

Direction des Ressources Vivantes  
Laboratoire Ressources Aquacoles - Station de la Martinique

GARDES Lionel, VILLANOVE Philippe, BUCHET Vincent, FAUVEL Christian

Juillet 1999 - DRV/RA/RST/99-11

**ifremer**

---

# L'INDUCTION HORMONALE DE LA PONTE A L'AIDE DE LA LH-RH CHEZ L'OMBRINE, *SCIAENOPS OCELLATUS*

MISE EN EVIDENCE DES CONDITIONS OPTIMALES POUR  
LA PRODUCTION D'ŒUFS ET DE LARVES DE QUALITE

L'induction hormonale de la ponte à l'aide de la LH-RH chez  
l'ombrine, *Sciaenops ocellatus*

Mise en évidence des conditions optimales pour la production  
d'œufs et de larves de qualité

<b>Numéro d'identification du rapport :</b> DRV/RA/RST/99-11  <b>Diffusion :</b> libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/>  <b>Validé par :</b> Vincent Buchet  <b>Version du document :</b> définitive		<b>date de publication</b> Juillet 1999 <b>nombre de pages</b> 41 <b>bibliographie (Oui)</b>  <b>illustration(s) (Oui)</b>  <b>langue du rapport</b> Français
<b>Titre et sous-titre du rapport :</b> L'induction hormonale de la ponte à l'aide la LH-RH chez l'ombrine, <i>Sciaenops ocellatus</i> . Mise en évidence des conditions optimales pour la production d'œufs et de larves de qualité  <b>Titre traduit :</b> LH-RH induced spawning of the red drum, <i>Sciaenops ocellatus</i> . Search of optimal conditions for the production of good quality eggs and larvae.		
<b>Auteur(s) principal(aux) :</b> nom, prénom Gardes Lionel		<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b> IFREMER/DRV/RA/Martinique
<b>Collaborateur(s) :</b> nom, prénom Villanove Philippe Buchet Vincent Fauvel Christian		<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b> IFREMER/DRV/RA/Martinique IFREMER/DRV/RA/Martinique IFREMER/DRV/RA/Palavas
<b>Travaux universitaires :</b> diplôme : _____ discipline : _____ établissement de soutenance : _____ année de soutenance : _____		
<b>Titre du contrat de recherche :</b> Contrat de Plan Etat-Région <b>Organisme commanditaire :</b> nom développé, sigle, adresse Région Martinique <b>Organisme(s) réalisateur(s) :</b> nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)		<b>n° de contrat IFREMER</b>
<b>Responsable scientifique :</b> Vincent Buchet		
<b>Cadre de la recherche :</b> Programme : _____ Convention : _____ Physiologie de la reproduction de l'ombrine, <i>Sciaenops ocellatus</i> . Projet : _____ Autres (préciser) : _____  Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)		

**Résumé :**

L'analogue [D Trp<sup>6</sup>] LH-RHa prouve son efficacité aux doses de 20 et 50 µg.kg<sup>-1</sup> pour induire et synchroniser les pontes chez l'ombrine, *Sciaenops ocellatus*, dans les conditions tropicales martiniquaises. Un suivi régulier du développement ovocytaire par biopsies ovariennes permet en outre de réaliser des injections aux différents stades retenus. L'influence du stade de développement ovarien de la femelle au moment de la stimulation est ainsi mise en évidence. La phase C du stade Noyau en Migration est identifiée comme un optimum pour la réussite des stimulations. Un potentiel intéressant de stimulations successives aboutissant à des pontes de qualité est établi et les facteurs de réussite identifiés. Ce travail met en évidence l'intérêt de l'utilisation combinée des analyses multivariées et de l'analyse de variance à un facteur pour la recherche de liens au sein des résultats d'expérimentations aquacoles faisant intervenir une diversité de causes et d'effets.

**Abstract :**

20 and 50 µg.kg<sup>-1</sup> doses of [D Trp<sup>6</sup>] LH-RHa analogue proved to be effective in inducing and synchronising spawns in red drum, *Sciaenops ocellatus*, in the French West Indies tropical conditions. The study of oocyte development through steady ovarian biopsies allowed to carry out injections at different stages. The influence of female ovarian development state at stimulation time on further development is shown. Phase C of germinal vesicle migration stage was identified as an optimum for successful stimulations. An interesting potential of successive stimulations leading to good quality spawns is established and the factors of success identified. The present work shows the interest of combined use of multivariate analyses and one way analyse of variance for the search of links within aquaculture experiments results involving a diversity of causes and effects.

**Mots-clés :**

Induction de ponte, LH-RH analogues, Analyse multivariée, Qualité des œufs, Développement ovarien, ombrine, *Sciaenops ocellatus*

**Keywords :**

Induced breeding, LH-RH analogues, Multivariate analysis, Egg quality, Ovarian development, red drum, *Sciaenops ocellatus*

Commentaire : Ce rapport est issu des résultats obtenus durant le stage de fin d'études de Lionel Gardes dans le cadre de la spécialisation halieutique de l'ENSA de Rennes (soutenance du mémoire en septembre 1998).

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE GENERALE</b>	<b>2</b>
1.1. BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION DE L'OMBRINE, <i>SCIAENOPS</i> <i>OCELLATUS</i>	2
1.2. DEVELOPPEMENT OVOCYTAIRE CHEZ L'OMBRINE	2
1.3. INDUCTION HORMONALE DES PONTES A L'AIDE DU LH-RH	4
1.3.1. GENERALITES	4
1.3.2. ETAT DES CONNAISSANCES SUR L'INDUCTION CHEZ <i>SCIAENOPS</i> <i>OCELLATUS</i>	7
1.4. OBJECTIFS DU TRAVAIL	8
<b>2. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>10</b>
2.1. LES GENITEURS ET LEUR CONDITIONNEMENT	10
2.2. LE SUIVI DU DEVELOPPEMENT GONADIQUE	11
2.3. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	11
2.3.1. EXPERIENCE N° 1 : DETERMINATION DES DOSES EFFECTIVES	12
2.3.2. EXPERIENCE N° 2 : INFLUENCE DU STADE DE DEVELOPPEMENT OVOCYTAIRE SUR LA QUALITE DES PONTES	12
2.3.3. EXPERIENCE N° 3 : DETERMINATION DU POTENTIEL DE RESTIMULATION DES FEMELLES	13
2.4. PROCEDURE GENERALE RETENUE POUR EVALUER LA REPONSE A L'INDUCTION	13
2.5. ANALYSE STATISTIQUE	15
<b>3. RESULTATS</b>	<b>16</b>
3.1. SUIVI DU DEVELOPPEMENT GONADIQUE	16
3.2. BILAN DES TRAVAUX REALISES	17
3.3. ETUDE DE L'ENSEMBLE DES PONTES A L'AIDE DE LA CLASSIFICATION ASCENDANTE HIERARCHIQUE (CAH)	17
3.3.1. CARACTERISATION DE LA PARTITION EN HUIT CLASSES	17
3.3.2. DESCRIPTION DES CLASSES	20
3.4. DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES DES PONTES EN FONCTION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES	22
3.4.1. DESCRIPTION DU PLAN FACTORIEL D'ETUDE DE L'ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES (ACP)	22
3.4.2. EXPERIENCE N°1 : DETERMINATION DES DOSES EFFECTIVES	25
3.4.3. EXPERIENCE N°2 : INFLUENCE DU STADE DE DEVELOPPEMENT SUR LA QUALITE DES PONTES	28
3.4.4. EXPERIENCE N°3 : DETERMINATION DU POTENTIEL DE RESTIMULATION DES FEMELLES	31
3.4.5. CARACTERISATION DE L'EFFET MALE RENCONTRE	34
<b>4. DISCUSSION GENERALE</b>	<b>36</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>40</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>40</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>41</b>

## INTRODUCTION

Les mécanismes de régulation du développement des gonades des poissons téléostéens, dont les principes fondamentaux sont bien connus depuis plusieurs décennies, ont fait l'objet d'abondants travaux depuis 1960. Ces études ont permis de mieux connaître le fonctionnement des gonades, les molécules et les phénomènes mis en cause mais aussi de mieux comprendre les interactions existant entre les différents mécanismes régulateurs.

Ces nouvelles connaissances ont ainsi ouvert la voie d'un contrôle plus rigoureux de la reproduction des espèces domestiquées, maîtrise devant assurer une meilleure productivité et une meilleure rentabilité des entreprises aquacoles.

Le développement d'une filière aquacole est en effet étroitement lié aux possibilités de maîtrise des techniques d'obtention des œufs et des alevins, à la fois en termes de quantité, de qualité mais aussi de disponibilité tout au long de l'année, afin de répondre au mieux à la demande.

La filière Ombrine (*Sciaenops ocellatus*), mise en place en Martinique depuis le milieu des années 80, se retrouve aujourd'hui face à ce problème d'obtention des alevins, en particulier en dehors de la période naturelle de reproduction. En effet, si le conditionnement des géniteurs est à peu près maîtrisé, les techniques relatives à l'induction des pontes n'en sont qu'à leurs balbutiements, peu de travaux ayant été réalisés sur place ou aux USA où l'Ombrine représente pourtant une espèce d'intérêt commercial très important.

En plus de ces intérêts aquacoles, la maîtrise de l'induction de ponte peut être regardée comme un outil scientifique permettant d'aborder dans l'avenir des questions telles que la fécondation artificielle et la génétique.

L'étude de l'ovogenèse proposée également dans ce travail s'inscrit dans la continuité des travaux de PARFOURU et FAUVEL (1997). Elle vise à affiner la technique de suivi de ce processus ovarien afin de mieux le connaître d'une part et afin d'évaluer l'influence des stades de développement ovocytaires sur la qualité des pontes obtenues suite à la stimulation hormonale d'autre part.



## 1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE GENERALE

### 1.1. BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION DE L'OMBRINE, *SCIAENOPS OCELLATUS*

La première maturité sexuelle se produit lorsque les poissons sont âgés de 18 à 24 mois dans les conditions martiniquaises, les mâles étant de manière générale plus précoces que les femelles.

Les scientifiques américains ont quant à eux étudié les populations sauvages de *Sciaenops ocellatus* au cours de nombreuses campagnes de pêches scientifiques. Les travaux d'OVERSTREET (1983), BECKMAN *et al.* (1988), FITZHUGH *et al.* (1988), MURPHY et TAYLOR (1990), WILSON et NIELAND (1994), ROSS *et al.* (1995), ont ainsi permis d'établir à partir de courbes Taille-Age, que la maturation se déroule entre 1 et 3 ans pour les mâles (plus de 50 % à 2 ans ; 100 % à 3 ans) et entre 3 et 6 ans pour les femelles (50 % à 4 ans ; 100 % à 6 ans). Ces travaux ayant eu lieu dans différentes régions ont par ailleurs mis en évidence une forme de gradient de précocité de la première maturation sexuelle du nord vers le sud, ce que semblerait vérifier la précocité des Ombrines placées dans les conditions naturelles de la Martinique. Les pontes, de type fractionné, se produisent à la fin de l'été dans les eaux subtropicales nord américaines, à proximité des passes et des canaux. PARFOURU et FAUVEL (1997) ont mis en évidence, en analysant cette bibliographie, une relation entre la saison de ponte et la latitude : la ponte étant d'autant plus tardive que la latitude diminue, c'est-à-dire que les variations annuelles de photopériode et de température diminuent. Dans les conditions environnementales martiniquaises, la maturation sexuelle des Ombrines se déroule entre les mois de juillet et d'octobre. Il s'agit d'une période de croissance de la température, (29 à 31°C) et de décroissance de la durée du jour (de 13 h à 12 h). La ponte commence après le léger pic de température (fin octobre) et se poursuit jusqu'au milieu du mois de décembre dans une phase de diminution de la température (1°C).

