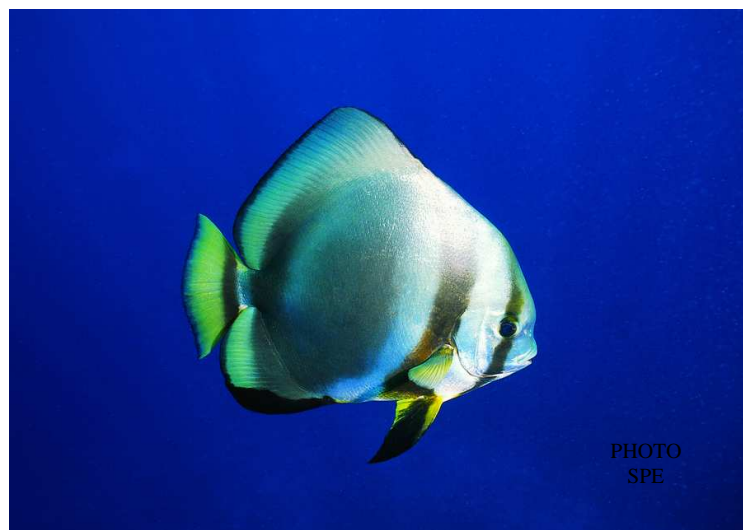


Rapport de soutenance de stage de
2^{ème} année de Master BGAE
Spécialité EFDD



Parcours : Bioressources Aquatiques en Environnement
Méditerranéen et Tropical



La synchronisation des pontes chez *Platax orbicularis*

BOICHARD, sylvestre

Maître de stage :

GASSET, Eric

Eric.Gasset@ifremer.fr

Organisme d'accueil :

IFREMER

Centre Océanologique du Pacifique,
BP 7004 98719 TARAVALO - Tahiti

Ifremer



Service de la Pêche
PIHA RAVA'AI

INTRODUCTION.....	3
I. PRESENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL	6
II. MATERIEL ET METHODE.....	7
1. PRESENTATION DU PLATAX ORBICULARIS (PARAHA PEUE)	7
a) <i>Systématique</i>	7
b) <i>Distribution</i>	7
c) <i>Intérêt pour l'aquaculture</i>	7
2. LES PRATIQUES D'ELEVAGE.....	8
a) <i>Origine et constitution des lots de géniteurs</i>	8
b) <i>Conditions d'élevage</i>	8
3. LES ACTIONS DE ROUTINE (HORS MANIPULATION).....	9
a) <i>Suivi des paramètres d'élevages et entretien</i>	9
b) <i>Suivi des poissons</i>	9
❖ <i>Suivi des gamètes</i>	9
❖ <i>Suivi des pontes</i>	9
4. L'INDUCTION ENVIRONNEMENTALE DES PONTES : LA DESSALURE CONTROLEE	10
a) <i>Déroulement de la dessalure expérimentale</i>	10
b) <i>Récolte et observation des pontes</i>	11
❖ <i>Observation d'échantillons dans les cuves de Dolphus</i>	11
❖ <i>Mesure des œufs et de leur globules</i>	11
❖ <i>Mise en incubation</i>	11
5. L'INDUCTION HORMONALE DES PONTES : L'INJECTION DE LHRL.....	12
III. RESULTATS	13
1. L'INDUCTION ENVIRONNEMENTALE	13
a) <i>Paramètres environnementaux durant les dessalures</i>	13
b) <i>Série de manipulations « dessalure avec contrôle de la température »</i>	14
c) <i>Les pontes émises en couple</i>	15
d) <i>Les contrôles de maturité</i>	16
e) <i>Comparaison des pontes post dessalures et des pontes naturelles du 01/02/08 au 01/07/08</i>	17
2. L'INDUCTION HORMONALE.....	18
a) <i>Les contrôles de maturités</i>	18
❖ <i>Pour les mâles</i>	18
❖ <i>Pour les femelles</i>	19
b) <i>Suivi des pontes après injections</i>	19
IV. DISCUSSION	21
1. LA DESSALURE	21
2. L'INJECTION	25
CONCLUSION.....	26
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	28

Introduction

Le *Platax orbicularis* (Paraha peue en polynésien, poisson lune ou poule d'eau en français et orbicular batfish en anglais, *1*) est un poisson dont l'aquaculture est à ses débuts. Cette espèce est élevée à Taiwan et fait également l'objet de petites productions en Thaïlande pour le marché de l'aquariophilie. La bibliographie concernant la biologie et la zootechnie de ce poisson est quasi-inexistante (*2*).

Aujourd'hui, le *Platax orbicularis* est l'espèce prioritaire du développement de la pisciculture lagonaire en Polynésie française avec l'émergence d'une filière de production locale à l'horizon 2009.

Le contrôle des pontes est primordial en aquaculture pour démarrer une filière d'aquaculture pérenne (*3*). Il permet en premier lieu de n'être plus dépendant des pontes naturelles, dont les conditions de déclenchement sont mal connues chez la plupart des espèces. Le risque de se trouver, même pendant un temps relativement court, sans aucune production d'œufs, peut mettre en danger la totalité de la filière.

En plus d'assurer un approvisionnement durable d'œufs, une meilleure gestion du déclenchement des pontes ouvre d'autres perspectives. En ayant des dates précises d'émission d'œufs, il est possible de planifier de façon optimale la production d'une écloserie, c'est à dire de contenter les besoins des éleveurs en alevins à des périodes données et d'éviter tout gaspillage d'aliment, que ce soit de granulés ou des très coûteuses proies vivantes (rotifères et artémias, zooplancton indispensable à la survie des larves chez de nombreuses espèces piscicoles).

Un autre gain attendu d'une bonne gestion des pontes est de faciliter les croisements spécifiques entre géniteurs et ainsi de pouvoir créer des lignées monoparentales de poissons (*3*). C'est un avantage à considérer à plus long terme pour la filière du *Platax orbicularis* mais aussi vital puisqu'il permet de limiter la consanguinité du cheptel et d'envisager d'éventuels programmes de sélection.

Enfin, la difficulté d'approvisionnement en géniteurs sauvages de *Platax orbicularis* alliée aux risques de pertes de poissons, d'inversion sexuelle (quatre cas ont été observés depuis le début du programme, dont deux durant mon stage) et de dégradation possible des capacités reproductrices (bien qu'aucune étude ne prouve que l'âge induise une baisse de qualité des œufs chez les poissons, *4*) nécessitent l'utilisation optimale du potentiel de reproduction de la totalité des spécimens disponibles.

Pour résumer, la maîtrise des méthodes d'induction des pontes peuvent avoir de très bonnes répercussions, à court comme à long terme, sur les coûts, la qualité et la régularité de la production d'une écloserie, en particulier pour le *Platax orbicularis*. Le but de ce stage est d'acquérir les connaissances permettant la mise en place d'outils fiables de contrôle de la reproduction.

En pisciculture, l'induction des pontes se fait principalement par injections hormonales. L'utilisation de facteurs environnementaux pour ce contrôle est en adéquation avec la mise au point de méthodes d'élevage durables et éco-responsables et pourrait avoir un coût économique moindre, en particulier en Polynésie.

Entre Janvier 2007 et février 2008, un suivi de la reproduction des lots de géniteurs 6, G1A et G1B a été réalisé. L'analyse des conditions d'obtention des pontes révèle que des modifications de l'environnement (baisse de température et de salinité) lors des traitements préventifs contre les ectoparasites, déclenchent très souvent des pontes 2 jours après le retour à une salinité normale (2 dessalures sur 15 n'ont pas déclenché de pontes). Par contre, les évolutions saisonnières de la température de l'eau, de la photopériode et des phases lunaires semblent n'avoir aucun impact sur l'obtention de ponte (5).

L'analyse qualitative des pontes du lot 6 (annexe 13) ne montre pas de différences significatives entre les pontes naturelles et les pontes post-dessalure en termes de diamètre du globule et de taux de fécondation (test bilatéral de Man Withney). Mais un résultat étonnant a été obtenu en comparant le diamètre moyen des œufs. Celui ci est significativement supérieur pour les œufs obtenus après une dessalure (test T unilatéral de student, p value de 0.011). La taille des œufs est souvent citée comme indice de la qualité car ils contiennent plus de réserve de vitellus (6) et augmente donc le potentiel de croissance durant les premières phases de vie larvaire (7), bien que ces résultats soient à nuancer (8).

Les pontes post dessalure sont aussi significativement plus volumineuses que les pontes naturelles (test unilatéral de Mann Whitney, p value de 0.039) ce qui permet de mettre en avant l'effet synchronisateur de la dessalure. L'analyse qualitative des pontes des lots G1A et G1B n'est pas représentative en raison de l'âge des poissons. Les femelles étaient trop jeunes pour pouvoir exprimer leur capacité optimale de reproduction comme Brooks et al. l'ont observé chez d'autres espèces (5).

Une relation semble donc bien établie entre la dessalure et le déclenchement des pontes des femelles de cette espèce. Mais de nombreux points restent à éclaircir :

- Est-ce que les pontes induites par dessalure ont une qualité similaire aux pontes naturelles ?
- Lors des traitements hormonaux destinés à déclencher les pontes, un stade de maturité ovocytaire avancé (au minimum un stade B, 9) est primordial pour obtenir un taux de réponse acceptable chez les femelles injectées. Est ce aussi le cas lors d'une induction par dessalure ?
- La dessalure a-t-elle un effet sur les mâles en particulier sur la qualité et la quantité de semence prélevée ?
- Lors des dessalures anti-parasitaires, l'eau douce ajoutée fait baisser la température de l'eau d'élevage de 3.7 °C en moyenne. Cette variation de température (qui ne se retrouve pas dans les conditions normales d'élevage) ne joue-t-elle pas aussi un rôle dans le déclenchement des pontes ? Afin de répondre à cette question, une série de 8 dessalures avec réchauffement de l'eau douce est réalisée.
- Certains des poissons ayant subit la dessalure vont être séparés du lot et installés par couple dans des bassins prévus à cet effet. Est-il possible de produire des œufs de bonne qualité et de façon importante à partir de couples ?
- Enfin, qu'est ce que cette méthode apporte de plus que les méthodes traditionnelles d'induction hormonale ?

Depuis les années 60, de nombreuses méthodes d'induction de pontes à base d'hormones ont vu le jour, en particulier en Asie. Ces méthodes ont permis de boucler le cycle d'élevage en captivité de nombreuses espèces (3). L'annexe 1 décrit succinctement l'ovogenèse des téléostéens et les méthodes de stimulations connues.

Les différents travaux effectués sur l'induction des pontes par administration de LHRH sont légions et concernent de très nombreuses espèces d'intérêt commercial telles que : la carpe, *Cyprinus carpio* (10), le saumon atlantique, *Salmo salmar* (11), le tilapia, *Oréochromis niloticus* (12), le bar, *Dicentrarchus labrax*, (13) et plus récemment l'ombrine, *Sciaenops ocellatus* (14).

Les méthodologies de ces études peuvent être très diverses. Les paramètres qui varient le plus sont :

- ✓ Le mode d'administration (injection unique, injections multiples ou implant sous-cutané).
- ✓ L'analogue utilisé : en effet, depuis 1973, plusieurs analogues structuraux synthétiques (LHRHa) de la LHRH sont utilisés. Ils sont intéressants car ils peuvent posséder une demi-vie plus longue et un effet plus marqué que la LHRH (15; 16).
- ✓ Les doses injectées.
- ✓ Le stade de maturation des ovocytes au moment de l'injection : c'est un point important à éclaircir, car une stimulation de la maturation d'ovocytes trop précoce peut entraîner des lésions gonadiques. Le meilleur niveau de réponse semble en général être obtenu avec des ovocytes au stade C (cf. annexe 8) (17).
- ✓ Le sexe des animaux injectés : les mâles et les femelles de nombreuses espèces sont sensibles aux injections de LHRHa.

Chez *Platax orbicularis*, une première étude réalisée par DAGOURET (2005) (9) a permis de mettre au point les bases d'une méthode d'injection plus ou moins fiable. Le but de cette étude est donc de fiabiliser et d'optimiser les résultats obtenus. Nous tenterons également à répondre à un certain nombre de questions :

- Est-ce que l'administration de LHRH permet de « débloquer » la maturation des ovocytes de certaines femelles qui n'ont encore jamais pondu ?
- Est-ce que le volume et la qualité des pontes induites par administration de LHRH sont différents des pontes naturelles et post dessalures ?
- L'injection de LHRH a-t-elle un effet sur les mâles et en particulier sur la qualité et la quantité de semence prélevée ?
- Certains animaux vont être isolés par couple dans des bassins de pontes pour permettre des observations individuelles. Est-il possible de produire des œufs de bonne qualité et de façon importante à partir de couples injectés ?

Afin de répondre à ces différentes questions, un suivi des gamètes et des pontes des géniteurs de *Platax orbicularis* va être mis en place tout en appliquant une série d'inductions environnementales et hormonales. Pour comparer la qualité des différents types de pontes obtenus lors de mon stage, il est essentiel de choisir des indicateurs pertinents. La taille de l'œuf, son poids, sa composition chimique (en particulier en acide gras et en acide aminés (18), le fractionnement du globule lipidique (19 ; 20), l'étude de la descendance sur une plus ou moins longue période (21) sont autant de critères de qualité des pontes régulièrement cités (4).

