12 autochtones et 12 introduites.

Ces espèces sont élevés à des degrés divers dans les trois principaux système d'élevage développés au Vietnam que sont la rizipisciculture, les étangs et les cages flottantes. En 1990, les 115 000 tonnes de poissons produits se répartissent de la façon suivante :

| | |
|-------------------------------------|-----|
| - rizipisciculture : | 21% |
| - pisciculture en étang : | 64% |
| - pisciculture en cage flottantes : | 15% |

2.2.1- La rizipisciculture.

La rizipisciculture est une activité traditionnelle basée, soit sur l'alevinage incontrôlé des rizières à partir du milieu naturel lors des crues, soit sur l'alevinage contrôlé de certaine espèces. La rizipisciculture "contrôlée" tend à se développer rapidement du fait de rendement décroissants en poissons provenant du milieu naturel dans les rizières. Cette évolution est due à plusieurs facteurs: cycle de riz plus court (2 à 3/an au lieu d'un seul), variétés plus courtes (donc hauteur d'eau inférieure dans la rizière), utilisation des pesticides...

On estime à 40 000 ha la superficie consacrée à la rizipisciculture dans le delta du Mékong.

Les principales espèces utilisées en rizipisculture sont la carpe commune, argentée, le rohu (*Puntius rohiotus*), et les tilapia.

2.2.2- La pisciculture en étangs.

La pisciculture en étangs recouvre une grande variété de système d'élevage: les étangs à latrines, les zones d'emprunt (pour la construction de maisons, la réalisation de digues pour les rizières), les dépressions naturelles ou artificielles (trous refuges) dans les rizières. *Pangasius hypophthalmus* constitue l'espèce essentielle élevée en étang mais depuis une quinzaine d'années, notamment avec le développement des écloséries, d'autres espèces sont apparues (en association avec *P. bocourti*): giant gourami, *Clarias sp.* et carpe argenté. Les autres espèces (carpes chinoises, indiennes et tilapias) sont également élevées en polyculture dans des étangs de dimension moyenne (200 à 500 m²): il s'agit d'une pisciculture de type

familial. La fertilisation des étangs est essentiellement assurée par les eaux usées domestiques et les effluents d'élevage lorsque celui-ci est pratiqué à proximité des étangs.

Cette pratique de pisciculture intégrée est connue au Viet Nam sous le nom de "VAC" (Verger, Mare, Élevage).

2.2.3- La pisciculture en cages flottantes.

La pisciculture en cages se présente sous deux formes différentes, selon qu'elle est pratiquée dans le Mékong (ou un affluent) ou dans un lac (principalement de barrage).

Dans le Delta, la principale zone d'élevage en cages est située à Chau Doc, à proximité de la frontière cambodgienne. En 1974, le nombre total de cages dans le Delta était estimé à 10 000 dont 7 250 à Chau Doc. En 1993, leur nombre s'élève à 1000.

La principale espèce élevée en cage au Viet Nam est *Pangasius bocourti* qui requiert une bonne qualité d'eau. Le site de Chau Doc, avec un fort débit du Mékong (vitesse du courant de 1 à 3 m/s), est à ce titre tout à fait favorable. Ce site présente également comme atouts d'être proche de la source d'approvisionnement (Cambodge) en alevins et fingerlings des principales espèces élevées en cage et les sous-produits (son de riz notamment) y sont disponibles en grande quantité et bon marché. *Pangasius hypophthalmus* est l'autre importante espèce élevée en cages. Les autres espèces élevées en cages dans le Delta, en qualité essentiellement de poissons d'accompagnement, sont: les tilapias, *Puntius altus*, les carpes. On fournit en annexe le cycle d'élevage de *P. bocourti*.

Les cages sont construites en bois. Elles ont une forme d'un parallélépipède-rectangle et sont construites en planches faiblement espacées pour permettre la circulation de l'eau. Les deux faces recevant le courant sont en grillage métallique galvanisé pour assurer un bon renouvellement en eau.

L'alimentation est apportée, et composée essentiellement de son de riz et de farine poissons.

3- La filière « *Pangasius* ».

3.1- Aperçu global de la filière.

Environ 1000 cages participaient en 1993 à la production de *P. bocourti*, habitées par 7 000 personnes regroupant les pisciculteurs, leur famille et les ouvriers. Pas moins de 1 700 personnes participeraient à la production (10 tonnes de production brute pour une personne au minimum), auxquelles s'ajoutent les 1 000 personnes des deux usines de conditionnement du poisson. Avec les pisciculteurs, les commerçants et les transporteurs, le total serait de presque 3 000 personnes directement concernées par la filière.

En 1993, la production totale commercialisée de *P. bocourti* est estimée à 13 400 tonnes, dont 80% sont destinés au filetage, effectué par deux usines. La capacité journalière de traitement de chacune d'entre elle est de 20 à 30 tonnes. Ces usines, aux capitaux publics traitent également d'autres produits halieutiques. Les filets congelés ne représentent que 20% de la production, du fait du faible rendement de transformation (20-25%). ils sont exportés en Amérique du Nord, en Europe de l'ouest et plus faiblement au Japon; en transitant par les marchés de Hongkong et Singapour. Les exportations rapporteraient 48.7 MFF, soit 69% des recettes de la filière grâce à un produit de forte valeur ajoutée (19.13 FF/kg).

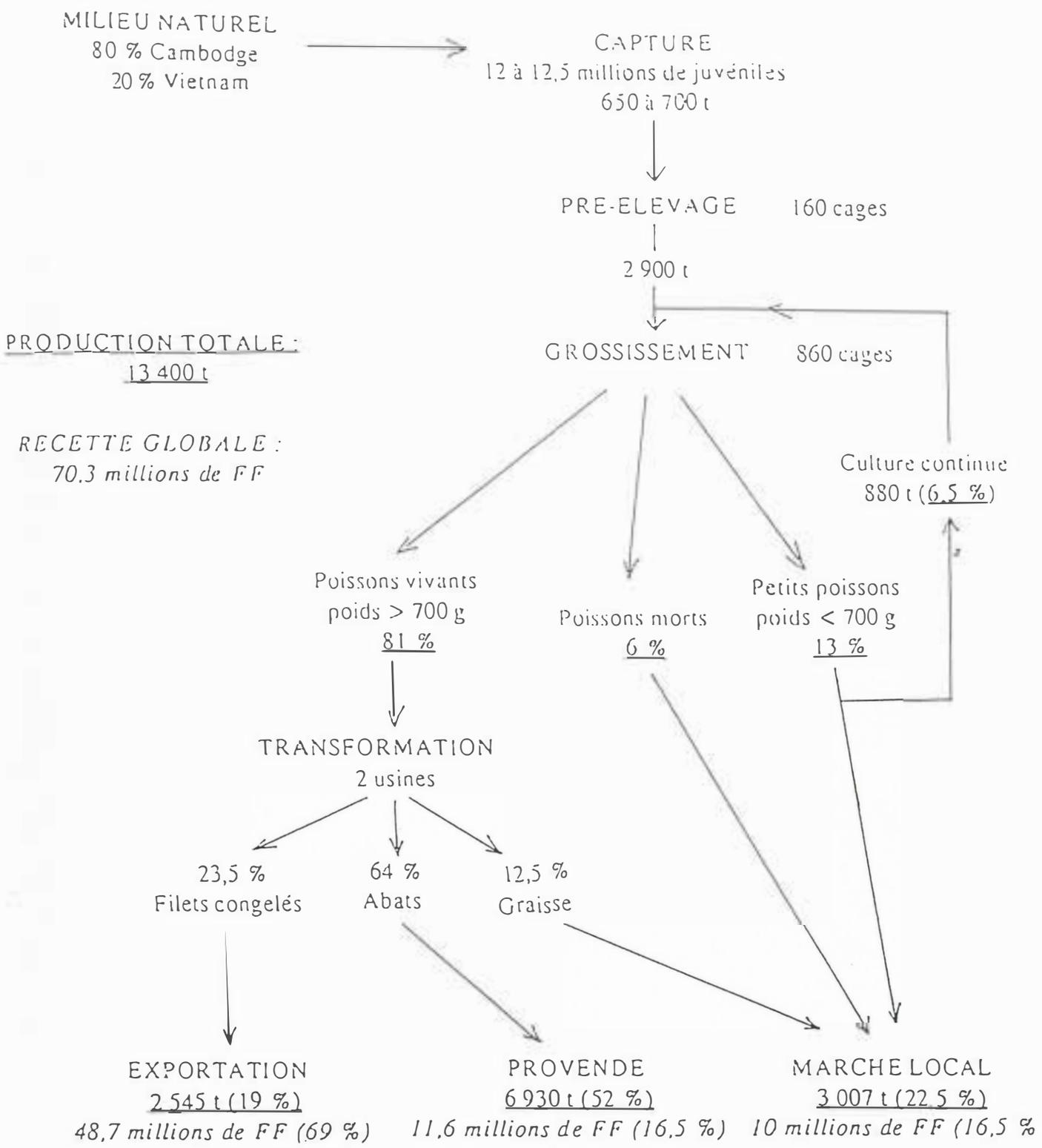


Figure 2.- Aperçu global de la filière de production piscicole de *Pangasius bocourti* dans le Sud-Vietnam (Cacot, 1993).

Les marchés local et national absorbent 74% du tonnage, mais ils ne rapportent que 31% des recettes. Ces ventes sont principalement des déchets destinés à la provende et des sous produits transformés en partie pour l'alimentation humaine (huile, poissons salés séchés, sauce de poisson), dont la valeur marchande moyenne est faible (2.17 FF/kg). Ces marchés sont conditionnés par l'offre des produits de la pêche, qui détermine le niveau des prix, alors que le niveau des prix à l'exportation n'évolue qu'en fonction de la parité entre la monnaie nationale et le dollar. Par conséquent, la mise en marché des *P. bocourti* est plus importante en début de saison des pluies (de juin à août), lorsque le poisson pêché se fait rare, pour vendre au meilleur prix les sous-produits de la transformation.

En 1993, la production de 13 400 t nécessitait environ 2 900 t de fingerlings produits par les nurseries, à partir de 650-700 t de juvéniles capturés dans le milieu naturel, pour 70% au moins au Cambodge. Avec des taux de conversion de 3.1 en nurseries et de 4.6 en élevage, la quantité d'aliment utilisée est estimée à 58 000 tonnes.

3.2- Point faible de la filière.

La production de *Pangasius* est à l'heure actuelle entièrement dépendante de la capture de juvéniles dans le Mékong par des pêcheurs.

En 1993, le prix d'achats des alevins représentaient 50% des charges d'exploitation d'une structure d'élevage en cage flottante. Ces alevins provenaient à 70% du Cambodge.

Or, depuis ces dernières années, le prix de l'alevins a doublé. En effet, le Cambodge a très fortement réglementé le commerce des alevins avec le Vietnam en imposant de lourdes taxes sur cet échange. De plus, du fait de l'attractivité de l'élevage des *Pangasius* en cages flottantes, une spéculation s'est développée qui contribue elle aussi à la hausse des prix.

En outre, avec 26 millions d'alevins pêchés chaque année dans le milieu naturel, on ne peut que s'inquiéter face à la détérioration des stocks naturels, d'autant qu'aucune gestion de ces pêches n'est faite. Ce dernier point interpelle sur le développement durable de cette filière.

Ainsi la maîtrise de la reproduction artificielle des *Pangasius* apparaît donc pour les Vietnamiens comme un axe de recherche prioritaire, non seulement pour ces retombées économiques mais aussi écologiques.

CHAPITRE II : LE PROGRAMME DE COOPERATION FRANCO-VIETNAMIEN.

1- Historique du programme de coopération.

En 1992, une première mission conjointe CIRAD-ORSTOM a été réalisée en Asie du Sud-Est en vue d'identifier les partenaires scientifiques et techniques pour la mise en oeuvre de projets de coopération en recherche et en développement dans le domaine de l'aquaculture continentale. L'Asie constitue en effet dans ce domaine une région stratégique: 85% de la production mondiale en sont issus.

Les pays visités avaient été : Singapour, la Thaïlande, le Cambodge, le Laos, l'Indonésie et le Viet Nam.

Des demandes de coopération avec le CIRAD-ORSTOM en matière de pisciculture continentale ont été alors exprimées; pour le Viet Nam, elles portaient d'abord sur la maîtrise des cycles biologiques des principales espèces autochtones d'intérêt commercial en vue de leur complète domestication et sur la formation de personnels techniques et de chercheurs. Des partenaires vietnamiens avaient alors été identifiés; ils s'agissaient de:

- la Faculté des Pêches de l'Université de Can Tho (UCT),
- l'Institut de Recherche en Aquaculture n°2, ou "ARI 2", dépendant du Ministère des Pêches et basé à Ho Chi Mina Ville (HCM),
- l' Université Agronomique et Forestière de Thu Duc (UAF) basée à HCM, avec ces quatre départements de la Faculté des Pêches: ichtyologie, hydrobiologie, aquaculture (en eaux continentales, douces et saumâtres) et transformations des produit de la pêche et de l'aquaculture.

Pour amorcer le plus rapidement possible cette coopération, les responsables de l'UAF proposaient alors d'accueillir dès 1993 des étudiants français pour leur stage de fin d'études sur des thèmes relatifs à l'analyse des principales filières aquacoles existantes. Ces études descriptives et analytiques de ces systèmes d'élevage serviraient de base à l'édification de thématiques scientifiques qui pourraient constituer le fondement de programme de coopération ultérieure entre l'UAF et CIRAD-ORTSTOM.

Ainsi en 1993, trois étudiants français (A. Bazir, P. Cacot et A. Peignen) étaient accueillis à l'UAF dans le cadre de leur stage de fins d'études. P. Cacot, étudiant en 3ième année en Zootechnie à l'INA-PG, réalisait une étude sur la pisciculture en cage flottante dans le sud Viet Nam en s'intéressant en particulier aux caractéristiques de l'élevage sur le Mékong de *Pangasius bocourti* et *hypophtalmus*. Ce travail servait de base à l'édification d'un programme de coopération scientifique entre l'UAF, l'UCT et le CIRAD dans le cadre de la formation doctorale à l'INA-PG de P. Cacot. Ce programme de recherche porte sur la reproduction en captivité et les performances zootechniques en fonction de divers mode d'alimentation de *P. bocourti* et *hypophtalmus*.

Dans le cadre de ce programme de coopération franco-vietnamiens, l'accueil d'étudiants français au sein des Universités de Can Tho et de l'UAF dans le cadre de stage de fin d'études se poursuivaient. En 1995, M. Campet, étudiant à l'Institut des Sciences et des Techniques d'Outre-Mer, était accueilli à l'UCT et participait aux expérimentations menées par P. Cacot sur la croissance et l'alimentation comparée sur *P. bocourti* et *hypophtalmus*.

En 1996, l'accueil d'étudiants français se renouvelaient. En plus du stage dont ce présent mémoire fait l'objet, S. Lenormand, étudiante en spécialisation halieutique à l'École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes a réalisé une étude sur l'écologie des pangasidés aboutissant à des modifications dans la classification.

2- Bilan du programme " *Pangasius*" en 1996.

2.1- Partenaires et infrastructures.

Trois partenaires vietnamiens interviennent dans le projet de recherches:

- l'Université Agronomique et Forestière de Thu Duc à Ho Chi Minh Ville,
- l'Université de Can Tho,
- la Compagnie AGIFISH, fortement impliquée dans la production et la transformation des *Pangasius* d'élevage.

L' UAF, premier partenaire au Viet Nam a largement contribué par son soutien humain et logistique à l'analyse de la filière d'élevage de *Pangasius* en cages flottantes réalisée en 1993. Depuis 1994, sa participation à la composante "Pangasisus» du projet s'est essentiellement limitée à des échanges d'informations. Ceci tient à deux raisons principales: d'une part, la disponibilité réduite des chercheurs de la Faculté des Pêches de cette université dont beaucoup sont actuellement en complément de formation à l'étranger et ,d'autre part, son relatif éloignement par rapport aux sites d'élevage et d'expérimentation. Cependant depuis cette année, Mr Le Thanh Hung, professeur à l'UAF, participe en collaboration avec P. Cacot, aux expérimentations sur l'élevage larvaire de *Pangasius* dans le cadre de son travail de thèse au sein de l'INA-PG.

Pour des raisons de logistique, le projet est actuellement basé sur le campus de l'UCT, en relation avec la Faculté des Pêches de l'UCT, qui ont permis la mise à disposition des infrastructures suivantes:

- une pièce servant de bureau et de laboratoire,
- un hall d'expérimentation équipé de bacs composite de 2m³, de bouteilles de zougs et d'aquariums, destinés notamment aux expériences de reproduction et d'élevages larvaires,
- 4 étangs en terre où sont maintenus et régulièrement suivis un total d'une centaines de géniteurs de *P. bocourti* et *hypophthalmus*, provenant du stock de géniteurs entretenu par AGIFISH à Chau Doc et de poissons conservés par l'université de Can Tho.

La compagnie AGIFISH, déjà en contact avec les enseignants-chercheurs de l'UAF et de l'UCT depuis plusieurs années et disposant d'un stock de plus de 1 millier de géniteurs de *P. bocourti* et *hypophthalmus* élevés en cages flottantes sur le site de Chau Doc depuis 7 ans, est également apparu comme un partenaire logique du projet.

Les expériences, décrites plus loin et relative à une meilleure connaissance de l'appareil reproducteur mâle, se sont déroulées dans les infrastructures d'AGIFISH et en étroite collaboration avec des ingénieurs et des techniciens vietnamiens de cette compagnie.

2.2- Bilan scientifique.

L'objectif du programme est de préciser la saison de reproduction, de déterminer les conditions les plus favorables à la maturation sexuelle et d'établir une méthode de reproduction induite en vue de la production d'alevins de *P. bocourti* et *hypophthalmus* en conditions d'élevage.

Ainsi, le suivi mensuel de la croissance et de la maturité sexuelle de ces deux poissons a permis de définir au mieux la saison de reproduction.

En plus, des efforts ont été apportés pour améliorer les conditions d'élevage de ces poissons-géniteurs, en particulier sur l'alimentation. Ainsi, cette démarche a donc permis de limiter les dépôts adipeux périsvécéraux et de favoriser le développement des gonades. Des rapports gonado-somatique (ou RGS) supérieur à 6% ont été observés sur des femelles, alors que, jusque là, le RGS maximal observé sur des femelles élevées en cage flottante selon les méthodes traditionnelles ne dépassait pas 2%.

Fort de ces enseignements, des tentatives d'induction de l'ovulation par traitement hormonal ont été réalisées qui débouchaient le 11 mai 1995 sur la fécondation de 70 grammes d'ovules de *P. bocourti*. Le pourcentage de fécondation était de 79%, et celui d'éclosion de 12%. C'était la première fois que des larves de *P. bocourti* étaient obtenues en captivité au Vietnam (une seule publication scientifique a déjà fait état de la reproduction de ce poisson en conditions contrôlées, en 1968 en Thaïlande). Cet objectif était recherché par les partenaires vietnamiens depuis une dizaine d'années. Cet événement a fait l'objet d'un article dans l'un des quotidiens nationaux, Tuoi Tre.

Ce succès justifiait la poursuite des recherches engagées pour la maîtrise de la reproduction de cette espèce en conditions d'élevage.

Quant à *P. hypophthalmus*, la reproduction de ce poisson est maîtrisée depuis 1982 au Vietnam. Des taux de fécondation variables (de 20 à 80%) et des taux de survie des alevins de 10 à 20% après 2 semaines justifient, de leur côté, la poursuite des recherches sur cette espèce.

3- La compagnie AGIFISH.

3.1- Activités de la Compagnie AGIFISH.

An Giang Fisheries Import & Export Co. est une entreprise d'état (dépendante de la province de An Giang) créée en 1990, avec l'ouverture du Viet Nam, suite à la politique d'ouverture mise en place par le gouvernement vietnamien. Cette entreprise a pour vocation l'export de produits de la pêche ou de l'aquaculture, transformés ou pas. Le chiffre d'affaire de ces exportations s'élevait en 1995 à 25 000 000 US\$. 50% de la production (en volume) est achetée par des intermédiaires de Hong Kong. Les autres principaux clients sont Singapour, le Japon, l'Australie, les Etats-Unis, l'Allemagne, la Belgique et la France. 80% de ce chiffre d'affaire est représenté par les filets de *P. bocourti*, qui se vend sous différentes appellations commerciales: Pacific Dory, *Pangasius* ou encore Ba Sa.

Cette entreprise dispose de 3 usines: à Long Xuyen, 2 usines de transformations et de congélation des produits employant 1 000 personnes dont 85% de femmes; ces deux usines sont aux normes européennes et japonaises. A Chau Doc se trouve une usine de fabrication et

de conditionnement du Nuoc Mam, et le site d'élevage des poissons chats en cages flottantes. 150 personnes travaillent sur le site de Chau Doc.