### 1.2. DEVELOPPEMENT OVOCYTAIRE CHEZ L'OMBRINE

Le développement ovarien chez l'Ombrine en conditions tropicales martiniquaises a été étudié par PARFOURU et FAUVEL (1997). Le suivi de la croissance des ovocytes secondaires a été réalisé entre la fin du repos sexuel (juillet) et le début de la saison de ponte (fin octobre), par des biopsies mensuelles sur des femelles soumises aux conditions naturelles de température et de photopériode. L'ovogenèse a été examinée à partir de deux paramètres : le stade et le diamètre ovocytaires. A partir des travaux de YAMAMOTO (1956), WALLACE et SELMAN (1981), WALLACE *et al.* (1987), MUGNIER (1996) et ZIMMERMAN (1997), PARFOURU et FAUVEL (1997) ont adapté une classification des stades de développement. Six stades



ont ainsi été retenus pour caractériser le développement ovocytaire chez l'Ombrine. Les principales caractéristiques microscopiques de ces stades sont les suivantes :

- **Croissance Primaire (CP)** : ovogonies et ovocytes en pré-vitellogenèse caractérisés par un petit cytoplasme très clair (absence de vacuole ou d'inclusion) et un gros noyau. Le diamètre ovocytaire (ovocyte plus follicule) est inférieur à 120  $\mu\text{m}$ .
- **Alvéoles Corticaux (AC)** : l'ovocyte est plus sombre, de couleur marron et les nombreux alvéoles corticaux sont visibles en cercles concentriques autour du noyau qui est central. Le rapport nucléoplasmique est peu élevé et le diamètre ovocytaire est compris entre 100 et 260  $\mu\text{m}$ .
- **Globules Vitellins (GV)** : apparition des globules vitellins qui remplissent rapidement et de façon homogène tout le cytoplasme, cachant ainsi le noyau. Le noyau réapparaît ensuite. Les alvéoles corticaux sont progressivement repoussés en périphérie, sur une fine lame. Le diamètre ovocytaire augmente de façon importante (260-575  $\mu\text{m}$ ). L'ovocyte prend une couleur grisâtre caractéristique.
- **Noyau en Migration (NM)** : Le cytoplasme est clairement stratifié et la membrane ovocytaire est épaisse. Présence de gros globules vitellins puis fusion progressive entraînant une nouvelle hyalinisation, au moins partielle, du cytoplasme. Le noyau nettement visible migre en périphérie. Le diamètre ovocytaire varie peu (450-590  $\mu\text{m}$ ), 590  $\mu\text{m}$  semblant être le diamètre seuil à partir duquel la maturation terminale peut avoir lieu. Les ovocytes deviennent beaucoup moins adhérent les uns aux autres et se dispersent beaucoup plus aisément dans l'EFA.
- **Hydratation (H)** : Disparition des enveloppes nucléaires et forte augmentation du diamètre ovocytaire (0,9 -1,1 mm). Globule(s) lipidique(s) bien visible(s).
- **Atrésie (A)** : Dégénérescence des structures internes de l'ovocyte.

Les dernières phases de la maturation se déroulant très rapidement, les travaux de PARFOURU et FAUVEL (1997) n'ont pas permis d'étudier avec précision ces étapes. BROWN-PETERSON *et al.* (1988) ont par contre étudié cette phase chez *Cynoscion nebulosus*, un sciaenidé dont la biologie est proche de celle de l'Ombrine. Chez cette espèce, les dernières transformations sont elles aussi très rapides : la coalescence des globules vitellins commence à l'aube, la migration du noyau débute en fin de matinée et la ponte se produit au crépuscule comme chez l'Ombrine (HOLT *et al.*, 1985).

Le développement ovocytaire de l'Ombrine est très fortement influencé par la température et la photopériode (THOMAS *et al.*, 1995) qui constituent des stimuli environnementaux fondamentaux pour le déclenchement des





mécanismes neuro-hormonaux régulateurs de la gamétogenèse. De nombreux travaux basés sur le contrôle de ces deux facteurs environnementaux ont ainsi été réalisés afin de maîtriser le conditionnement des reproducteurs de *Sciaenops ocellatus* (ARNOLD, 1988 et 1991 ; ROBERTS *et al.*, 1978 ; ROBERTS, 1990). Les corrélations entre les variations de température et de photopériode et le développement ovocytaire sont en revanche assez délicates à établir puisque les femelles mûrissent naturellement en Martinique au cours d'une période de faible croissance de température et de diminution moyenne de la photopériode, alors que les conditionnements de type " américain " sont basés sur une forte croissance puis décroissance simultanées de ces deux facteurs (variations calquées sur les rythmes de l'aire de répartition naturelle de l'Ombrine). Un processus d'adaptation aux nouvelles conditions environnementales est vraisemblablement à mettre en cause.

### 1.3. INDUCTION HORMONALE DES PONTES A L'AIDE DU LH-RH

#### 1.3.1. GENERALITES

Les travaux sur l'induction hormonale des pontes ont commencé dès la fin des années 60 en Asie. Différentes techniques et préparations ont été utilisées. L'administration de **gonadotrophines exogènes** (extraits bruts d'hypophyses de poissons et gonadotrophine chorionique humaine (HCG)) a été la pratique la plus courante pendant de longues années. L'intervention au niveau des **stéroïdes sexuels** a également fait l'objet de recherches soit pour leur action régulatrice de la maturation des gonades, soit pour leur intervention rétroactive sur la sécrétion de gonadotrophine (HARVEY et HOAR, 1979). Nous allons nous intéresser à la troisième voie d'intervention ayant fait l'objet d'importantes recherches contemporaines : l'administration **d'hormones libérantes** et plus particulièrement de **LH-RH** (Luteinising Hormon Releasing Hormon ; hormone libérante lutéinisante), décapeptide formé de la chaîne d'acides aminés suivante :

pGlu - His - Trp - Ser - Tyr - Gly - Leu - Arg - Pro - Gly-NH<sub>2</sub>  
(Source : Sigma Chimie).

Le recours à l'utilisation de cette hormone et de ses analogues a permis d'intervenir de façon plus précoce dans la chaîne endocrinienne de régulation de la maturation sexuelle qu'avec les deux méthodes citées plus haut. L'intervention est en effet réalisée ici au niveau de **l'interface hypothalamus-hypophyse**, c'est-à-dire au tout début du processus de régulation. Certes les temps de réponse entre injection et ponte lors de l'induction à la LH-RH ou ses dérivés, sont parfois plus longs que ceux obtenus à l'aide de l'HCG ou d'extraits hypophysaires (ANONYME, 1977 ; BARNABE et BARNABE-QUET, 1985), mais le processus physiologique impliqué est mieux cerné et les résultats obtenus plus robustes et plus constants. En outre, la LH-RH, **peu**



**antigénique** (ANONYME, 1977), en agissant au niveau hypothalamique pour déclencher la production de gonadotrophine hypophysaire **endogène**, est susceptible de faire évoluer indirectement un ovaire en cours de maturation alors qu'une gonadotrophine non spécifique ne permet pas de reconstituer tout le cycle gonadique, mais simplement de déclencher la phase ultime de maturation d'un ovaire parvenu en fin de vitellogenèse. La LH-RH est très intéressante car elle n'entraîne pas la production d'anticorps, contrairement à l'HCG qui favorise la production d'anticorps anti-HCG, ayant à terme pour conséquence une baisse d'efficacité des gonadotrophines endogènes. On dispose depuis 1973 de plusieurs analogues structuraux synthétiques (LH-RHa) de la LH-RH (ARIMURA *et al.*, 1974 ; MONAHAN *et al.*, 1973). Un certain nombre d'entre eux possèdent une demi-vie plus longue ainsi qu'une plus grande activité biologique que la LH-RH. Cela est dû à la structure chimique et à la configuration moléculaire qui rendent ces peptides plus résistants à l'action des protéinases et des peptidases ou encore à leur plus grande affinité pour les récepteurs des cellules cibles (ANONYME, 1977). L'analogue LH-RHa (Des-Gly<sup>10</sup>, D-Ala<sup>6</sup>)-LH-RH éthylamide a été synthétisé en Chine pour la première fois en 1973, pour être utilisé de manière intensive et avec succès sur plusieurs espèces de carpes. Cet analogue ainsi que d'autres (D-Ser(But)<sup>6</sup>, Gly<sup>10</sup> ; D-Trp<sup>6</sup>, Gly<sup>10</sup>) ont été utilisés depuis sur de nombreuses espèces d'intérêt commercial telles que : la carpe (*Cyprinus carpio*) (BILLARD *et al.*, 1987), le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) (DONALDSON *et al.*, 1982), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (CRIM *et al.*, 1988), le saumon atlantique (*Salmo salar*) (CRIM *et al.*, 1983, 1986), le bar (*Dicentrarchus labrax*) (ZOHAR *et al.*, 1984 ; BARNABE et BARNABE-QUET, 1985), le tilapia (*Lates calcarifer*) (NACARIO J.F., 1983), le pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (CAROLSFELD *et al.*, 1988), le milkfish (*Chanos chanos*) (LEE *et al.*, 1987a ; TAMARU *et al.*, 1988), le mullet gris (*Mugil cephalus*) (LEE *et al.*, 1987b) ou encore le poisson chat asiatique (*Clarias macrocephalus*) (TAN-FERMIN *et al.*, 1997)... Ces travaux mettent en évidence la capacité de la LH-RHa à induire et synchroniser les ovulations chez de nombreuses espèces.

L'analyse de ces travaux fait apparaître plusieurs éléments intéressants en matière de protocoles d'études et de résultats. Ils présentent tout d'abord différents centres d'intérêt et paramètres d'étude : le mode d'administration de l'hormone (injection(s), implants sous-cutanés), la dose minimale effective et le nombre d'injections, l'état de maturation des ovocytes lors de l'induction (stade et diamètre), la saisonnalité de la réponse ou encore l'activité de l'analogue de la LH-RH utilisé. Deux de ces paramètres intéressent particulièrement ce travail : la dose hormonale injectée et le stade de développement ovarien au moment de l'induction. Ce deuxième paramètre est généralement évalué grâce au diamètre ovocytaire (FERMIN *et al.*, 1991, FRANCESCON *et al.*, 1994) qui ne donne qu'une information partielle de



l'état ovarien si elle n'est pas associée à l'évaluation du stade de développement ovocytaire (BERLINSKY *et al.*, 1996 ; CHUDA *et al.*, 1997 ; CRIM *et al.*, 1983, 1986 ; MYLONAS *et al.*, 1995 ; WEIL *et al.*, 1978). En revanche, si l'influence de la dose sur les résultats de ponte a été mise en évidence dans de nombreux travaux, l'influence du stade de développement ovocytaire n'a été que très rarement approfondie (WEIL *et al.*, 1978 ; CRIM *et al.*, 1983 ; FAUVEL et SUQUET, 1998).

Les critères permettant d'évaluer l'effet de ces paramètres sont également nombreux. Les plus courants dans cette bibliographie sont le pourcentage de femelles répondant à la stimulation, le nombre d'œufs collectés et leur diamètre, le pourcentage d'œufs fécondés et le temps de réponse. En revanche, les travaux tentant d'évaluer de manière plus ou moins indirecte **la qualité des œufs et des larves** produits suite à l'induction hormonale sont plus rares. L'évaluation de la qualité des œufs, c'est à dire du potentiel des œufs à donner des alevins viables, a été décrite comme une tâche difficile, la qualité étant à la fois influencée par les propriétés intrinsèques (physiques, génétiques et chimiques) des œufs et par l'environnement dans lesquels ces œufs sont fécondés puis incubés (KJORSVIK *et al.*, 1990 ; BROOKS *et al.*, 1997). Selon KJORSVIK *et al.* (1990), l'évaluation devrait être basée sur des tests comparatifs d'un grand nombre de paramètres qui, pris séparément, ne permettent pas de conclure.

Chez l'Omble chevalier, *Salvelinus alpinus*, GILLET *et al.* (1996) observent une survie comparable entre les œufs issus de pontes induites et de pontes naturelles. Ils mettent en revanche en évidence une corrélation négative entre la teneur en gonadotrophines plasmatiques de la femelle et la survie des œufs. Pour cette même espèce, HARALDSSON *et al.* (1993) n'observent également aucune influence de la stimulation hormonale sur la taille des œufs, leur poids, leur composition chimique, le temps d'incubation, le taux d'éclosion et la longueur des alevins. MYLONAS *et al.* (1992) mettent en revanche en évidence une moins bonne fertilité des œufs, une moins bonne survie jusqu'au stade de pigmentation et une moins bonne éclosion dans le cas des pontes induites chez *Salmo trutta*. Ils n'observent cependant pas d'influence du traitement hormonal sur la survie des larves. Ces travaux les conduisent à émettre l'hypothèse d'une baisse de la qualité des œufs corrélée avec l'induction au LH-RHa qui modifie les cinétiques de maturation finale et d'ovulation. AKO *et al.* (1994) étudient par ailleurs la composition chimique des œufs chez le milkfish, *Chanos chanos*. Ils révèlent que des œufs plus gros, plus riches en acides gras et en acides aminés essentiels sont produits lors des pontes naturelles. En revanche, la quantité d'œufs émise est significativement supérieure dans le cas des pontes induites hormonalement. THOMAS et BOYD (1989) mettent enfin en évidence de bons taux d'éclosion et une bonne survie larvaire chez *Cynoscion nebulosus*.