I. Présentation de l'organisme d'accueil

J'ai effectué mon stage à l'Ifremer au centre océanologique du pacifique (COP) . L'Ifremer est un organisme public qui a pour fonction de « conduire et de promouvoir des recherches fondamentales et appliquées, des activités d'expertise et des actions de développement technologique et industriel destinées à :

- Connaître, évaluer et mettre en valeur les ressources des océans et permettre leur exploitation durable. ;
- Améliorer les méthodes de surveillance, de prévision d'évolution, de protection et de mise en valeur du milieu marin et côtier. ;
- Favoriser le développement économique du monde maritime. » (texte tiré de la référence 22).

L'Ifremer est composé de 1385 salariés et possède un budget annuel de près de 160 millions d'euros qui permettent de remplir ces missions (23). Les modalités d'embauche à l'Ifremer sont les mêmes que pour n'importe quelle entreprise privée (candidature écrite puis entretien d'embauche) que ce soit pour un CDI, un CDD, un VCAT ou n'importe quels autres contrats (24).

Les travaux effectués sur le site du COP ont pour but « la recherche appliquée au développement de l'aquaculture tropicale, le soutien technique et l'expertise scientifique aux filières de production aquacole. Il a effectué également des études dans des domaines variés comme l'ingénierie (ETM ou Energie Thermique des Mers) et la pêche (ECOTAP ou Etude du Comportement des Thonidés par l'Acoustique et la Pêche) »(texte tiré de la référence 24).

En 2007, le budget de fonctionnement était de 931 864 euros dont 30 % consacrés aux programmes de recherche. Le nombre total d'agents permanents était de 46 (25). Il accueille également des équipes de Services extérieurs : le Service de la Perliculture et le service de la pêche (annexe 2). Réparti sur un site de 7 ha (annexe 4), le COP comprend 6200 m² d'infrastructures, dont le Laboratoire Biotechnologie et Qualité de la Perle ou LBQP (histologie, bactériologie, biologie moléculaire), le Laboratoire de Domestication de l'Huître Perlière ou LDHP (biométrie, biochimie), et de nombreux équipements aquacoles dont trois écloséries expérimentales : huîtres perlières, crevettes et poissons (annexe 3) et plusieurs sites de production pour ces espèces (bassins à terre et concessions en mer) (26). Une station de pompage fournit 80 m³ par heure d'eau de mer aux différents sites à terre.

Le COP est le seul centre de recherche public de Polynésie française axé sur l'aquaculture. Il rassemble les connaissances et savoir-faire de l'Ifremer, du SPE et du service de la perliculture. Seules les grandes exploitations perlières travaillent aussi sur des projets de recherche et de développement (27). Le SPE à l'intention de monter un centre technique aquacole à l'horizon 2010. Il comprendra deux écloséries (crevettes et poissons), une centrale d'achat (aliment et matériel), une zone de stabulation temporaire pour l'export (aquariophilie principalement) et une structure permettant la formation et l'assistance technique aux porteurs de projets aquacoles(28).

Mon maître de stage, Eric Gasset, est le responsable de l'action « filière poissons lagunaires » (projet pisciculture marine d'Outre Mer) de l'Ifremer et fait partie de l'équipe Assistance Technique et Transfert. Il y travaille en collaboration avec le Service de la Pêche de Polynésie (SPE) dans le cadre d'une convention de collaboration. L'annexe 5 présente les différentes actions et perspectives de ce projet. Mon sujet de stage s'insère dans l'acquisition des connaissances nécessaires pour « gérer des saisons de ponte » et « gérer le risque de consanguinité » (texte tiré de l'annexe 5).

II. Matériel et méthode

1. Présentation de *Platax orbicularis* (Paraha peue)

a) Systematique

Famille : *Ephippidae*
Classe : Actinoptérygiens (poissons à nageoires rayonnées)
Ordre : Perciformes (Perches)

b) Distribution

Indo-Pacifique : De la côte américaine jusqu'à l'Afrique de l'Est, sa limite Nord se situe vers le Japon méridional, et au Sud jusqu'à l'Australie et la Nouvelle-Calédonie (2).

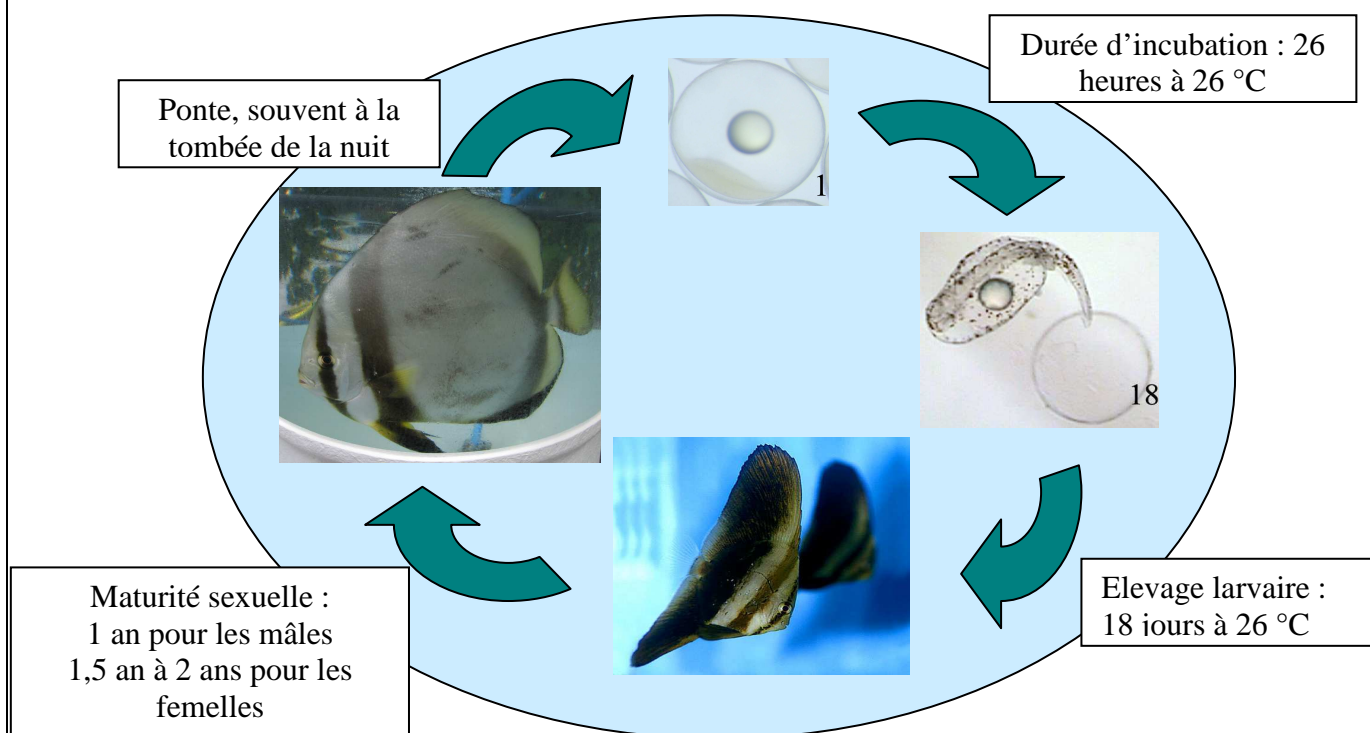


Fig. 1 : Cycle de vie de *Platax orbicularis*

c) Intérêt pour l'aquaculture

Sa chair est très appréciée, à la fois en Polynésie mais aussi dans toute l'Asie. Les effectifs naturels sont en déclin dans toute la Polynésie et son prix de vente est élevé. Une production aquacole aurait ainsi sa place sur le marché local (d'après une étude de marché effectuée en 2002, le demande est approximativement de 100 tonnes de poissons par an, 28)

Les œufs sont flottants donc aisément récupérables. Ils sont émis tout au long de l'année en grande quantité (en moyenne 2 millions d'œufs par kg de femelle et par an, 2). Sa croissance est relativement rapide (environ 900 g au bout d'un an, 2). De plus, c'est une espèce facilement manipulable bien que sensible au stress.

2. Les pratiques d'élevage

a) Origine et constitution des lots de géniteurs

Quatre lots de géniteurs sont utilisés, le premier (lot 6) est composé de 7 individus sauvages de trois origines géographiques différentes. Le deuxième (lot G1A 06-04) et le troisième lot (lot G1B 06-04) sont composés de 10 et 8 individus de première génération issus d'une même ponte. Enfin le dernier lot (lot 5) est un groupe de géniteurs sauvages pêchés au cours du quatrième trimestre 2006. Tous les géniteurs sont marqués individuellement par Pit-Tag (marque magnétique). L'annexe 6 résume la composition de ces différents lots.

b) Conditions d'élevage

Bassin de maturation : d'un volume de 7,7 m³, circulaire de couleur noir à fond plat clair, avec évacuation centrale et trop plein latéral (annexe 7).

Bassin pour couple : d'un volume de 1,7 m³ circulaire de couleur noir à fond plat (noir), avec évacuation centrale et trop plein latéral.

Filtration : passage par un piège à coquillage puis par deux filtres à sable (Ø 600 mm) de granulométrie 0,9 à 1,6 mm, puis deux séries de 2 filtres à poches (25 et 10 µm) et un réacteur U.V. Une colonne de dégazage permet d'éliminer les sur-saturations gazeuses de l'eau, en particulier celles dues à l'azote.

Type de circuit : Les bassins sont tous en circuit totalement ouvert. Toute l'eau d'élevage est rejetée après son passage dans les bassins.

Température : La température d'élevage a varié depuis 2004 entre 25,5°C et 29,5°C.

Salinité : la salinité de l'eau de mer reste très stable à 36 ‰ en raison de la présence d'une halocline.

pH : 8.0

[O2] : 80% de saturation maintenu par le débit d'eau et d'air

Arrivée d'eau : Elle se fait par la surface des bassins juste après une colonne de dégazage.

Arrivée d'air : Un bulleur alimenté en air sous pression est installé dans chaque bassin

Renouvellement en eau des bassins : il est de 25 % du volume par heure, ce qui correspond à un débit de 32 L par minute.

Intensité lumineuse : l'éclairage est artificiel (néon à lumière blanche) et l'intensité est de 480 lux pour le bassin de maturation et de 460 lux pour le bassin couple.

Photopériode : elle dépend de la période de l'année. Elle est en effet calquée sur la photopériode naturelle entre 11 et 13 heures de jour.

Alimentation : le nourrissage est effectué le matin à satiété 6 fois par semaine. L'aliment utilisé est le Neo repro 9 et 11 mm de Le Guessant. L'aliment non distribué est pesé.

3. Les actions de routine (hors manipulation)

a) Suivi des paramètres d'élevages et entretien

La température et la quantité d'aliment consommée sont mesurées tous les jours.

Tous les jours, les récolteurs de ponte et leur panier sont rincés à l'eau douce. Une fois par semaine les paniers subissent un traitement à la javel par immersion durant environ 30 minutes.

Les bassins d'élevage sont purgés une fois par jour d'au moins un tiers de leur volume. Cette purge peut être accompagnée d'un nettoyage au balai lorsque les bassins sont sales.

Toutes les huit semaines environ une dessalure sanitaire préventive de cinq jours à 10 ‰ est effectuée. Le but est d'éradiquer les ectoparasites éventuels par un choc osmotique.

Au terme de chaque dessalure les poissons sont changés de bassin. L'ancien bassin d'élevage est vidé, chloré et maintenu en vide sanitaire pendant au moins 5 jours.

b) Suivi des poissons

Une observation générale du comportement et de l'aspect extérieur est effectuée lors du nourrissage.

❖ *Suivi des gamètes*

Cette méthode a été mise en place afin de travailler sur l'induction des pontes par injection d'hormone en 2005 lors du stage de J.M. DAGOURET (9).

Les gamètes du lot 5 et du lot G1B ont été suivis du mois de Mars à Décembre 2007 toutes les trois semaines. Quelques contrôles post ponte ont été effectués sur le lot G1B.

Le mode opératoire de prélèvement et d'observation des gamètes est détaillé dans l'annexe 8.

Chez les femelles, le stade de maturité des gamètes est observé (A, B, C, D ou ovule). Seul le stade le plus avancé est pris en compte. Les modalités de reconnaissance des différents stades sont détaillées dans l'annexe 9.

Chez le mâle, les critères observés sont la fluance (0, +, ++, +++) qui donne une idée de la quantité de sperme récupérée et la motilité (0, 1, 2, 3, 4 ou 5) qui est un indice de viabilité du sperme récoltés. Les différentes échelles de mesure sont détaillées dans l'annexe 10.

❖ *Suivi des pontes*

Dès les premières pontes d'un géniteur de *Platax orbicularis* (courant 2003), un suivi de celles-ci a été effectué. Ce suivi a évolué au cours des années. Dans un souci de clarté et pour éviter tout biais, seule la méthode utilisée depuis début 2007 est décrite. Les résultats cités dans ce rapport ne seront donc jamais antérieurs au 8 janvier 2007.

La méthode est détaillée dans l'annexe 11. Ce suivi permet d'obtenir le volume de la ponte, le taux de fécondation et le diamètre des œufs fécondés et de leurs globules.

4. L'induction environnementale des pontes : la dessalure contrôlée

a) Déroulement de la dessalure expérimentale

Avant la dessalure un bilan de l'état des gamètes des poissons est effectué. La méthodologie de cette manipulation est la même que précédemment mais une différence est faite entre les différents ovules observés (voir annexe 12). Les ovules frais (ovules prêts à être fécondés) sont différenciés des ovules sur-matures (non fécondables). Ceux-ci ne sont plus considérés comme un stade de maturité. Le stade ovule frais devient donc le stade le plus avancé.