AGIFISH possède 34 cages flottantes d'élevage, dont 5 sont uniquement utilisées pour la reproduction artificielle de *P. bocourti* et *hypophthalmus*, le pré-grossissement de fingerlings issus de ces manipulations et le stockage des géniteurs. AGIFISH dispose en outre d'un petit centre de développement de la reproduction artificielle de ces poissons chats à Tanua, où les fingerlings sont élevés en étangs.

La production de *P. bocourti* dans ces cages est estimée pour 1996 à 2 500 tonnes; elle n'était que de 1 200 tonnes en 1994. Ce tonnage représente 16% de la production nationale de ce poisson, qui, je le rappelle, serait estimée par tous mes interlocuteurs à 15 000 tonnes, entièrement produite dans le delta du Mékong. En ce qui concerne les *P. hypophthalmus* et les tilapia, la production d'AGIFISH serait respectivement estimée pour 1996 à 400 tonnes (soit 8% de la production nationale) et 500 t.

En 1995, 10 000 tonnes de poissons avaient été transformées dans les usines de la compagnie; 80% de ce tonnage était constitué de filet de *P. bocourti* congelé (nature ou pané), 10% de filet de *P. hypophthalmus*. Les 10% restants sont constitués de crevettes congelées, calmars, de filets de River Cobbler, de Tilapia, de Nuoc Mam... Ainsi AGIFISH transforme 53% de la production nationale de *P. bocourti*, et 20% de celle de *P. hypophthalmus*.

En ce qui concerne le *P. bocourti*, 30% des poissons transformés dans les usines de Long Xuyen ont été élevés dans les cages de la compagnie AGIFISH. Les 70% restant sont achetés à des éleveurs privées ou à d'autres compagnies, à un prix de 17 000 dongs par kilo de poisson vif. Ce prix correspond à un animal de qualité moyenne; nos interlocuteurs n'ont pas voulu nous dévoiler le prix pour des poissons de qualité supérieur.

Pour le *P. hypophthalmus*, la totalité des poissons transformés est achetés hors de la compagnie AGIFISH, à un prix de 13 000 dongs/kg¹, toujours pour un animal de qualité moyenne.

En résumé:

Tableau 1.- Place de la société AGIFISH dans la filière *Pangasius*.

| Espèces | <i>P. bocourti</i> | <i>P. hypophthalmus</i> |
|---|---------------------------|--------------------------------|
| Production AGIFISH 1996 (en tonnes) | 2 500 | 400 |
| Production nationale (en tonnes) | 15 000 | 5 000 |
| % | 16.6 | 8.0 |
| Tonnage transformé | 8 000 | 1 000 |
| Part de la production AGIFISH dans ce tonnage (en %) | 31.2 | 40.0 |
| % production nationale transformé par AGIFISH | 53.3 | 20.0 |

¹ 2100 dongs = 1FF.

CHAPITRE III : INTRODUCTION A L'EXPERIMENTATION.

1- Quelques aspects de la biologie de *P. bocourti* et *hypophtalmus*.

1.1- Caractéristiques biologiques.

Les *Pangasius bocourti* et *hypophtalmus* sont des poissons téléostéens, qui appartiennent au genre des Siluridés (englobant les « poissons-chats ») et à la famille des Pangasidés. Cette famille est représentée au Vietnam par 11 espèces dont 5 ont été recensées dans la pisciculture en cage.

La vessie natatoire de ces poissons est un organe respiratoire accessoire. Cette caractéristique rend ces poissons particulièrement adaptés aux conditions d'élevage en cage, où la densité d'empeisonnement élevée en saison sèche diminue la quantité d'oxygène dissous.

Tout en restant omnivore, le régime alimentaire évolue avec la taille des poissons. La présence dans le tractus digestif de débris animaux et de crustacés augmente avec la taille des poissons, alors que celle des fruits diminue.

1.2- Cycle biologique.

Une partie des Téléostéens du delta du Mékong, suivent des flux migratoires annuels qui les ramènent en début de saison des pluies au Cambodge. Le *P. bocourti* et *hypophtalmus* effectuent également cette remontée, qui semble nécessaire à leur reproduction. Au Cambodge, on peut pêcher des individus de 120 cm pour 15 kg, alors que au Vietnam, les individus pêchés ne dépassent pas 3 kg. De plus aucune gonade dans un état de maturation sexuelle avancée n'a été signalée au Vietnam. La migration vers les lieux de reproduction serait peut être une condition au déclenchement de la maturation sexuelle. Deux hypothèses peuvent être émises quant à la localisation des sites de frai :

- les zones boisées inondées au Cambodge attirent un grand nombre d'espèces en début de saison des pluies : ce biotope semble propice à la reproduction des poissons (abri, nourriture). Elles bordent essentiellement le Tonlé-Sap, dont la superficie triple au cours de la saison des pluies, et où une importante quantité de *Pangasius* juvéniles sont capturés de juin à novembre.

- en amont du Mékong, vers le Laos dans la province de Cong-Pong-Cham au Cambodge, où des *Pangasius bocourti* de grande taille, et présentant des gonades développées ont été signalés. Il s'agit d'une zone de plateaux élevés, où le Mékong présente un courant rapide et un lit de roche.

Chaque année en saison des pluies, d'importantes quantités d'alevins descendent le Mékong : ils seraient issus donc de la ponte en amont sur l'un ou l'autre de ces sites. La présence des poissons au Vietnam correspondrait à une partie de leur cycle biologique, qui se poursuivrait en amont lorsque les poissons atteignent l'âge adulte.

Le rendement de transformation de ces deux poissons est le suivant:

- pour *P. bocourti*: 4 à 4.5 kg de poissons vifs sont nécessaires pour faire 1 kg de filet.

- pour *P. hypophthalmus*: 3.5 à 3.7 kg de poissons vifs sont nécessaires pour faire 1 kg de filet.

Le prix de vente du kilo de filet de ces deux poissons départ usine est de:

- 5.20 US\$² pour *P. bocourti*,

- 4.70 US\$ pour *P. hypophthalmus*.

Le kilo d'abats est vendu, de son côté, 4 000 dong sur le marché intérieur.

3.2- Les infrastructures de recherche dans la Compagnie AGIFISH.

Comme nous l'avons souligné plus haut, cinq cages flottantes de la Compagnie AGIFISH sont utilisées pour la reproduction artificielle de *P. bocourti* et *hypophthalmus*, le prégrossissement de l'ingelings issus de ces manipulations et le stockage des géniteurs. Une de ces cages est prêtée à Philippe Cacot pour mener à bien les recherches sur la reproduction artificielle.

Le stock de géniteurs dont dispose la compagnie AGIFISH sur le site de Chau Doc se répartit comme suit:

Tableau 2.- Le stock de géniteurs entretenus par AGIFISH.

| Espèces | Mâles | Femelles | Non matures | Total |
|-------------------------|----------|----------|-------------|-------------|
| <i>P. hypophthalmus</i> | 75+(22) | 25+(60) | (18) | 200 |
| <i>P. bocourti</i> | 250+(17) | 350+(60) | 960+(24) | 1661 |
| | | | | 1861 |

(X)= géniteurs mis à disposition de P. Cacot par AGIFISH pour des expérimentations.

Pour réaliser les expériences, nous disposons de:

- 6 bacs en composites d'une capacité de 1m³ (taux de renouvellement en moyenne de 10) afin de stocker les géniteurs sélectionnés pour les manipulations de reproduction artificielle.

- un microscope de grossissement (10x10, 20, 40 ou enfin 100), utilisé lors des tests de motilité.

- une loupe binoculaire afin de mesurer l'évolution du diamètre ovocytaire lors de la maturation.

² 1USD = 5.30 FF

2- Reproduction artificielle de *Pangasius bocourti* et *hypophthalmus*.

Les techniques de reproduction induite et de fécondation artificielle sont maîtrisées chez *P. bocourti* depuis l'année dernière, et depuis une vingtaine d'années pour *P. hypophthalmus*.

En ce qui concerne les femelles, la maturation ovocytaire et l'ovulation sont provoquées par injection intramusculaire de gonadotropine chorionique humaine (HCG) après sélection des femelles sur la bases d'un diamètre ovocytaire voisin de 1.6mm. Des injections à faible dose (dite de priming) entre 500 et 1000 UI/kg sont réalisées afin de faire mûrir les ovocytes. lorsque le diamètres ovocytaire a atteint une valeur suffisante (1.8 chez *P. bocourti*, 1.7 chez *P. hypophthalmus*), une injection plus forte d'HCG (entre 1500 et 2000 UI/kg) est pratiquée; nommée injection ovulatoire, elle vise comme son nom l'indique à faire ovuler la femelle. Les ovocytes sont obtenus par massage abdominal, couramment appelé stripping. Le temps de latence entre la dernière injection et le stripping reste encore imprécis; en effet, il dépend de la température et de l'individu c'est à dire de son état de maturation lors de la dernière injection.

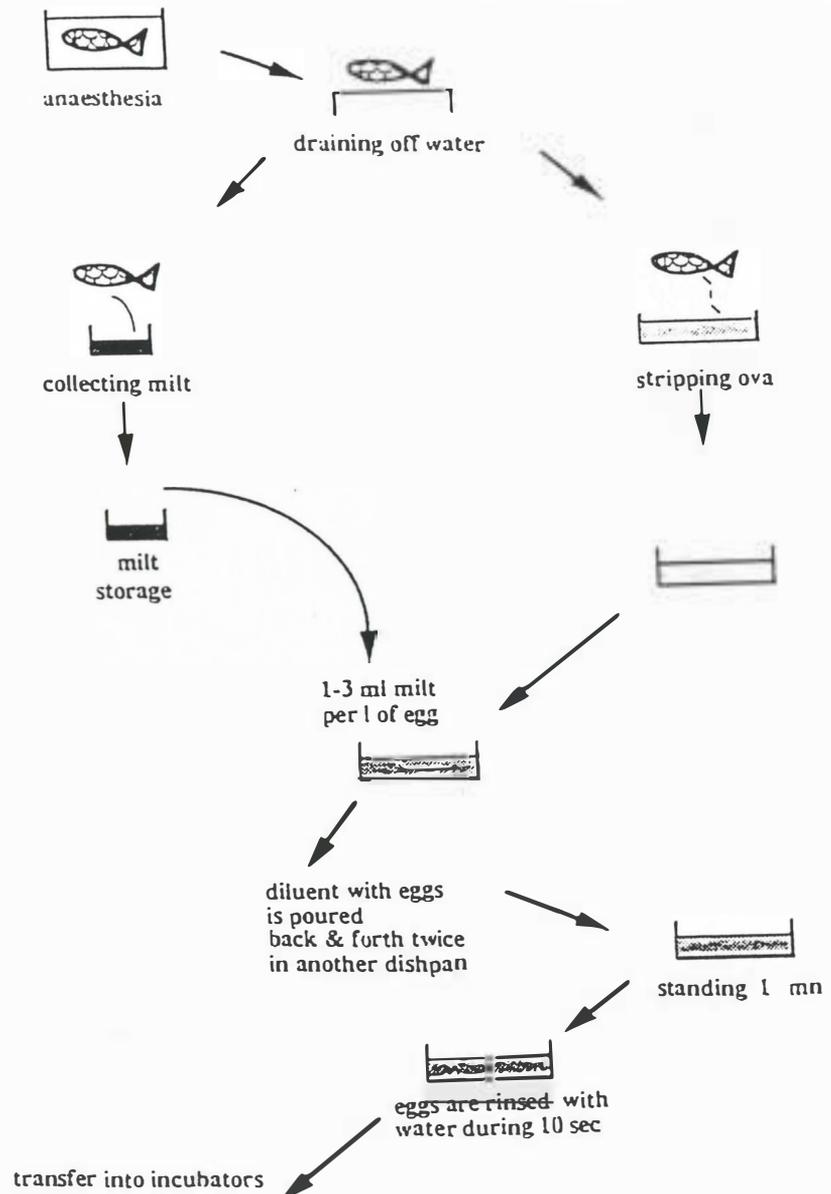


Figure 3.- Déroulement de l'insémination artificielle.

Pour les mâles, l'induction de la spermiation est réalisée à partir de différentes hormones:

- HCG, comme pour les femelles,
- LHRH, une Gonado Tropin Releasing Hormon associée au Dompéridone, un antidopaminergique, utilisées en association ou seule, et dans ce dernier cas lors de une ou plusieurs injections. Les temps de latence entre la (ou les) injections sont non définies.

Pour la fécondation, les gamètes sont mis en présence et activés par ajout dans un milieu de fécondation, qui était jusqu'alors soit de l'eau minérale soit de l'eau du Mékong. Ce liquide d'activation va induire d'une part, l'activation de spermatozoïdes et d'autre part, engendrer une suite de réactions biologiques aboutissant à la fermeture du micropile des ovules.

Les oeufs, une fois fécondés, sont rincés une trentaine de secondes dans une solution d'urée afin de limiter les risques d'agglomération des oeufs entre eux du fait de leur disque adhésif. L'incubation des oeufs est ensuite réalisée dans différentes installations qui vont du bac fermé en eau stagnante à une structure en système ouvert type bouteille de zougs.

3- Objectifs du travail de stage.

La physiologie de la gamétogénèse et de la fécondation chez les Pangasidés est encore mal connue et la reproduction artificielle présente quelques difficultés encore insurmontées. Si les connaissances commencent à s'accumuler concernant la physiologie de la reproduction chez les femelles, celles-ci sont quasiment nulles concernant les mâles. En effet, les efforts s'étaient d'abord portés sur l'obtention d'ovules, puisqu'on avait déjà observé des mâles matures en captivité. Néanmoins, en vue d'améliorer la méthode de reproduction artificielle, il est apparu souhaitable de mieux comprendre le fonctionnement de l'appareil reproducteur mâle, surtout en ce qui concerne, la stimulation de la spermiation, la récolte du sperme et les conditions optimales de l'insémination artificielle. Ainsi 4 objectifs ont été formulés:

a)- définir une méthode. fiable d'induction de la spermiation chez ces deux espèces; avant ce présent travail, les mâles-géniteurs qui après avoir été injectés, ne donnaient que peu de sperme lors du stripping étaient systématiquement sacrifiés.

b)- définir les modalités de collecte et établir des solutions de conservation à court terme du sperme, car ce dernier étant pollué par l'urine s'avérait souvent infertile.

c)- mise au point d'un dilueur d'insémination artificielle; l'objectif consiste à remplacer l'eau classiquement utilisé dans la pratique piscicole par un dilueur plus approprié.

d)- quantifier le volume nécessaire de sperme pour féconder une quantité connu d'oeufs, ce qui revient à calculer un nombre de spermatozoïdes nécessaires pour féconder un ovule.

CHAPITRE IV : STIMULATION HORMONALE DE LA SPERMIATION CHEZ PANGASIUS BOCOURTI ET HYPOPHTALMUS.

1- Physiologie de la reproduction chez les Téléostéens.

1.1- Endocrinologie de la reproduction chez les téléostéens.

Les diverses étapes de la reproduction chez les vertébrés sont coordonnées par les systèmes nerveux et endocrinien agissant de concert. La figure 4 représente à l'aide d'un diagramme la suite des événements qui se produisent depuis la perception de stimuli ambiants jusqu'à la libération des gamètes. On y constate que l'action neurale prédomine au début, pour être remplacée par la suite par l'action hormonale.

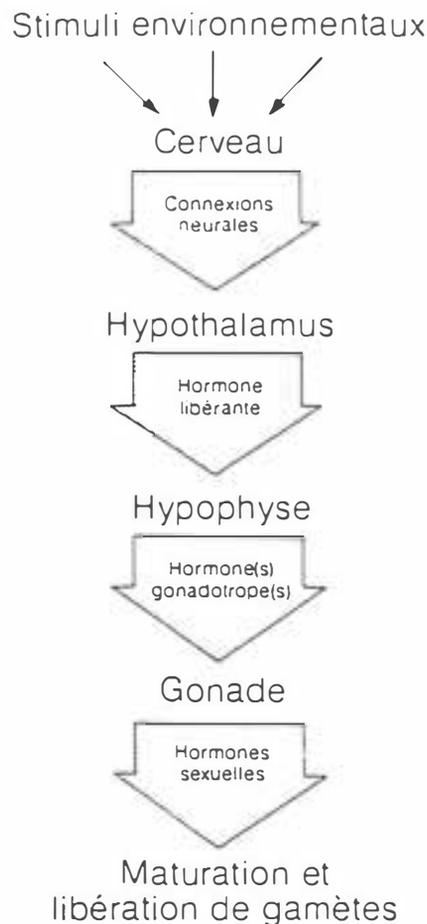


Figure 4.- Principaux maillons de la chaîne physiologique des événements qui vont de la réception des stimuli environnementaux à la libération des gamètes matures.

(Harvey et coll., 1980)

La réception de stimuli de l'environnement, tels que la longueur du jour (photopériode), température et précipitation, relève du système nerveux et comporte le passage de l'information des récepteurs sensoriels au cerveau. Cette information, au moment où elle atteint l'hypothalamus, détermine l'activité hypophysaire par le biais de messagers chimiques appelés hormones libérantes. Ce sont les gonadotropin-releasing hormon ou GnRH. Ces dernières stimulent positivement l'hypophyse qui libère dans l'appareil circulatoire générale une hormone dont l'organe cible est la gonade. Cette hormone porte le nom de gonadotropine ou GtH. Elle a pour effet de stimuler la production de stéroïdes sexuels sur la gonade; ces derniers sont responsables de la maturation des gamètes. Comme dans beaucoup de systèmes biologiques, il existe un système inhibiteur à la libération de la gonadotropine. Une neurohormone, la dopamine, présente en grande concentration dans les terminaisons nerveuses de l'hypothalamus inhibe la libération de gonadotropine.

1.2- De la spermatogenèse jusqu'à la spermiation.

Le testicule de poisson a une forme de sac et est tapissé par une couche de cellules germinales spermatogénétiques, les spermatocytes qui produisent des spermatozoïdes matures durant la spermatogenèse. Les spermatocytes sont enveloppés dans des cellules de Sertoli jusqu'à la libération des spermatozoïdes dans la lumière du testicule: c'est la spermiation. La dernière étape avant la libération des spermatozoïdes est l'hydratation de ces gamètes par le liquide séminal synthétisé au niveau des parois du spermiducte. Lors de l'éjaculation, la laitance est libérée dans le milieu extérieur.

Dans le contrôle de la gamétogenèse, l'action de la gonadotrophine est en grande partie indirecte, par le biais d'hormones sexuelles stéroïdes, et c'est ce dernier maillon de la chaîne qui serait responsable de l'interruption de la maturation en captivité. La figure 5 résume les actions des différentes hormones. On observe dans de nombreuses espèces une élévation de la gonadotropine à la fois dans l'hypophyse et le plasma lors de l'initiation de la spermatogenèse. pendant la spermatogenèse, les teneurs restent faibles dans l'hypophyse et augmentent dans le plasma où elles diminuent lors de la spermiation, alors que le taux d'androgènes augmente. La disparition des stéroïdes coïncident avec la fin de la spermiation.

Les mâles sont considérés comme mature dès que la spermiation a commencé. Les phénomènes de spermiation et d'hydratation s'accroissent avec l'apparition de stimuli adéquats et sont souvent synchronisés avec la maturation finale des femelles. Bien que les mâles sont facilement mûres en captivité, des injections d'hormones sont parfois nécessaires pour induire ou accélérer la spermiation. Le moment du stripping reste très important car une fois induit, l'hydratation continues jusqu'à ce que le sperme soit expulsé. Ainsi, si la laitance est prélevée pour une manipulation de reproduction artificielle, le pisciculteurs doit avoir une idée du moment où le volume est le plus élevé. Dans de nombreuses espèces, les mâles peuvent être induits plusieurs fois par saison.