FRANCESCON *et al.* (1994) révèlent une corrélation négative entre la dose injectée (1 et 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) et le pourcentage d'œufs viables. Ils observent trois types de développement anormal des œufs obtenus par stimulation hormonale : un fractionnement du globule lipidique (corrélé directement avec la dose de LH-RHa), un détachement du globule de l'embryon suite aux chocs mécaniques et un rétrécissement du sac vitellin. Ce fractionnement du globule lipidique est également abordé comme une caractéristique des mauvaises pontes lors des inductions hormonales par CARRILLO *et al.* (1995), FASQUEL (1997) et FAUVEL et SUQUET (1998) pour le Bar, *Dicentrarchus labrax*. HARALDSSON *et al.* (1993) remarquent quant à eux une baisse significative du taux de fécondation lors d'une injection de 150  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  chez *Salvelinus alpinus*. L'influence de la stimulation hormonale est cependant difficile à établir puisque d'autres auteurs ne révèlent aucune influence de la dose sur la fécondation et obtiennent de bons taux (> 60%) chez divers sciaenidés (THOMAS et BOYD, 1988) et chez *Alosa sapidissima* (MYLONAS *et al.*, 1995).

DYUBIN et BAYUNOVA (1993) présentent enfin une étude de l'influence des stimulations hormonales selon une toute autre perspective : l'étude de la descendance. La comparaison des caractéristiques d'alevins issus de pontes induites et de pontes naturelles les conduit ainsi à ne mettre en évidence aucune différence significative à 100 et 120 jours (critères taille-poids, taux de survie des juvéniles, développement de la gonade, du foie et de la glande inter-rénale).

### 1.3.2. ETAT DES CONNAISSANCES SUR L'INDUCTION CHEZ *SCIAENOPS OCELLATUS*

Des pontes ont été obtenues à l'aide de l'analogue de la LH-RH : (Des-Gly<sup>10</sup>, D-Ala<sup>6</sup>)-LH-RH éthylamide. Des injections à la dose de 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ont conduit à la production d'un grand nombre d'œufs fécondés et à des taux d'éclosion élevés (> 80%) (THOMAS et BOYD, 1988). Les injections ont été réalisées avec succès sur des femelles dont le diamètre ovocytaire était supérieur ou égal à 600  $\mu\text{m}$  (THOMAS *et al.*, 1995). La ponte survient 30 à 35 h après l'injection, à la tombée de la nuit. Des pontes supplémentaires ont couramment été observées le deuxième jour après l'injection en raison d'un niveau soutenu des gonadotrophines suite à l'injection de LH-RHa (THOMAS *et al.*, 1995). Ces auteurs relatent également l'obtention de pontes après injection du même analogue, à des doses de 20 et 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . La description très succincte de ces expériences ne permet cependant pas de connaître avec précision la qualité de la réponse observée. La comparaison des résultats obtenus (qualité des œufs et quantité libérée...) en fonction des doses injectées n'est en effet pas présentée.

GOYARD *et al.* (1993) font également le point sur les essais d'induction hormonale réalisés sur l'Ombrine en condition tropicales martiniquaises. Les



travaux ont été effectués avec un analogue de la LH-RH non précisé. Deux types d'essais ont été réalisés : après un conditionnement des femelles en salle à environnement contrôlé, injection à la dose de  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$  effectuée chez des femelles présentant des ovocytes d'un diamètre supérieur ou égal à  $550 \mu\text{m}$  d'une part et maturation en conditions naturelles, injection à la dose de  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$  effectuée chez des femelles présentant des ovocytes d'un diamètre supérieur ou égal à  $650 \mu\text{m}$  d'autre part. Une bonne réponse à l'induction hormonale a été mise en évidence. Des œufs de bonne qualité (taux de viabilité compris entre 41 et 100 %), en quantité conforme à ce qu'il est possible d'obtenir au cours des pontes naturelles, ont été récoltés 26 à 40 heures après les injections. D'après les résultats de ces travaux, les pontes induites ne peuvent être distinguées des pontes spontanées en terme de viabilité ou fécondation des œufs.

#### 1.4. OBJECTIFS DU TRAVAIL

S'appuyant sur l'ensemble des connaissances présentées dans cette introduction bibliographique, le présent travail a pour objectif d'approfondir les connaissances sur les possibilités de contrôle de la reproduction dans le cas particulier de l'Ombrière subtropicale, *Sciaenops ocellatus*.

Les doses effectives, le temps de réponse, la qualité des pontes obtenues en fonction du stade de développement ovocytaire au moment de l'induction, le potentiel de restimulation des femelles sont autant de questions auxquelles nous allons à présent tenter de proposer des éléments de réponse. L'objectif de ces travaux est une étude à la fois quantitative et qualitative de la réponse observée à l'induction, des œufs produits et des larves obtenues.

↳ La détermination des doses effectives est réalisée préalablement aux autres protocoles afin de préciser les conditions adaptées aux expériences suivantes. *Les questions auxquelles nous tenterons de répondre sont les suivantes : Est-il possible d'induire des pontes à des doses inférieures à  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ? Y-a-t-il une influence de la dose hormonale sur la qualité de la ponte ? Quelle est la dose minimale permettant d'obtenir des pontes de qualité ? La dose a-t-elle une influence sur le temps de réponse, c'est à dire sur la cinétique de maturation des œufs ? La dose a-t-elle une influence l'évolution ultérieure de la gonade ?*

↳ L'évaluation de l'influence du stade de développement ovocytaire des génitrices au moment de la stimulation hormonale est effectuée grâce à la comparaison des résultats de pontes induites à différents stades et différents états ovariens. *Observe-t-on des différences en matière de quantités produites ou de qualité des œufs en fonction du stade de maturation de la femelle ? Est-il possible d'identifier des critères objectifs assurant la réussite de l'induction hormonale de la ponte ?*



↳ L'expérience relative au potentiel de restimulation a pour but d'évaluer la capacité de l'Ombrine à revenir, après une première induction hormonale de la ponte, à un stade où la femelle est susceptible de répondre à une nouvelle stimulation et d'apprécier la qualité de cette nouvelle réponse.

*Est-il possible de réaliser des inductions successives chez l'Ombrine ? Est-il possible d'obtenir des pontes de qualité lors des restimulations ? Au bout de combien de temps les femelles reviennent-elles à un stade de développement ovocytaire permettant une nouvelle stimulation ? Ce potentiel est-il influencé par le stade ou la dose ?*



## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. LES GENITEURS ET LEUR CONDITIONNEMENT

Les expérimentations sont réalisées sur 25 femelles et 11 mâles, à la station IFREMER du Robert en Martinique. Ce sont des animaux âgés de 3 ans (31 individus) et 6 ans (5 individus), issus de géniteurs importés des U.S.A. en 1985. Leur poids moyen est de 5200 g ( $\pm$  900 g) au début des expérimentations (juillet 1998). Ces animaux sont répartis en deux lots : un lot de 14 femelles et 11 mâles placés dans le bassin de conditionnement le 06 mars et un deuxième lot de femelles (11 individus) ayant été rajouté au premier le 16 avril. Tous les animaux sont identifiables individuellement à l'aide d'une puce magnétique (pit tag) placée sous la peau dans la partie antéro dorsale.

Un conditionnement selon un cycle photo et thermopériodique de 12 semaines a été réalisé dans un bassin de 16 m<sup>3</sup> en circuit fermé, afin d'induire une période reproduction (juillet-septembre) en dehors de la période naturelle de ponte (octobre-décembre). La charge du bassin est d'environ 11 kg.m<sup>-3</sup>. Le taux de renouvellement de l'eau dans le circuit est compris entre 60 et 100 % du volume du bassin par jour. Le protocole de conditionnement mis en place est basé sur ceux effectués à la station entre 1989 et 1992 (GOYARD *et al.*, 1993), à partir des travaux réalisés dans les éclosiers américaines. En outre, PARFOURU et FAUVEL (1997) ayant suggéré que la ponte semblait être d'autant plus précoce que les variations annuelles de photopériode et de température étaient importantes, il est apparu intéressant d'augmenter la durée de lumière au niveau du pic (de 15 h initialement, à 16 h 30) pour tenter d'accélérer le déclenchement du cycle reproductif, mais aussi la précocité des pontes (figure 1). Les pics de température apparaissant à intervalles réguliers sur la figure 1 sont liés à la réalisation des biopsies, procédure nécessitant une vidange totale du bassin (anesthésie).

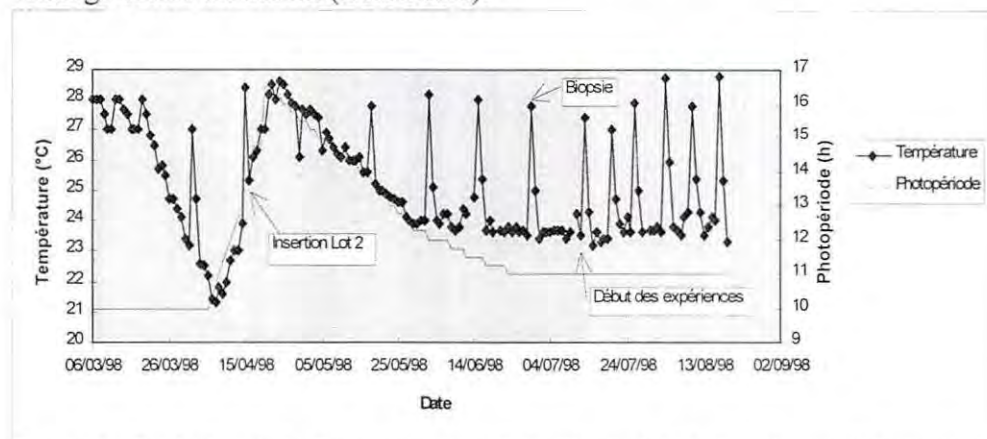


Figure 1 : Evolution de la Température et de la Photopériode lors du conditionnement des géniteurs entre mars et septembre 1998.

Le lot de femelles rajouté le 15 avril (Lot 2) est constitué d'animaux issus des cages en mer. Ils sont donc passés directement des conditions naturelles (27,6 °C, 11 h de lumière) au milieu de la phase de croissance de la température (25,3°C) et de la photopériode (12 h de lumière). Ils n'ont pas subi la période "froide".

## 2.2. LE SUIVI DU DEVELOPPEMENT GONADIQUE

Le suivi de la maturation sexuelle est effectué par réalisation de prélèvements *in vivo* d'ovocytes, au niveau de l'ovaire d'Ombrines préalablement anesthésiées au phénoxy-2 éthanol (0,3 %) (DEROSIER, 1989). Les biopsies sont réalisées à l'aide d'une pipelle de Cornier. Cette pipelle est formée d'un tube souple à piston d'un diamètre intérieur de 2,6 mm, à l'extrémité arrondie. Utilisée en médecine humaine pour les biopsies d'endomètre (MUGNIER, 1996), elle permet de réaliser un prélèvement d'ovocytes dans la zone médiane de l'ovaire. De plus, grâce aux graduations situées sur le tube, il est possible de contrôler la profondeur de pénétration de la pipelle dans l'ovaire, afin d'uniformiser le plus possible la zone de prélèvement au cours des biopsies successives. Une fois aspirés, les ovocytes sont disposés dans des coupelles en plastique et soumis à un flux sous pression (seringue) d'une solution fixatrice et désopacifiante (Ethanol 6 vol., Formol 3 vol., Acide Acétique 1 vol.) permettant la séparation des follicules et l'observation microscopique *in toto* du contenu cellulaire.

Les biopsies sont réalisées tous les quinze jours pendant les 12 semaines du conditionnement. A partir de la fin de cette période, le développement ovocytaire s'accélérate, des biopsies hebdomadaires sont apparues nécessaires afin d'évaluer le diamètre ovocytaire maximum, le stade de développement de l'ovocyte le plus avancé en utilisant l'index morphologique proposé par PARFOURU et FAUVEL (1997), l'homogénéité de l'échantillon notée de 1 à 3 en fonction de la représentativité du stade le plus avancé au sein de l'échantillon observé.

Un suivi de la maturation des mâles est également effectué par massage abdominal des animaux.