La dessalure consiste à faire baisser la salinité de l'eau d'élevage jusqu'à 10 ‰ grâce à l'adjonction d'eau douce (issue d'un captage situé au dessus du centre et ne subissant aucune filtration, annexe 13) à l'eau de mer. Cette valeur de salinité est maintenue à ± 1 ‰ durant toute la période de la dessalure. Le débit de l'eau de mer est quand à lui abaissé pour garder un taux de renouvellement proche de celui des conditions normales d'élevage. Les débits sont de 24 L par minute d'eau douce et 8 L par minute d'eau de mer.

Le mélange des deux types d'eau se fait dans la colonne de dégazage.

Lors des dessalures avec température contrôlée (les 8 premières), l'eau douce est chauffée avec un réchauffeur d'eau composé de trois résistances (2 x 2000 et 1 x 800 watts) contenues dans un caisson où l'eau transite (annexe 13). Une différence de 0,4°C avec la température mesurée dans les autres bassins d'élevage (qui servent de témoin) est tolérée. Cette différence est acceptée car les variations nyctémérales de température de l'eau d'élevage peuvent atteindre 0,6°C dans des conditions normales.

Lorsqu'un des deux paramètres varie trop (température ou salinité), un réajustement des débits est effectué afin de revenir au seuil acceptable. Les modalités de mesure de ces paramètres (salinité, température et débit) sont détaillées dans l'annexe 14.

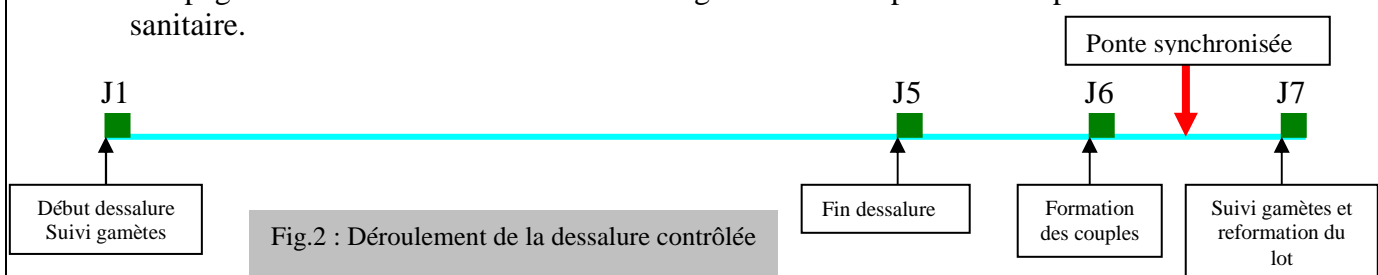
Au bout de cinq jours, la dessalure est arrêtée (J5). L'arrivée d'eau douce est stoppée et le débit d'eau de mer est augmenté pour revenir à un taux de renouvellement normal (25 % par h).

Le lendemain (J6) un certain nombre de poissons (en fonction des « bassins couple » disponible) ayant subi la dessalure est séparée du reste du lot et mis en couple dans les bassins prévus à cet effet. Pour ce faire les poissons sont pêchés un par un et identifiés grâce à la puce magnétique présente dans leurs tissus (au dessus de la tête sur le flanc latéral gauche). Pour limiter le plus possible un éventuel biais, les couples sont maintenus dans des conditions d'élevage identiques à celles des bassins collectifs.

Les résultats antérieurs montrent que c'est durant la nuit entre le premier et le deuxième jour post-dessalure (J6 et J7) que la plupart des pontes doivent être observées.

Un suivi des gamètes de tous les poissons est effectué à J7. Les critères d'observation et la méthodologie sont les mêmes que pour le contrôle de maturité pré-dessalure (annexe 12)

Les poissons en couple sont ensuite remis dans un nouveau bassin de maturation en compagnie des autres individus du lot d'origine comme le préconise le protocole de dessalure sanitaire.



b) Récolte et observation des pontes

Pour notre étude les critères observés sont le volume de ponte, le taux de multi-globules, le taux de fécondation, le taux d'œufs non viables (fécondés mais morts au moment de l'observation), le taux d'œufs viables (= œufs fécondés – œufs non viables), le taux d'éclosion, le taux de survie après éclosion et le diamètre des œufs et de leur globule.

La méthodologie d'analyse des pontes est sensiblement la même que celle détaillée dans l'annexe 11, mais plusieurs points ont été revus afin d'être plus précis.

❖ *Observation d'échantillons dans les cuves de Dolphus*

Six prélèvements (au lieu de quatre) de 2.5 ml sont effectués et déposés dans des cuves de Dolphus. Un test du Chi 2 est systématiquement effectué sur les différents effectifs de chaque échantillon. On les compare à leur valeur moyenne pour s'assurer que les six prélèvements sont représentatifs de la ponte dans sa totalité. Ce test n'est vraiment fiable qu'à partir de 10 individus par échantillon pour au moins 80% des échantillons (annexe 17). Il convient donc de prélever 5 fois au minimum 10 œufs. Si ce nombre n'est pas obtenu, la ponte est transvasée dans un volume d'eau plus petit. Les valeurs extrêmes sont remplacées par de nouveaux prélèvements tant que le test ne donne pas une réponse concluante ($p > 0.05$).

Deux nouvelles variables sont observées, le taux d'œufs présentant des multi-globules et le taux d'embryons mal-formés et/ou bloqués dans leur développement (ou œufs non viables ??) (Annexe 15).

❖ *Mesure des œufs et de leur globules*

Le diamètre de 30 œufs (à la place de 15) et de leur globule lipidique est mesuré grâce à l'utilisation d'un micromètre (grossissement X 24). Cette mesure est effectuée quelque soit la ponte (plus simplement les pontes fécondés).

❖ *Mise en incubation*

Elle devient systématique. Elle est effectuée dans de petits puits permettant des observations individuelles. 72 œufs prélevés dans la fraction flottante (bien fécondée) sont mis un à un dans 3 plaques de 24 puits contenant chacune 2 ml d'eau de mer récupérés en sortie de filtration. La durée d'incubation est fixée à 24 heures et se déroule dans l'obscurité. Durant cette période l'eau des puits n'est pas renouvelée. Les plaques sont maintenues dans un bain-marie renouvelé en continu ce qui permet aux différents puits d'avoir une évolution identique de la température.

L'observation des résultats se fait par lecture directe sous une binoculaire (grossissement X 6). Le nombre de larves écloses, vivantes et bien formées ou mortes et mal formées et le nombre d'œufs non éclos sont relevés pour calculer les taux d'éclosion et de survie totale.

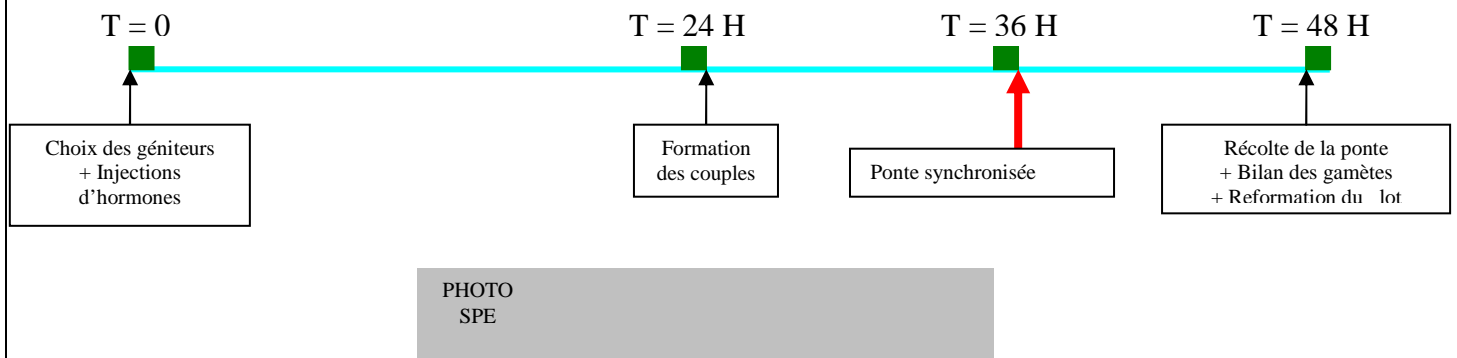
5. L'induction hormonale des pontes : l'injection de LHRL

Cette étude portera uniquement sur le lot 5, lot sauvage le plus récent. C'est un lot particulièrement intéressant parce qu'une seule femelle semble capable de pondre, mais de façon irrégulière, et que les deux autres possèdent parfois des ovocytes à un stade de maturité suffisant pour une induction hormonale sans risque pour le poisson (stade B).

Le test d'injection se déroule en cinq phases.

- Bilan des gamètes pré-injection : il consiste en un suivi des gamètes semblable à celui décrit dans la partie « l'induction environnementale des pontes : la dessalure contrôlée ». Seules les femelles présentant au moins quelques ovocytes au stade C sont sélectionnées pour l'injection. Les mâles sont contrôlés également et une analyse de la concentration en spermatozoïdes est réalisée en plus des mesures de fluence et de motilité. Cette analyse consiste à diluer suffisamment le sperme (le plus souvent suivant un facteur de 1/10 000) dans de l'eau distillée pour rendre sa concentration mesurable au moyen d'une cellule de Malassez (protocole détaillé en annexe 16).
- Injection de LHRHa : l'hormone retenue est la [C Trp⁶] LHRHa. Les injections de 15 µg de LHRHa par kg de poissons sont effectuées à la base postérieure de la nageoire dorsale. Pour ce faire, 1,5 ml/kg de poisson d'une solution de LHRHa à 10 µg/ml est administré au moyen d'une seringue de 5 ml. Le protocole de préparation de l'injection est détaillé en annexe 16.
- Formation des couples : 24 heures après l'injection, les couples sont formés.
- Récolte des pontes : les pontes sont déclenchées en général 36 heures après l'éclosion (8) mais il faut attendre une dizaine d'heures pour que l'ensemble des œufs soit collecté dans les paniers collecteurs. Le protocole est le même que pour les pontes post-dessalures.
- Bilan des gamètes post pontes : ce contrôle consiste à répéter les différents contrôles effectués lors du « bilan des gamètes pré-injection ».

Pour finir les poissons sont tous remis dans le même bassin.



III. Résultats

1. L'induction environnementale

a) Paramètres environnementaux durant les dessalures

Durant toute l'expérimentation, les valeurs d'oxygène et de pH ont très peu varié, restant stables autour de 80 % de la saturation et de 7,8.

L'évolution des deux paramètres les plus variables de l'expérience (la salinité et la température) est détaillée dans les annexes 18 et 19.

Deux écarts de salinité non prévus par le protocole ont eu lieu. Le premier, lors de la première dessalure du lot G1A, est dû à priori à une baisse du débit d'eau de mer qui a entraîné une chute importante de la salinité (jusqu'à 6 ‰). Le second, durant la troisième dessalure du lot 1B, est dû à une coupure du réseau d'eau douce du centre. La dessalure a été arrêtée avec un jour d'avance sur le programme.

Le respect du protocole a été beaucoup plus difficile avec la température mais deux cas posent réellement problème. Tout d'abord, un écart de 1,3°C s'est maintenu durant toute la première dessalure du lot G1A (fig. 4). Cette différence importante ne permet pas de classer cette dessalure comme une dessalure avec température contrôlée. Enfin, au début de la seconde dessalure du lot 6, un dérèglement de la consigne du réchauffeur a fait varier la température de façon importante (fig. 5). N'ayant duré que pendant deux jours, cette variation de température n'empêche pas cette dessalure d'être toujours considérée comme avec contrôle de la température.

Malgré une panne des puces enregistreuses lors des deux dernières dessalures avec température contrôlée, aucune variation importante n'a été détectée. Les variations de températures des quatre dernières dessalures ne sont pas présentées car sans importance avec la validité du protocole.