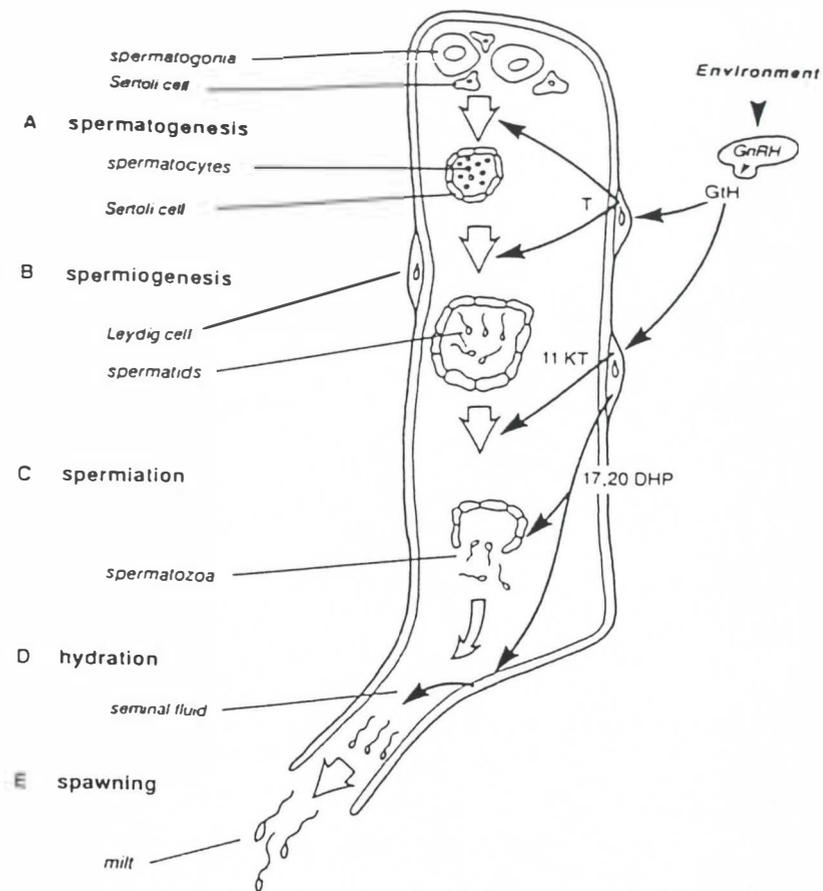


Figure 5.- Coupe d'un lobe testiculaire montrant le contrôle hormonal des différents stades de maturation du sperme (GnRH : gonadotropin-releasing hormone, GtH : hormone gonadotrope, T : testostérone, 11-KT : 11-kéto testostérone, 17.20-DHP : 17.20-dihydroxy progestérone) (Harvey et coll., 1993).

2- Stimulation de la spermiation chez *Pangasius bocourti*.

2.1- Problématique.

La quantité de sperme récoltée manuellement par massage de la paroi abdominale de mâles matures non induits demeure très faible (moins de 1 ml). Après stimulation hormonale, les volumes recueillis n'étaient pas toujours probants et les collègues vietnamiens n'hésitaient pas à sacrifier les géniteurs mâles afin de récupérer les testicules qui, une fois broyés et pressés, fournissent le sperme nécessaire aux fécondations. Dernièrement, les collègues ont tenté de pallier au sacrifice des mâles en pratiquant une laparotomie et en prélevant une partie du testicule. Nous n'avons pas pu évaluer la mortalité chez ces animaux opérés, mais il est clair que cette méthode présente aussi d'autres inconvénients: animal utilisé une seule fois par campagne de reproduction, conséquences sur la physiologie testiculaire non évaluée. Pourtant dans un contexte d'optimisation de la reproduction artificielle de ce poisson, le sacrifice systématique des géniteurs mâles ne peut pas toujours être économiquement envisagé. En effet, l'âge moyen des mâles géniteurs doit être de l'ordre de 3 à 4 ans, ce qui représente un coût de production et une immobilisation importante. L'utilisation potentielle des géniteurs est de plusieurs années; de ce fait la mise au point d'une méthode fiable d'induction de la spermiation afin de préserver les géniteurs se justifie pleinement.

La première partie de ce travail a consisté à répertorier les différentes stimulations hormonales (nature, dose, combinaison) qui avaient été alors pratiqués sur ce poisson. Ces résultats, sont répertoriés dans le tableau X (annexe).

Le stripping des mâles étaient jusqu'alors effectué juste avant le stripping des femelles: en effet le facteur limitant des reproductions artificielles était l'obtention d'ovules car on savait que l'on pouvait avoir des mâles spermiant facilement en captivité après induction. Néanmoins, on constate de grande différence dans les résultats en fonction de la nature de l'hormone employée, de l'intervalle de temps entre la dernière injection et le stripping, des combinaisons d'hormones injectées.

Nous avons donc décidé d'évaluer la dynamique de la réponse de *P. bocourti* après une seule injection, d'HCG ou de LHRH+DOM, en mesurant le volume recueilli après stripping et la concentration en spermatozoïdes.

2.2- Stimulation de la spermiation après une injection d'HCG.

PRINCIPE.

Le but de cette expérience est de mesurer la dynamique de la spermiation après stimulation hormonale par de l'HCG. Le volume recueilli et la concentration en spermatozoïdes du sperme sont mesurés.

MATERIEL ET METHODE.

L'expérience a été effectuée avec 3 lots de 4 mâles, strippés une seule fois à des temps croissants (12, 24 et 48 heures) après une injection d'HCG à la dose de 2 000UI/kg, diluée dans une solution saline à 9⁰/₀₀. Un groupe témoin (de 4 mâles), non injecté, est strippé en début d'expérience.

Le *P. bocourti* est un poisson sans écaille. De ce fait, un stripping détériore la peau de ces animaux, car il enlève une grande quantité de mucus. Les infections cutanées se développent d'autant plus vite que les stripping sont longs et qu'ils se répètent. Ainsi, avons-nous décidé de ne pratiquer qu'un seul stripping par poisson et ce dans le seul but de préserver le stock de géniteurs.

Les poissons sont checkés la veille du début de expérience dans le stock de poissons-géniteurs entretenus en cage flottante par la compagnie AGIFISH. Durant expérience les poissons sont stockés en circuit ouvert par 2 dans des bacs composites de 1m³, dont l'eau est renouvelé en moyenne 10 fois par jour. La température lors des mesures variait de 28.6 à 30.2°C. Les poissons avant stripping sont endormis dans un bain de phenoxy-éthanol. Le sperme est prélevé dans une seringue contenant un volume fixe de solution saline à 9⁰/₀₀. Ainsi, après lecture et par différence avec ce volume connu, on détermine la quantité de sperme recueilli. La concentration en spermatozoïdes est mesurée par dénombrement des têtes spermatiques sur hématimètre après dilution à un taux de 4000 dans une solution saline à 9⁰/₀₀. Quatre mesures successives de concentration sont effectuées pour chaque sperme.

En outre, du fait d'un nombre de bacs trop faible, cette expérience a dû être réalisée en 2 fois. Pour chaque demi-expérience, ce n'était donc pas quatre poissons qui étaient affectés à chaque traitement mais seulement deux.

Les résultats sont analysés statistiquement par la méthode ANOVA en utilisant des tests paramétriques lorsque les variances sont égales (test de Dunnet) ou non paramétriques lorsque elles ne le sont pas (test de Dunn's).

RESULTATS.

Les résultats de l'expérience sont consignés dans le tableau 3.

Tableau 3.- Dynamique de la spermiation après une injection d'HCG chez *P. bocourti*.

| | Volume collecté ($\mu\text{l}/\text{kg}$) | | Concentration ($10^9/\text{ml}$) | | Quantité ($10^7/\text{kg}$) | |
|---------|---|--------|------------------------------------|-------|-------------------------------|--------|
| | Moyenne (Ecart type) | | Moy. (ET) | | Moy. (ET) | |
| Témoins | 26,54 | 29,96 | 13,27 | 15,36 | 86,38 | 113,19 |
| H12 | 344,54 | 125,27 | 26,89 | 13,43 | 836,91 | 455,47 |
| H24 | 234,14 | 198,32 | 16,70 | 5,92 | 433,14 | 473,20 |
| H48 | 169,59 | 168,60 | 12,96 | 3,57 | 260,07 | 323,71 |

Nous pouvons observer que le volume de sperme collecté est maximal 12 heures après injection et s'élève à 345 $\mu\text{l}/\text{kg}$ de poissons. Néanmoins du fait de très fortes variations individuelles, les différences observées ne sont pas significatives au seuil des 5%. La concentration en spermatozoïdes suit la même évolution que celle du volume, c'est à dire qu'elle est maximale 12 heures après injection, et redevient semblable au contrôle 48 heures après injection. Pour autant, la concentration ne varie pas significativement entre traitement. Au bilan, la quantité de spermatozoïdes récoltée est donc maximale 12 heures après injection et est de 837 10^7 spermatozoïdes par kg .

DISCUSSION.

Cette expérience montre que la spermiation est stimulée par une injection d'HCG et que la réponse est maximale 12 heures après injection. Cette stimulation provoque une augmentation du nombre de spermatozoïdes récoltés du fait non seulement d'une augmentation du volume de sperme collecté mais aussi de la concentration en spermatozoïdes. Ainsi, l'HCG provoque d'une part une synthèse de liquide séminal , mais en plus il semblerait qu'il y ait une spermatogenèse. Ce dernier phénomènes physiologiques semble être plus prépondérant que la synthèse de liquide séminal puisque la concentration en spermatozoïdes augmente.

Pour autant, ces conclusions doivent être relativisées puisque les différences ne sont pas significatives au seuil des 5%. En effet, lors du checking des géniteurs mâles, était sélectionné tout individu qui était spermiant lors d'un léger massage abdominal. De ce fait et puisqu'il y avait une répartition aléatoire des individus par traitement, on se retrouve avec une grande hétérogénéité pour chaque groupe :

- hétérogénéité de poids,
- hétérogénéité d'âge,
- et surtout hétérogénéité dans le stade de maturité sexuelle.

Par conséquent, les individus sont donc plus ou moins sensible à une induction hormonale selon qu'il se trouve en début ou en fin de cycle de reproduction. En outre, il faut souligner le nombre assez faible de poissons affectés à chaque traitement. Ce fait résulte d'abord du faible nombre de géniteurs dont dispose la société AGIFISH, mais surtout des capacités de stockage des géniteurs qui ne nous permettaient pas de traiter plus d'individus.

Néanmoins, dans un cadre de développement et moins dans un souci d'exactitude scientifique, l'objectif avoué de cette expérience était double :

- estimer quel délai on devait laisser après l'injection pour pouvoir collecter le maximum de sperme,
- préciser en moyenne (sur 4 poissons) combien de millilitre de sperme on pouvait espérer recueillir.

2.3- Stimulation de la spermiation après une injection de LHRH+Dompéridone.

PRINCIPE.

Le but de cette expérience est de mesurer la dynamique de la spermiation après stimulation hormonale par une association LHRH+Dompéridone. Le volume recueilli et la concentration en spermatozoïdes du sperme sont mesurés.

MATERIEL ET METHODE.

Le protocole est identique à celui défini plus haut mais appliqué à un nouveau lot de 16 poissons.

Les doses de LHRH et de Dompéridone injectées sont respectivement de 30µg/kg et 3mg/kg.

Les poissons sont stockés dans les mêmes bacs que précédemment et la température lors des mesures variait de 28.1 à 30.4°C.

RESULTATS.

Les résultats de l'expérience sont consignés dans le tableau 4.

Tableau 4.- Dynamique de la spermiation après une injection de LHRH+Dompéridone chez *P. bocourti*.

| | Volume collecté ($\mu\text{l}/\text{kg}$) | | Concentration ($10^9/\text{ml}$) | | Quantité ($10^7/\text{kg}$) | |
|---------|---|--------|------------------------------------|------|-------------------------------|--------|
| | Moyenne (<i>Ecart type</i>) | | Moy. (<i>ET</i>) | | Moy. (<i>ET</i>) | |
| Témoins | 39,52 | 36,18 | 13,29 | 9,40 | 43,30 | 33,90 |
| L12 | 65,04 | 73,49 | 12,15 | 8,15 | 109,64 | 133,31 |
| L24 | 143,92 | 100,25 | 17,56 | 5,05 | 241,00 | 171,20 |
| L48 | 187,06 | 146,64 | 15,77 | 6,28 | 328,69 | 285,73 |

Nous pouvons observer que le volume de sperme collecté est maximal 48 heures après injection avec $187 \mu\text{l}/\text{kg}$ prélevé en moyenne. Néanmoins du fait de très fortes variations individuelles, les différences observées ne sont pas significatives au seuil des 5%. La concentration en spermatozoïdes est relativement stable et de ce fait ne varie pas significativement entre traitement. Au bilan, on peut espérer recueillir au maximum 48 heures après injection $329 \cdot 10^7$ spermatozoïdes par kilo.

DISCUSSION.

Cette expérience montre que la spermiation est stimulée par une injection de LHRH et de Dompéridone et que la réponse est maximale 48 heures après injection. Cette stimulation provoque une augmentation du nombre de spermatozoïdes récoltés du fait essentiellement d'une augmentation du volume de sperme collecté puisque la concentration en spermatozoïdes reste stable au cours de l'expérimentation. Là encore il semble qu'il y ait spermatogenèse (augmentation des spermatozoïdes collectés) mais ce phénomène est beaucoup moins fort que par exemple pour l'HCG puisque la concentration reste stable.

Pour autant, ces conclusions doivent être relativisées puisque les différences ne sont pas significatives au seuil des 5%.

3- Stimulation de la spermiation chez *Pangasius hypophtalmus*.

3.1- Problématique.

D'une manière générale, les mâles de *P. hypophtalmus* sont beaucoup plus spermiantes après induction hormonale que les *P. bocourti*. Cependant, nous n'avons pas pu recueillir de données antérieures sur les volumes collectés (comme nous avons pour *P. bocourti*) car nos confrères vietnamiens ne conservaient pas de données sur cet animal. Pour autant, cette particularité physiologique de l'appareil reproducteur mâle de *P. hypophtalmus* explique pourquoi nos confrères vietnamiens réalisaient sporadiquement des reproductions croisées entre femelle *P. bocourti* et mâle *P. hypophtalmus*. Si ces manipulations étaient effectués dans un seul souci de facilité opératoire, elles ne sont pas sans conséquence d'un point de vue génétique puisqu'elles aboutissent à la création d'hybride dont à l'heure actuelle on ne sait pas si il est fertile ou pas. La menace réelle d'une pollution génétique des populations naturelles de *Pangasius* par l'hybride est un argumentaire auquel nos partenaires vietnamiens ne sont pas sensibles à l'heure actuelle. Par contre, le potentiel de croissance de ce « nouveau » poisson, de résistance aux maladies etc..., résultant de l'effet d'hétérosis et en comparaison avec ceux des populations naturelles, sont, dans l'optique économique qu'adopte à l'heure actuelle nos partenaires vietnamiens, beaucoup plus intéressants et justifient à eux seuls la poursuite de telles reproductions.

Si ces faits confirment le bien-fondé du travail mené pour *P. bocourti*, ils ne sont pas non plus sans appeler des approfondissements quant à la stimulation hormonale des mâles *hypophtalmus*. Par manque de temps et connaissant les résultats obtenus pour *P. bocourti*, nous n'avons testé qu'une hormone: l'HCG.

3.2- Induction par l'HCG.

PRINCIPE.

Le but de cette expérience est de mesurer la dynamique de la spermiation après stimulation hormonale par de l'HCG. Le volume recueilli et la concentration en spermatozoïdes du sperme sont mesurés.

MATERIEL ET METHODE.

Le protocole est identique à celui défini plus haut mais appliqué à un nouveau lot de 16 poissons.

La dose d'HCG injectée est comme pour *P. bocourti* de 2000 UI/kg.

Les poissons sont stockés dans les mêmes bacs que précédemment et la température lors des mesures variait de 27.8 à 29.5°C.

RESULTATS.

Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau 5.

Tableau 5.- Dynamique de la spermiation après une injection d'HCG chez *P. hypophthalmus*.

| | Volume collecté ($\mu\text{l}/\text{kg}$) | | Concentration ($10^9/\text{ml}$) | | Quantité ($10^7/\text{kg}$) | |
|---------|---|--------|------------------------------------|-------|-------------------------------|-------|
| | Moyenne (<i>Ecart type</i>) | | Moy. (<i>ET</i>) | | Moy. (<i>ET</i>) | |
| Témoins | 151,18 | 257,89 | 47,98 | 18,64 | 9,10 | 15,82 |
| H12 | 671,38 | 512,00 | 61,44 | 12,26 | 45,36 | 39,23 |
| H24 | 823,43 | 850,13 | 57,22 | 6,81 | 49,93 | 55,55 |
| H48 | 413,46 | 360,10 | 70,06 | 25,80 | 29,61 | 27,86 |

Nous pouvons observer que le volume de sperme collecté est maximal 24 heures après injection avec 823 $\mu\text{l}/\text{kg}$ prélevé en moyenne. Néanmoins du fait de très fortes variations individuelles, les différences observées ne sont pas significatives au seuil des 5%. La concentration en spermatozoïdes suit la même évolution que celle du volume, c'est à dire qu'elle est maximale 24 heures après. Pour autant, la concentration ne varie pas significativement entre traitement au seuil des 5%. Au bilan, la quantité de spermatozoïdes récoltée est donc maximale 12 heures après injection et est de 49.93 10^9 spermatozoïdes par kg .

DISCUSSION.

Cette expérience montre que la spermiation est stimulée par une injection d'HCG et que la réponse est maximale 24 heures après injection. Cette stimulation provoque une augmentation du nombre de spermatozoïdes récoltés du fait non seulement d'une augmentation du volume de sperme collecté mais aussi de la concentration en spermatozoïdes. Ainsi, l'HCG provoque d'une part une synthèse de liquide séminal , mais en plus il semblerait qu'il y ait une spermatogenèse. Ce dernier phénomènes physiologiques semble être plus prépondérant que la synthèse de liquide séminal puisque la concentration en spermatozoïdes augmente.

Pour autant, ces conclusions doivent être relativisées puisque les différences ne sont pas significatives au seuil des 5%.

4- L'induction de la spermiation chez d'autres espèces de téléostéens.

Dans ce paragraphe, nous avons voulu replacer ces deux espèces de *Pangasius* par rapport à d'autres espèces de la même famille des siluriformes (*Silure glane*, *Hétérobranchus longifilis*), ou alors par rapport à d'autres poissons d'intérêt aquacole en Asie.

Nous rapportons dans le tableau ci contre les rapports gonado-somatique (ou RGS) observés chez les *P. bocourti* ou *hypophthalmus*.

Ces résultats classent ces animaux parmi les poissons téléostéens ayant de faibles poids testiculaires. Ces deux espèces peuvent donc être considérées comme oligospermique. A titre de comparaison, on donne ci-joint, les valeurs de quelques RGS observés chez d'autres poissons :

Tableau 6.- Valeurs de RGS pour quelques espèces de poissons.

| Espèces | RGS (en %) | Références-auteurs |
|--|---------------|-------------------------|
| <i>P. bocourti</i> | 0.07 à 1.00 | |
| <i>P. hypophthalmus</i> | 0.14 à 2.02 | |
| Silure, <i>Silurus glanis</i> | 1.4 (+/- 0.2) | Saad et Billard, 1994 |
| Channel Catfish <i>Ictalurus punctatus</i> | 0.25 | Billard, 1986, 1987 |
| Carpe <i>Cyprinus Carpio</i> | 6.9(+/- 2.6) | Saad et Billard, 1987 |
| <i>Hétérobranchus longifilis</i> | 0.2 à 0.8 | GAMET, 1996, non publié |

La concentration du sperme en spermatozoïdes est aussi un paramètre intéressant de classification de ces poissons :

Tableau 7.- Concentration en spermatozoïdes de la laitance de quelques poissons.

| Espèces | Concentration (10 ⁹ /ml) | Références-auteurs |
|--|-------------------------------------|-----------------------|
| <i>P. bocourti</i> | 13.0 à 26.9 | |
| <i>P. hypophthalmus</i> | 48.0 à 70.1 | |
| Silure, <i>Silurus glanis</i> | 7.18 (+/- 1.3) | Saad et Billard, 1994 |
| Tilapia (<i>O. niloticus</i> , <i>aureus</i> , <i>mossambicus</i>) | 2.8 | Rana et Andrew, 1989 |
| Carpe <i>Cyprinus Carpio</i> | 24.0 (+/- 3.5) | Saad et Billard, 1987 |
| <i>Hétérobranchus longifilis</i> | 0.7 à 9.7 | Legendre, 1991 |
| Milkfish (<i>Chanos chanos</i>) | 3690 (+/- 720) | Hara et coll., 1982 |

La dynamique de la spermiation après induction hormonale n'a été que peu étudiée chez les espèces tropicales. On ne fournira ici les résultats pour d'autres espèces.

Chez la carpe (*Cyprinus carpio*), Saad et Billard (1987) montre que la réponse est maximale entre 12 et 24 heures après induction hormonale avec des extraits pituitaires de carpe à la dose de 2mg/kg. Le volume de sperme collecté était de 6 à 8 ml/kg. Ce chiffre est bien entendu à rapprocher avec la valeur élevée du RGS de cette espèce. Par contre la stimulation hormonale provoque une dilution du sperme qui se traduit par une légère diminution de la concentration. L'HCG n'a semble-t-il aucun effet sur la spermiation alors que le LHRH (10 ou 50 µg/kg) permet une collecte maximale 4 à 5 jours après la stimulation. De meilleurs résultats sont obtenus par injection d'antidopaminergique (Pimozide) avec le LHRH par rapport à une injection seule de releasing hormone (Billard et coll., 1987).

Chez le silure glane (*Silurus glanis*), des expériences de stimulation à l'aide de poudre hypophysaire de carpe (4 mg/kg de poids vif) ont permis une récolte du sperme qui demeure assez faible (1.49 +/- 0.70 ml par mâle) à la concentration de 7.18 +/- 1.29 10⁹ spz./ml, alors que les mâles témoins ayant reçus du solvant uniquement n'ont pas produit de sperme. Des essais associant la gonadolibérine (LHRHA) au dompéridone, n'ont pas notablement stimulé la spermiation du poisson-chat européen.