## 2.3. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

L'hormone retenue est le [D Trp<sup>6</sup>] LH-RHa (Réf. L 9761 - SIGMA chimie). Les injections sont réalisées dans la zone intermusculaire à la base postérieure de la nageoire dorsale, à raison de 1 ml.kg<sup>-1</sup> de solution diluée de LH-RHa. Les Ombrines répondant aux critères du protocole sont sélectionnées lors des biopsies hebdomadaires. Une fois l'injection hormonale réalisée, elles sont placées individuellement dans un bassin d'induction de 2 m<sup>3</sup> où un mâle a été préalablement introduit. L'adduction et l'évacuation de l'eau de mer des bacs étant individualisées, les œufs émis par un couple donné sont récupérés





séparément à l'aide d'un collecteur disposé au niveau de la surverse de chaque bassin.

### 2.3.1. EXPERIENCE N° 1 : DETERMINATION DES DOSES EFFECTIVES

Les doses 10, 20 et 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ont été retenues après étude des résultats recueillis dans la bibliographie. Les génitrices sont stimulées lorsque le diamètre ovocytaire est supérieur à 500  $\mu\text{m}$ . Pour chaque traitement effectué, un triplicat de couples est utilisé. Les critères retenus pour évaluer la réponse seront présentés au chapitre II. 2.4.

### 2.3.2. EXPERIENCE N° 2 : INFLUENCE DU STADE DE DEVELOPPEMENT OVOCYTAIRE SUR LA QUALITE DES PONTES

Trois phases (phases A, B, C) sont retenues dans le cadre de ce travail sur l'induction hormonale. Ces phases (figure 2) ont été décrites par FAUVEL et SUQUET (1998) pour le bar, *Dicentrarchus labrax* :

- phase A : correspond à la fin du stade Globules Vitellins.
- phase B : Première phase du stade Noyau en Migration. Différentiation centripète des granules et disposition des alvéoles corticaux sur une fine lame basale. Hyalinisation périphérique du vitellus. Noyau nettement visible en position centrale.
- phase C : Seconde phase du stade Noyau en Migration. Migration du noyau et fusion complète des granules vitellins en un vaste sac entourant le noyau. Formation des gouttelettes lipidiques.

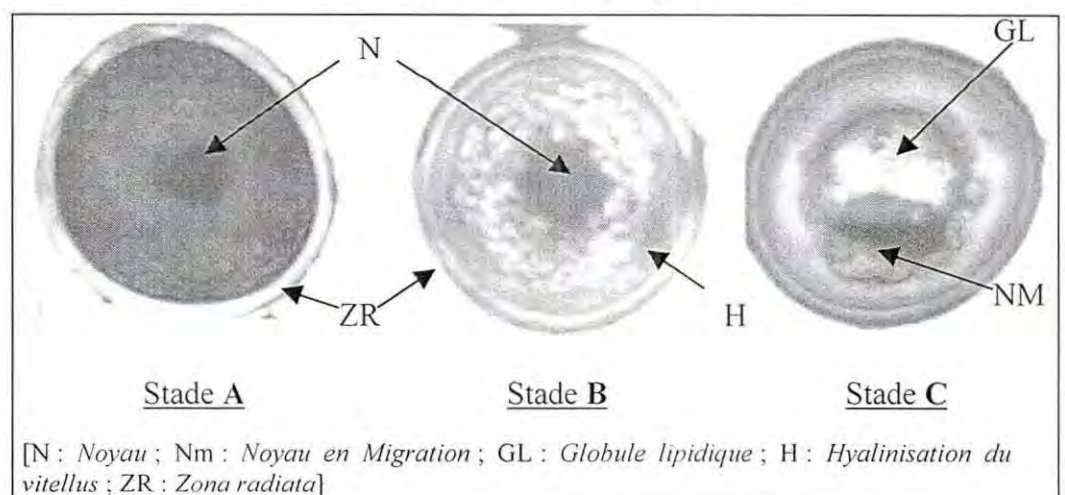


Figure 2 : Illustration des stades ovocytaires retenus pour l'induction hormonale (D'après FAUVEL, 1998).

Les ovocytes ont alors un diamètre supérieur à 450  $\mu\text{m}$ .

Les femelles sont choisies pour les expérimentations lorsqu'un nombre significatif d'ovocytes a atteint le stade et le diamètre ovocytaire désirés (homogénéité de l'échantillon observé). La dose utilisée est déterminée d'après les résultats de l'expérience n°1. Les traitements sont étudiés en triplicats. Les critères retenus pour évaluer la réponse seront présentés au chapitre **II**. 2.4.

### 2.3.3. EXPERIENCE N° 3 : DETERMINATION DU POTENTIEL DE RESTIMULATION DES FEMELLES

Le délai minimal entre ponte et restimulation est fixé arbitrairement à 15 jours. Les femelles ne sont ensuite restimulées qu'à partir du moment où les ovocytes de l'échantillon observé ont de nouveau atteint de façon homogène le stade désiré (B ou C). Les critères retenus pour évaluer la réponse seront présentés au chapitre **II**. 2.4.

## 2.4. PROCEDURE GENERALE RETENUE POUR EVALUER LA REPONSE A L'INDUCTION

L'évaluation de la qualité des pontes est réalisée grâce à l'enregistrement des données suivantes.

- *Durée entre Injection et Ponte* (en heures),
- *Fractionnement de la ponte* (Oui/Non) : dans le cas où la stimulation hormonale est suivie de plusieurs pontes les jours suivants.
- *Volume total de la ponte* (en ml),
- *Nombre d'œufs émis* : Un comptage exhaustif de 2 prélèvements de 500µl d'œufs est réalisé.  
⇒ Nombre d'œufs émis = Volume ponte × (2 × Nb d'œufs dans 500 µl)
- *Taux de fécondation* : Il est obtenu par comptage exhaustif des œufs fécondés et non fécondés dans les 2 échantillons de 500 µl.  
⇒ Taux de fécondation = (Nb œufs fécondés / Nb œufs total) × 100
- *Diamètre moyen des œufs* : L'évaluation du diamètre des œufs est réalisée sur 100 œufs, à l'aide d'un microscope muni d'une grille micrométrique.
- *Nombre de globules lipidiques par œuf* : Les globules lipidiques sont comptés sur 2 fois 100 œufs. Sont considérés comme globules lipidiques tous les globules dénombrables, même si les écarts de taille peuvent être importants.  
⇒ % œufs à 1 globule = (Nb œufs à 1 globule / Nb œufs total) × 100
- *Taux d'éclosion* : Une fois collectés, les œufs sont placés dans des incubateurs de 3,7 litres dans une structure expérimentale composée de 20 petits incubateurs, spécialement réalisée pour ces travaux d'après les



prototypes mis au point à l'IFREMER pour des travaux similaires sur la qualité des œufs (FASQUEL, 1997 ; NOGUERRA, 1994). Grâce à cette structure, les pontes sont placées dans des conditions d'incubation rigoureusement identiques (volume de l'incubateur, débit et renouvellement, température de l'eau : 27 à 28 °C, obscurité) permettant de comparer les taux d'éclosion avec un minimum de biais expérimental. Pour chaque femelle étudiée, trois lots de 1000 œufs environ sont mis en incubation. A l'éclosion, l'intégralité du contenu de chaque incubateur est récupérée dans un béccher et le taux d'éclosion est évalué par comptage des nombres d'œufs morts et de larves.

⇒ Taux d'éclosion =  $(\text{Nb larves} / \text{Nb théorique d'œufs fécondés}) \times 100$   
avec Nb théorique d'œufs fécondés =  $(\text{Nb larves} + \text{Nb œufs morts}) \times \text{Taux de fécondation}$

- *Survie larvaire à jeun* : L'étude de la survie larvaire est réalisée en plaçant 3×100 larves dans des bécchers d'un litre contenant de l'eau de mer filtrée et placés dans un laboratoire à 22 °C, sans renouvellement d'eau et à l'obscurité. Les larves mortes sont récupérées une fois par jour jusqu'à l'ouverture de la bouche entre J3 et J4, deux fois par jour ensuite, matin et soir, toujours à la même heure. A partir de ces données, trois variables sont calculées à posteriori :
  - ⇒ Survie larvaire totale = Nb de jours entre éclosion et mort de la dernière larve
  - ⇒ Mortalité à 6 jours =  $(\text{Nb larves mortes à 6 jours} / \text{Nb de larves mortes total}) \times 100$
  - ⇒ Durée létale pour 50 % des larves = Nb jours entre éclosion et mort de 50 % des larves

Par ailleurs, pour chaque femelle subissant une injection, un enregistrement des données suivantes est également réalisé :

- *Code et Poids* de la femelle,
- *Nombre de pontes* déjà réalisées,
- *Temps entre ponte et restimulation* (seulement pour les injections multiples),
- *Dose injectée*,
- *Stade et diamètre* ovocytaires,
- *Homogénéité* de l'échantillon prélevé lors de la biopsie,
- *Code du mâle* avec lequel la femelle considérée a été associée,
- Niveau de *spermiation* du mâle (noté de 1 à 3 en fonction de la quantité de sperme obtenue par massage abdominal de l'animal).



## 2.5. ANALYSE STATISTIQUE

Deux types d'analyses statistiques sont choisis pour étudier les résultats de ces expériences combinées.

Une analyse factorielle multivariée réalisée sur la population P formée de 26 individus et sur 11 variables quantitatives, décrit la structure globale de la population P formée de l'ensemble des pontes obtenues après stimulation hormonale. Cette analyse comporte elle-même deux méthodes dont les résultats se complètent : une *Analyse en Composantes Principales* (ACP) permettant de comparer des sous-populations caractérisées par des conditions expérimentales particulières (dose, stade de la femelle au moment de l'injection, nombre de stimulations) grâce à l'étude de la dispersion spatiale de ces populations (ESCOFIER et PAGES, 1997) et une *Classification Ascendante Hiérarchique* (CAH) permettant de mieux comprendre l'influence des différentes variables sur la partition de la population P et ainsi de déterminer les caractéristiques qui différencient le mieux les classes les unes des autres (WARD, 1963).

Une analyse de variance à un facteur, suivie du test Student Newman-Keuls de comparaisons multiples de moyennes, permettent enfin de valider et d'affiner les résultats de l'analyse multivariée en recherchant les différences significatives entre les sous-populations mises en évidence et en associant un intervalle de confiance à ces différences. Le modèle d'analyse choisi est adapté à l'étude des populations d'effectifs inégaux, suivant la procédure décrite par DAGNELIE (1975).

Le logiciel utilisé pour effectuer les analyses multivariées est le logiciel SPAD version 3.5.



### 3. RESULTATS

#### 3.1. SUIVI DU DEVELOPPEMENT GONADIQUE

Les résultats du suivi bimensuel puis hebdomadaire du groupe composé des 25 femelles conditionnées sont synthétisés sur les figures 3 et 4.

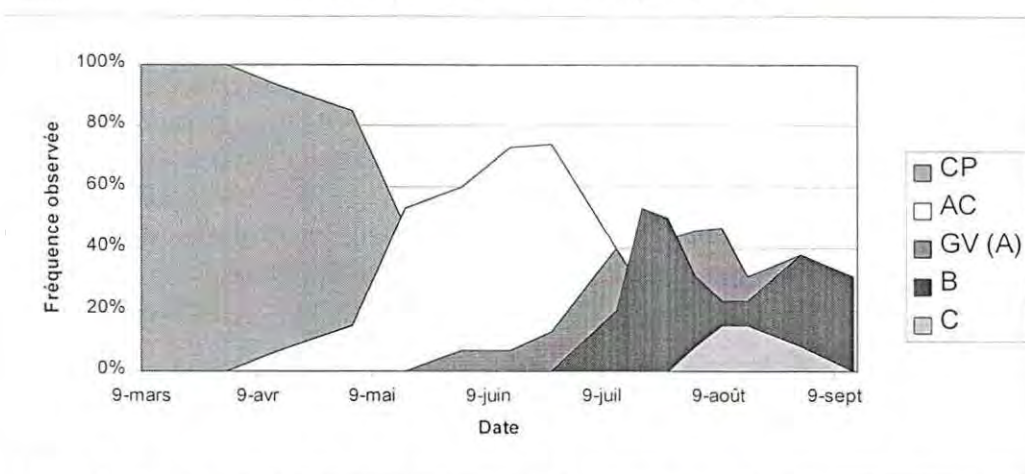


Figure 3 : Evolution de la fréquence des stades de développement ovocytaire observés au cours des biopsies.