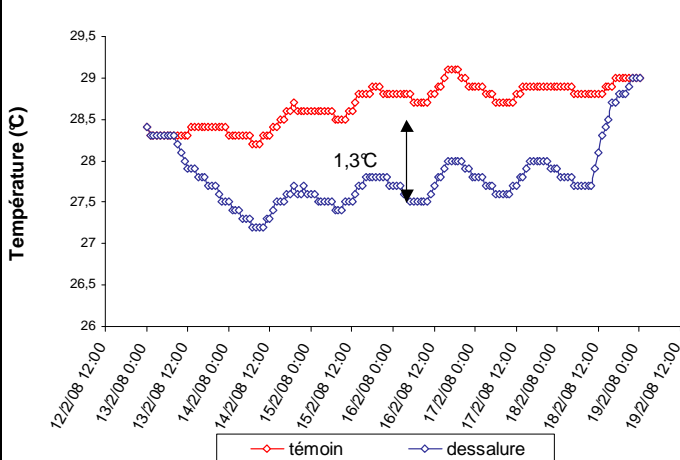


Fig. 4 : Evolution de température la dessalure du lot G1A du 13/02 au 18/02

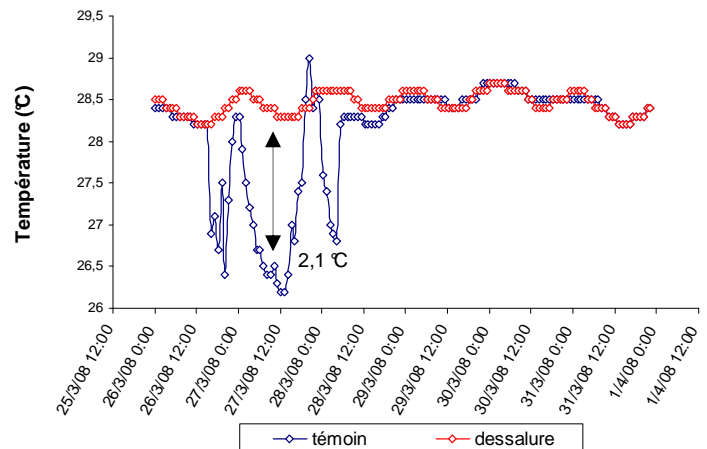


Fig. 5 : Evolution de température la dessalure du lot 6 du 26/03 au 31/03

b) Série de manipulations « dessalure avec contrôle de la température »

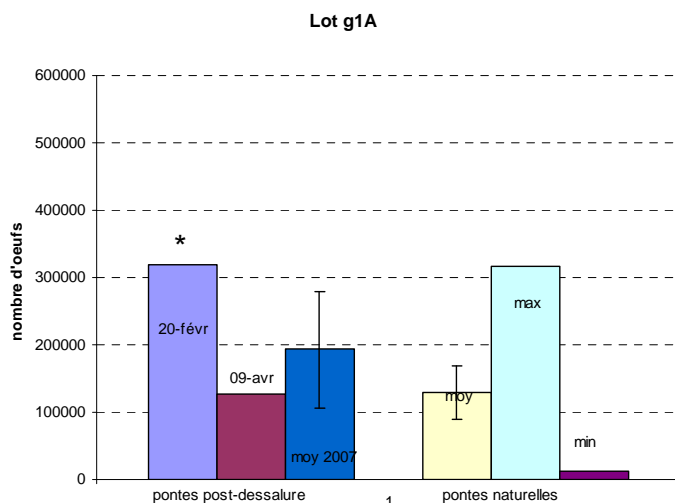
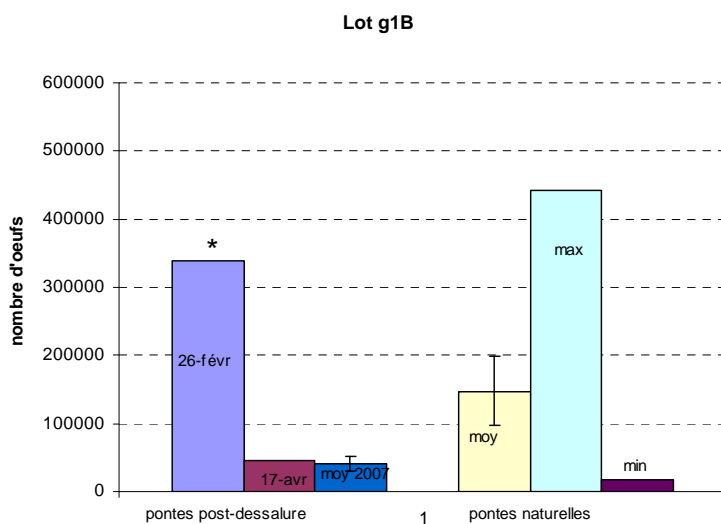
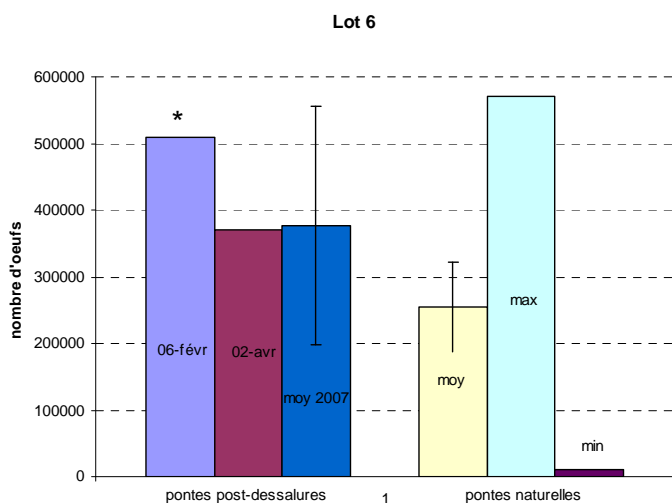
La totalité des dessalures effectuées avec contrôle de la température (6 au total) a déclenché des pontes durant la deuxième nuit post-dessalure. Pour les trois lots, la première série de pontes post dessalure est statistiquement plus volumineuse que les pontes naturelles sur la même période (test t de comparaison à une moyenne théorique) (Tab. I; fig. 6). Les résultats de la deuxième série d'expériences diffèrent en fonction des lots. La ponte du lot 6 est statistiquement plus volumineuse que les pontes naturelles de ce lot sur la même période, la ponte du lot G1A est de même volume et la ponte du lot G1B est plus petite (Tab. I; fig. 6).

Si l'on compare les volumes de pontes à ceux produits par le même lot en 2007, ils sont tous statistiquement non différents, sauf pour la première ponte post-dessalure avec température contrôlée du lot g1B qui est statistiquement plus grosse (Tab. I; fig. 6).

Tab. I : Résultats des tests de comparaison de moyenne des pontes post dessalure avec contrôle de la température

lot	Dates de la ponte	P value du test t entre le volume de la ponte indiquée et celui des pontes naturelles	P value du test t entre le volume de la ponte indiquée et celui des pontes post dessalure sans contrôle de la température
6	06/02	< 0,0001 ***	0,33
6	02/04	0,002 **	0,73
G1A	20/02	< 0,0001 ***	0,24
G1A	09/04	0,89	0,92
G1B	26/02	< 0,0001 ***	0,026 *
G1B	17/04	0,0001 ***	0,38

Fig. 6 : Bilan comparatif des volumes de pontes obtenues lors des dessalures avec contrôle de la température des lots 6, 1a et 1b



c) Les pontes émises en couple

Suite aux 21 couples qui ont été formés après une dessalure, 15 pontes sont récoltées. 7 de ces 15 pontes ne sont pas fécondées et 8 le sont. Mais, seules 2 des pontes fécondées présentent des embryons bien formés (Fig. 7). Les 6 autres possèdent toutes les mêmes caractéristiques :

- elles sont émises plus tard dans la nuit que les pontes normales. De ce fait, tous les œufs ne sont pas encore récoltés dans le panier récolteur ou décantés dans la purge centrale lors de l'arrivée des agents dans le bâtiment (aux alentours de 7h30). D'où leur dénomination de pontes tardives.
- ces pontes sont significativement moins volumineuses, moins bien fécondées et présentent moins d'œufs viables et ont un taux de multi-globule plus élevé (Tab. II, annexe 20).
- la plus grande partie des œufs fécondés est bloquée dans leur développement (comme décrit dans l'annexe 15). Aucun œuf issu de ces pontes n'a jamais éclos lors des tests d'incubations.

Les volumes de pontes post-dessalure émis par les poissons en couple varie de 4 813 œufs par kilo de femelle (femelle n°59565 du lot g1A) à 61 111 œufs par kilo de femelle (femelle n°41650 du lot 6). Les quantités obtenues sont très variables en fonction des femelles et des lots considérés (Fig. 8).

Tab. II , résultats des tests de comparaison de moyennes des différentes variables qualitatives de pontes tardives et des pontes naturelles

Variables	P value du test de Mann Whitney
Volume de ponte	<0.0001***
Taux de fécondation	<0.0001***
Diamètre moyen des oeufs	0.774
Diamètre moyen du globule lipidique	0.125
Taux de multi-globules	0.001***
Taux d'œufs non viables	<0.0001***
Taux d'œufs viables	<0.0001***

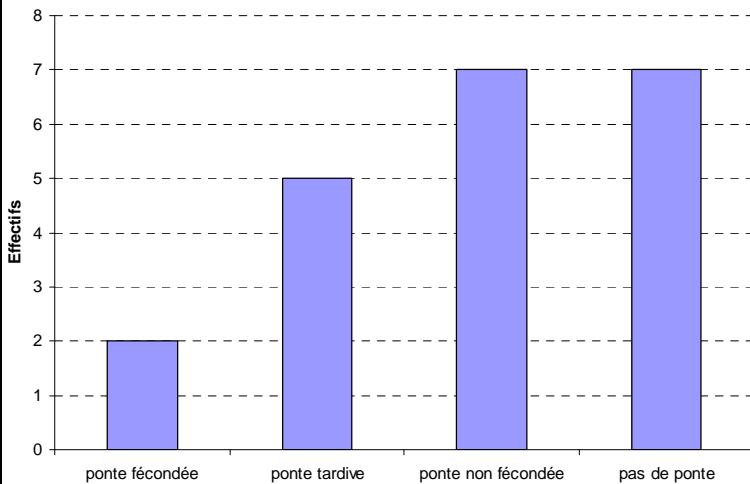
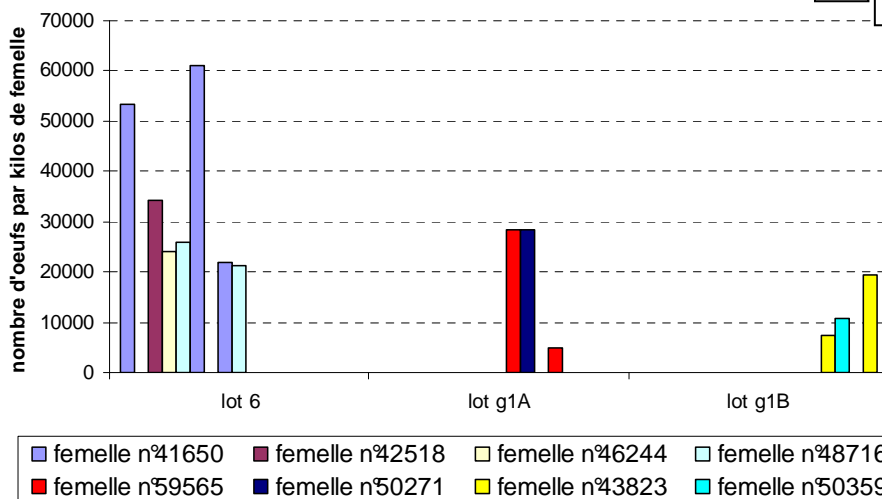


Fig. 7 : Bilan qualitatif des pontes par couple



χ

Test unilatéral
 ponte naturelle <
 ponte tardive

χ

Test unilatéral
 ponte naturelle >
 ponte tardive

Fig. 11 : Evolution de la fluence avan

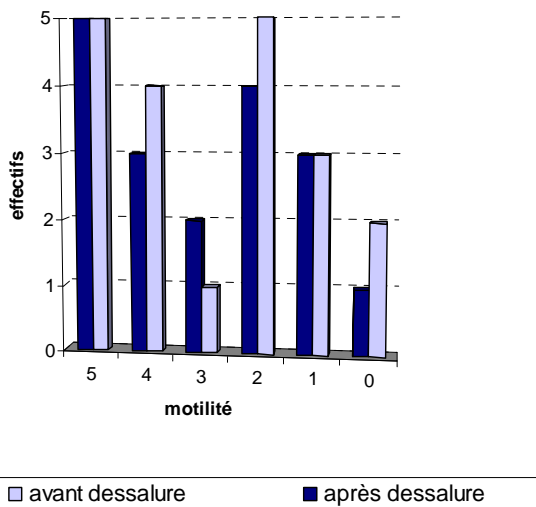
d) Les contrôles de maturité

Grâce à la formation des couples et aux contrôles de la maturité pré et post dessalure, des différences significatives de stade de maturité ont été observées.

Plus de la moitié des femelles (8/14) qui ont pondu après la dessalure avait seulement des ovocytes au stade B lors du contrôle pré-dessalure. Alors que plus de la moitié des femelles (5/7) qui n'ont pas pondu avaient des ovules frais lors de ce contrôle (Fig. 9). Si l'on teste la présence ou l'absence d'ovule en comparant le cas où la dessalure a déclenché une ponte et le cas où la stimulation a été sans effet, le test exact de Fisher conclut à une différence significative (Tab. III).

Le résultat le plus marqué de ces contrôles de maturité concerne celui du contrôle post ponte. Des ovules frais sont présents chez la totalité des femelles ayant pondu mais jamais chez les femelles n'ayant pas pondu (Fig. 9). Le test exact de Fisher conclut qu'il y a une différence significative entre la distribution des deux échantillons (Tab. III).

Les résultats obtenus chez les mâles ne présentent aucune particularité (Fig. 10 et 11). C'est donc sans surprise que le test exact de Fisher conclut qu'il n'y a aucune différence significative entre la distribution des deux échantillons (Tab. III).