Chez *Hétérobranchus longifilis*, pratiquement, la collecte du sperme de mâle mature est difficile. Les inséminateurs sont condamnés à sacrifier les géniteurs pour prélever les testicules. Pour autant aucune induction hormonale n'est réalisée couramment avant l'opération. Legendre (1996, non publié) montre que une injection d'HCG (2 000 UI/kg) permet de collecter de la laitance, en faible quantité certes, au stripping. Mais il peut aussi s'agir d'un artéfact lié à une plus grande quantité d'urine systématiquement présente chez les mâles injectés. Il semble en effet que la quantité d'urine dans la vessie soit nettement plus importante chez les poissons traités à HCG que chez les contrôles.

Tableau 8.- Bilan des expériences d'induction (HCG 2000 UI/kg) réalisées sur *Hétérobranchus longifilis*.

| Traitements des mâles | Poids (en g) | moyen RGS (%) | Vol sperme/kg (ml) | Vol. sperme strippé (ml) | Concentration en spz (10 ⁹ /ml). |
|-----------------------|--------------|---------------|--------------------|--------------------------|---|
| Sol. saline | 4396 | 0.55 | 2.99 | 0.15 | 3.44 |
| HCG 24h | 4114 | 0.56 | 2.79 | 0.78 | 4.01 |
| HCG 48H | 3441 | 0.77 | 3.50 | 1.62 | 3.44 |

En annexe, sont présentés les résultats de quelques méthodes d'induction hormonale pratiquées sur des poissons-chats en Asie du sud-est.

CHAPITRE V : COLLECTE ET CONSERVATION A COURT TERME DU SPERME DE *P. BOCOURTI* ET *HYPOPHTALMUS*.

1- Problématique.

1.1- Rappel sur l'activation du sperme.

Chez les *Pangasius*, oeufs et spermatozoïdes sont expulsés simultanément dans l'eau ambiante, un comportement reproducteur approprié assurant le moment exact et la bonne position du mâle et de la femelle de façon que le mélange et la fécondation puissent se produire immédiatement. Il est important de noter que les spermatozoïdes ne deviennent motiles que lorsqu'ils viennent en contact avec l'eau.

Chez la plupart des Téléostéens à fécondation externe, l'activité du sperme est brève et son intensité, qui est maximale immédiatement après dilution, diminue durant la période de mouvement. La baisse rapide de motilité du sperme après son activation est liée à la diminution des réserves en ATP intracellulaires.

Les mécanismes de l'initiation de la motilité ne sont pas encore connus. Néanmoins, la pression osmotique, la composition ionique et le pH sont les facteurs les plus importants déterminant l'activité du sperme. Il est bien connu qu'un simple choc osmotique (telle qu'une dilution dans l'eau) peut activer un sperme. Chez les salmonidés, l'immobilité du sperme est due à une forte concentration extracellulaire en K^+ et sa diminution lors de la dilution initie la motilité. Ca^{2+} est aussi nécessaire lors de l'initiation du mouvement. Il semblerait que la dilution du sperme dans la solution d'activation entraînerait une hyperpolarisation de la membrane des spermatozoïdes, initiant l'ouverture de canaux voltage-dépendants. C'est le même mécanisme que celui de la contraction de la fibre musculaire.

1.2- Pollution du sperme par l'urine.

Lors des stripings des mâles *P. bocourti* et *hypophthalmus*, il a été observé à de multiples reprises que de l'urine est expulsé en même temps que le sperme. Ce constat est plus net chez *P. hypophthalmus* que chez *P. bocourti* (sans doute du fait d'une position de la vessie différentes chez ces deux espèces).

Or l'urine est un liquide beaucoup plus hypoosmotique que le sperme. Ainsi, une pollution du sperme par l'urine entraîne une activation des spermatozoïdes. Or entre le moment du stripping et celui de la fécondation, il s'écoule souvent plusieurs minutes, durée souvent suffisante pour désactiver les spermatozoïdes.

Ainsi, il est apparu nécessaire de mettre au point une solution qui permette de « protéger » les spermatozoïdes de l'urine et une méthode fiable permettant de les collecter (sachant que l'on ne peut empêcher totalement l'émission d'urine). Ces solutions sont appelées solution d'immobilisation. En outre ces solutions permettent de conserver les spermatozoïdes fertiles pendant quelques heures au froid (4-5°C) en conditions aérobies. C'est pour cela qu'elles portent le nom de solution de conservation. Ces solutions de conservations présente en outre d'autres avantages. Elles facilitent le travail de l'inséminateur pour qui il était relativement difficile de suivre l'évolution de la maturité des oeufs et de planifier le stripping des mâles. Elles permettent le transport des gamètes lorsque les lieux de prélèvement

et de fécondation ne sont pas les mêmes ou encore de différer la fécondation lorsque les gamètes femelles ne sont pas « strippables ».

Trois axes de recherche se sont donc naturellement dégagés:

(a) caractéristiques de la motilité du sperme de *P. bocourti* et *hypophthalmus*,

(b) mise au point d'un protocole de collecte du sperme,

(c) définition d'une solution d'immobilisation ou de conservation (composition ionique, pH, pression osmotique).

2- Motilité du sperme de *Pangasius bocourti* et *hypophthalmus*.

PRINCIPE.

Plusieurs paramètres sont utilisés pour évaluer la motilité. Le plus commun est le pourcentage de cellules motiles et leur évolution durant la période de nage.

MATERIEL ET METHODE..

Les spermatozoïdes sont observés sous microscope (x100) immédiatement après stripping. Le sperme est prélevé dans une solution d'immobilisation de façon à prévenir toute activation par l'urine.

Une goutte de sperme est déposée sur une lamelle puis mélangée sous microscope à une goutte d'eau (ou d'autres solutions d'activation). On relève alors les temps correspondant à 100%, 50% et 0% de mobilité des spermatozoïdes. Pour chaque échantillon de sperme, quatre mesures étaient réalisées.

Pour *P. bocourti*, 14 échantillons de sperme ont été observés après activation dans l'eau, et 11 après activation dans une solution saline (NaCl 2‰, Tris 30mM, pH7).

Pour *P. hypophthalmus*, 10 échantillons de sperme ont été observés après activation dans l'eau.

RESULTATS.

Les résultats des mesures pour les deux espèces sont consignés dans le tableau 9. Schématiquement on distingue que ce soit pour *P. bocourti* comme pour *P. hypophthalmus*, 3 grandes phases successives suivant la mise en contact du sperme et de l'eau :

- pendant les 5 à 6 premières secondes, aucune activité spermatique n'est visible ; puis brutalement, on constate une explosion de l'activité spermatique.

- 100% des spermatozoïdes sont mobiles. Ce palier se maintient 10 à 11 secondes chez *P. hypophthalmus* et 5 à 6 chez *P. bocourti*.

- la troisième phase est la décroissance d'activité spermatique. Pour *P. bocourti*, elle est d'abord brutale jusqu'à 10-20% d'activité, puis se maintient faiblement et s'arrête 1 minute après la mise en contact. Pour *P. hypophthalmus*, cette décroissance est plus régulière et plus aucun spermatozoïde n'est visiblement motile 45 secondes après l'activation.

Tableau 9.- Motilité des spermatozoïdes de *P. bocourti* et *hypophthalmus* dans différents milieux.

| Milieu activation | | Eau minérale | | | Milieu salin | | |
|-------------------------|------------|--------------|-------|-------|--------------|-------|--------|
| | | 100% | 50% | 0% | 100% | 50% | 0% |
| <i>Espèces</i> | | | | | | | |
| <i>P. bocourti</i> | Moyenne | 6,47 | 16,71 | 57,29 | 6,64 | 19,27 | 112,41 |
| | Ecart type | 1,89 | 2,2 | 11,78 | 1,35 | 2,5 | 40,93 |
| <i>P. hypophthalmus</i> | Moyenne | 5,56 | 23,56 | 44,76 | | | |
| | Ecart type | 1,35 | 5,08 | 8,73 | | | |

(Temps exprimés en seconde)

L'activation dans un milieu plus hyperosmotique que l'eau provoque sur du sperme frais de *P. bocourti* un allongement de la durée de vie des spermatozoïdes par rapport à une simple activation dans l'eau.

Ces observations sont représentées dans les graphiques suivant.

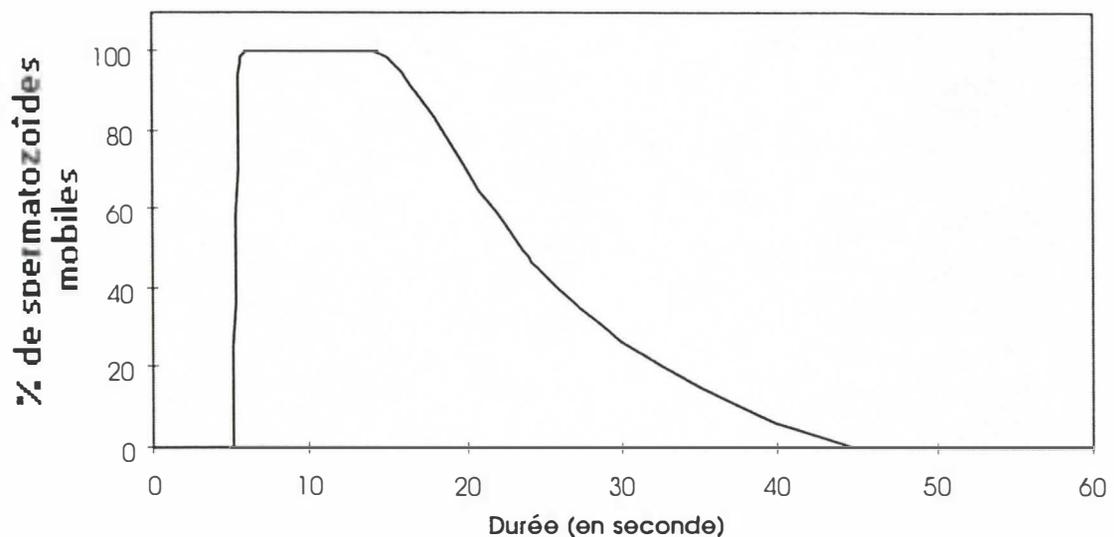


Figure 6.- Profil d'activité du sperme de *P. hypophthalmus* après dilution dans l'eau.

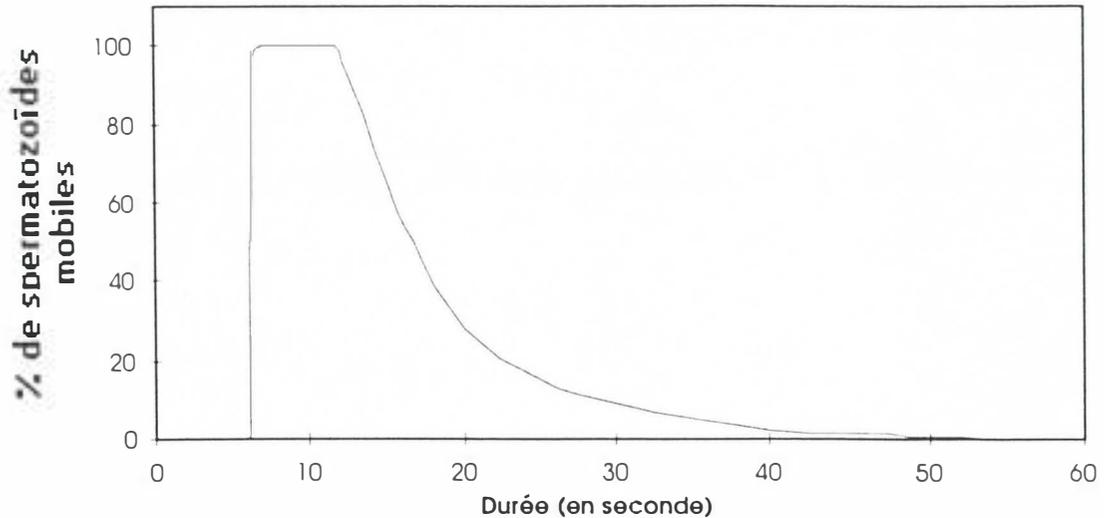


Figure 7.- Profil d'activité du sperme de *P. bocourti* après activation dans l'eau.

DISCUSSION.

Ces résultats montrent que le délai entre le stripping du sperme et la fécondation ne doit être le plus rapide possible et ne pas excéder la minute lorsqu'il y a eu pollution du sperme par l'urine. En outre, elles soulignent que lors de la fécondation, une fois la solution d'activation ajoutée, il est inutile d'agiter le mélange oeufs-sperme-solution d'activation plus de 1 minute.

Un autre phénomène, parallèle à la motilité du sperme et causé par la solution d'activation, est la fermeture du micropile de l'ovule qui une fois réalisée condamne toute fécondation. Aucune donnée n'a jusqu'à présent été faite sur ce point.

Chez le silure glane (*Silurus glanis*), la motilité des spermatozoïdes devient nulle 120 secondes après activation dans l'eau. De même que pour *P. bocourti*, on note que la survie des spermatozoïdes est meilleure dans une solution de pression osmotique voisine de 100 mOsm/kg (30 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7) que dans l'eau douce (Saad et Billard, 1995) ; une minute après dilution, 60% des spermatozoïdes sont encore en mouvement, alors qu'après dilution dans l'eau douce, 5% seulement des spermatozoïdes sont actifs.

Chez *Hétérobranchus longifilis*, Bernard (1996, non publié) montre que la motilité des spermatozoïdes n'excède pas une minute après activation dans l'eau. Par contre, une solution de NaCl 80mOsm avait un effet favorable sur la nage des cellules.

Chez la carpe (*Cyprinus carpio*), la motilité est très courte dans l'eau (30 à 40 s à 20°C) et le sperme se désorganise rapidement, conduisant à un enroulement du flagelle 30 secondes après dilution dans l'eau et donc à une diminution de la fréquence de battement (Perchec et coll., 1993). Dans des solutions salines, de telles désorganisations flagellaires ne se produisent pas. En outre le pourcentage de spermatozoïdes motiles dépend de la pression osmotique et de la nature des ions. Une dilution du sperme dans la solution d'activation (NaCl 45 mM, KCl 5 mM, Tris-HCl 30 mM, pH 8) permet de maintenir une motilité maximale

pendant 30 à 40 secondes. Entre 60 et 90 secondes après activation, on assiste à un rapide diminution de la motilité qui se maintient à une faible valeur jusqu'à 200 s. après dilution.

3- Mise au point d'une solution de conservation pour *P. hypophthalmus*.

3.1- Détermination d'un dilueur de conservation du sperme : effet de l'osmolarité.

PRINCIPE.

Cette première étude a pour but d'obtenir des informations préliminaires sur la conservation de sperme au froid, dans une solution de chlorure de sodium. Trois solutions d'immobilisation du sperme sont testés et comparés par mesure du taux d'éclosion (les conditions étant égales par ailleurs).

MATERIEL ET METHODE.

Deux mâles, induits avec de l'HCG à la dose de 2 000 UI/kg, sont strippés 24 heures après l'injection. Les spermatozoïdes sont prélevés respectivement dans des solutions salines à 12, 9 et 6‰, à un taux de dilution de 5. Un pool des deux spermatozoïdes est réalisé (50% de chaque en volume). Ces différentes solutions sont stockées dans des beshers (80 ml) et conservées au réfrigérateur à une température de 4 à 5°C, pendant 26 heures et 30 minutes.

Les 3 solutions de sperme sont utilisées pour féconder les oeufs d'une femelle. 200 à 300 oeufs sont disposés dans des barquettes plastiques et mélangés avec le sperme; 10 ml de solution d'activation (NaCl 2‰, Tris 20 mM, pH 7) sont ensuite ajoutés; 50 µl de sperme et de solution d'immobilisation sont déposés sur les oeufs ce qui correspond à une dilution finale du sperme de 1 000 (compte tenu de la prédilution dans la solution d'immobilisation). Les oeufs et le sperme sont agités pendant 1 minute après ajout de la solution d'activation. La fécondation est stoppée par ajout d'eau minérale en quantité dans les barquettes, qui sont plusieurs fois rincées par la suite. L'incubation des oeufs se fait dans les barquettes à une température variant de 26.9 à 27.7°C.

Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est évalué par le taux d'oeufs embryonnés au bout de 24 heures (juste avant l'éclosion).

Quatre barquettes sont réalisées par traitement.

La mesure de la concentration en sperme se fait par dénombrement des têtes spermatiques sur hématimètre. Quatre mesures sont effectuées à la dilution de 8 000 dans une solution saline à 9‰. La concentration mesurée est de 51.00 (+/- 3.43)10⁹ spz./ml. Les résultats sont analysés statistiquement par la méthode ANOVA en utilisant le test de Bonferroni pour les comparaisons multiples.

RESULTATS.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci dessous.

Tableau 10.- Influence de l'osmolarité de la solution d'immobilisation sur le taux d'éclosion.

| Taux d'éclosion | Solution d'immobilisation | | |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | 6 ⁰ / ₀₀ | 9 ⁰ / ₀₀ | 12 ⁰ / ₀₀ |
| Moyenne | 55.69 | 74.59 | 3.26 |
| Ecart type | 17.06 | | 6.24 |

* p<0.05 ; ** p<0.01.

On note que la solution à 9⁰/₀₀ est significativement supérieure aux autres solutions utilisées. Du sperme conservé au frais dans une solution à 12⁰/₀₀ n'est pratiquement plus fécondant.

DISCUSSION.

La conservation du sperme de *P. hypophthalmus* à des températures de 4 à 5°C pendant plus de 24 heures est possible. La solution d'immobilisation la plus efficace à l'heure actuelle est celle à 9⁰/₀₀ de NaCl (155 mM NaCl, Tris 20 mM, pH 7), ce qui correspond à une osmolarité de 310 mOsm. On obtient dans ce cas un taux d'éclosion intéressant de presque 75%.

3.2- Effet du taux de dilution du sperme dans le liquide de conservation.

PRINCIPE.

Cinq taux de dilutions du sperme dans une solution de conservation à 9⁰/₀₀ sont testés par mesure du taux d'éclosion.

MATERIEL ET METHODE.

Le protocole de cette expérience est sensiblement le même que dans expérience précédente. Deux mâles, induits avec de l'HCG à la dose de 2 000 UI/kg, sont strippés 24 heures après l'injection. Chacun des spermes est prélevé dans une solution saline à 9⁰/₀₀, à différents taux de dilution (2, 5, 10 et 20). En outre, du sperme pur, c'est à dire non dilué dans la solution d'immobilisation, est prélevé sur chacun des mâles (ce sperme correspond à un taux de dilution de 1). Un pool des deux spermes est réalisé (50% de chaque en volume). Ces

5 solutions sont stockés dans des beshers (80 ml) et conservés au réfrigérateur à une température de 4 à 5°C, pendant 26 heures et 30 minutes.

Les 5 solutions de sperme, correspondant à des taux de dilution de 1, 2, 5, 10 et 20 sont utilisés pour féconder les oeufs d'une femelle. 200 à 300 oeufs sont disposés dans des barquettes plastiques et mélangés avec le sperme; 10 ml d'eau minérale est ensuite ajoutée (pH 7). Le taux de dilution du sperme est de 1 000, correspondant à des volumes de sperme variant de 10 à 200 µl, selon le taux de dilution initial dans la solution d'immobilisation. Les oeufs et le sperme sont agités pendant 1 minute après ajout de l'eau. La fécondation est stoppée par ajout d'eau minérale en quantité dans les barquettes, qui sont plusieurs fois rincées par la suite. L'incubation des oeufs se fait dans les barquettes à une température variant de 26.9 à 27.7°C.

Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est évalué par le taux d'oeufs embryonnés au bout de 24 heures (juste avant l'éclosion).

Quatre barquettes sont réalisées par traitement.

La mesure de la concentration en sperme se fait par dénombrement des têtes spermatiques sur hématimètre. Le sperme est dilué 8 000 fois dans une solution saline à 9⁰/₁₀₀. Quatre mesures sont effectuées. La concentration mesurée est de 51.00 (± 3.43)10⁹ spz./ml. Les résultats sont analysés statistiquement par la méthode ANOVA en utilisant le test de Bonferroni pour les comparaisons multiples.

RESULTATS.

Les résultats de cette expérience sont consignés dans la figure 8.