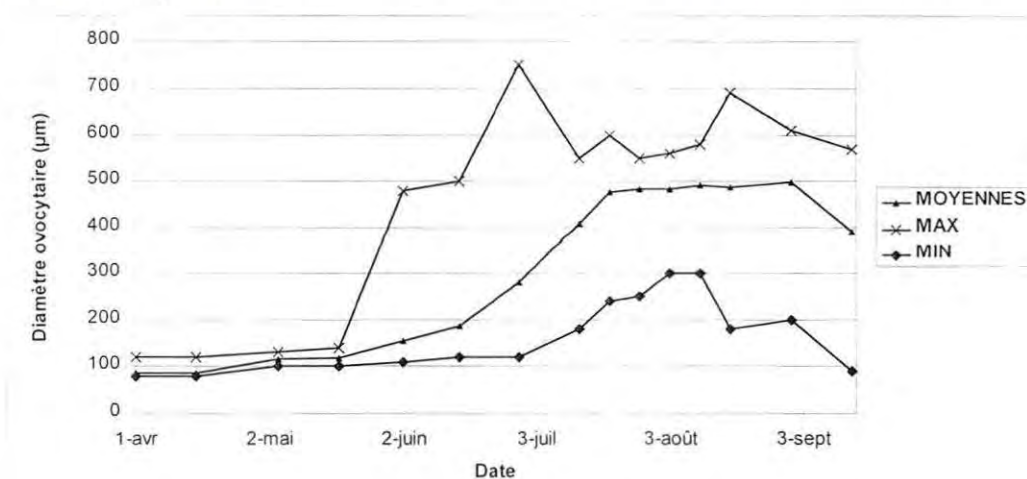


Figure 4 : Evolution du diamètre ovocytaire observé au cours des biopsies.

Ce suivi a permis de mettre en évidence une réponse très similaire des femelles des deux lots au conditionnement réalisé. Ce résultat conduit à émettre l'hypothèse qu'il n'est peut-être pas nécessaire de réaliser une phase de refroidissement aussi importante (21°C) pendant la première phase du cycle de conditionnement, puisque les animaux du lot 2 qui n'ont pas subi ce " choc froid " ont aussi bien répondu que ceux du lot 1.

Le stade A a par ailleurs été écarté des protocoles d'induction hormonale d'après les résultats de ce suivi, qui ont suggéré l'impossibilité de réaliser des inductions à ce stade de développement. En effet, les ovocytes au stade A ont une taille en général inférieure ou égale à 500  $\mu\text{m}$  et les échantillons observés sont très hétérogènes. Trois essais ont été réalisés et aucun n'a conduit à une ponte. Il semblerait qu'il ne s'agisse pas chez l'Ombrine d'un stade où l'on peut attendre de bons résultats d'induction. Cette hypothèse sera en outre validée dans la suite de ce travail par les résultats obtenus aux stades B et C. Ce suivi a permis de réaliser les travaux d'induction aux moments les plus opportuns. Avec un peu d'expérience, les biopsies ont parfois également permis de prédire l'évolution du développement ovocytaire de certaines femelles, à une semaine ou quinze jours, ce qui a présenté un grand intérêt en matière de programmation des travaux d'induction.

### 3.2. BILAN DES TRAVAUX REALISES

Au cours des sept semaines d'expérimentation, 17 stimulations (dont 11 au stade B et 6 au stade C) et 9 restimulations (dont 5 au stade B et 4 au stade C) ont été réalisées. Les paramètres environnementaux sont restés à peu près constants dans les bacs d'induction (Temp. : 27,8-31,5°C et salinité : 33‰).

### 3.3. ETUDE DE L'ENSEMBLE DES PONTES A L'AIDE DE LA CLASSIFICATION ASCENDANTE HIERARCHIQUE (CAH)

#### 3.3.1. CARACTERISATION DE LA PARTITION EN HUIT CLASSES

La CAH a abouti à la réalisation du dendrogramme suivant (figure 5).

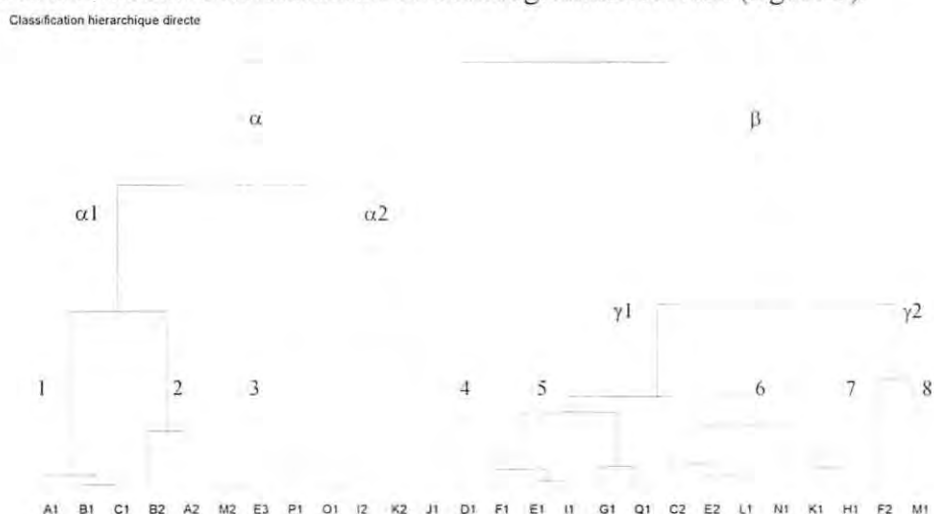


Figure 5 : Dendrogramme représentant les 26 individus étudiés dans leurs classes respectives.

Cette représentation met tout d'abord en évidence une opposition forte entre deux groupes d'individus ( $\alpha$  et  $\beta$ ). Au sein de chacun de ces groupes, il semble opportun de s'intéresser aux partitions successives aboutissant à l'identification de huit sous-groupes (numérotés **1 à 4** pour le groupe  $\alpha$  ; **5 à 8** pour le groupe  $\beta$ ). Ces partitions apparaissent sur la figure 5.

L'analyse de ces sous-groupes (classes) est réalisée au travers de l'étude des valeurs tests, critères permettant de mettre en évidence les variables ayant le plus contribué à la constitution des classes considérées.

La première partition étudiée est l'opposition entre  $\alpha$  et  $\beta$  dont les principales valeurs test sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous.

Variables	Valeurs Test	Valeurs Test
	Classe $\alpha$	Classe $\beta$
Mortalité à 6 jours	4,49	-4,49
Taux de fécondation	-3,37	3,37
% 1GL	-2,96	2,96
Taux d'éclosion	-2,91	2,91

**Tableau 1 : Comparaison des valeurs test pour une partition de l'arbre en deux classes.**

La population P étudiée peut donc se diviser en un groupe de bonnes pontes, caractérisées par une très faible mortalité à 6 jours, des taux de fécondation et d'éclosion élevés et un pourcentage d'œufs à 1 globule supérieur à la moyenne et un groupe de mauvaises pontes ayant les caractéristiques inverses.

La population  $\alpha$  peut à son tour être subdivisée en deux classes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  (tableau 2) très différentes l'une de l'autre.

Classes	Variables	Valeurs Test
$\alpha 1$	Mortalité à 6 jours	3,72
	% 1 GL	-4,02
	Diamètre moyen	-2,87
$\alpha 2$	Durée I-P	2,81
	Volume	-2,52
$\beta$	Taux fécondation	3,20
	% 1 GL	3,12
	Mortalité à 6 jours	-4,84

**Tableau 2 : Comparaison des valeurs test pour une coupure de l'arbre en trois classes.**

La classe  $\alpha 2$  diffère ainsi de la classe  $\alpha 1$  par des volumes de pontes extrêmement faibles et des temps de réponse très longs. Ces trois classes peuvent ensuite être séparées en deux et on aboutit à une partition en six classes décrite dans le tableau 3.

Classes	Variables	Valeurs Test
1	Volume	2,44
	Durée I-P	-2,90
2	Nb œufs dans 500 µl	2,74
	Diamètre moyen	-3,12
3	Mortalité à 6 jours	2,89
	Diamètre moyen	-2,36
4	Durée I-P	3,29
	Nb œufs dans 500 µl	-2,56
γ1	Volume	-2,38
	% 1GL	2,38
γ2	Diamètre moyen	2,36
	Mortalité à 6 jours	-4,03
	-	-

Tableau 3 : Comparaison des valeurs test pour une coupure de l'arbre en six classes.

La classe 1 est caractérisée par un volume d'œufs produits plus important et un temps de réponse plus court que dans le cas des autres pontes du groupe. La classe 2 est formée de pontes dont les œufs sont particulièrement plus petits que la moyenne. La classe 3 se caractérise par des œufs très petits et une absence totale de larves. La classe 4 se distingue enfin par des volumes de pontes extrêmement faibles et des temps de réponse très longs. La classe γ1 est caractérisée par de gros œufs, un fort pourcentage d'œufs à 1 globule et une très bonne survie des larves. Les valeurs tests de la classe γ2 ne sont pas données. En revanche, l'étude des individus de cette classe montre qu'elle est formée des 2 individus ayant produit les meilleures pontes.

Compte tenu de l'organisation du dendrogramme, il apparaît intéressant d'effectuer une dernière partition en scindant la classe γ1 en deux (tableau 4).

Classes	Variables	Valeurs Test
1		
2	Idem partition en 6 classes	
3		
4		
5	Taux de fécondation	3,25
6	Mortalité à 6 jours	-2,75
7	-	-
8	-	-

Tableau 4 : Comparaison des valeurs test pour une coupure de l'arbre en huit classes.

Cette dernière partition permet de caractériser les classes 5 et 6 qui se différencient par de très bons taux de fécondation pour la première et une



survie des larves supérieure pour la seconde. Dans cette partition de l'arbre, les très bonnes pontes de la classe  $\gamma 2$  sont également dissociées en deux classes (7 et 8) composées d'un seul individu.

On peut enfin résumer les résultats de cette étude de la classification sur la figure 6.

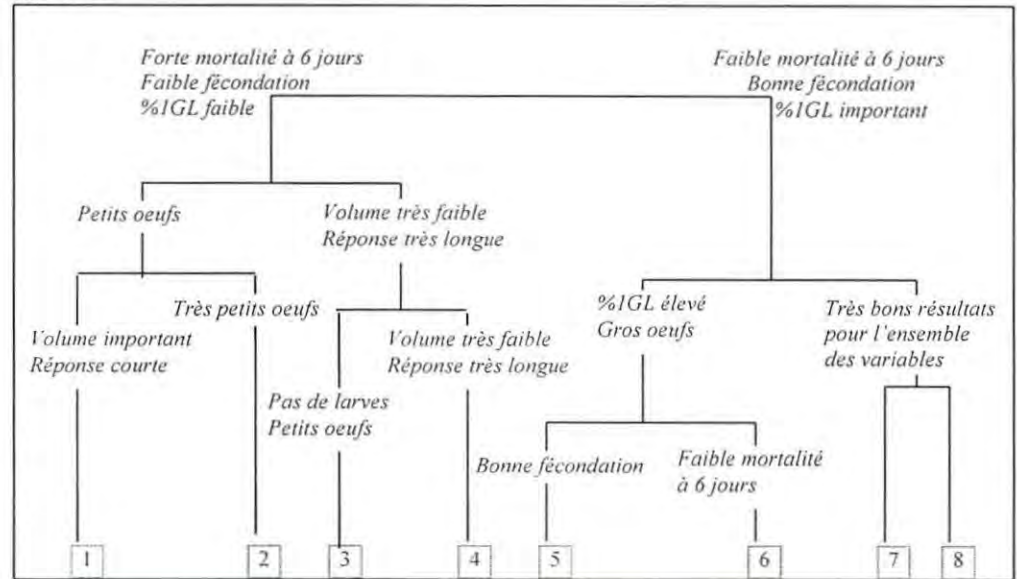


Figure 6: Synthèse des variables ayant le plus contribué à la constitution des différentes classes étudiées.

A partir de cette figure de synthèse, il est possible de proposer une typologie pour les bonnes et les mauvaises pontes. Les variables opposant ces deux types de ponte sont résumées dans le tableau 5.

Variable	Bonne ponte	Mauvaise ponte
Mortalité à 6 jours	faible	forte
% IGL	fort	faible
Taux de fécondation	fort	faible
Taille des œufs	gros	petits

Tableau 5 : Critères de différenciation des bonnes et des mauvaises pontes d'après les résultats de la CAH.

### 3.3.2. DESCRIPTION DES CLASSES

#### ↳ Facteurs caractéristiques des mauvaises pontes :

Les conditions expérimentales conduisant à des pontes de mauvaise qualité (classes 1 à 4) sont présentées dans le tableau 6.