PHOTO

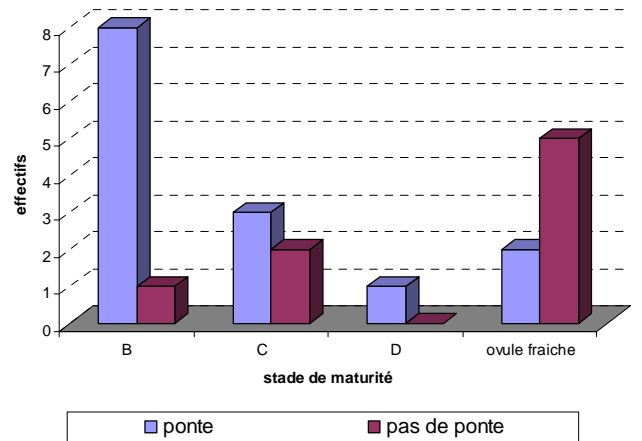
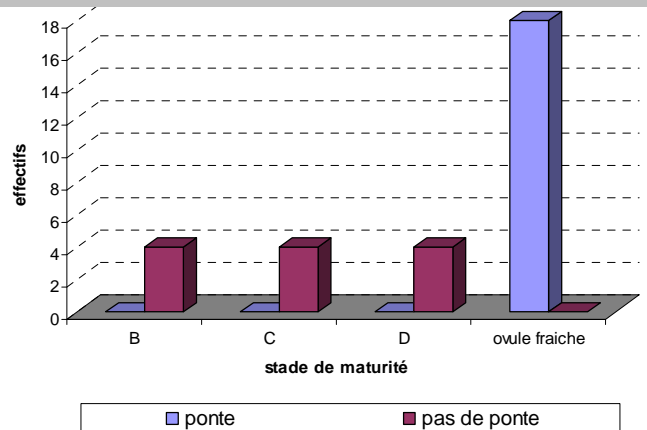


Fig. 9 : Bilan des stades de maturité rencontrés chez les femelles ayant pondu ou n'ayant pas pondu, avant la dessalure (en haut) et après la ponte post dessalure (en bas)



Tab. III : Résultats des tests exacts de Fisher

Distributions comparées (distr. 1/distr. 2)	P value du test exact de Fisher
Présence ou absence d'ovule lors du bilan de maturité pré-dessalure (ponte/pas de ponte)	0.0207*
Bilan de maturité post dessalure (ponte/pas de ponte)	1.15 ^{e-08} ***
Bilan de fluence (avant/après dessalure)	0.7321
Bilan de motilité (avant /après dessalure)	1

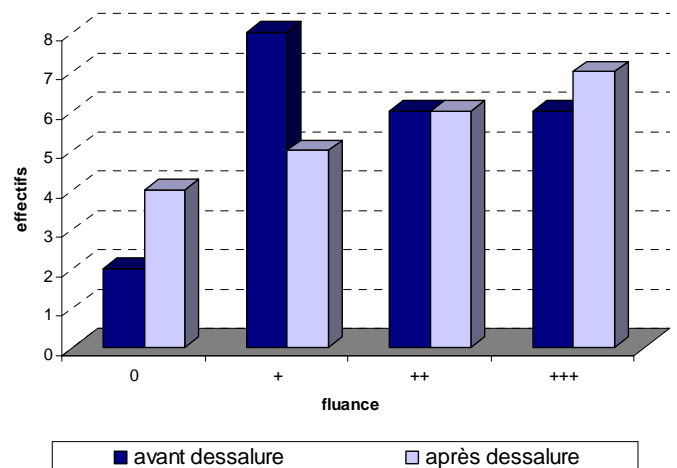


Fig. 11 : Evolution de la fluence avant et après la dessalure

e) Comparaison des pontes post dessalures et des pontes naturelles du 01/02/08 au 01/07/08

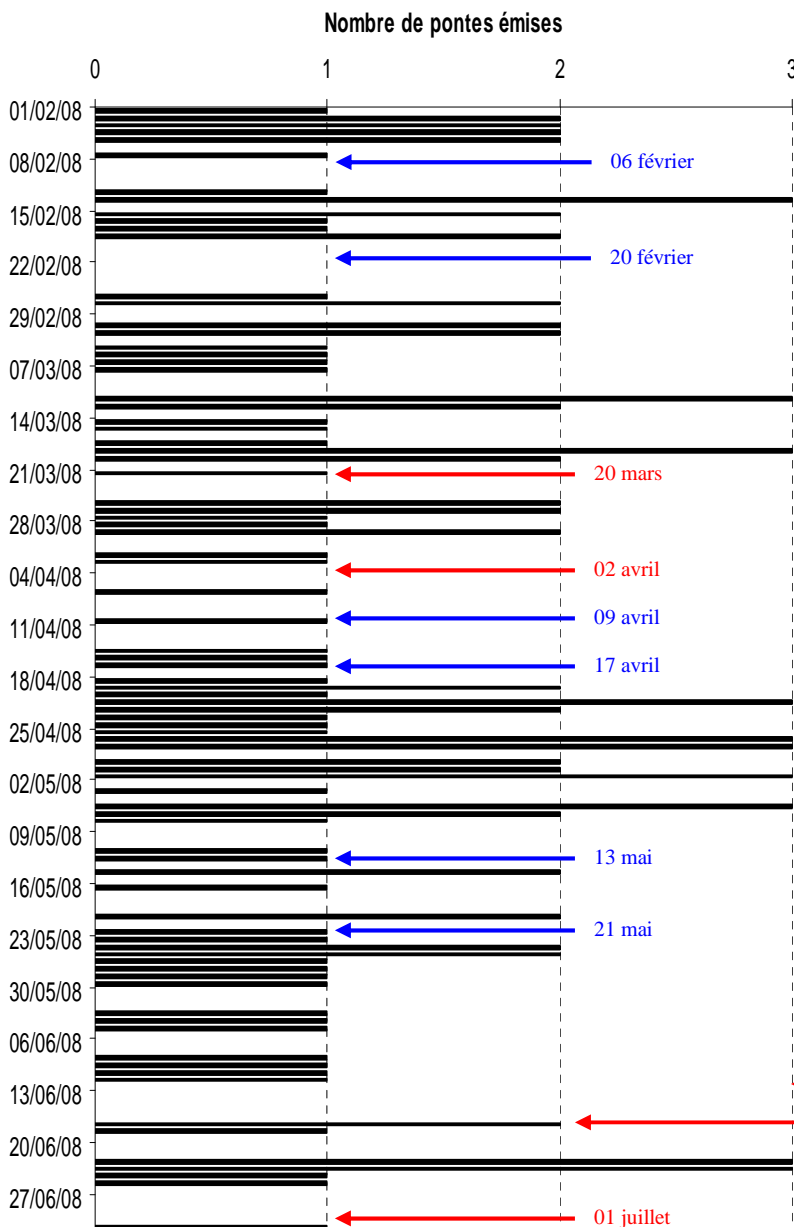
Dix dessalures ont été effectuées du 01/02/08 au 01/07/08 sur les lots 6 G1A et G1B mais le protocole n'a pas été identique pour chacune d'elles. Durant les trois premières dessalures et durant la troisième du lot G1A il n'y a pas eu de contrôle de maturité et de formation de couple.

Afin de pouvoir comparer les pontes de lots complets avec les pontes par couple, les données de celles-ci ont été rassemblées (en additionnant les volumes de pontes et en faisant la moyenne des autres indicateurs).

Plusieurs différences significatives ont été mises en évidence entre les pontes naturelles et les pontes post dessalures (annexe 21 ; tab. IV). Les œufs post dessalure

Tab. IV : Résultats des tests de comparaison de moyennes des différentes variables qualitatives des pontes post dessalure et des pontes

Variable analysée	P value (test de Mann-Whitney)	P value (test t de Student)
Volume de ponte	0.067	
Taux de fécondation	0.012 *	
Diamètre des œufs	0.004 **	0.001 ***
Diamètre des globules	0.967	
Taux de multi-globules	0.479	
Taux d'œufs non viables	0.029 *	
Taux d'œufs viables	0.027 *	



Test unilatéral ponte naturelle < ponte post dessalure

Test unilatéral ponte naturelle > ponte post dessalure

sont très significativement plus gros que ceux issus des pontes naturelles.

Les taux de fécondation et les taux d'œufs viables sont significativement plus bas lors des pontes post-dessalure. Le taux d'œufs non viable est par contre plus important lors des pontes naturelles.

Aucune différence significative n'a été mise en avant pour le volume des pontes, le diamètre du globule et le taux de multi-globules.

Les données des tests d'incubation n'apparaissent pas car une seule incubation a pu être réalisée.

Cinq pontes naturelles ont été répertoriées le même jour qu'une des post-dessalures (Fig., 12).

Date d'obtention d'une ponte poste dessalure sans ponte naturelle le même jour

Date d'obtention d'une ponte poste dessalure le même jour qu'une ponte naturelle

Fig. 12 : Occurrence des pontes naturelles du 01/02/08 au 01/07/08 et date des pontes post dessalures

2. L'induction hormonale

a) Les contrôles de maturité

❖ Pour les mâles

Le niveau de fluence, de motilité et la concentration du sperme ont été mesuré 5 fois : 4 fois avant et après une manipulation d'injection conjointe aux femelles et une fois avant l'injection du 9 Juin.

La fluence est restée à un haut niveau durant toute l'expérience (Fig. 13). Lors des contrôles post injection, une fluence +++ a été mesurée chez l'ensemble des mâles. La motilité a varié de manière beaucoup plus aléatoire malgré de très bons résultats lors du dernier contrôle post injection (Fig. 14).

Plusieurs résultats intéressants ressortent du suivi de la semence des mâles du lot 5. Tout d'abord le plus marquant est celui de l'évolution de la concentration en spermatozoïdes (Fig. 15). Les valeurs du 26 Mai ne sont pas utilisables car trois analyses de sperme n'ont pu être réalisées en raison d'une mauvaise méthode de conservation des échantillons mais un test de Friedman a pu être effectué sur les concentrations des 5 mâles du 28 Mai au 19 Juin. La P value de 0.029 est significative et les comparaisons multiples par paires montrent une différence

significative entre les concentrations mesurées le 10 Juin et celle mesurée le 19 Juin (Tab. V).

Tab. V : Comparaison multiple par paires des données de concentration en spermatozoïdes observées à quatre dates différentes (sortie XLstat)

	28/06/2008	10/06/2008	17/06/2008	19/06/2008
28/06/2008	Non	Non	Non	Non
10/06/2008	Non	Non	Non	Oui
17/06/2008	Non	Non	Non	Non
19/06/2008	Non	Oui	Non	Non

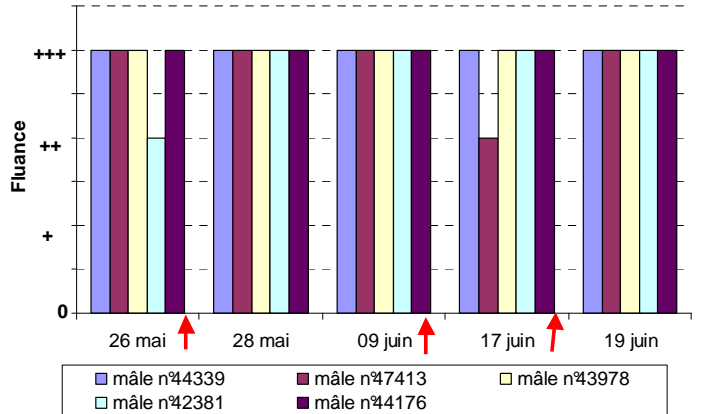


Fig. 13 : Bilan de la fluence des mâles du lot 5 du 26/05/08 au 19/07/08

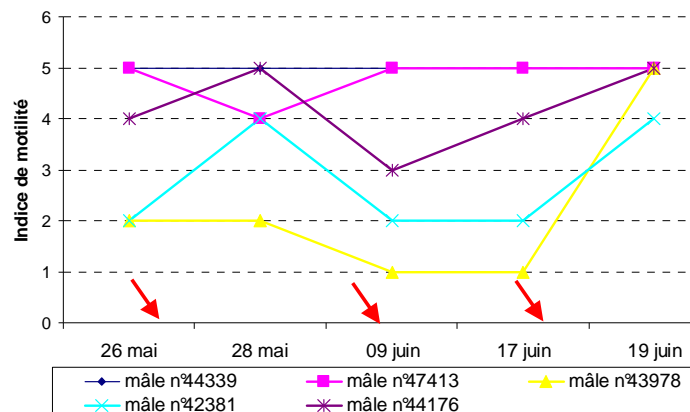


Fig. 14 : Bilan de la motilité des mâles du lot 5 du 26/05/08 au 19/07/08

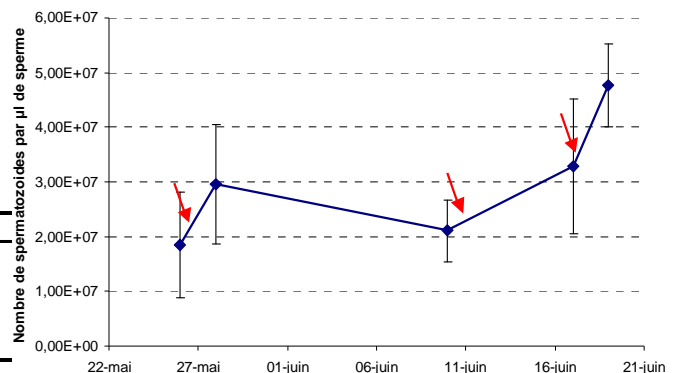


Fig. 15 : Bilan de la concentration en spermatozoïdes des mâles du lot 5 du 26/05/08 au 19/07/08

❖ *Pour les femelles*

Deux séries d'injections ont été réalisées. Malheureusement la femelle n° 42236 est morte des suites d'une crise cardiaque présumée durant un contrôle de maturité. Des ovules frais ont été retrouvés chez l'ensemble des femelles lors du contrôle post injection et ce, quelque soit le stade de maturité observé lors du contrôle pré injection (Fig. 16).

Un test exact de Fisher conclu à une différence significative entre les deux distributions (p-value de 0.008).