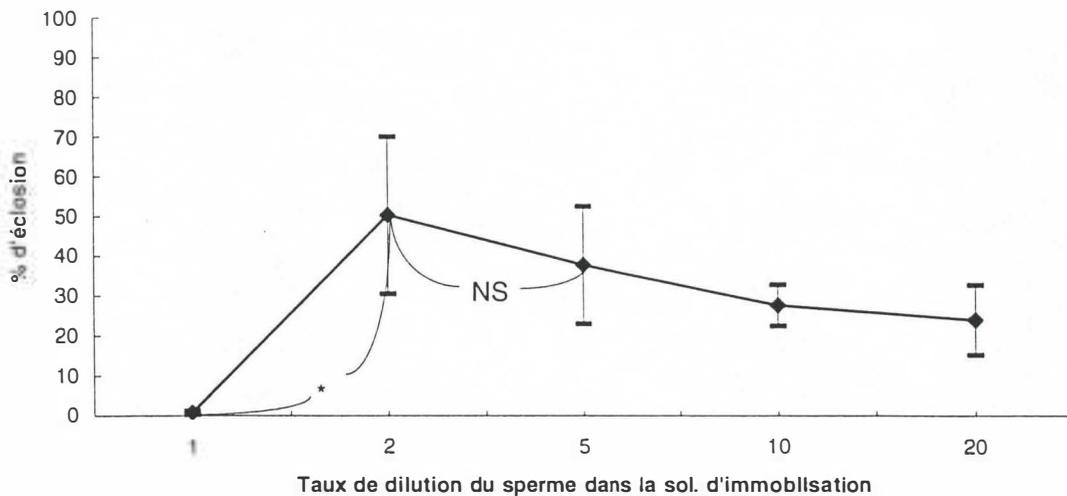


Figure 8.- Influence du taux de dilution du sperme dans le liquide de conservation sur le taux d'éclosion. * $p < 0.05$; NS : non significatif.

Des différences significatives ne sont observées que entre un taux de dilution de 1 (c'est à dire du sperme pur) et de 2. Les autres valeurs ne sont pas significativement différentes au seuil des 5%. On notera que un sperme pur conservé 26 heures au réfrigérateur présente une fertilité nulle.

DISCUSSION.

Ces résultats montrent l'influence du taux de dilution du sperme dans le liquide de conservation sur sa capacité fécondante. Plus on dilue le sperme, moins il est fécondant. Pour autant ces résultats pourraient être améliorés si la fécondation avait eu lieu dans une solution d'activation mieux adapté que l'eau. On se situe déjà ici dans des conditions limites de fécondation (solution d'activation, concentration finale des spermatozoïdes de 10^{-3}) ce que démontre les fortes valeurs des écarts types rapportées à la moyenne.

Ainsi, nous préconisons, dans l'attente de résultats complémentaires de réaliser des dilutions du sperme dans la solution de conservation à un taux de 5, d'une part pour s'abstraire de l'influence de ce phénomène mais aussi pour faciliter la manipulation du sperme lors de la fécondation par le pisciculteur.

4- Conservation à court terme du sperme de *P. bocourti*.

PRINCIPE.

L'objectif de cette expérience est d'évaluer au cours du temps la qualité du sperme dilué dans une solution d'immobilisation et conservé à 4-5°C.

MATERIEL ET METHODE.

La capacité de fécondation des spermatozoïdes conservés au froid (4 à 5°C) dans un liquide d'immobilisation est mesurée par le taux d'oeufs fécondés 8 heures après insémination (stade gastrula).

Six mâles répartis en 3 lots de deux sont induits 24 heures avant stripping avec de l'HCG à la dose de 2 000 UI/kg. Leur sperme est prélevé dans une solution d'immobilisation (NaCl 12‰, Tris 20 mM, pH 7) au taux de 5. Les spermatozoïdes des mâles du même lot sont poolés. Ces différents spermatozoïdes sont utilisés pour féconder les oeufs de deux femelles, dont le stripping a lieu en même temps. Les 3 lots de mâles sont induits de telle sorte que lors de la fécondation, les 3 lots de spermatozoïdes ont été respectivement conservés 30 min., 11 heures et 35 heures 30 minutes au réfrigérateurs dans la solutions d'immobilisation (respectivement notés pool 1, 2 et 3).

200 à 300 oeufs sont disposés, immédiatement après stripping, dans des barquettes plastiques et mélangés avec le sperme; 10ml d'eau minérale (pH 7) sont ensuite ajoutés; 50 µl de sperme et de solution d'immobilisation sont déposés sur les oeufs ce qui correspond à une dilution finale du sperme de 1 000 (compte tenu de la prédilution dans la solution d'immobilisation). Les oeufs et le sperme sont agités pendant 1 minute après ajout d'eau. La fécondation est stoppée par ajout d'eau en quantité dans les barquettes, qui sont plusieurs fois

rincées par la suite. L'incubation des oeufs se fait dans les barquettes à une température variant de 29.0 à 29.9°C.

La concentration en spermatozoïdes est établie par dénombrement des têtes spermatiques sur hématimètre (grossissement x 400). Pour ces mesures, le sperme est dilué 4 000 fois dans une solution saline à 9⁰/100. Quatre mesures de concentration sont effectuées pour les 3 pools de sperme.

Les résultats sont traités statistiquement par la méthode ANOVA, en considérant deux facteurs, les pools de sperme (c'est à dire en définitive le temps de conservation) et les femelles.

RESULTATS.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau 11.- Évolution de la qualité du sperme conservé au froid (4-5°C).

| Durée de conservation | Concentration en spermatozoïdes 10 ⁹ spz/ml | | Taux de fécondation | | | |
|-----------------------|---|-------------------|---------------------|-------------------|-----------|-------------------|
| | | | Femelle 1 | | Femelle 2 | |
| | Moyenne | <i>Ecart type</i> | Moyenne | <i>Ecart type</i> | Moyenne | <i>Ecart type</i> |
| Pool 1 | 15,03 | 1,35 | 24,09 | 3,59 | 49,59 | 4,80 |
| Pool 2 | 16,45 | 2,08 | 31,93 | 6,47 | 61,24 | 3,41 |
| Pool 3 | 14,31 | 3,66 | 28,22 | 6,64 | 50,79 | 1,25 |

L'analyse statistique montre que le facteur temps et femelle ont tous le deux une influence significative (p<0.01).

Les pools 1 et 3 ne sont pas significativement différents (p>0.05). Par contre le pool 2 est significativement différent du pool 1 et 3 (p<0.05).

Les femelles 1 et 2 sont significativement différentes au seuil des 5%.

DISCUSSION.

Ces résultats montrent que l'on peut conserver du sperme de *P. bocourti* presque 36 heures au frais dans une solution d'immobilisation à 12⁰/100 de NaCl, sans que leur pouvoir fécondant soit altéré par rapport à un sperme conservé une demi-heure au frais dans la même solution d'immobilisation.

Pour autant ces résultats doivent être nuancer du fait du faible taux de fécondation mesuré : au mieux on a 61% de taux de fécondation. La qualité des 3 pools de sperme est donc à mettre en doute, et donc par là, le bien fondé d'utiliser une solution d'immobilisation à 12⁰/100 de NaCl. La qualité des œufs peut elle aussi être incriminée (stripping trop tardif ou trop précoce).

5- Les solutions de conservation à court terme chez d'autres espèces.

En résumé, la solution d'immobilisation utilisée à l'heure actuelle pour la préservation du sperme de *P. bocourti* est une solution aqueuse à 12⁰/₁₀₀ de NaCl (205 mM NaCl, Tris 20 mM, pH 7), et pour *P. hypophthalmus* une solution à 9⁰/₁₀₀ (155 mM NaCl, Tris 20 mM, pH 7) soit respectivement 410 et 310 mOsmol/kg. Dans ce dernier cas, on rappelle l'effet d'une forte dilution du sperme dans le liquide de conservation.

Chez *Hétérobranchus longifilis*, Bernard (1996, non publié) a réussi à conserver le sperme 72 au frais dans la solution de conservation suivante : 155 mM NaCl, Tris-HCl 20 mM, pH 8 soit une osmolarité de 310mOsmol/kg. Les taux d'éclosion ne sont pas sensiblement différents de ceux trouvés avec du sperme frais mélangés aux mêmes œufs. En outre, le taux de dilution du sperme dans ce liquide de conservation semble être sans effet sur la qualité du sperme. Une autre solution de conservation testée, à base de sucrose (sucrose 310 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8, 312 mOsmol/kg), ne permet pas de conserver le sperme 72 heures. Legendre (communication personnelle) souligne que de meilleurs résultats avaient été obtenus avec des solutions de sucrose et que l'utilisation d'albumine sérique bovine (BSA) ainsi que d'antibiotiques améliorent la conservation.

Chez le silure glane (*Silurus glanis*), la laitance est toujours plus ou moins diluée par de l'urine. Ainsi par pression abdominale, on recueille avec une seringue de « petite quantité de laitance ». Cette seringue contient au préalable 2 ml d'une solution d'immobilisation contenant 8 g soit 135 mM NaCl, 5g soit 20 mM KCl, 10 g glycine/ litre d'eau distillée (Jähnichen, 1992). Dans ces conditions, le sperme peut être conservé quelques heures au frais avant usage.

Proteau et coll. (1990, 1991, 1992) souligne que la laitance doit être récupérée par aspiration dans des seringues contenant une solution d'immobilisation de composition : pour un litre d'eau distillée, 11.6 g de NaCl (200 mM) + 2.4 ml de Tris (20 mM), pH ajusté à 7 par HCl (Saad et coll., 1988). Proteau souligne que les proportions à ne pas dépasser sont de 1 volume de laitance pour 1 volume de solution d'immobilisation. La conservation dans ces conditions est possible « pendant quelques heures voire quelques jours ».

Linhart (1987) recommande d'utiliser une solution d'immobilisation contenant 276 mOsmol/kg NaCl, KCl et glycine 228 mOsmol/kg, pH 5.6. Le sperme est prélevé dans une seringue contenant la solution de conservation ; Linhart suggère d'ajouter à 1 volume de solution, 2 volumes de sperme.

Saad et Billard (1995) suggère, afin d'éviter l'activation spontanée des spermatozoïdes par l'urine, de prélever le sperme directement dans 5 ml d'une solution d'immobilisation (200 mM NaCl, 30 mM Tris-HCL, pH 7) préalablement placé dans une seringue de 10 ml. Un sperme ainsi dilué conserve au bout de 10 heures un pouvoir fécondant comparable à celui du sperme témoin fraîchement prélevé également dans une solution d'immobilisation. La motilité est conservée jusqu'à 72 heures.

Chez la carpe (*Cyprinus carpio*), Saad et coll. (1988) montre qu'il est possible de conserver du sperme intact à des températures proches de 4°C plusieurs jours sans que l'on note une perte de la capacité fécondante ou une altération de la qualité des gamètes. Plusieurs facteurs contribuent à rallonger la survie des spermatozoïdes : inhibition des développements bactériens par ajout d'antibiotiques (streptomycine, pénicilline), atmosphère enrichie en

oxygène, modification du pH du sperme. Dans ces conditions, le sperme peut être conservé 10 jours sans aucun problème. Par contre, la dilution du sperme dans une solution de conservation s'est avérée être beaucoup moins efficace que la conservation du sperme intact.

A titre de renseignements, on fournit en annexe quelques exemples de conservation courte-période de sperme pour d'autres espèces de poissons.

CHAPITRE VI : OPTIMISATION DE LA REPRODUCTION ARTIFICIELLE.

1- Définition de la dilution optimale de la laitance lors de l'insémination artificielle.

1.1- Problématique

L'objectif de cette expérience est de définir les conditions standards d'insémination artificielle, en particulier la dilution optimale du sperme lors de la fécondation. Ce travail répond à un souci d'économie de sperme. Une des questions essentielles que se posaient nos partenaires vietnamiens était de savoir pour une quantité d'oeufs connue quel volume de sperme y ajouter ?

Ainsi, en effectuant des inséminations à différents taux de dilution du sperme, on peut mesurer un nombre de spermatozoïdes nécessaires pour fertiliser les oeufs dans un volume défini de diluent.

*1.2- Chez *P. hypophthalmus*.*

MATERIEL ET METHODE

L'insémination est réalisée avec le sperme de 2 mâles dans une solution d'activation (NaCl 2⁰/₀₀, Tris 20mM, pH 7). Le sperme des deux mâles avait au préalable été récolté et dilué 10 fois dans une solution d'immobilisation (NaCl 9⁰/₀₀, Tris 20mM, pH 7). Puis il fut stocké 4 heures 30min au réfrigérateur, avant fécondation.

Les taux de dilution du sperme lors de la fécondation sont compris entre 10⁻² et 10⁻⁷. L'insémination artificielle se fait dans les conditions standards. 200 à 300 ovules sont prélevés à l'aide d'une spatule, puis déposés dans une barquette plastique et, enfin, mélangés avec le sperme. Le dilueur d'activation est alors ajouté. Juste avant l'insémination, différentes dilutions du sperme ont été effectuées de telle sorte que pour chaque taux de dilution testé, ce soit 100 µl de sperme qui soit mélangés avec les oeufs dans 10 ml de solution d'activation (excepté pour le taux de 10⁻², où 0.5 ml de solution de conservation du sperme ont été mélangés à 4.5 ml de solution d'activation). Les oeufs et le sperme sont agités pendant 1 minute après ajout de la solution d'activation. La fécondation est stoppée par ajout d'eau minérale en quantité dans les barquettes, qui sont plusieurs fois rincées par la suite. L'incubation des oeufs se fait dans les barquettes à une température variant de 27.6 à 28.5°C.

Le taux d'oeufs éclos est mesuré 17 heures après insémination (juste avant éclosion).

La concentration en spermatozoïdes est mesurée par dénombrements des têtes spermatiques sur hématimètre (taux de dilution 8 000, dans une solution saline à 9⁰/₀₀). Huit mesures de concentrations ont été faites. La concentration est de 64.92 (+/- 3.09) 10⁹ spz./ml. Les résultats sont analysés statistiquement par la méthode ANOVA en utilisant le test de Bonferroni pour les comparaisons multiples.

RESULTATS.

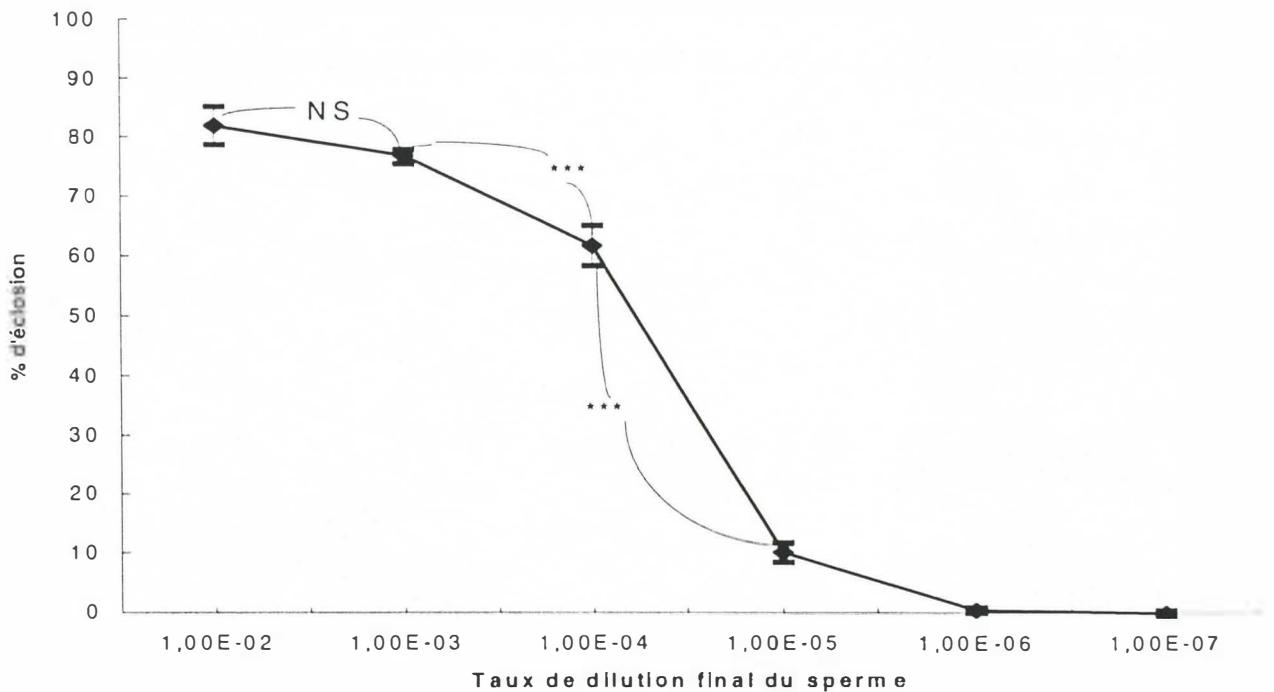


Figure 9.- Evolution du pourcentage d'éclosion en relation avec le taux de dilution du sperme de *P. hypophthalmus*. * $p < 0.001$; NS : non significatif.**

Les taux d'éclosion baisse régulièrement des dilutions 10^{-2} à 10^{-4} . A partir de 10^{-5} , des différences nettes apparaissent : on assiste à une chute brutale du taux d'éclosion qui s'annule à 10^{-7} . A 10^{-5} , les écarts types augmentent ce qui montre que l'on travaille dans des conditions limites qui sont dépendantes de la façon dont on mélange le sperme, dont on agite la solution lors de la fécondation etc...

On fournit également dans le graphe suivant les résultats d'une expérience semblable réalisée par P. Cacot (1996, non publié).

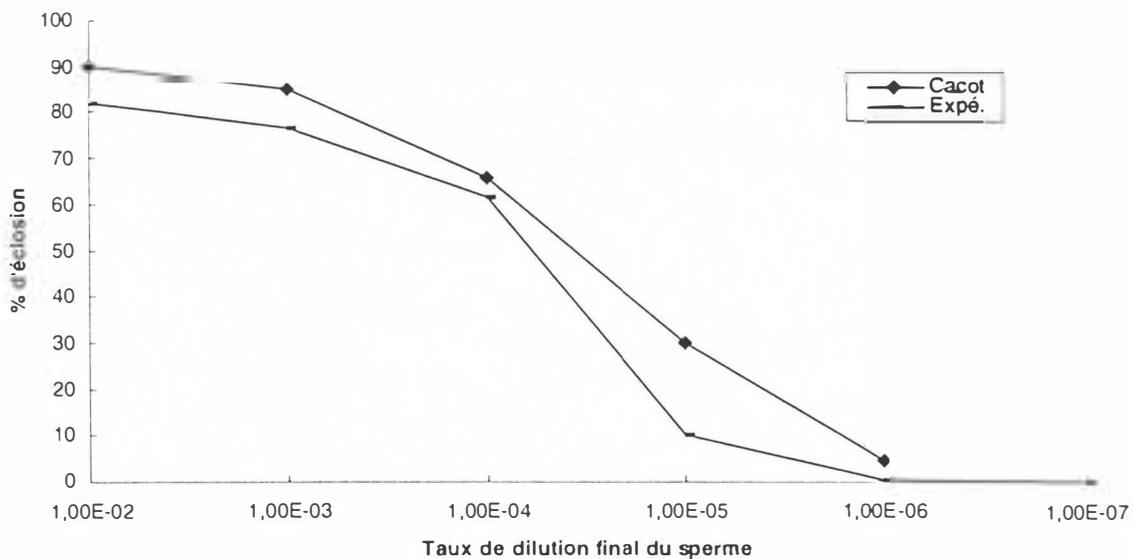


Figure 10.-Variabilité du pouvoir fécondant du sperme de *P. hypophthalmus* pour différents taux de dilution.

La partie Discussion est traitée en commun avec *P. bocourti*. Les résultats sont aussi comparés à ceux d'autres espèces.

1.3- Chez *P. bocourti*.

MATERIEL ET METHODE.

Le protocole de cette expérience est le même que celui présenté dans le cas de *P. hypophthalmus*. Néanmoins dans ce cas, sept mâles ont été strippés pour faire cette expérience, et c'est un pool d'oeufs de 2 femelles qui a servi lors de l'insémination.

Le sperme est prélevé directement et dilué 5 fois dans une solution d'immobilisation (NaCl 12‰, Tris 20 mM, pH 7). Il est conservé 13 heures au réfrigérateur avant utilisation.

La fécondation est réalisée cette fois dans de l'eau minérale, de salinité nulle et de pH 7. L'incubation des oeufs se fait à 29.1-30.2°C.

La capacité fécondante des spermatozoïdes est mesurée par le taux d'oeufs fécondés 8-10 heures après fécondation (stade gastrula). La concentration du sperme a été établie selon la méthode habituelle ; elle est de $12.56 (^+ 1.18) 10^9$ spz./ml. Les résultats sont analysés statistiquement par la méthode ANOVA en utilisant le test de Bonferroni pour les comparaisons multiples.

RESULTATS.