Classe	1			2		3					4		
Indiv. <sup>1</sup>	<i>AI</i>	<i>BI</i>	<i>CI</i>	<i>A2</i>	<i>B2</i>	<i>P1</i>	<i>O1</i>	<i>M2</i>	<i>K2</i>	<i>E3</i>	<i>I2</i>	<i>J1</i>	<i>D1</i>
Dose	50	50	50	50	50	20	20	20	20	20	20	20	20
Stade	C	C	B	C	B	C	C	B	B	B	B	B	B
Homo <sup>2</sup>	3	3	3	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1
Sti/re <sup>3</sup>	Sti	Sti	Sti	Re	Re	Sti	Sti	Re	Re	Re	Re	Sti	Sti

**Tableau 6 : Caractérisation des individus appartenant aux classes 1 à 4.**

Plusieurs éléments intéressants apparaissent dans ce tableau. Le premier est le regroupement dans les classes **1** (les stimulations) et **2** (les restimulations) des femelles ayant subi une stimulation hormonale à  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Ce résultat est très intéressant dans la mesure où il met en évidence que la stimulation à  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  induit des pontes de moins bonne qualité mais très homogènes.

En s'aidant de la synthèse réalisée à la figure 6, on peut décrire le type de ponte obtenue avec cette dose hormonale : les œufs sont petits (particulièrement en restimulation), les temps de réponse sont courts et les volumes émis importants. En outre, les individus de la classe 1 en particulier, soulèvent des questions intéressantes. En effet, ce sont des femelles qui bien qu'ayant été stimulées dans des conditions favorables comme nous le verrons plus tard (stade C, homogénéité de niveau 3), ont eu des mauvais résultats de ponte. L'hypothèse d'une moindre qualité des pontes lors des injections à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  peut donc être posée.

La classe **3** regroupe quant à elle en particulier les mauvaises restimulations. On s'aperçoit que ce sont essentiellement des injections réalisées au stade B et qu'elles ont donné de mauvais résultats malgré une bonne homogénéité des ovocytes (niveau 2 en général). On peut donc également proposer l'hypothèse d'une mauvaise adéquation du stade B en matière de restimulation. Les stimulations "ratées" au stade C apparaissent également dans cette classe. Il est difficile de conclure à leur sujet. On peut néanmoins remarquer que la proportion de mauvaises pontes obtenues au stade C est faible, en particulier si l'on élimine les pontes réalisées après injection à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

La classe **4** des très mauvaises réponses à la stimulation hormonale est enfin constituée de femelles en première stimulation à la dose 20 et au stade B. Cette caractéristique va bien dans le sens des remarques précédentes ; la fréquence des mauvais résultats en stimulation au stade B est vraisemblablement plus élevée qu'au stade C.

<sup>1</sup> Indiv. = individu (numéro d'identification)

<sup>2</sup> Homo = homogénéité

<sup>3</sup> Sti = Stimulation ; Re = Restimulation



### ↳ Facteurs caractéristiques des bonnes pontes :

Les conditions expérimentales conduisant à des pontes de bonne qualité (classes 5 à 8) sont présentées dans le tableau 7.

Classe	5					6					7	8	
Indiv.	<i>FI</i>	<i>EI</i>	<i>II</i>	<i>GI</i>	<i>QI</i>	<i>C2</i>	<i>L1</i>	<i>E2</i>	<i>NI</i>	<i>KI</i>	<i>HI</i>	<i>F2</i>	<i>MI</i>
Dose	20	20	20	20	20	50	20	20	20	20	20	20	20
Stade	C	B	B	B	C	C	B	C	B	B	B	C	B
Homo	3	3	3	2	2	1	1	1	2	3	1	3	2
Sti/Re	Sti	Sti	Sti	Sti	Sti	Re	Sti	Re	Sti	Sti	Sti	Re	Sti

**Tableau 7 : Caractérisation des individus appartenant aux classes 5 à 8.**

Il apparaît clairement ici encore que les niveaux d'homogénéité 2 et 3 (classes 5 et 8) et dans une moindre mesure le stade C (classes 6 et 7) constituent des éléments de réussite. Les individus ayant des ovocytes à un stade de développement très homogène (3) ont de plus conduit à des pontes relativement typées puisqu'un certain nombre d'entre elles ont pu être rassemblées au sein d'une classe spécifique (classe 5), caractérisée par des taux de fécondation supérieurs.

### 3.4. DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES DES PONTES EN FONCTION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

#### 3.4.1. DESCRIPTION DU PLAN FACTORIEL D'ETUDE DE L'ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES (ACP)

L'étude des valeurs propres des premiers axes factoriels met en évidence les caractéristiques suivantes :

Axe	Valeur Propre	Pourcentage	Pourcentage cumulé
1	3,359	30,5	30,5
2	2,562	23,3	53,8
3	1,448	13,2	67,0
4	1,408	12,8	79,8
5	0,602	5,5	85,3

**Tableau 8 : Description des 5 premières valeurs propres de l'ACP.**

Les quatre premiers axes de l'ACP décrivent 80 % de la variabilité des données, le plan factoriel 1-2 rendant compte à lui seul de près de 54 % de



l'information. Il apparaît ainsi dans ce tableau 8 que l'étude des quatre premiers axes est suffisante pour analyser la plus grande partie de la variabilité des données.

L'étude des variables est effectuée dans un premier temps au travers des coordonnées des variables sur les facteurs (axes) 1, 2, 3 et 4, c'est-à-dire des corrélations variable-facteur. Les corrélations les plus importantes sont les suivantes :

- Axe 1 : 0,68 (Mortalité 6j) ; 0,5 (Nb œufs dans 500 µl)  
-0,78 (% IGL) ; -0,76 (Tx fécondation) ; -0,65 (Diamètre moyen) ;  
-0,57 (Temps Létal 50) ; -0,56 (Tx éclosion).
- Axe 2 : 0,89 (Volume) ; 0,88 (Nb œufs émis)  
-0,75 (Durée I-P).
- Axe 3 : 0,47 (Mortalité 6j)  
-0,61 (Tx éclosion) ; -0,56 (Nb œufs dans 500 µl)
- Axe 4 : -0,72 (Survie Larv. Tot.) ; -0,65 (Temps Létal 50)

L'axe 1 peut être interprété globalement comme un " axe qualité des pontes " puisqu'il est composé d'une opposition entre des variables permettant de différencier les bonnes pontes des mauvaises : pourcentage d'œufs à 1 globule lipidique (% IGL), taux de fécondation, diamètre moyen, temps létal pour 50 % des larves (TL50) et taux d'éclosion d'une part, mortalité des larves à 6 jours et nombre d'œufs dans 500 µl d'autre part.

L'axe 2 est quant à lui un axe très fortement corrélé aux variables relatives aux " quantités " d'une part et au temps de réponse des femelles d'autre part.

L'axe 3 et l'axe 4 sont enfin des axes plutôt corrélés aux variables relatives à l'éclosion et à la survie des larves. En revanche, l'axe 3 en particulier, présente des corrélations moins fortes et réparties sur un plus grand nombre de variables n'ayant pas forcément de liens directs les unes avec les autres. L'interprétation de ces axes est moins évidente.

Compte tenu de toutes ces remarques, il apparaît finalement intéressant de mettre de côté les axes 3 et 4 et de s'intéresser à présent plus particulièrement au plan factoriel formé des axes 1 et 2. Une certaine part de la variabilité des données sera vraisemblablement écartée, mais l'essentiel de l'information recherchée pourra être mise en évidence. En effet, ce plan apparaît tout à fait adapté à la caractérisation de l'ensemble des pontes (quantité et qualité) et donc à la recherche d'éventuels effets des différents traitements imposés aux femelles sur la qualité de leur ponte.

Cette capacité de caractérisation des pontes d'un point de vue quantitatif et qualitatif sur le plan factoriel 1-2 est confirmée par le cercle des corrélations (figure 7).

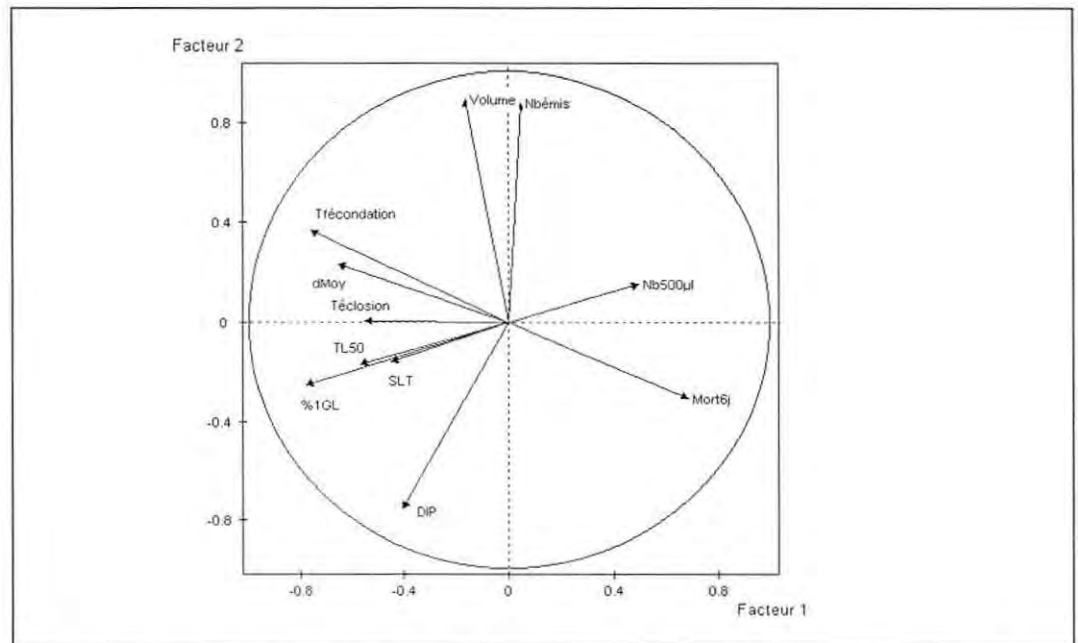


Figure 7 : Cercle des corrélations des variables actives selon les facteurs 1 et 2 de l'ACP.

En outre, ce cercle des corrélations confirme ou fait apparaître les éléments suivants :

- le volume et le nombre d'œufs émis sont deux variables fortement corrélées (0,75 dans la matrice des corrélations) puisque deux variables corrélées de la même manière et de façon importante aux composantes principales sont nécessairement corrélées entre elles (ESCOFIER et PAGES, 1997).
- de la même manière, le TL 50 et la survie larvaire totale (SLT), très proches l'une de l'autre sur le cercle, sont deux variables très corrélées (coefficient de 0,71 dans la matrice des corrélations).
- le taux de fécondation et le taux de mortalité à 6 jours sont en revanche diamétralement opposés et leur coefficient de corrélation est de -0,6. Il est cependant important de demeurer prudent sur l'interprétation de ce résultat.
- le taux de fécondation est presque indépendant du temps de réponse (corrélation très faible entre les deux variables caractérisée par l'orthogonalité de leurs directions et le coefficient de 0,1 donné par la matrice des corrélations).
- pour les mêmes raisons, le volume et le nombre d'œufs dans 500 µl (coefficient de -0,01) apparaissent totalement indépendants.

Grâce à tous ces éléments, il est possible de proposer une aide à l'interprétation de la qualité des pontes dans le plan factoriel 1-2. Ces éléments sont résumés dans la figure 8.

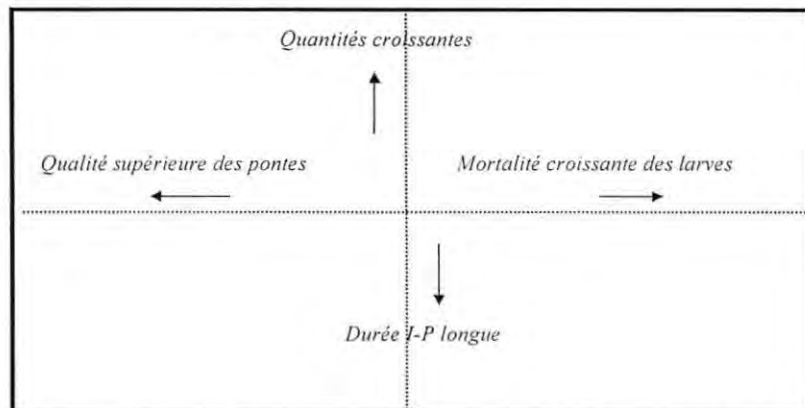


Figure 8 : Aide à la caractérisation des individus sur le plan factoriel 1-2 (Facteur 1 horizontal ; Facteur 2 vertical).