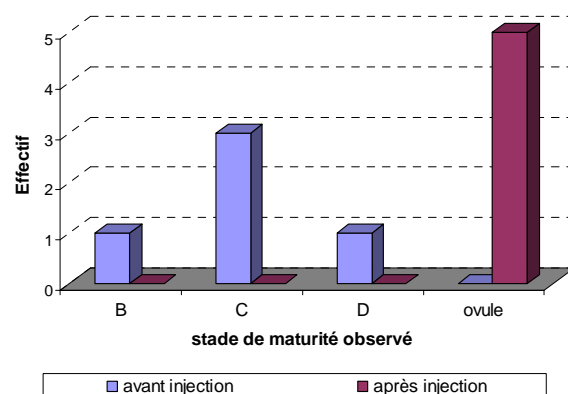


Fig. 16 : Stades de maturité des femelles observés avant et après l'injection

b) Suivi des pontes après injections

Les deux séries d'injections ont déclenché des pontes chez la totalité des femelles injectées mais elles sont survenues à des moments différents entre 42 et 62 heures après l'injection (fig. 19). Quatre de ces pontes présentent toutes les caractéristiques des pontes tardives décrites dans le chapitre « résultats des dessalures » et une des pontes était non fécondée (Fig. 18).

Les quantités d'œufs émises par kilos de femelle varient entre 24 175 et 2 320. Les volumes obtenus sont très variables en fonction des femelles et des injections considérées (Fig. 17).

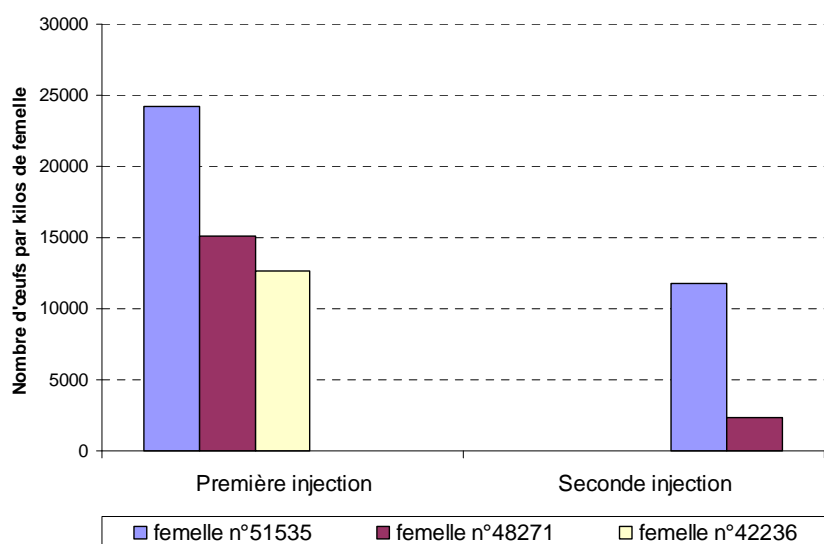


fig. 17 : Bilan quantitatif des pontes post injection

Comme deux des trois femelles du lot 5 n'ont jamais pondu, une comparaison avec les pontes naturelles de ce lot n'est pas possible. Une comparaison avec les pontes naturelles des autres lots de la même période (du 28/05 au 20/06) est effectuée (Tab. VI; annexe 22).

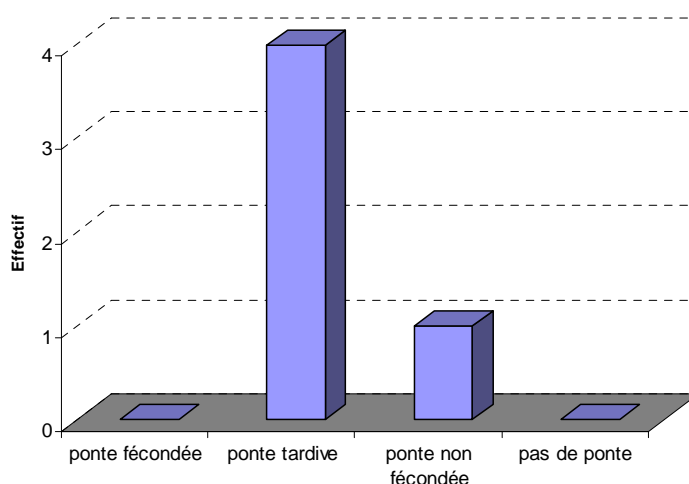


Fig. 18 : Bilan qualitatif des pontes post injection

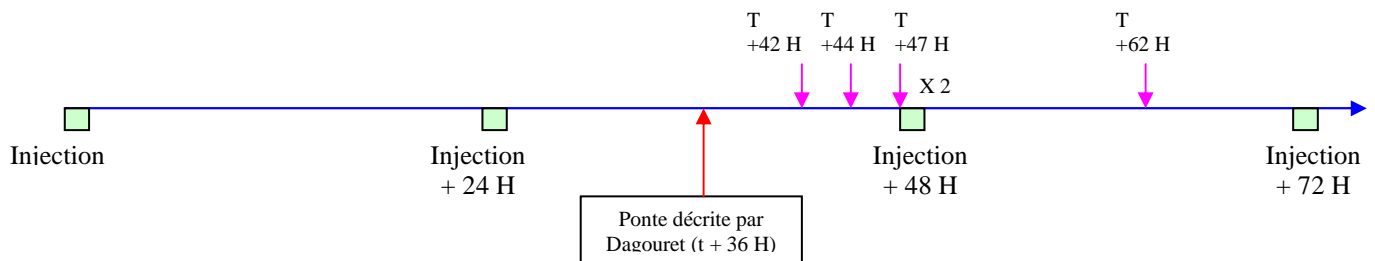


Fig. 19 : Chronologie des pontes post injections

Tab. VI : Résultats des tests de comparaison de moyenne des différentes variables qualitatives des pontes post injections et des pontes naturelles

Variable analysée	<i>P value (test de Mann-Whitney)</i>
Nombre d'œufs par kilo de femelle	0.343
Taux de fécondation	0.073
Diamètre des oeufs	0.717
Diamètre des globules	0.794
Taux de multi-globules	0.224
Taux d'œufs non viables	0.973
Taux d'œufs viables	0.022 *

Seul le taux d'œufs viables présente une différence significative entre les deux séries de pontes. La moyenne d'œufs viables est plus élevée lors des pontes naturelles. Ce qui n'est pas surprenant car aucune injection n'aboutit à la production d'œufs viables.

IV. Discussion

1. La dessalure

La baisse de salinité durant cinq jours suivi d'un retour à la normale a bel et bien eu un rôle déclencheur sur la ponte de *Platax orbicularis*. Les dix dessalures effectuées durant la durée de l'expérimentation ont déclenché des pontes du lot dessalé durant la deuxième nuit après leur terme. Le petit nombre de pontes naturelles obtenues aux mêmes dates confirme bien le rôle déclencheur de la dessalure.

La baisse de température n'est pas nécessaire pour obtenir des pontes lors de la seconde nuit post-dessalure. Les cinq manipulations où seul l'effet de la salinité a été testé ont toutes eu le même effet que les dessalures classiques. Les volumes d'œufs obtenus lors de ces manipulations ne sont pas statistiquement différents de ceux récoltés suite aux autres dessalures. La ponte du 20/03 du lot G1B est même statistiquement plus volumineuse que les autres pontes post dessalures de ce lot.

Le bilan de la formation des couples est mitigé. Très peu de pontes viables ont été obtenues lors de ces manipulations (9.5 % des couples formés) et dans 30 % des cas, aucune ponte n'a été émise. Les quantités d'œufs récoltées par kilo de femelle restent en deçà de celles avancées par l'équipe de Vairao. Les femelles du lot 6 sont capables de pondre 50 000 œufs par kilo et la moyenne obtenue en couple n'est que de 34 600 et pour les lots G1A et G1B, 20 500 et 12 600 d'œufs par kilo ont été récoltés en moyenne à la place des 30 000 observés précédemment. Le stress des changements de bassin et de la séparation du reste du lot peut expliquer ces mauvais résultats. Certaines femelles semblent moins sensibles à ce stress. Par exemple la femelle n° 41650 du lot 6 est la seule à avoir permis l'obtention d'œufs viables et ses volumes de pontes sont particulièrement importants (jusqu'à 61 000 œufs par kilo). Cela permet d'espérer une amélioration graduelle des capacités de ponte en couple des autres poissons.

La formation de couples nous a également permis d'avoir des informations sur les évolutions de la maturité des gonades des femelles durant les dessalures. Deux informations très importantes ont pu en être tirées. De nombreux ovules frais ont été retrouvés à proximité de l'oviducte lors de la canulation de la totalité des femelles ayant pondu. Le stade ovule frais est donc caractéristique de l'état de maturité observable après une ponte. De plus la comparaison des stades de maturité près dessalure des femelles ayant pondu après la dessalure et des femelles n'ayant pas pondu ont donné un résultat très important. La présence ou l'absence d'ovule frais lors de ce contrôle de maturité est statistiquement différente entre les deux cas. Ainsi, une dessalure a de grandes chances de ne pas déclencher de ponte si les femelles ont pondu peu de temps avant son commencement et qu'elles présentent ainsi des ovules lors du contrôle de maturité précédant la dessalure.

Par contre le suivi des mâles n'a montré aucune variation de la qualité de leur semence, tant au niveau de la fluence que de la motilité.

La comparaison des pontes post dessalures aux pontes naturelles a permis de détecter plusieurs différences significatives entre les deux types de pontes. Les œufs post dessalures sont significativement plus gros que ceux obtenus naturellement, conformément aux résultats obtenus lors de l'analyse des données de l'année 2007. Par contre une baisse du taux de fécondation et du taux d'œufs viables a été observée ainsi qu'aucune différence en terme de volume de ponte. Cela semble s'expliquer par le stress occasionné par la formation de couple et les contrôles de maturité. En effet le protocole n'a pas été suivi à la lettre pour la totalité des dessalures et trois ont été effectuées sans contrôle de maturité et formation de couple. Le taux de fécondation et le taux d'œufs viables ne sont alors plus significativement différents de ceux mesurés pour les pontes naturelles (p value du test de Mann-Whitney : 0.758 pour le taux de fécondation et 0.901 pour le taux d'œufs viables). Le volume de ponte post-dessalure devient lui significativement plus important (p-value < 0.0001). Les sept dessalures effectuées comme le prévoyait le protocole présentent par contre des différences très significatives avec les pontes naturelles (p value du test de Mann-Whitney : 0.003 pour le taux de fécondation et 0.008 pour le taux d'œufs viables).

Ce stress accru a peut être été aussi à l'origine de l'observation récurrente de pontes tardives. Elles sont survenues à la fois lors des pontes post dessalures et des pontes naturelles et leur occurrence a nettement augmenté à partir du début des expérimentations (Fig. 20). Les œufs obtenus lors de ces pontes présentent plusieurs indices d'une fécondation tel que la formation d'un cône d'attraction et de l'espace périvitellin (29) et l'ébauche des premiers stades du développement embryonnaire tel qu'il ont été décrit chez le *Platax* (30). Mais le développement se bloque et/ou devient anarchique aboutissant à la formation d'amas cellulaire puis à la mort de l'œuf. Deux hypothèses pourraient expliquer les caractéristiques de ces pontes.

Soit les œufs émis de manière tardive sont déjà de mauvaise qualité, soit, lors de leur émission tardive, les œufs ne trouvent pas un environnement propice à leur développement contrairement aux œufs produits normalement. Le seul paramètre environnemental qui diffère lors de l'émission des pontes tardives est l'intensité lumineuse au début de l'embryogenèse. La lumière, lorsqu'elle n'est pas accompagnée d'UV (31), n'est pas connue pour avoir un effet délétère sur le développement de l'embryon (32). Elle est même bénéfique chez certaines espèces (cas d'*Epinephelus striatus*, 33). L'éclairage artificiel étant effectué avec des néons blancs, aucun UV n'est produit.

Par contre il est prouvé qu'un séjour prolongé des œufs dans la cavité ovarienne après l'ovulation peut en diminuer la qualité très rapidement en fonction des espèces jusqu'à empêcher toute fécondation (une semaine pour la truite arc en ciel, 5 à 6 heure pour la morue et moins d'une heure pour le tilapia, 34). De plus, le stress occasionné par les manipulations peut entraîner des retards de pontes (35) et ainsi entraîner la sur-maturation des ovules déjà hydratées. La différence significative du taux de multi-globules observé chez les pontes tardives va dans le sens de cette hypothèse car le fractionnement du globule est un indicateur de mauvaise qualité des œufs (19 ; 20). Il semble bien que les mauvais résultats obtenus en

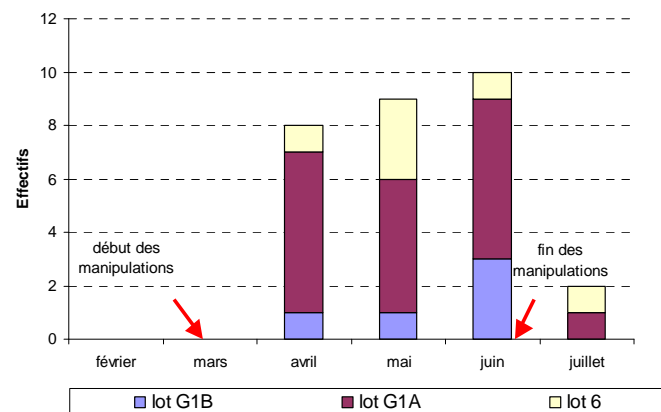


Fig. 20 : Occurrence des pontes tardives du 01/02/08 au 01/07/08

termes de taux de fécondation, de taux d'œufs viables et de taux de multi-globules sont imputables aux différentes manipulations imposées.