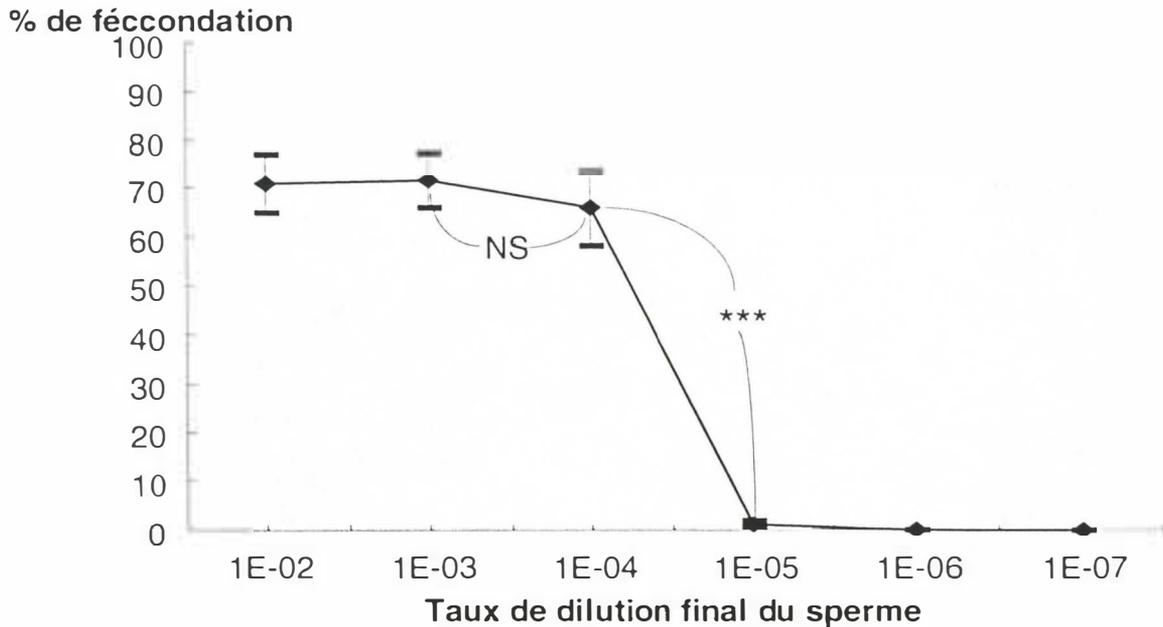


Figure 11.- Evolution du pourcentage de fécondation en relation avec le taux de dilution du sperme de *P. bocourti*. *** $p < 0.001$; NS : non significatif.

Les taux d'éclosion baisse régulièrement des dilutions 10^{-2} à 10^{-4} . A partir de 10^{-5} , des différences nettes apparaissent : on assiste à une chute brutale du taux d'éclosion qui s'annule à 10^{-7} . A 10^{-5} , les écarts types augmentent ce qui montre que l'on travaille dans des conditions limites qui sont dépendantes de la façon dont on mélange le sperme, dont on agite la solution lors de la fécondation etc...

1.4- Discussion. et comparaison avec d'autres espèces.

Au cours des expériences effectuées, l'évolution du taux d'éclosion en relation avec le taux de dilution a montré quelques variations : le pourcentage d'éclosion reste stable entre 10^{-2} et 10^{-4} (quelquefois même à 10^{-5}), et diminue brutalement au delà. Cela semblerait autoriser des dilutions de 10^{-4} lors de l'insémination, mais du fait de la variabilité individuelle de la qualité du sperme et la nécessité de se ménager une marge de sécurité, il faut retenir des taux de dilution de 10^{-3} lors de l'insémination en pisciculture.

Chez la carpe (*Cyprinus carpio*), la même expérience a été conduite par Saad et Billard (1987). Pour des taux de dilution compris entre 10^{-2} et 10^{-4} , le pourcentage de fécondation reste stable (75-85%). A 10^{-5} , on assiste à une chute du taux d'éclosion. Néanmoins, les auteurs soulignent la très grande variabilité individuelle des résultats. Ainsi, pratiquement, l'insémination se réalise donc à des dilutions de 10^{-3} .

Pour *Hétérobranchus longifilis*, Legendre (1991) préconise compte tenu, là encore, de la grande variabilité individuelle de la concentration en spermatozoïdes, de réaliser la fécondation à des dilutions finales de l'ordre de 10^{-3} .

Pour le silure glane (*Silurus glanis*), Saad et Billard réalise préconise une dilution finale de 10^{-3} .

1.5- Suite de la recherche.

Un autre paramètre important pour la standardisation et l'optimisation de l'insémination artificielle est le rapport oeufs/sperme/diluent. Par exemple, à un taux de dilution du sperme de 10^{-3} (i.e. 1ml de sperme dans 1 litre de diluent), quel volume de sperme dilué doit-on mélangé à 1 volume d'oeufs ? Cette dernière contrainte est la conclusion d'une remarque simple: les spermatozoïdes perdent rapidement leur capacité fécondante après dilution dans la solution d'activation et initiation de la motilité, et doivent de ce fait être rapidement en contact avec les oeufs dès qu'ils se mettent en mouvement.

Une expérience corollaire aux manipulations précédentes serait la définition du rapport optimum ovules/sperme/solution d'activation. Dans cette expérience, le volume d'ovules est constant (1 ml par exemple), ainsi que la concentration en spermatozoïdes (10^{-3} , par exemple): seul le volume du dilueur d'activation est variable (entre 0.1 et 10 ml par exemple).

Cette expérience n'a pu être réalisé par manque de temps. Néanmoins, aux vues des résultats trouvés chez d'autre espèces (Saad et Billard, 1987 chez *Cyprinus carpio*), nous pratiquions, à une dilution finale du sperme de 10^{-3} , le mélange de 1 volume de solution d'activation pour 1 volume d'oeufs.

2- Mise au point d'un dilueur d'activation pour le sperme de *P. hypophthalmus* et *bocourti*.

2.1- Problématique.

L'insémination artificielle consiste, en général, à mélanger des ovules avec du sperme et à ajouter selon les espèces, de l'eau douce ou de l'eau salée, dans laquelle les spermatozoïdes sont mis en mouvement. Dans le cas de poissons d'eau douce, on sait que l'eau provoque un choc osmotique qui entraîne l'éclatement de la membrane plasmique du spermatozoïde et provoque la réaction corticale à la suite de laquelle l'ovule devient rapidement non fécondable. Ce choc osmotique est d'autant plus important que le sperme se trouve dans notre cas dans une solution de conservation hyperosmotique par rapport au liquide séminal. En fonction de la variation de pression osmotique entre les deux milieux, il est possible d'obtenir soit un « départ massif » de l'ensemble des spermatozoïdes, soit, au contraire, une activation étalée dans le temps. Si un choc osmotique important active rapidement l'ensemble des spermatozoïdes, il est alors fréquemment observé un enroulement du flagelle, ce qui diminue les capacités de déplacement des spermatozoïdes : ce phénomène est appelé enroulement en « haltères ».

L'eau n'est donc pas automatiquement le meilleur milieu d'activation des spermatozoïdes. Des solutions salines plus appropriées permettent d'induire la mise en mouvement des spermatozoïdes de façon plus efficace.

Les présentes expériences visent justement à résoudre ce problème.

2.2- Influence de l'osmolarité du dilueur d'activation sur la motilité du sperme de *P. hypophthalmus*.

MATERIEL ET METHODE.

Le sperme de 2 mâles, injectés 24h avant stripping par de l'HCG à la dose de 2 000 UI/kg, est prélevé directement dans 2 solutions d'immobilisation respectivement à 9‰ et 12‰ (Tris 20 mM et pH ajusté à 7 avec HCl). Le taux de dilution de ce sperme dans la solution d'immobilisation est de 10. Les solutions sont ensuite conservés au réfrigérateur à la température de 4 à 5°C.

La qualité des spermatozoïdes est testée par la durée et l'intensité de la motilité après exposition dans l'eau ou dans deux solutions d'activation (NaCl 2‰ ou 6‰, Tris 20mM et pH ajusté à 7 par HCl). La motilité des spermatozoïdes est estimée sous microscope (x 100) en utilisant une échelle arbitraire dite de Sanchez-Rodriguez (Sanchez-Rodriguez, 1975), allant de 0 (aucun spermatozoïdes en mouvement) à 5 (tous les spermatozoïdes présentent une forte motilité). Les valeurs de motilité relevées correspondent au pic d'activité spermatique. Quatre mesures ont été effectuées pour chaque traitement.

Les spermatozoïdes ont été examinés immédiatement, 24, 48, 72 et enfin 96 heures après le stripping.

RESULTATS.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau 12.- Evolution de la motilité du sperme de *P. hypophthalmus* en fonction de la durée de conservation, de la nature de la solution de conservation et d'activation.

| Durée de conservation (en heures) | Liquide de conservation (en ‰ de NaCl) | Milieu d'activation | |
|--------------------------------------|--|---------------------|-----------------|
| | | Eau minérale | Solution saline |
| 0 | 12 | 5 | 5 |
| | 9 | 5 | 5 |
| 24 | 12 | 0 (v) | 1 |
| | 9 | 0 (v) | 4 |
| 48 | 12 | 0 (v) | 0 |
| | 9 | 0 (v) | 3 |
| 72 | 12 | 0 (v) | 0 |
| | 9 | 0 (v) | 1 |
| 96 | 12 | 0 (v) | 0 |
| | 9 | 0 (v) | 0+ |

(v)= viscosité du sperme.

Immédiatement après stripping, la motilité du sperme est maximale quelque soit le milieu d'immobilisation et le liquide d'activation. Par contre, après 24 heures de conservation, le sperme conservé dans du 12⁰/₀₀ est pratiquement mort : on n'observe qu'une faible motilité (1) après activation dans la solution saline.

Pour le sperme conservé dans la solution d'immobilisation à 12⁰/₀₀, une bonne motilité (3 sur l'échelle adoptée) persiste après 48 heures de conservation, mais uniquement après activation dans la solution saline. Après 3 jours de conservation, ce sperme ne présente qu'une faible activité.

On remarque aussi dans le cas d'une activation dans l'eau, la formation d'un gel emprisonnant le sperme, qui devient alors très visqueux. Par contre, dans le cadre d'une activation par la solution saline, aucune « prise en masse » du sperme n'est constatée.

DISCUSSION.

Cette expérience nous conduit à deux constats:

- d'une part, elle prouve la supériorité du liquide d'immobilisation à 9⁰/₀₀ par rapport à celui à 12⁰/₀₀ dans le cas de *P. hypophthalmus*. Ceci vient corroborer les conclusions du chapitre précédent.

- d'autre part, elle souligne l'importance de l'utilisation d'une solution saline lors de l'activation des spermatozoïdes par rapport à l'eau. Après 24 heures de conservation, plus aucune motilité n'est observée lors d'une activation dans l'eau.

En outre nous avons remarqué la formation d'un gel lors de l'activation dans l'eau. Ce constat avait aussi été formulé par Withler (1982) pour une autre espèce de *Pangasius*. Le sperme de *P. sutchi* conservé 1 jour dans l'azote liquide produisait un gel lorsqu'il était activé dans l'eau et ne pouvait donc fertiliser les œufs. Le sperme était conservé à un taux de dilution de 10 dans deux types de liquide de conservation : extender 251 (850mg NaCl, 500mg NaHCO₃, 1500mg lécithine dans 1 litre d'eau distillée) et extender 189M (730mg NaCl, 500mg NaHCO₃, 500mg fructose, 750mg lécithine et 500mg mannitol dans 1 litre d'eau distillée) additionné de 1, 5 ou 10% de DMSO ou glycérol (cryoprotecteur). Dans tout ces cas, la formation de gel avait été observée après activation dans l'eau. Aucune expérience d'activation dans une solution plus osmotique que l'eau n'a été rapportée.

2.3- Définition d'un dilueur d'insémination pour *P. hypophthalmus* : effet de la pression osmotique et du pH.

MATERIEL ET METHODE.

Deux mâles, induits avec de l'HCG à la dose de 2 000 UI/kg, sont strippés 24 heures après l'injection. Chacun des spermes est prélevé dans une solution saline à 9⁰/₀₀, à un taux de dilution 5. Un pool des deux spermes est réalisé (50% de chaque en volume). Cette solution est stockée dans des beshers (80ml) et conservée au réfrigérateur à une température de 4 à 5°C, pendant 26 heures et 30 minutes.

Cette solution de sperme est utilisée pour féconder les oeufs d'une femelle; 200 à 300 oeufs sont disposés dans des barquettes plastiques où la fécondation est réalisée dans différents milieux d'activation:

- l'eau minérale de salinité nulle et de pH égal à 7,

- solution aqueuse de NaCl à 2⁰/₀₀, Tris 20mM et pH 7 ajusté par HCl.
- solution aqueuse de NaCl à 4⁰/₀₀, Tris 20mM et pH 7 ajusté par HCl.
- solution aqueuse et une autre à 2⁰/₀₀, Tris 30mM. et pH ajusté à 9 par HCl.

Le taux de dilution du sperme est de 1 000 (10 ml de solution d'activation et volume correspondant de solution conservateur+sperme). Les oeufs et le sperme sont agités pendant 1 minute après ajout de la solution d'activation. La fécondation est stoppée par ajout d'eau minérale en quantité dans les barquettes, qui sont plusieurs fois rincées par la suite. L'incubation des oeufs se fait dans les barquettes à une température variant de 26.9 à 27.7°C.

Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est évalué par le taux d'oeufs embryonnés au bout de 24 heures (juste avant l'éclosion).

Quatre barquettes sont réalisées par traitement.

La mesure de la concentration en sperme se fait par dénombrement des têtes spermatiques sur hématimètre. Quatre mesures sont effectuées à la dilution de 8 000 dans une solution saline à 9⁰/₀₀. La concentration mesurée est de 51.00 (+/- 3.43) 10⁹ spz./ml. Les résultats sont analysés statistiquement par la méthode ANOVA en utilisant des tests paramétriques lorsque les variances sont égales (test de Dunnet) ou non paramétriques lorsque elles ne le sont pas (test de Dunn's).

RESULTATS.

Les résultats consignés dans le tableau suivant montrent que la pression osmotique la meilleure est de 2⁰/₀₀ au seuil des 5%. Avec cette solution on atteint 75% de taux d'éclosion.

Tableau 13.- Variation du taux d'éclosion en fonction de l'osmolarité et du pH de la solution d'activation chez *P. hypophthalmus*.

| Nature du dilueur d'activation | | Taux d'éclosion en % | |
|-----------------------------------|----|-------------------------|------------|
| NaCl ⁰ / ₀₀ | pH | Moyenne | Ecart type |
| 0 | 7 | 37.74 | 14.17 |
| 2 | 7 | 74.59 (* ¹) | 2.79 |
| 4 | 7 | 50.06 | 13.42 |
| 2 | 9 | 67.50 (* ²) | 5.39 |

*p<0.05.

(*¹) : comparaison multiple entre les solutions d'activation de pH 7 et à 0, 2 et 4⁰/₀₀ NaCl.

(*²) : comparaison t-test entre solution à 2⁰/₀₀ de NaCl de pH 7 et 9.

En outre une solution d'activation de pH 7 semble être meilleure que celle de pH 9.

DISCUSSION.

Cette série d'expériences montre l'influence de l'osmolarité et du pH de la solution d'activation. Le rôle de ces deux paramètres sur la motilité des spermatozoïdes a été établi dans l'expérience précédente. En outre, leur influence sur la fécondabilité des ovules n'a pas été mis en évidence. Cette expérience n'a pour but que d'éclaircir certains aspects qui demanderont par la suite des approfondissements. Pour l'instant, la composition proposée pour un dilueur d'insémination se limite à NaCl 2⁰/₀₀, Tris 20 mM, pH 7. Cette composition sera inévitablement conduite à être modifiée. En particulier, il faudra s'intéresser à l'influence de la composition ionique du dilueur.

2.4- Comparaison de deux solutions d'activation chez P. bocourti.

PRINCIPE.

L'objectif de cette expérience est de mesurer à partir du taux d'oeufs embryonnés le pouvoir fécondant des spermatozoïdes activés dans l'eau ou dans une solution saline (NaCl 2⁰/₀₀, Tris 20mM, pH 7).

MATERIEL ET METHODE.

Un mâle, induits avec de l'HCG à la dose de 2 000 UI/kg, sont strippés 24 heures après l'injection. Le sperme est prélevé directement dans une solution saline à 12⁰/₀₀, à un taux de dilution 5. Cette solution est stockée dans des tubes à essai et conservée au réfrigérateur à une température de 4 à 5°C, pendant 11 heures.

Cette solution de sperme est utilisée pour féconder les oeufs d'une femelle; 200 à 300 oeufs sont disposés dans des barquettes plastiques où la fécondation est réalisée dans différents milieux d'activation:

- l'eau minérale de salinité nulle et de pH égal à 7,
- solution aqueuse de NaCl à 2⁰/₀₀, Tris 20 mM et pH 7 ajusté par HCl.

Le taux de dilution du sperme est de 1 000 et de 10 000 (soit respectivement 50 et 5 µl de solution conservateur+sperme dans 10 ml de solution d'activation). Les oeufs et le sperme sont agités pendant 1 minute après ajout de la solution d'activation. La fécondation est stoppée par ajout d'eau minérale en quantité dans les barquettes, qui sont plusieurs fois rincées par la suite. L'incubation des oeufs se fait dans les barquettes à une température variant de 28.9 à 29.8°C.

Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est évalué par le taux d'oeufs fécondés (TF) au bout de 8 heures (stade gastrula). Le taux d'éclosion est aussi mesuré (TE).

Quatre barquettes sont réalisées par traitement.

La mesure de la concentration en sperme se fait par dénombrement des têtes spermatiques sur hématimètre. Quatre mesures sont effectués à la dilution de 4 000 dans une solution saline à 9⁰/₀₀. La concentration est évaluée à 31.39 10⁹ spz./ml. Les résultats sont analysés statistiquement par la méthode ANOVA.

RESULTATS.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau 14.- Variation du taux de fécondation et d'éclosion chez *P. bocourti* en fonction du taux de dilution du sperme dans deux milieux d'activation.

| Taux de dilution finale du Milieu d'activation sperme | Eau | | | | Solution saline | | | |
|--|---------|-------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-------|
| | TF | | TE | | TF | | TE | |
| | Moy. | E.T. | Moy. | E.T. | Moy. | E.T. | Moy. | E.T. |
| | 10exp-3 | 90,15 | 1,82 | 88,02 | 1,96 | 90,47 | 1,68 | 88,23 |
| 10exp-4 | 88,13 | 3,05 | 85,75 | 2,29 | 87,47 | 1,14 | 83,15 | 1,78 |

On obtient que la fécondation se produise dans l'eau ou dans la solution saline, des taux de fécondation de l'ordre de 90%. Les taux d'éclosion sont légèrement plus faibles (environ 88%). On note une légère diminution de la valeur du taux de fécondation et du taux d'éclosion lorsque l'on passe d'une dilution finale de 10^{-3} à 10^{-4} .

DISCUSSION.

Aucune différence significative n'est constatée entre une fécondation dans l'eau et dans la solution saline. Il serait souhaitable de renouveler cette expérience peut être en la pratiquant à des taux de dilution plus critiques (10^{-5} , par exemple).

2.5- Comparaison des compositions des dilueurs d'activation avec d'autres espèces.

Nous avons montré que en particulier pour *P. hypophthalmus*, que l'eau n'est pas nécessairement le meilleur milieu d'activation. En particulier en jouant sur le pH mais surtout sur la pression osmotique du dilueur d'insémination, on peut améliorer significativement les taux d'éclosion. En l'état actuel des connaissances, nous réalisons la fécondation avec une solution de composition : 2‰ soit 35 mM NaCl, Tris 20 mM, pH 7, que ce soit pour *P. hypophthalmus* ou *P. bocourti*.

Chez *Hétérobranchus longifilis*, Bernard (1996, non publié) souligne qu'une solution saline (38 mM NaCl, Tris-HCl 5mM, pH 8, 79mOsmol/kg/Kg) n'a pas d'effet favorable sur l'activation des spermatozoïdes par rapport à de l'eau.

Chez le silure glane (*Silurus glanis*), Saad et Billard (1995) montrent que les spermatozoïdes sont progressivement inhibés lorsque la pression osmotique augmente et le pouvoir fécondant est maximum lorsque l'insémination est pratiquée dans un dilueur dont la pression osmotique est comprise entre 100 et 150 mOsmol/kg. Ainsi, dans un dilueur de pression osmotique voisine de 100 mOsmol/kg (30 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7), la survie des spermatozoïdes est meilleure que dans l'eau douce ; une minute après dilution, 60% des spermatozoïdes sont encore en mouvement alors qu'après dilution dans l'eau douce, 5% seulement des spermatozoïdes sont actifs.

Enfin, l'étude de l'effet du pH du dilueur sur le succès de la fécondation montre que le pH optimum est de 7.

Chez la carpe (*Cyprinus carpio*), Saad et Billard (1987) montre que le dilueur d'insémination le plus approprié pour la survie des œufs et des spermatozoïdes doit avoir une pression osmotique voisine 120 mOsmol/kg et un pH de 8. Il a été montré que le potassium était largement plus favorable à la motilité (fréquence de battements flagellaires) et à la survie des spermatozoïdes que le sodium (Morizawa et coll., 1983). Mais la quantité de cet ion supportable par les ovules ne doit pas excéder 5 mM (Plouidy, 1982). De ce fait, la composition proposée pour un dilueur se limite donc à 45 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Tris, pH 8.