#### 3.4.2. EXPERIENCE N°1 : DETERMINATION DES DOSES EFFECTIVES

Les expérimentations ont permis de tester les doses 10, 20 et 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . La dose 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ne sera plus abordée dans la suite de ce travail car les deux femelles ayant subi une injection hormonale à cette dose n'ont pas répondu à la stimulation. Pour des raisons de disponibilité en temps et en matériel biologique, l'essai n'a pas été renouvelé.

Le tableau 9 présente les résultats de ponte obtenus aux doses 20 et 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Variables	Dose 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (n=20)		Dose 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (n=6)		Proba <sup>4</sup>
	Moy.	Etype	Moy.	Etype	
Temps de réponse (h)	28	3	22,5	3	P<0,01
Volume (ml)	420	229	630	204	P<0,05
Nb œufs émis (milliers)	198,7	141	338,2	109,5	P<0,05
Taux de fécondation (%)	30,2	29	17,8	17,4	NS
Taux d'éclosion (%)	33	29,3	12,1	8	NS
Survie Larvaire Totale (j)	5,2	4,3	2,9	4,1	NS
Taux mortalité à 6 jours (%)	48,3	43,7	76,7	38,3	NS
% d'œufs à 1 Globule lipidique	88,4	9,3	62,8	15,4	P<0,01
Diamètre moyen des œufs ( $\mu\text{m}$ )	856	29	843	47	NS

Tableau 9 : Moyennes et écart-types des variables relatives aux résultats des pontes des femelles induites aux doses hormonales 20 et 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

<sup>4</sup> Proba : Probabilité

↳ Soient tout d'abord les sous-populations A et B différenciées d'après la dose hormonale reçue ( $20$  ou  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Les individus de ces deux populations apparaissent sur la figure 9.

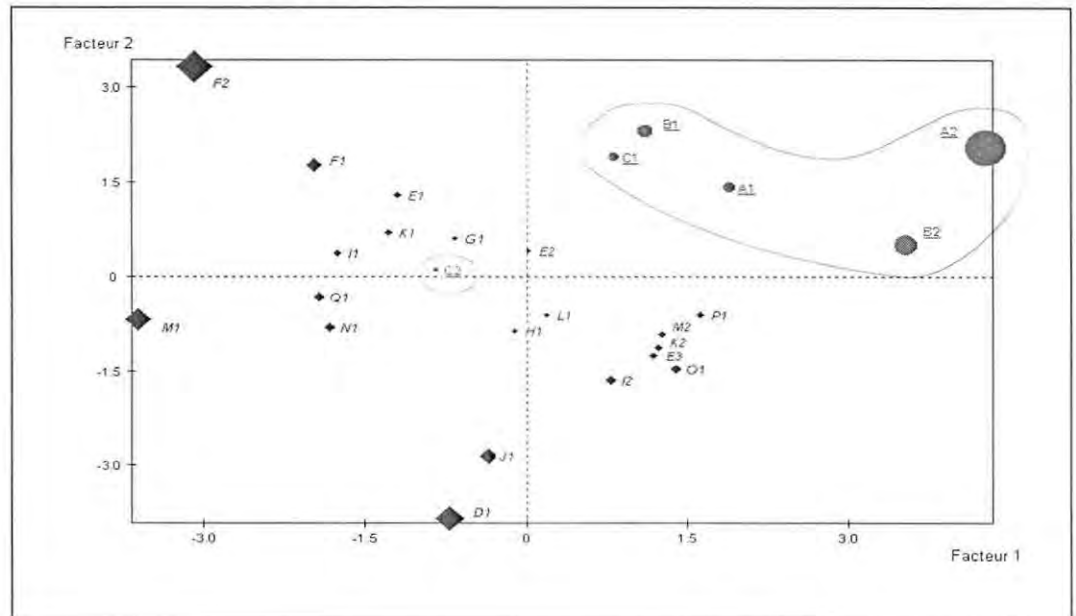


Figure 9 : Comparaison des individus stimulés à la dose  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (losanges) et à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (ronds). (taille des points proportionnelle à la contribution des individus au plan).

Les pontes réalisées à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  se trouvent dans le quart supérieur gauche du plan, nettement à l'écart du reste des pontes. Il s'agit de pontes volumineuses et/ou de durée entre induction et ponte très courte mais de mauvaise qualité. La mortalité des larves est variable mais globalement bien supérieure à la moyenne.

Il apparaît très clairement que les pontes réalisées à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , hormis la ponte de la femelle C2, sont dans l'ensemble de moins bonne qualité que les pontes réalisées à l'aide de la dose  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Il existe néanmoins une importante diversité de pontes au sein du groupe caractérisé par la dose  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

↳ On peut tenter d'affiner cette vision en introduisant le stade (B ou C) auquel ont été réalisées les inductions hormonales (figures 10 et 11).

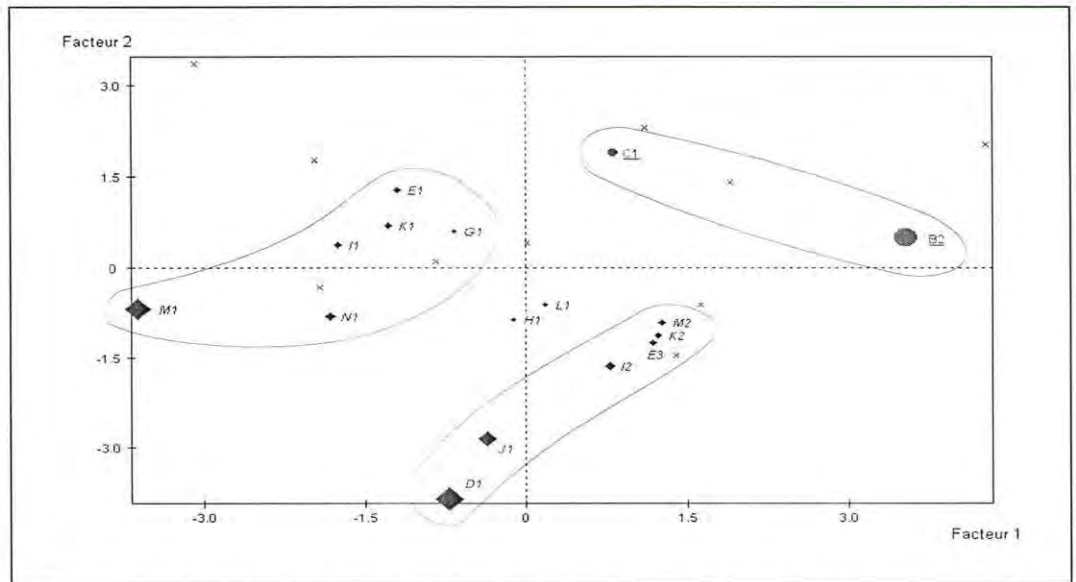


Figure 10 : Comparaison des individus stimulés au stade B à la dose 20 (losanges) et à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (ronds). (taille des points proportionnelle à la contribution des individus au plan).

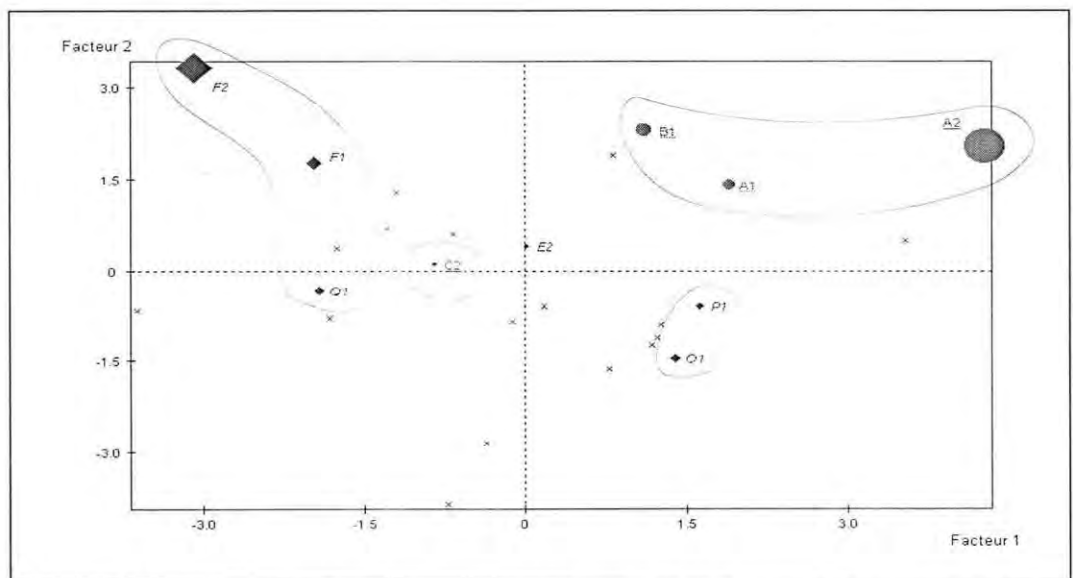


Figure 11 Comparaison des individus stimulés au stade C à la dose 20 (losanges) et à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (ronds). (taille des points proportionnelle à la contribution des individus au plan).

Concernant la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , ces figures mettent en évidence que le seul bon résultat de pontes en terme de qualité a été obtenu chez une femelle au stade C. Cette information est à considérer avec prudence, compte tenu du faible nombre d'individus.



Pour la dose  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , on peut noter un certain décalage du nuage de points vers le haut et vers la gauche pour le lot de femelles stimulées au stade C par rapport à celles stimulées au stade B. On peut donc émettre l'hypothèse d'une réponse plus volumineuse et/ou plus rapide et d'un peu meilleure qualité, lorsque l'induction hormonale est réalisée au stade C.

Cette analyse confirme donc les résultats de la C.A.H. L'effet de la dose hormonale peut enfin être résumé grâce aux résultats de l'analyse de variance (tableau 9) :

- Le temps de réponse est significativement plus court ( $P < 0.01$ ) à la dose 50 (22 h 30 en moyenne) qu'à la dose 20 (28 h 30),
- Les volumes de ponte produits à la dose 50 ( $> 700 \text{ mL}$ ) sont significativement supérieurs ( $P < 0.05$ ) à ceux émis à la dose 20 (380 mL),
- Le nombre d'œufs émis par ponte à la dose 50 ( $340.10^3$ ) est supérieur ( $P < 0,05$ ) à celui émis à la dose 20 ( $200.10^3$ ),
- Le pourcentage d'œufs à 1 globule est significativement supérieur ( $P < 0,01$ ) à la dose 20 (90 %) qu'à la dose 50 (60 %). Si on considère cette variable comme un critère de qualité de la ponte (cf. 3.3.), le pourcentage supérieur d'œufs à 1 globule observé globalement pour les inductions à la dose 20, par rapport à la dose 50, semblerait mettre en évidence la meilleure qualité des pontes obtenues après une induction à cette dose.
- L'étude de la survie larvaire révèle enfin qu'aucune larve n'a été obtenue en stimulation avec la dose 50.

#### 3.4.3. EXPERIENCE N°2 : INFLUENCE DU STADE DE DEVELOPPEMENT SUR LA QUALITE DES PONTES

Les résultats d'ensemble de cette expérience sont présentés dans le tableau 10.

Variables	Stade B (n=16)		Stade C (n=10)		Proba
	Moy.	Etype	Moy.	Etype	
Temps de réponse (h)	28	4	26	3	NS
Volume (ml)	406	215	569	247	NS
Nb œufs émis (milliers)	177,6	88,3	316,2	180	$P < 0,05$
Taux de fécondation (%)	22,8	24	34,6	31,1	NS
Taux d'éclosion (%)	28,3	24	27,9	27,8	NS
Survie Larvaire Totale (j)	4,4	4,4	5,2	4,3	NS
Taux mortalité à 6 jours (%)	56,2	45,6	52,8	42,4	NS
% d'œufs à 1 Globule lipidique	86,9	12,8	75,5	16,9	NS
Diamètre moyen des œufs ( $\mu\text{m}$ )	850	33	859	34	NS

Tableau 10 : Moyennes et écart-types des variables relatives aux résultats des pontes des femelles induites aux stades B et C.



Comme pour les doses, il apparaît une variabilité entre les traitements et au sein même de chacun d'entre eux.

↳ La figure 12 présente l'ensemble des individus injectés au stade B d'une part et au stade C d'autre part.