Un autre indice du stress que nous avons infligé aux poissons pourrait être la féminisation de deux poissons mâles (mâles n°41326 du lot g1A et n°47329 du lot 6) chez qui des ovules sur-matures ont été observés lors du stripping. Le stress est en effet connu pour avoir un effet sur le changement de sexe des poissons hermaphrodites (36 ; 37).

La cause de ce stress accru est sûrement à rechercher dans la formation des couples encore plus que dans les manipulations. Tout d'abord parce que les poissons des lots G1A, G1B et surtout du lot 6 ont relativement l'habitude d'être manipulés depuis plusieurs années. Mais aussi parce que l'anesthésiant utilisé, l'extrait de clous de girofle ou eugénol, est reconnu comme l'un des meilleurs pour limiter le niveau de stress des poissons lorsqu'il est bien utilisé (38 ; 39 ; 40). La formation de couple a par contre le désavantage de désorganiser les relations établies au sein du groupe et de limiter l'espace disponible au moment de la reproduction (Fig. 21). Les observations effectuées depuis plusieurs années ont en effet montré des comportements de parades avant les phases de reproduction et des affrontements, parfois violents (Fig. 22), entre les différents mâles présents. Les bassins couples, trop petits, pourraient limiter les mouvements des poissons et empêcher le mâle de correctement stimuler la femelle. De plus, il est possible que certains mâles, constamment dominés, ne soient pas réellement capables de se reproduire (bien que cela aille à l'inverse de la théorie dites des « mâles voyeurs » décrite chez d'autres espèces de poissons récifaux (41 ; 42)).

Ainsi la dessalure déclenche la ponte chez *Platax orbicularis* de façon préférentielle chez les femelles n'ayant pas pondu peu de temps avant son commencement. Les œufs obtenus sont significativement plus gros que ceux issus des pontes naturelles. Ces résultats sont particulièrement étonnants.

Tout d'abord parce que les autres méthodes d'induction environnementale de la ponte chez les poissons consistent souvent en la variation contrôlée de plusieurs paramètres (température, salinité, photopériode) sur une longue période simulant ainsi les grandes variations saisonnières, comme par exemple pour le *Lates calcarifer* (43) ou avec la méthode dite de DUBISH qui simule une crue dans un étang contenant des géniteurs de carpes, de poissons chats ou encore de brochet (3).

Par contre, aucun téléostéen ne semble réagir ainsi suite à une modification aussi courte d'un seul paramètre environnemental et en particulier de la salinité. Seules certaines



Fig. 21 : Bassin couple

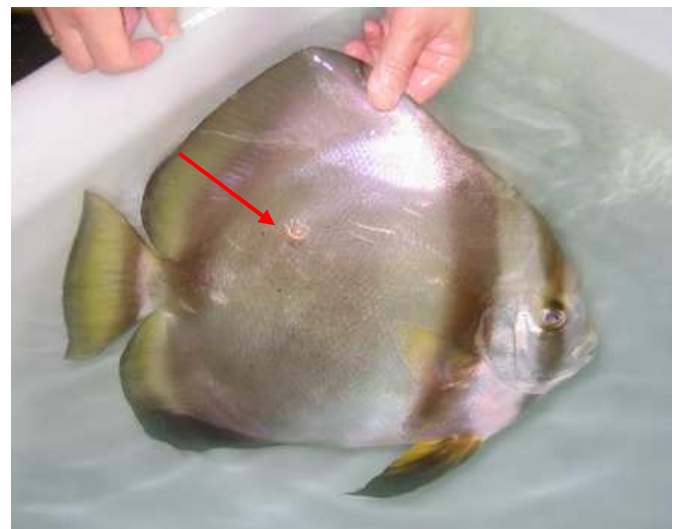


Fig. 22 : Mâle avec une morsure sur le flanc

espèces d'invertébrés déclenchent leur ponte après des modifications rapides de la salinité comme par exemple différents mollusques de l'océan indien (44).

Ensuite parce que les méthodes d'induction des pontes connues (en particulier hormonales) induisent une baisse de la qualité des gamètes plus ou moins marquée à cause du dérèglement de la cinétique de maturation finale qu'elles entraînent (45). Les œufs de *Chanos chanos* sont ainsi plus petits et moins riches en acides gras et en acides aminés essentiels lors des pontes induites (46) et MYLONAS et al (1992) observe une baisse du taux de fécondation, du taux de survie jusqu'au stade pigmentation et du taux d'éclosion chez *Salmo trutta* après une induction hormonale (45). Lors d'une dessalure pratiquée dans des conditions normales, aucune baisse de qualité n'a été détectée et il semble même que les œufs obtenus sont significativement plus gros que les œufs issus des pontes naturelles. Cela s'accompagne-t-il d'une amélioration notable de la qualité (augmentation des réserves vitellines en particulier)? Il faudrait pour cela refaire une étude comparative des différentes pontes avec de nouveaux critères de qualité tels que le poids sec des œufs, leur composition chimique et la survie larvaire à plus ou moins long terme (47).

La justification évolutive de l'apparition ou de la conservation de cette sensibilité à la baisse de salinité est bien expliquée par STEPHEN et SHETTY en 1981 durant leurs travaux sur différentes espèces de mollusques indiens (44). Celle-ci permet de synchroniser la ponte de toute une population dans un milieu où il n'y a pas de grande variation saisonnière tout en assurant un milieu optimal pour la fécondation et la survie des œufs et des larves.

Les individus matures de *Platax orbicularis* se tiennent le plus souvent à proximité des canaux, des récifs profonds et vers le large à une profondeur d'au moins 30 m (1). Mais de nombreux gros individus se retrouvent aussi dans les lagunes côtières (48) fortement susceptibles de subir de grandes variations de salinité lors des pluies torrentielles typiques de la saison chaude des îles de la société (49). D'après les observations réalisées sur des poissons élevés en captivité, les stimuli déclencheurs de pontes chez le Platax ne semblent pas liés aux variations de température et de phase lunaire. Cette sensibilité aux variations de salinité pourrait permettre une synchronisation des pontes augmentant ainsi les chances de survie de leur progéniture (44). De plus le sperme du Platax n'est pas activé dans l'eau douce, c'est à dire qu'en période de basse salinité toute fécondation est impossible. Le déclenchement de la ponte au moment du retour à une salinité normale permet de s'assurer un taux de fécondation optimal. Enfin les juvéniles du Paraha peu se retrouvent régulièrement dans les zone abritées des lagunes et des mangroves. L'augmentation de salinité de ces milieux étant liée à l'entrée massive d'eau de mer, l'émission des œufs à ce moment là pourrait éviter leur propagation vers le large où les attendent de nombreux prédateurs.

Pour finir, il est important d'aborder l'aspect de la régulation hormonale hypothétique de ce mécanisme. Comme un lien aussi étroit entre osmorégulation et reproduction n'a jamais été rencontré chez les téléostéens, il est difficile d'avancer des hypothèses sans travaux supplémentaires. Une hormone pourrait être candidate pour expliquer en partie ce résultat, le cortisol. Son rôle dans l'osmorégulation et plus particulièrement dans la stimulation de la sécrétion du Na Cl est bien connue (50 ; 51). Il semble aussi que le cortisol joue un rôle dans l'ovulation, plusieurs équipes ayant réussi à induire l'hydratation des ovocytes par injections de cortisol (52 ; 53 ; 54). Chez la truite arc en ciel des pics de cortisol plasmatique ont été détectés durant toute la phase finale de maturation des ovocytes (55). Un pic de cortisol lié à la reprise des mécanismes d'excrétions du Na Cl pourrait ainsi stimuler la maturation des ovocytes chez le Platax orbicularis et expliquer les pontes obtenues.

2. L'injection

Le résultat des injections à la LHRHa est encourageant. Tout d'abord, l'administration de LHRHa a permis de faire pondre la totalité des femelles injectées dont deux femelles chez qui la présence d'ovules n'avait jamais été observée (les n°51535 et 48571). Mais un point pose encore problème.

Aucun œuf viable n'a été produit et de nombreuses pontes dites « tardives » ont été récoltées. Comme pour les dessalures, le stress retardant le moment de la ponte pourrait être la cause de l'obtention de ce type d'œufs. L'hypothèse de sur-maturation intra-ovarienne est d'ailleurs confortée par les résultats obtenus lors des injections hormonales. Les pontes sont en effet émises avec un retard de plusieurs heures comparé aux résultats obtenus par DAGOURET en 2005 (9). Il avait obtenu des pontes de bonnes qualités mais sans former de couples ce qui pourrait renforcer l'hypothèse avancée dans le chapitre suivant. Le fait de travailler avec deux femelles n'ayant encore jamais pondu en captivité a sûrement eu aussi un impact sur la qualité des pontes obtenues.

Un autre indice du stress important apporté par les manipulations lié au protocole de l'injection est la mort de la femelle n°42236.

Les manipulations d'injections sont stressantes pour le poisson et il est difficile de limiter encore le stress occasionné par celles-ci.

Un résultat très intéressant a été obtenu en injectant les poissons mâles. Il semble en effet qu'en plus de maintenir la quantité de sperme disponible à des niveaux importants (le lot 5 est le seul lot où tous les poissons mâles se sont maintenus à des niveaux de fluence aussi important pendant près de trois semaines), l'injection répétée de LHRH ait permis d'augmenter de manière significative la concentration en spermatozoïde de leur liquide séminal.

Cette action stimulante de l'injection répétée de LHRH avait déjà été mise en avant par plusieurs travaux tels que ceux de WEIL et CRIM, 1983 sur le saumon atlantique (*Salmo salmar*) (56) ou plus récemment par LINHART et al., 2000 sur le poisson spatule américain (*Polyodon spathula*) (57).

Conclusion

Les deux méthodes de stimulation de la ponte testées durant ce stage ont permis toutes les deux d'obtenir des œufs. Les différentes manipulations effectuées ont permis d'en savoir beaucoup plus sur les caractéristiques de ces méthodes.

Pour l'induction environnementale, le stimulus déclenchant la ponte semble bien être une baisse de la salinité pendant cinq jours suivi d'un retour à la normale. La température n'a semble-t-il aucun effet, mais plusieurs manipulations de baisse contrôlée de la température du milieu d'élevage reproduisant les conditions d'une dessalure serait nécessaire afin de s'en assurer vraiment. Le stade de maturité des femelles précédant la dessalure et en particulier la présence d'ovules frais semble avoir une influence sur l'obtention de ponte induite. C'est une indication particulièrement intéressante pour l'utilisation de la dessalure dans une optique de production car elle permet de sélectionner les femelles présentant le plus de chance de pondre. Enfin, les œufs obtenus lors des pontes induites par cette méthode sont significativement plus gros que ceux obtenus lors des pontes naturelles. Est-ce un signe d'amélioration de leur qualité ? Pour répondre à cette interrogation, un nouveau suivi qualitatif basé sur de nouveaux indicateurs pourrait être mis en place, en particulier l'analyse du poids sec des œufs qui est bien représentatif de la quantité de matière organique dans l'œuf (58). Un comparatif de la survie larvaire à jeûn et de la taille des larves pourrait aussi être intéressant.

Les résultats de l'induction hormonale nous ont permis de confirmer ceux obtenus par DAGOURET en 2005(8). L'ovulation semblerait bien avoir lieu aux alentours de 36 heures après l'injection, pour une température moyenne de 26°C. Ce temps de réaction est comparable à celui déterminé chez l'ombrine (35 heures en moyenne) par GARDES et al. (14). C'est un résultat important car les œufs du *platax orbicularis* semblent très sensible à la surmaturation intraovarienne. Féconder artificiellement des œufs récupérés par stripping à différentes horaires après l'injection permettrait de confirmer ces deux hypothèses (temps de réaction et surmaturation rapide).

Mais cette série de manipulations a permis aussi d'apprendre plusieurs informations importantes pour la filière du Paraha peu en Polynésie. La présence inévitable d'ovule frais lors de la biopsie d'une femelle venant de pondre permet de retrouver de façon quasiment certaine les femelles ayant participé à une ponte commune. Cela peut être très utile pour assurer une meilleure gestion du cheptel et en particulier pour retrouver les femelles à l'origine d'un cycle d'élevage. L'obtention de pontes viables en couple s'est par contre révélée particulièrement difficile, sûrement à cause du stress qu'elle implique et d'un manque de stimulation de la part des mâles. L'utilisation de bassins couples plus grands, la formation plus précoce des couples et la détermination des capacités de stimulation de chaque mâle permettraient peut-être d'améliorer ces résultats. La formation de lignées monoparentales étant l'une des priorités du programme *Platax orbicularis* (cela faciliterait énormément d'éventuelles recherche au niveau génétique), la fécondation artificielle est aussi envisagée comme méthode de remplacement. Le dernier résultat obtenu faciliterait cette option. Les niveaux de fluence mesurés chez le *Platax* sont en effet très variables et il n'est pas rare que les mâles soit très peu productifs (quelques μ l), voire complètement vides. Si les injections répétées de LHRH ont bien un effet important sur la fluence et la concentration en spermatozoïdes, cela permettrait de se débarrasser de ce problème. Une étude portant sur un plus grand nombre de mâles, avec des individus témoins et avec une estimation plus précise des quantités de laitance émises lors du stripping est nécessaire pour valider ces résultats.