CONCLUSION

Face à la nécessité de répondre rapidement aux problèmes liés à la maîtrise de la reproduction artificielle de *P. bocourti* et *hypophthalmus*, nos priorités de recherche se sont portées sur la connaissance de l'appareil reproducteur mâle.

Concernant l'induction hormonale de ces poissons, nous avons testé différents types d'hormones. Il apparaît, pour l'HCG injecté à la dose de 2 000 UI/kg, que la réponse est maximale 12 à 24 heures après injection et que l'on peut espérer collecter 345 µl/kg de sperme pour *P. bocourti* et 825 µl/kg pour *P. hypophthalmus*. La concentration en spermatozoïdes de la laitance suit la même évolution que le volume sans que pour autant les mesures faites soient significativement différentes.

Le LHRH, associé à un antidopaminergique, le dompéridone, injectés respectivement aux doses de 30 µg/kg et 3 mg/kg, induit chez *P. bocourti* une réponse plus éloignée dans le temps (maximum observé 48 heures après injection) et plus discrète en intensité (185 µl/kg).

Les tests de motilité montrent que l'activité des spermatozoïdes est de courte durée après activation. Elle est de 57 secondes pour *P. bocourti* et de 45 s. pour *P. hypophthalmus*. Le maximum d'activité est observé 5 à 6 s. après activation. Ce palier est maintenu 5 à 6 s. chez *P. bocourti* et 10 à 11 s. chez *P. hypophthalmus*.

Les solutions d'immobilisation stoppent l'activation du sperme produite par l'urine. Différentes osmolarités ont été testées par mesure du taux de fécondation ou d'éclosion. Dans l'attente de données supplémentaires, on utilisera une solution à 9⁰/100 de NaCl (pH 7) pour *P. hypophthalmus*, et 12⁰/100 (pH 7) pour *P. bocourti*.

On souligne, en outre, l'importance d'un trop fort taux de dilution du sperme de *P. hypophthalmus* dans son liquide de conservation.

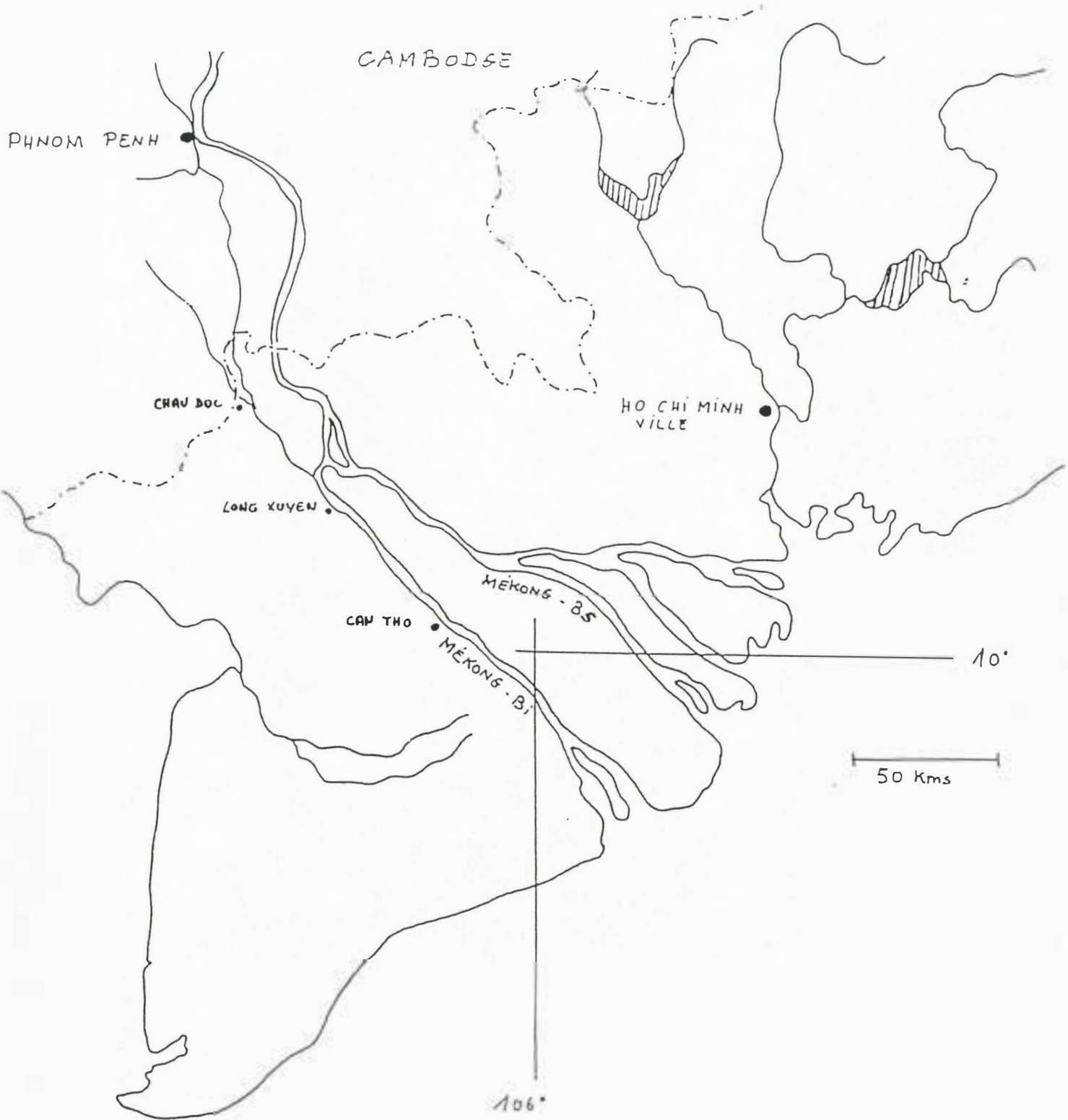
Dans ces conditions, on peut espérer conserver le sperme à 4-5 °C entre 24 et 36 heures sans que son pouvoir fécondant en soit significativement modifié.

Enfin, différentes solutions d'activation ont été étudiées. Elles nous conduisent à préférer à l'eau, une solution saline à 2⁰/100 NaCl et à pH 7. De plus, dans un souci d'économie du sperme lors de l'insémination, on suggère de pratiquer la fécondation à une dilution du sperme de 10⁻³.

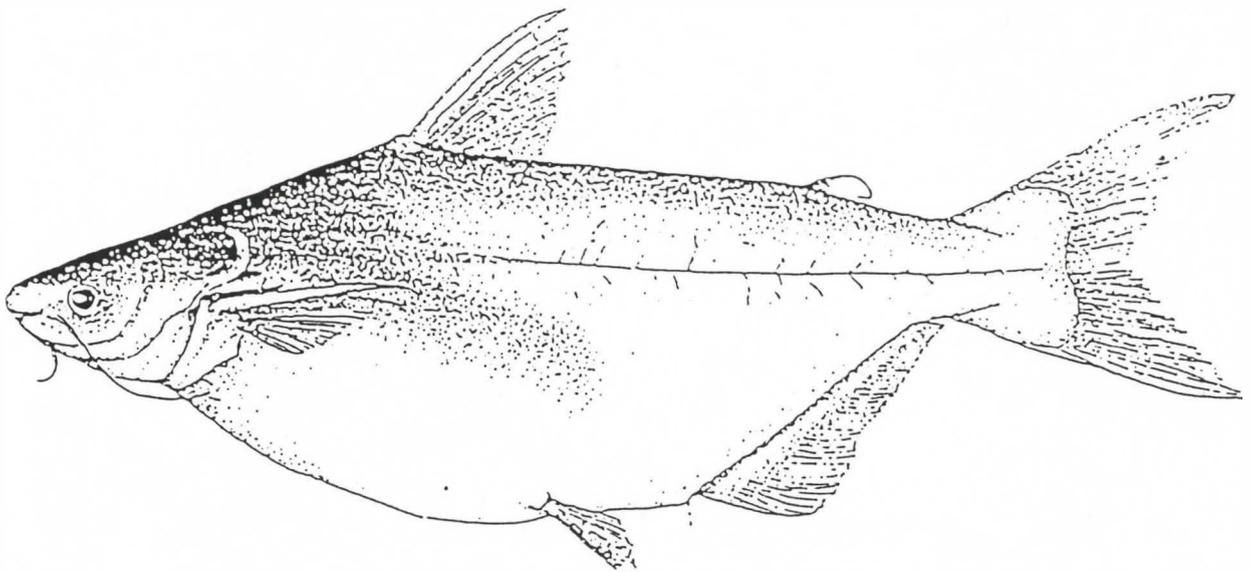
ANNEXES

| | |
|---|----|
| Annexe 1.- Carte du delta du Mékong. | 53 |
| Annexe 2.- <i>Pangasius bocourti</i> . | 54 |
| Annexe 3.- <i>Pangasius hypophtalmus</i> . | 55 |
| Annexe 4.- Le cycle de production de <i>P. bocourti</i> . | 56 |
| Annexe 5.- Bilan des stimulations hormonales réalisées chez <i>P. bocourti</i> . | 57 |
| Annexe 6.- Evolution annuelle de la maturité sexuelle et mesure de RGS chez <i>P. bocourti</i> et <i>hypophtalmus</i> . | 58 |
| Annexe 7.- Bilan de quelques inductions hormonales pratiquées sur des poissons chats d'Asie. | 59 |
| Annexe 8.- Exemples de conservation courte durée de sperme de poissons de différentes espèces. | 60 |
| Annexe 9.- Echelle de Sanchez-Rodriguez pour exprimer la motilité des spermatozoïdes. | 61 |

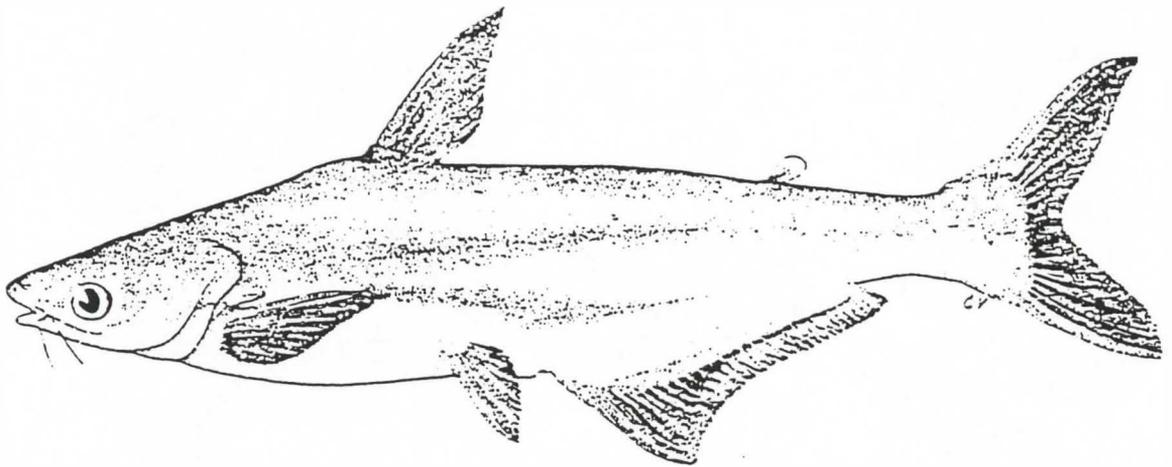
Annexe I.- Carte du delta du Mékong.

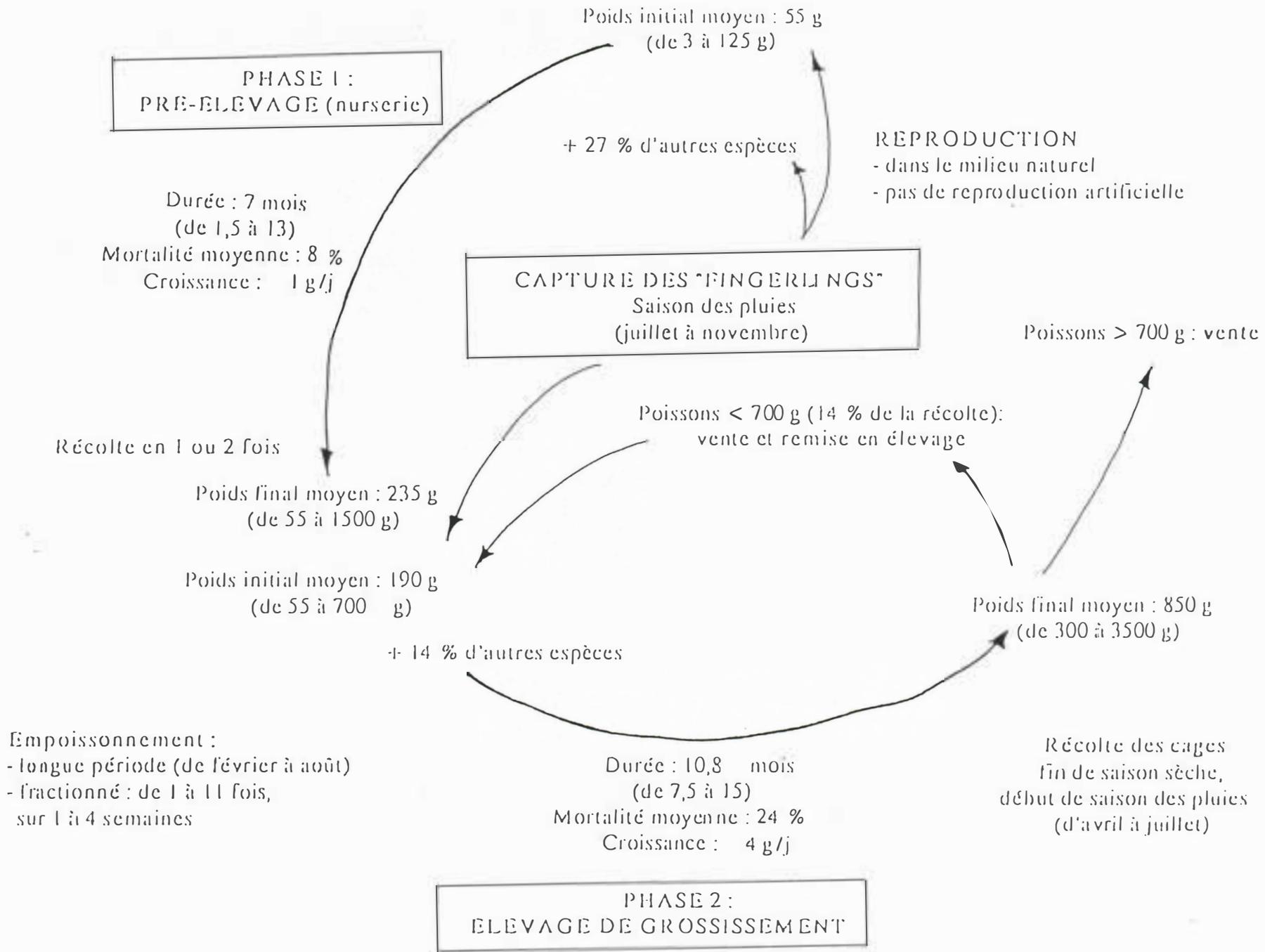


Annexe 2.- *Pangasius bocourti* (Cacot, 1993).



Annexe 3.- *Pangasius hypophthalmus* (Roberts, 1991).





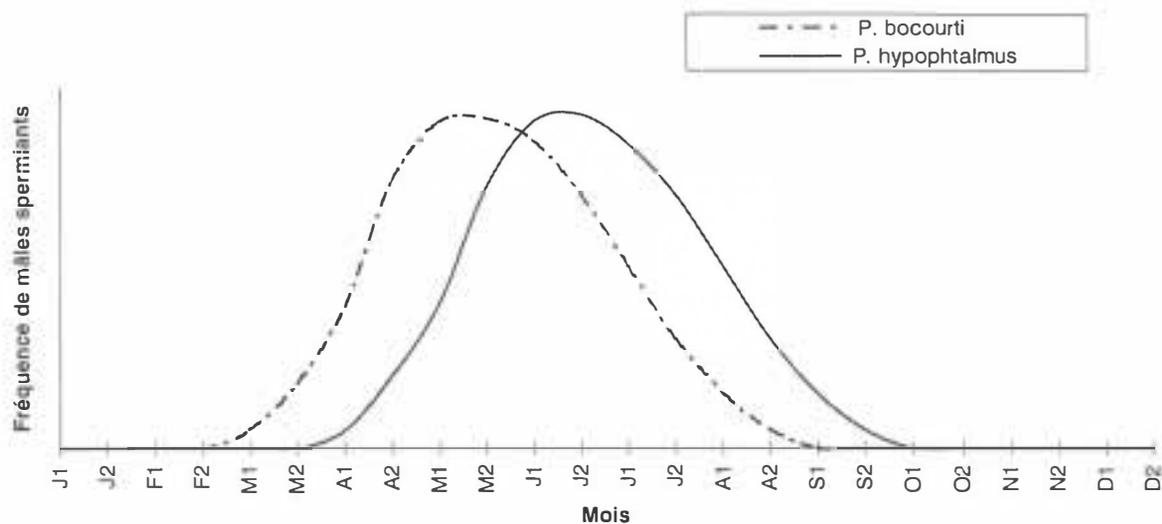
Annexe 5.- Bilan des stimulations hormonales réalisées chez *P. bocourti*.

| Nbre de mâles par traitement | i1 | delta t | s1 | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|----------|---------------------------------------|---------------------|---|----------------|----------------------|----------------|-----------|
| 1 | HCG (2000 UI/kg) | 13 | 0ml | | | | | | |
| 2 | HCG (2000 UI/kg) | 13 | < 1ml | delta t 23h30min | i3 LHRH (30µg/kg) et DOM (3mg/kg) | delta t 16h | s2 2 à 3ml | | |
| 2 | LHRH (30µg/kg) et DOM (3mg/kg) | 16h | < 1ml | | | | | | |
| 1 | LHRH (30µg/kg) et DOM (3mg/kg) | 16h | > 1ml | | | | | | |
| 1 | LHRH (38µg/kg) et DOM (3.8mg/kg) | 120 | LHRH (38µg/kg) et DOM (3.8mg/kg) | delta t 13h45min | s1 0.12% RGS | | | | |
| 1 | LHRH (38µg/kg) et DOM (3.8mg/kg) | 13h55min | 2 ml concentré | delta t 5h20min | s2 1 à 2 ml concentré | | | | |
| 1 | LHRH (38µg/kg) et DOM (3.8mg/kg) | 14h30min | 2 ml concentré | | | | | | |
| 1 | LHRH (30µg/kg) et DOM (3mg/kg) | 35h20min | 0.2 ml concentré | | | | | | |
| 1 | LHRH (21.3µg/kg) et DOM (1.0mg/kg) | 24h | LHRH (21.3µg/kg) et DOM (1.0mg/kg) | delta t 24h | i3 HCG (2000 UI/kg) | delta t 20h | s1 1 ml avec urée | | |
| 1 | | 24h | LHRH (20.2µg/kg) et DOM (1.0mg/kg) | delta t 24h | i3 LHRH (40.4µg/kg) et DOM (4.0mg/kg) | delta t 20h | s1 0ml | delta t 17h | s2 0ml |
| 1 | HCG (2000 UI/kg) | 20h | 0.4 ml concentré | delta t 1h | s2 0ml | | | | |
| 1 | HCG (2000 UI/kg) | 31h | 3ml | | | | | | |
| 1 | LHRH (10µg/kg) et PIM (1mg/kg) | 19h | 1% RGS 6 ml par biopsie | | | | | | |

i : injection

s : stripping

Annexe 6.- Evolution annuelle de la maturité sexuelle de *P. bocourti* et *hypophthalmus* et mesure de RGS.



| <i>P.hypophthalmus</i> | | | | | <i>P.bocourti</i> | | | | |
|------------------------|----------------|-------------------|------------------|---------|-------------------|----------------|-------------------|------------------|---------|
| Date | Poids vif (kg) | Poids graisse (g) | Poids gonade (g) | RGS (%) | Date | Poids vif (kg) | Poids graisse (g) | Poids gonade (g) | RGS (%) |
| 1/05 | 4,20 | 20 | 85 | 2,02 | 22/03 | 4,20 | 289 | 5 | 0,12 |
| 29/06 | 9,00 | 80 | 23 | 0,26 | 14/05 | 5,60 | 556 | 6 | 0,11 |
| 25/06 | 7,00 | 195 | 12 | 0,17 | 16/02 | 4,99 | 310 | 7 | 0,14 |
| 16/06 | 5,00 | 89 | 7 | 0,14 | 2/03 | 6,70 | 508 | 5 | 0,07 |
| | | | | | | 3,80 | - | 38 | 1,00 |
| | | | | | 24/04 | 3,80 | 392 | 33 | 0,87 |
| | | | | | 16/06 | 4,00 | 379 | 10 | 0,25 |