D'autres travaux pourraient aussi être envisagés afin de valider l'hypothèse du pic de cortisol survenant lors du retour à une salinité normale et son rôle déclencheur de l'ovulation. Si le rôle du cortisol comme déclencheur de la ponte est avéré chez *Platax orbicularis*, cela permettrait de nouvelles avancées au niveau de la recherche appliquée et fondamentale.

Pour conclure, il est intéressant de comparer les deux méthodes d'induction de la ponte. La dessalure semble présenter de nombreux avantages face à l'injection. Sa facilité de mise en œuvre, le niveau limité de stress qu'elle provoque, la possible meilleure qualité des pontes induites, l'administration d'un traitement anti-parasitaire simultané et son caractère éthique et éco-responsable sont autant d'arguments en sa faveur. Mais l'injection semble un moyen plus robuste de stimulation (au départ) car les deux femelles n°51535 et 48571 du lot 5 n'ont répondu qu'à la stimulation hormonale et jamais aux dessalures sanitaires. Ainsi une bonne connaissance des deux méthodes de stimulation est importante pour une gestion durable des reproducteurs et de toute la filière du *Platax orbicularis*.

Références bibliographiques

1. Lieske, E., Meyers, R. et Boucho, -Navarro, Y., Guide des poisons des récifs coralliens, Delachaux et Niestlé, Paris, p 56, **1995**.
2. IFREMER,
http://wwz.ifremer.fr/aquaculture/filieres/filiere_poissons/la_decouverte_des_poissons/platax,
18 décembre 2007.
3. Woynarovich, E. et Horváth, L., La reproduction artificielle des poissons en eau chaude: manuel de vulgarisation, FAO Doc. Tech. Pêches, **1981**.
4. Brooks, S., Tyler, C.R. et Sumpter, J., Egg quality in fish: what makes a good egg?, Reviews in Fish Biology and Fisheries, 7, p 387-416, **1997**
5. Joufoques, V. et all., communication interne au service de la pêche, Etat de l'art de l'élevage du Paraha peue (*Platax orbicularis*) après trois années de recherche en Polynésie française (2004 à 2006), Annexe 2, Etat de l'art de la phase maturation et ponte, p 17-22, **2008**.
6. Blaxter, J.H.S., Hempel, G., The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus*), J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer, 28, p 211-240, **1963**.
7. Moodie, G.E.E., Loadman, N.L., Wiegand, M.D. and Mathias, J.A, Influence of egg characteristics on survival, growth and feeding in larval walleye (*Stizotiedion vitreum*), Can. J. Fish. Aquat. Sci., 46, p 516-521, **1989**.
8. Bromage, N.R., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J. et Barker, G., Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 100, p 141-166, **1992**.
9. Dagouret, J.M., Fauvel, C. et Nédélec, G, Rapport final de la convention N° 5.0015 relative à la collaboration du Service de la pêche de Polynésie française et de l'Ifremer dans le cadre de l'opération : « Maîtrise technique de la production de poissons lagunaires », « Mise en place d'une échelle de maturité ovocytaire chez le moi, *Polydactylus sexfilis* et le Paraha peue, *Platax orbicularis*, non publié, **2005**.
10. Billard, R., Bieniarz, K., Popek, W., Epler, P., Breton, B. et Alagaraswami, K., Stimulation of gonadotropin secretion and spermatation in carp by pimozide-LH-RH treatment : effects of dose and time of day. Aquaculture, 62, p 161-171, **1987**.
11. Crim, L.W., Glebe, B.D. et Scott, A.P., The influence of LHRH analog on oocyte development and spawning of atlantic salmon (*salmo salar*), Aquaculture, 56, p139-149, **1986**.
12. Nacario, J.F. 1983. Releasing hormones as an effective agent in the induction of spawning of the sea perch (*Lates calcarifer*) in captivity, Terramar Bay Farms INC, Manila, 10 p, **1983**.

13. Zohar, Y., Billard, R. et Weil, C., La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*) : connaissance du cycle sexuel et contrôle de la gamétogenèse et de la ponte, L'aquaculture du bar et des sparidés, INRA Publications, Paris, p 3-24, **1984**.
14. Gardes L., Villanove P., Buchet V. et Fauvel C., L'induction hormonale de la ponte a l'aide de la LHRH chez l'ombrine, *Sciaenops ocellatus*, mise en évidence des conditions optimales pour la production d'œuf et de larve de qualité, rapport interne Ifremer, **1999**.
15. Arimura, A., Vilchez-Martinez, J.A., Coy, D.H., Coy, E.J., Hirotsu Y. et Schally A.V., D-Ala⁶, Des-Gly¹⁰-NH₂-LH-RH ethylamide : a new analogue with unusually high LH-RH/FSH-RH activity, *Endocrinology*, 95, p 1174-1177, **1974**.
16. Monahan, M.W., Amoss, M.S., Anderson, H.A. et Vale, W., Synthetic analogs of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor with increased agonist properties, *Biochemistry*, 122, p 4616-4620, **1973**.
17. Thomas, P., Arnold, C.R. et Holt G.J., Broodstock management and egg and larval quality, *Red drum and other sciaenids*, Blackwell Science Ltd, Oxford, p 118-137, **1995**.
18. Haraldsson, H., Sveinsson, T. et Skulason, S., Effects of LH-Rha treatments upon the timing of ovulation and upon egg and offspring quality in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, *Aquaculture and fisheries management*, 24, p 145-150. **1993**.
19. Carrillo, M., Zanuy, S., Prat F., Cerda, J., Ramos, J., Manamos, E. et Bromage, N., Broodstock management and egg and larval quality, Sea bass (*Dicentrarchus labrax*), Blackwell Science Ltd, Oxford, p 138-168, **1995**.
20. Fauvel, C. et Suquet, M., Avancées récentes en reproduction et élevage larvaire des espèces aquacoles (atelier professionnel ENITA-IFREMER), La qualité des gamètes chez le bar et son déterminisme en aquaculture, compte rendu du colloque Bordeaux Aquaculture 1998, Bordeaux, 5 p, **1998**.
21. Dyubin V.P. et Baynova N.N., Physiological condition of juvenile chum salmon, *Onchorhynchus keta*, reared from hormonally stimulated females, *Journal of ichthyology*, 33, p 127-133, **1993**.
22. IFREMER, <http://www.ifremer.fr/francais/institut/missions.htm>, **04/07/2008**.
23. IFREMER, <http://www.ifremer.fr/francais/institut/presentation.htm>, **04/07/2008**.
24. Gasset, E., employé Ifremer, communication personnel, **20/08/2008**.
25. IFREMER, <http://www.ifremer.fr/cop/presentation.htm>, **04/10/2007**.
26. IFREMER, <http://www.ifremer.fr/cop/organisation.htm>, **04/10/2007**.
27. Maamaataiahutapu M., Responsable SPE du projet Paraha peue, communication personnelle, **2007**.

28. Service de la Pêche,
http://www.peche.pf/IMG/pdf/Situation_de_l_aquaculture_en_PF_2007.pdf, février 2008
29. Mellinger, J., Sexualité et reproduction des poissons, la fécondation et l'activation de l'œuf, CNRS EDITIONS, Paris, p 245, **2002**.
30. Ramanantseheno, R., Description du développement embryonnaire et larvaire du *Platax orbicularis*, rapport de stage effectué pour le compte du SPE, **2005**.
31. Wiegand, M.D., Young, D.L.W., Gajda, B.M., Thuen, D.J.M., Rittberg, D.A.H., Huebner, J.D. et Loadman, N.L., Ultraviolet light-induced impairment of goldfish embryo development and evidence for photorepair mechanisms, *Journal of Fish Biology*, 64, p 1242–1256, **2004**.
32. Downing, G. et Litvak M.K., Effects of light intensity, spectral composition and photoperiod on development and hatching of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) embryos, *Aquaculture*, 213, p 265-278, **2002**.
33. Ellis, E.P., Watanabe, W.O., Ellis, S.C., Ginoza, J. et Moriwake A., Effects of Turbulence, Salinity and Light Intensity on Hatching Rate and Survival of Larval Nassau Grouper, *Epinephelus striatus*, *Journal of Applied Aquaculture*, Vol. 7(3), p 33-43, **1997**.
34. Bromage, N.R., Bruce, M., Basavaraja, N. et Rana, K., Egg quality determinants in fish: the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, *Journal of the World Aquaculture Society*, 25, p 13-21, **1994**.
35. Moberg, G.P., Mench, J.A. (Eds.), *The Biology of Animal Stress: Assessment and Implications for Welfare, Accumulation and long-term effects of stress*, Schreck, C.B., CAB International, Wallingford, **2000**.
36. Robertson, D.R., Social control of sex reversal in a coral-reef fish, *Science*, 177, p 1007–1009, **1972**.
37. Ross, R.M., Sex-change linked growth acceleration in a coral-reef fish, *Thalassoma duperrey*, *J. Exp. Zool*, 244, p 455–461, **1987**.
38. Wagner, E., Arndt, R. et Hilton, B., Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide, *Aquaculture*, 211, p 353–366, **2002**.
39. Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S. et Eliassen, R.A., The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity, *Aquaculture*, 221, p 549–566, **2003**.
40. Davis K.B. et Griffin B.R., Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anaesthetics, *Aquaculture*, 233, p 531–548, **2004**.
41. Taborsky, M., Sneakers, satellites, and helper: parasite and cooperative behaviour in fish reproduction, *Advances in studies of behaviour*, 23, p 1-100, **1994**.

42. Taborsky, M., The evolution of “bourgeois”, parasitic and cooperative reproductive behavior in fishes, *Journal of heredity*, 92, p 100-110, **2001**.
43. Kungvankij, P. et Suthemechaikul, N., Mass production of seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) by environmental manipulation, Network of aquaculture centres in Asia, Bangkok, Thailand, Archive de la FAO, **1986**.
44. Stephen, D. et Shetty, H.P.C., Induction of spawning in four species of bivalves of the Indian coastal waters, *Aquaculture*, 25, p 153-159, **1981**.
45. Mylonas, C.C., Hinshaw, J.M. et Sullivan C.V., GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on eggs quality, *Aquaculture*, 106, p 379-392, **1992**.
46. Ako, H., Tamaru, C.S., et Cheng Sheng, L., Chemical and physical differences in milkfish (*Chanos chanos*) eggs from natural ant hormonally induced spawns, *Aquaculture*, 127, p 157-167, **1994**.
47. Kjorsvik, E., Mangor-Jensen, A. et Holmefjord, I., Egg quality in fishes, *Advances in marine biology*, 26, p 71-113, **1990**.
48. Remoissenet, G., Responsable aquaculture du SPE, communication personnel, **24/06/08**.
49. Météo France, <http://www.meteo.pf/climat.php?lien=pf>, ?.
50. McCormick, S.D., Endocrine control of osmoregulation in teleost fish, *American Zoology*, 41, p 781-794, **2001**.
51. Evans, D.H., Piermarini, P.M. and Choe, K.P., The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste, *Physiological Reviews*, 85, p 97-177, **2005**.
52. Hirose, K., Hirano, T. et Ishida, R., Effects of salmon gonadotropin on ovulation in the ayu, *Plecoglossus altivelis*, with special reference to water balance, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 47, p 283-289, **1974**.
53. Babiker, M.M. et Ibrahim, H., Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): effects of steroid and trophic hormones on ovulation and ovarian hydration, *Journal of Fish Biology*, 15, p 21-30, **1979**.
54. Milla, S., Jalabert, B., Rime, H., Prunet, P. et Bobe, J., Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and in vitro regulation by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol, *The Journal of Experimental Biology*, 209, p 1147-1156, **2006**.
55. Bry, C., Plasma cortisol levels of female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at the end of the reproductive cycle: relationship with oocyte stages, *General and Comparative Endocrinology*, 57, p 47-52, **1985**.
56. Weil, C. et Crim, L.W., Administration of LHRH analogues in varoius ways : effect on the advancement of spermatation in prespawning landlocked salmon, *Salmo salmar*, *Aquaculture*, 35, p 103-115, **1983**.

57. Linhart, O., Mims S.D., Gomelsky, B., Hiott, A.E., Shelton, W.L., Cosson, J., Rodina, M. et Gela D., Spermiation of paddlefish (*Polyodon spathula*, Acipenseriformes) stimulated with injection of LHRH analogue and carp pituitary powder, Aquatic Living Resources, 13, p 455–460, **2000**.

58. Mellinger, J., Sexualité et reproduction des poissons, la quantité de vitellus, CNRS EDITIONS, Paris, p 295, **2002**.

➤ **Référence des annexes**

59. Mellinger, J., Sexualité et reproduction des poissons, l'ovogenèse, CNRS EDITIONS, Paris, p 169-170, **2002**.

60. Harvey, B.J. et Hoar W.S., Theory and practice of induced breeding in fish, Haynes E.D., 51 p, **1979**.

61. Barnabe, G. et Barnabe-Quet, R., Avancement et amélioration de la ponte induite chez le loup (*Dicentrarchus labrax*) à l'aide d'un analogue de LH-RH injecté, Aquaculture, 49, p 125-132, **1985**.

62. Legendre, M.; Billard, R., Cryoconservation of rainbow trout sperm (*Salmo gairdneri* R.), Bulletin Français Piscicole, 278, p 11-33, **1980**.

63. Scherrer, B., Biostatistique, Gaëtan Morin éditeur, Chicoutoumi, Canada, 850 p, **1984**.