Annexe 8.- Exemples de conservation courte durée de sperme de poissons de différentes espèces (Billard, 1995).

| Species | Storage conditions | | | Milt eggs (ml used) | Fertilization rate (% of control) | References |
|---|--------------------|------------------------|------------|--|-----------------------------------|--------------------------|
| | °C | Form | Duration | | | |
| Brown trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>) | 2 | neat | 15.5-20.5h | 1.2000 | 69-92 | Plavata & Keller 1974 |
| | 2 | neat | 15.5-20.5h | 1.2000 | 43-95 | Plavata & Keller 1974 |
| | 10 | 1:9 ¹ dil | 24h | 0.1.4ml | 90-95 | Erdahl & Graham 1987 |
| Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) | 0 | neat ² | 34 days | excess 25 motility test | 93 | Stoss & Hultz 1983 |
| | 0 | neat | 7 days | | 12-13 activation | Stoss et al. 1987 |
| | 4 | neat ² | 5 days | 0.1.200 | 80 | Billard 1981 |
| | 4 | 1:1 dil ³ | 37 days | 1.4 x 10 ⁶ sperm per egg (300 eggs) | 81 | McNiven et al. 1993 |
| | 10 | 1:1 dil ³ | 24h | 0.1.4 eggs | 90-95 | Erdahl & Graham 1987 |
| Pink salmon (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>) | 10 | 1.255 dil ⁴ | 30min | 0.1.4ml eggs | 85-90 | Erdahl & Graham 1987 |
| | 8-9 | neat | 46h | NG | 90 | Withler & Humphreys 1967 |
| | 3.2 | neat | 160h | NG | 50 | Withler & Humphreys 1967 |
| Sockeye salmon (<i>Oncorhynchus nerka</i>) | 3 | neat | 180h | NG | 50 | Withler & Humphreys 1967 |
| | 10 | neat | 180h | NG | 50 | Withler & Humphreys 1967 |
| Chinook salmon (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>) | 3 | neat | 8 days | 0.75.150 | 50 | Jensen & Alderdice 1984 |
| | 9 | neat | 88h | 0.75.150 | 50 | Jensen & Alderdice 1984 |
| Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>) | -4 | 1:1 dil | 21 days | 0.4:1000 | 93 | Rara unpublished data |
| Halibut (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) | -4 | neat | 29 days | 0.8 x 10 ⁶ sperm per egg | 75 | Eulwardes 1991 |
| Carp (<i>Cyprinus carpio</i>) | 0-5 | neat | 45h | NG | 90 | Hulata & Rothbard 1979 |
| | 4 | neat | 13 days | 0.1.200 | 83 | Saad et al. 1988 |
| Walleye (<i>Stizostedion vitreum vitreum</i>) | 4 | 1:2 dil ⁴ | 14 days | 2:118 ml eggs | 91 | Moore 1987 |
| Tilapia | | | | | | |
| (<i>Oreochromis aureus</i>) | 4 | 1:19 dil ⁵ | 6 days | motility test | 50% motile | Muiruri 1988 |
| (<i>Oreochromis niloticus</i>) | 4 | 1:19 dil ⁵ | 6 days | motility test | 50% motile | Muiruri 1988 |
| (<i>Oreochromis aulersoni</i>) | 4 | 1:19 dil ⁵ | 5 days | motility test | 50% motile | Muiruri 1988 |
| (<i>Oreochromis mossambicus</i>) | 4 | 1:19 dil ⁵ | 4 days | motility test | 50% motile | Muiruri 1988 |
| | 5 | neat | 27h | motility test | 41% motile | Harvey 1983 |
| <i>Sarotherodon galilaeus</i> | 4 | 1:19 dil ⁵ | 5 days | motility test | 50% motile | Muiruri 1988 |
| <i>Tilapia zilli</i> | 4 | 1:19 dil ⁵ | 4 days | motility test | 50% motile | Muiruri 1988 |

NG = Not given

¹ Extender = CaCl₂ 0.1 g l⁻¹, MgCl₂ 0.2 g l⁻¹, Na₂HPO₄ 0.25 g l⁻¹, KCl 2.55 g l⁻¹, NaCl 5.85 g l⁻¹, Glucose 10g, KOH 10ml at 1.27 g/100ml, Bicine 10ml at 5.3 g/100ml, deionised water 980ml

² Stored under pure oxygen

³ Extender = Fluorocarbon, FC-77

⁴ Extender = CaCl₂.2H₂O 0.243 g l⁻¹, MgCl₂.6H₂O 0.267 g l⁻¹, Na₂HPO₄ 0.472 g l⁻¹, NaCl 13.2 g l⁻¹, Glucose 20 g l⁻¹, Citric acid 0.2 g l⁻¹, NaOH 40ml at 1.27 g 100ml⁻¹, Bicine at 5.3 g 100ml⁻¹, distilled water 1920ml

⁵ Extender = NaCl 6.5 g l⁻¹, KCl 3.0 g l⁻¹, NaHCO₃ 0.2 g l⁻¹, CaCl₂.6H₂O 0.30 g l⁻¹, distilled water 1000ml

Annexe 9.- Echelle de Sanchez-Rodriguez pour exprimer la motilité des spermatozoïdes.

| 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) : — soit ils se déplacent vigoureusement, — soit ils se déplacent lentement, — soit ils sont immobiles. |
| 2 | Peu de spermatozoïdes se déplacent rapidement; quelques-uns se déplacent lentement. La majorité des spermatozoïdes est immobile. |
| 1 | Seuls quelques spermatozoïdes ont une légère agitation. |
| 0 | Tous les spermatozoïdes sont immobiles. |

BIBLIOGRAPHIE

1. Barnabe G., 1992. Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Tec et Doc (Ed.). Paris, 500p.
2. Baynes S.M., Scott A.P., 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thax fertility. *Aquaculture*, **66**, 53-67.
3. Bernard E., 1996. Elevage d'*Hétérobranchus longifilis* en eau recyclée thermorégulée : gestion des gamètes pour la fécondation *in vitro*. ORSTOM-GAMET, Montpellier, 27p.
4. Billard R., 1996. Reproduction of pike: gametogenesis, gamete biology and early development. In: John F. Craig (Editor), Pike: Biology and exploitation. Published by Chapman & Hall, London.
5. Billard R., Bieniarz K., Popek W., Epler P., Breton B., Alagarwami K., 1987. Stimulation of gonadotropin secretion and spermiation in carp by pimozide-LHRH-A treatment: effects of dose and time of day. *Aquaculture*, **62**, 161-170.
6. Billard R., Choisis J.P., Reinaud P., 1983. Stimulation of spermiation in carp response to LH-RH and D-Ala⁶-LH6RH ethylamide. *Aquaculture*, **35**, 173-176.
7. Billard R., Cosson J.P., Perchec G., Linhart O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, **129**, 95-112.
8. Billard R., Cosson M.P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. Exp. Zool.*, **261**, 122-131.
9. Billard R., Marcel J., 1980. Stimulation of spermiation and induction of ovulation in Pike (*Esox lucius*). *Aquaculture*, **21**, 181-195.
10. Bromage N.R., Roberts, R.J., 1995. Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science ed., London, 424p.
11. Büyükhatoğlu S., Holtz W., 1978. Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. *Aquaculture*, **14**, 49-56.
12. Cacot Ph., 1993. Présentation de la pisciculture en cages flottantes dans le sud Vietnam. Caractéristiques de l'élevage sur le Mékong de *Pangasius pangasius*. Ed. CIRAD-EMVT, Montpellier, 107p.
13. de Kinkelin P., Michel C. et Ghittino P., 1985. Précis de pathologie des poissons. INRA-OIE Edit., 340p.
14. De Leeuw R., Goos H.J.Th., Richter C.J.J., Eding E.H., 1985. Primozide-LHRHa-induced breeding of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquaculture*, **44**, 295-302.
15. Harvey B., Carosfeld J., 1993. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa, Ont., IDRC. x+144p. : ill.
16. Harvey B., Hoar W.S., 1980. La reproduction provoquée chez les poissons : théorie et pratique. Ottawa, Ont., IDRC. x+49p. : ill.
17. Harvey B., Kelley R.N., 1984. Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. *Aquaculture*, **36**, 85-95.
18. Hogendoorn H., Vismans M.M., 1980. Controlled propagation of the African catfish, *Clarias lazera* (C. & V.). II. Artificial reproduction. *Aquaculture*, **21**, 39-53.
19. Hulata G., Rothbard S., 1979. Cold storage of carp semen for short periods. *Aquaculture*, **16**, 267-269.
20. Linhart O., Billard R., 1994. Spermiation and sperm quality of European catfish (*Silurus glanis* L.) after implantation of GNRH analogues and carp pituitary extract. *J. Appl. Ichthyol.*, **10**, 182-188.

- 21.Linhart O., Billard R., 1995. Survival of ovulated oocytes of the European catfish (*Silurus glanis*) after in vivo and in vitro storage or exposure to saline solutions and urine. *Aquat. Living Resour.*, **8**, 317-322.
- 22.Linhart O., Billard R., Proteau J.P., 1993. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* L. spermatozoa. *Aquaculture*, **115**, 347-359.
- 23.Linhart O., Kouril J., Hamackova J., 1987. Increased rate of eggs fertilization in artificial propagation of sheatfish (*Silurus glanis* L.) by means of suppressing the movements of spermatozoa with immobilization solution. *Aquaculture*, **65**, 353-358.
- 24.Linhart O., Peter R.E., Rothbard S., Zohar Y., Kvasnicka P., 1995. Spermiation of common tench (*Tinca tinca* L.) stimulated with injection or implantation of GnRH analogues and injection of carp pituitary extract. *Aquaculture*, **129**, 119-121.
- 25.Marian T., Kraszanai Z.L., 1987. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) sperm. In: *Selection Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*. Tiewes K. (ed), FAO (EIFAC, Hamburg **Vol. I**, 253-260.
- 26.Perchec G., Cosson J., André F., Billard R., 1995. Degradation of the quality of carp sperm by urine contamination during stripping. *Aquaculture*, **129**, 133-137.
- 27.Rana K.J., McAndrew B.J., 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture*, **76**, 335-345.
- 28.Roberts T.R., Vidthayanon C., 1991. Systematic revision of the asian catfish family Pangasiidae, with biological observations and descriptions of three new species. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **143**, 97-144.
- 29.Saad A., Billard R., 1987. Spermatozoa production and volume of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, **65**, 67-77.
- 30.Saad A., Billard R., 1987. The composition and use of a sperm diluent in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, **66**, 329-345 (in French).
- 31.Saad A., Billard R., 1987a. Spermatogenetic production and spermiation yield in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, **65**, 67-77.
- 32.Saad A., Billard R., 1987b. Composition et emploi d'un dilueur d'insémination chez la carpe *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, **66**, 327-347.
- 33.Saad A., Billard R., 1995. Production et gestion des spermatozoïdes chez le poisson-chat européen *Silurus glanis*. *Aquat. Living Resour.*, **8**, 323-328.
- 34.Saad A., Hollebecq M.G., Billard R., Pionnier E., Heymann A., 1988. Production spermatogénétique, dilution et conservation du sperme du Silure Européen, *Silurus glanis*. In : Symp. Cultivo Intensivo de Peces Continentales, Assoc. Española de Aquacultura, Madrid.
- 35.Schlumberger O., 1993. Mémento de pisciculture d'étang. « Etudes » du CEMAGREF, série Ressources en eau, n°7. CEMAGREF-DICOVA, Antony (Editeur), TEC et DOC, Cachan (Diffuseur), 166p.
- 36.Slembrouck J., Legendre M., 1988. Aspects techniques de la reproduction contrôlée de *Heterobranchus longifilis* (Clariidae). Doc. Sci. Cent. Rech. Océanogr. Abidjan, 15p.
- 37.Stoss J., Holtz W., 1983. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture*, **31**, 269-274.
- 38.Stoss J., Refstie T., 1983. Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, **30**, 229-236.
- 39.Wheeler P.A., Thorgaard G.H, 1991. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture*, **93**, 95-100.
- 40.Withler F.C., 1980. Chilled and cryogenic storage of Thai carps and catfishes. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, No. **948**, 15pp.

41. Withler F.C., 1982. Cryopreservation of spermatozoa of some fresh water fishes cultured in South and Southeast Asia. *Aquaculture*, **26**, 395-398.
42. Withler F.C., Lim L.C., 1982. Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. *Aquaculture*, **27**, 389-392.

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1.- Place de la société AGIFISH dans la filière <i>Pangasius</i> | 13 |
| Tableau 2.- Le stock de géniteurs entretenus par AGIFISH..... | 14 |
| Tableau 3.- Dynamique de la spermiation après une injection d'HCG chez <i>P. bocourti</i> | 22 |
| Tableau 4.- Dynamique de la spermiation après une injection de LHRH+Dompéridone chez <i>P. bocourti</i> | 24 |
| Tableau 5.- Dynamique de la spermiation après une injection d'HCG chez <i>P. hypophthalmus</i> | 26 |
| Tableau 6.- Valeurs de RGS pour quelques espèces de poissons. | 27 |
| Tableau 7.- Concentration en spermatozoïdes de la laitance de quelques poissons. | 27 |
| Tableau 8.- Bilan des expériences d'induction (HCG 2000 UI/kg) réalisées sur Hétérobranchus longifilis. | 28 |
| Tableau 9.- Motilité des spermatozoïdes de <i>P. bocourti</i> et <i>hypophthalmus</i> dans différents milieux..... | 31 |
| Tableau 10.- Influence de l'osmolarité de la solution d'immobilisation sur le taux d'éclosion. | 34 |
| Tableau 11.- Evolution de la qualité du sperme conservé au froid (4-5°C). | 37 |
| Tableau 12.- Evolution de la motilité du sperme de <i>P. hypophthalmus</i> en fonction de la durée de conservation, de la nature de la solution de conservation et d'activation..... | 45 |
| Tableau 13.- Variation du taux d'éclosion en fonction de l'osmolarité et du pH de la solution d'activation chez <i>P. hypophthalmus</i> | 47 |
| Tableau 14.- Variation du taux de fécondation et d'éclosion chez <i>P. bocourti</i> en fonction du taux de dilution du sperme dans deux milieux d'activation. | 49 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1.- Carte du Vietnam..... | 4 |
| Figure 2.- Aperçu global de la filière de production piscicole de <i>Pangasius bocourti</i> dans le Sud-Vietnam..... | 8 |
| Figure 3.- Déroulement de l'insémination artificielle..... | 16 |
| Figure 4.- Principaux maillons de la chaîne physiologique des événements qui vont de la réception des stimuli environnementaux à la libération des gamètes matures..... | 18 |
| Figure 5.- Coupe d'un lobe testiculaire montrant le contrôle hormonal des différents stades de maturation du sperme..... | 20 |
| Figure 6.- Profil d'activité du sperme de <i>P. hypophthalmus</i> après dilution dans l'eau..... | 31 |
| Figure 7.- Profil d'activité du sperme de <i>P. bocourti</i> après activation dans l'eau..... | 32 |
| Figure 8.- Influence du taux de dilution du sperme dans le liquide de conservation sur le taux d'éclosion..... | 35 |
| Figure 9.- Evolution du pourcentage d'éclosion en relation avec le taux de dilution du sperme de <i>P. hypophthalmus</i> | 41 |
| Figure 10.-Variabilité du pouvoir fécondant du sperme de <i>P. hypophthalmus</i> pour différents taux de dilution..... | 42 |
| Figure 11.- Evolution du pourcentage de fécondation en relation avec le taux de dilution du sperme de <i>P. bocourti</i> | 43 |

RÉSUMÉ

Au Vietnam, la filière d'élevage en cages de *P. bocourti* et *hypophthalmus* générait, en 1993, un bénéfice de près de 70 millions de francs pour une production de l'ordre de 15 000 tonnes. Elle faisait vivre directement plus de 3 000 personnes.

Le cycle d'élevage de ces poissons est basé sur la capture dans le Mékong de juvéniles : environ 26 millions d'alevins sont nécessaires chaque année pour alimenter la filière. Or le prix de l'alevin ne cesse d'augmenter, alors que les frais d'achat de ces juvéniles peuvent représenter jusqu'à 50% des charges de fonctionnement d'une unité de production. Ainsi, la maîtrise de la reproduction artificielle de ces poissons apparaît vitale pour la pérennité de l'espèce. C'est un des objectifs du programme de recherche en coopération que mène le CIRAD dans ce pays. Or, en avril 1995, Philippe Cacot, allocataire de recherche au CIRAD, réussissait pour la première fois la maîtrise de la reproduction de *P. bocourti*.

Pour autant, des recherches supplémentaires en particulier dans la compréhension du fonctionnement de l'organe reproducteur mâle s'imposaient, car les inséminateurs vietnamiens n'hésitaient pas à sacrifier les géniteurs mâles lors des opérations de reproduction artificielles. Trois axes de recherche se dégagent :

- l'induction hormonale des géniteurs mâles,
- la collecte et la préservation du sperme du fait de sa pollution par l'urine,
- enfin, la gestion des gamètes lors de l'insémination.

L'induction hormonale par l'HCG montre que la réponse est maximale 12 à 24 heures après injection tant en volume que en terme de concentration spermatique. Chez *P. bocourti*, en plus, une injection de LHRH associé à un antidopaminergique, le dompéridone, permet une spermiation, mais plus faible en intensité et plus tardive (48 heures) que dans le cas de l'HCG.

Plusieurs solutions d'immobilisations ont été testées par mesure du taux de fécondation ou d'éclosion. L'osmolarité et le taux de dilution du sperme dans ce liquide ont été les facteurs étudiés. Ainsi, on utilisera donc comme liquide de conservation une solution tamponnée à pH 7 et de salinité respective à 12‰ de NaCl pour *P. bocourti* et 9 pour *P. hypophthalmus*. Dans ces conditions, on peut espérer conserver le sperme 24 à 36 heures au frais sans que son pouvoir fécondant soit modifié.

Les tests de motilité montrent que l'activité des spermatozoïdes est de courte durée après activation. Elle est de 57 secondes pour *P. bocourti* et de 45 s. pour *P. hypophthalmus*. Le maximum d'activité est observé 5 à 6 s. après activation. Ce palier est maintenu 5 à 6 s. chez *P. bocourti* et 10 à 11 s. chez *P. hypophthalmus*.

Enfin, différentes solutions d'activation ont été étudiées. Elles nous conduisent à préférer à l'eau, une solution saline à 2‰ NaCl et à pH 7. De plus, dans un souci d'économie du sperme lors de l'insémination, on suggère de pratiquer la fécondation à une dilution du sperme de 10^{-3} .

ABSTRACT

In Vietnam, *Pangasius bocourti* and *hypophthalmus* ' breeding in floating cages created in 1993 a 70-million FF-profit for a total production of 15 000 t. Three thousand persons lived directly from this breeding.

Breeding's cycle of this two catfish is dependant on the capture of fingerlings in Mekong river : every year, *Pangasius* breeding needs about 26 millions of fry. But fingerlings' price is going up, whereas thier purchase's expense represents up to 50% of a floating cages' operating cost.

Thus, control artificial propagation of this two fishes appears vital for channel's timelessness. It was also one of the scientific research program in cooperation led by CIRAD in this country. In April 1995, Philippe Cacot, scientific in CIRAD succeeded for the first time in artificial propagation of *P. bocourti*.

For all of that, research must be extensive, specially in understanding male reproductive organ working. Vietnamese inseminator didn't hesitate to sacrifice male genitors during propagation operation.

Our research were developped in three direction :

- male's hormonal induction,
- collect and preservation of sperm because of a urine's pollution,
- gamete management during insemination.

Response after HCG hormonal induction of spermiation is maximal between 12 to 24 hours after injection ; the volume of semen collected increases and also the concentration. In *P. bocourti*, a Dompéridoe-LHRH-induced spermiation is less important in quantity than HCG's one, and the maximal response occurs 48 h. after injection.

Different diluent for short-term preservation of *P. bocourti* and *hypophthalmus* semen were tested by fertilisation or hatching rate measure. Osmolarity and dilution rate of sperm in immobilizing extender were studied. So, we suggest to use as preservation diluent a pH 7 solution which NaCl concentration is 12 ‰ for *P. bocourti* and 9 ‰ for *P. hypophthalmus*. Under those conditions, we can preserve sperm 24 to 36 hours in liquid state at 4-5°C without changing spermatozoa' fertilizing capacity.

Motility test show that spermatozoa activity is very short after activation : 57 seconds for *P. bocourti* and 45 seconds for *P. hypophthalmus*. Maximum activity is observed 5 seconds after activation and is going on 5-6 s. for *P. bocourti* and 10-11 s. for *P. hypophthalmus*.

Finally, diluent for activating spermatozoa motility were studied. A 2 ‰ NaCl solution (pH 7) is better than fresh water. To manage sperm during insemination, a 10⁻³-final sperm dilution ratio must be used.