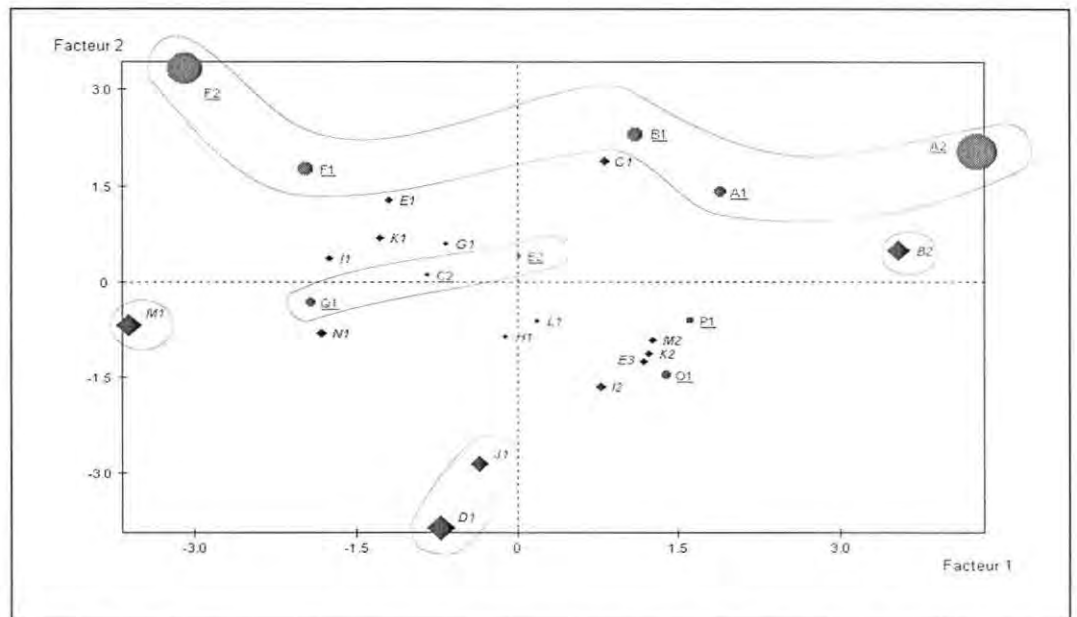


Figure 12 : Comparaison des femelles stimulées au stade B (losanges) et au stade C (ronds) (taille des points proportionnelle à la contribution des individus au plan).

Cette figure confirme les remarques précédentes en mettant en évidence un décalage du nuage des individus stimulés au stade C, vers les valeurs positives sur le facteur 2 (volume supérieur et/ou temps de réponse plus court). D'un point de vue de la qualité de pontes en revanche, il est difficile de s'exprimer puisque chacune des deux populations présente des individus répartis sur toute la longueur du facteur 1. On peut donc émettre l'hypothèse d'une réponse plus volumineuse et/ou plus rapide et peut-être de meilleure qualité, lorsque l'induction hormonale est réalisée au stade C. L'analyse de variance permet finalement de lever cette incertitude en mettant en évidence qu'un nombre d'œufs significativement plus grand ( $P < 0,05$ ) est émis au stade C ( $320 \cdot 10^3$ ) qu'au stade B ( $180 \cdot 10^3$ ).

↳ Par ailleurs, l'homogénéité des échantillons prélevés au cours de la biopsie est apparue de façon empirique au cours des manipulations comme un élément de réussite intéressant à prendre en compte. La figure 13 présente les pontes obtenues en fonction d'une homogénéité croissante de l'échantillon d'ovocytes prélevé.

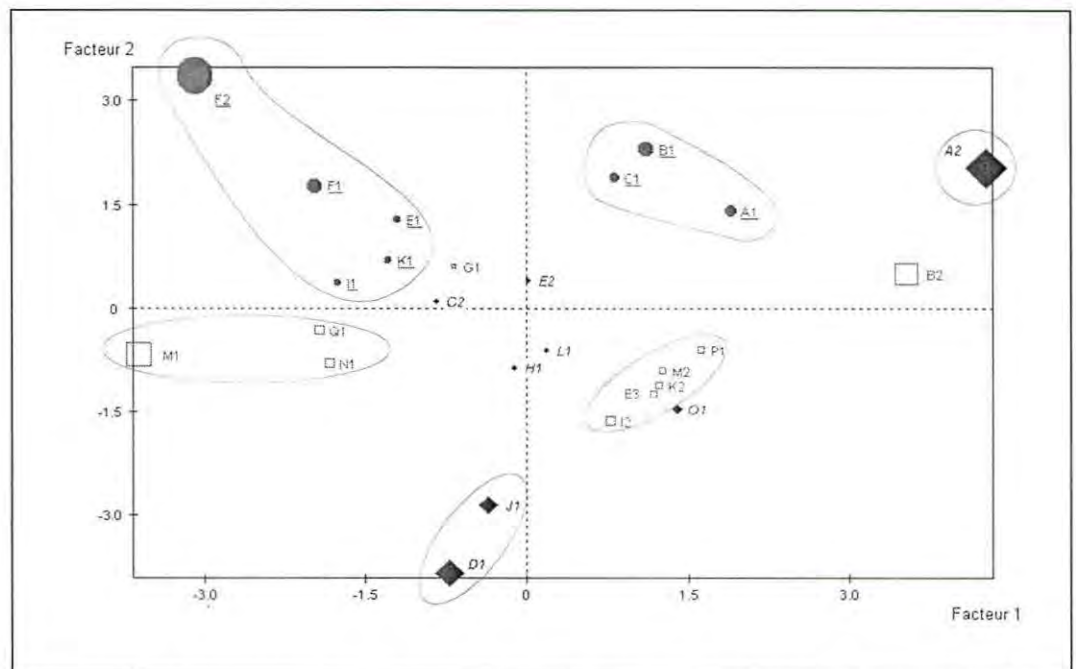


Figure 13 : Comparaison des femelles stimulées aux trois niveaux d'homogénéité des ovocytes (losanges pour le niveau 1, carrés vides pour le niveau 2, ronds pour le niveau 3 ; taille des points proportionnelle à la contribution des individus au plan).

On remarque tout d'abord que pour chacun de ces groupes, des résultats de ponte variables ont été enregistrés. Deux éléments apparaissent néanmoins très nettement sur cette figure. Les pontes obtenues pour une stimulation réalisée avec une très bonne homogénéité (niveau 3) sont corrélées à de très bons résultats de pontes. Les pontes réalisées par des femelles ayant des ovocytes à des stades de développement hétérogènes (niveau 1) peuvent donner des résultats corrects mais aussi les plus mauvais résultats.

Une analyse de variance réalisée sur les trois sous-populations constituées d'échantillons d'homogénéité croissante (Homo 1, 2, 3) confirme la meilleure réussite des pontes lorsque les ovocytes présentent des stades de développement très homogènes au sein de l'ovaire. Le tableau 11 présente les résultats pour les niveaux d'homogénéité 1 et 3. Les résultats du niveau 2 ne sont pas donnés puisqu'ils ne présentent aucune différence significative avec ceux du niveau 1.

Variables	Homogénéité 1 (n=8)		Homogénéité 3 (n=8)		Proba
	Moy.	Etype	Moy.	Etype	
Volume (ml)	320	169	758	161	P<0,05
Nb œufs émis (milliers)	182	166	345	151	P<0,05
Taux de fécondation (%)	12,6	12,5	46,3	27,7	P<0,05
Taux d'éclosion (%)	21,6	19,7	28,4	24,6	NS
Survie Larvaire Totale (j)	5,3	4,2	5,4	4,2	NS
Taux mortalité à 6 jours (%)	51	43	46,1	44,8	NS
% d'œufs à 1 Globule lipidique	84,2	12,1	82,5	20,3	NS
Diamètre moyen des œufs (µm)	847	33	880	13	P<0,05

Tableau 11 : Moyennes et écart-types des variables relatives aux résultats des pontes des femelles induites avec une homogénéité ovarienne de niveau 1 et de niveau 3.

#### 3.4.4. EXPERIENCE N°3 : DETERMINATION DU POTENTIEL DE RESTIMULATION DES FEMELLES

17 femelles ont été stimulées et 9 femelles restimulées au cours des expérimentations. Les résultats d'ensemble de ces travaux sont résumés dans le tableau 12.

Variables	Stimulation (n=17)		Restimulation (n=9)		Proba
	Moy.	Etype	Moy.	Etype	
Temps de réponse (h)	27	3	26	3	NS
Volume (ml)	492	245	486	218	NS
Nb œufs émis (milliers)	213	92,7	305	205	NS
Taux de fécondation (%)	34,2	26,1	20,3	27,5	NS
Taux d'éclosion (%)	34,3	29,2	22,2	22,9	NS
Survie Larvaire Totale (j)	5,1	4,3	3,9	4,4	NS
Taux mortalité à 6 jours (%)	45,8	43,9	62,5	42,4	NS
% d'œufs à 1 Globule lipidique	83,8	15,5	79,5	17,2	NS
Diamètre moyen des œufs (µm)	868	18	830	38	P<0,01

Tableau 12 : Moyennes et écart-types des variables relatives aux résultats des pontes des femelles en première stimulation et en restimulation.

La variabilité semble moins importante entre ces deux populations, mais les variations observées pour les autres traitements sont ici encore visibles.

↳ La comparaison des résultats obtenus pour les femelles en première stimulation et ceux obtenus en restimulation est présentée à la figure 14.

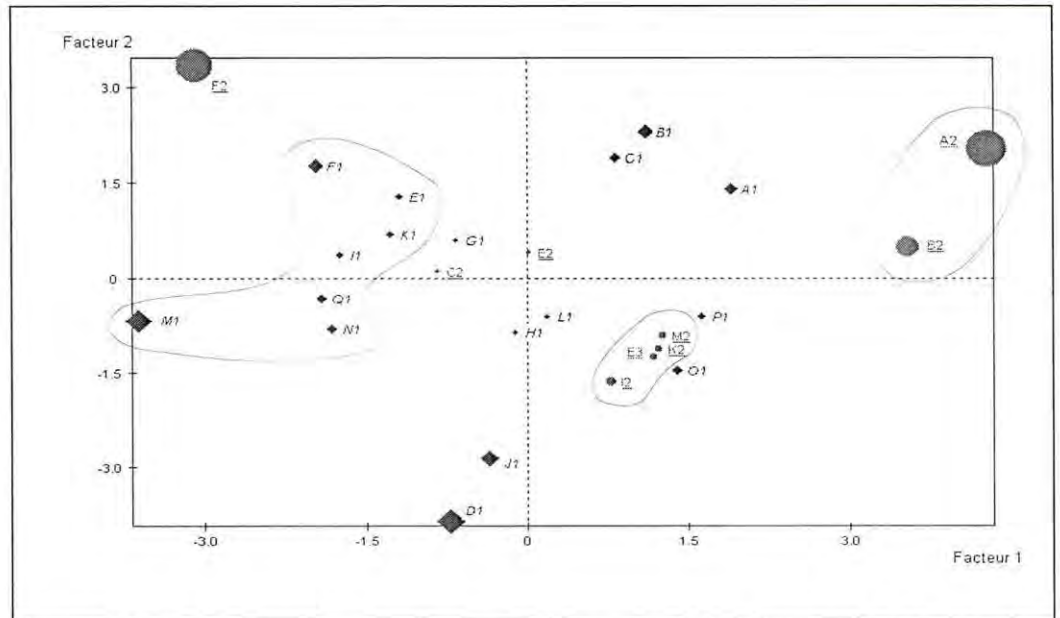


Figure 14 : Comparaison des femelles en première stimulation (losanges) et des femelles restimulées (ronds) (taille des points proportionnelle à la contribution des individus au plan).

L'étude de ce graphe fait apparaître une très grande variété de pontes (sur les facteurs 1 et 2) pour l'un et l'autre de ces traitements : il peut y avoir de très bonnes ou de très mauvaises pontes en stimulation comme en restimulation. On remarque en revanche un plus grand nombre d'individus de première stimulation dans les valeurs négatives du facteur 1, ce qui conduit à penser que ces pontes sont vraisemblablement de meilleure qualité. Concernant les volumes de ponte ou le temps de réponse en revanche, l'étalement des individus sur l'axe 2 ne permet pas de conclure. L'analyse de variance confirme par ailleurs l'absence de différences significatives pour ces variables relatives aux quantités. Elle met en revanche en évidence la très petite taille des œufs produits en restimulation par la différence significative observée pour le diamètre moyen des œufs (tableau 12).

↳ Tentons d'affiner ces premières conclusions en comparant les femelles stimulées et restimulées au stade B et les femelles stimulées et restimulées au stade C (figures 15 et 16).

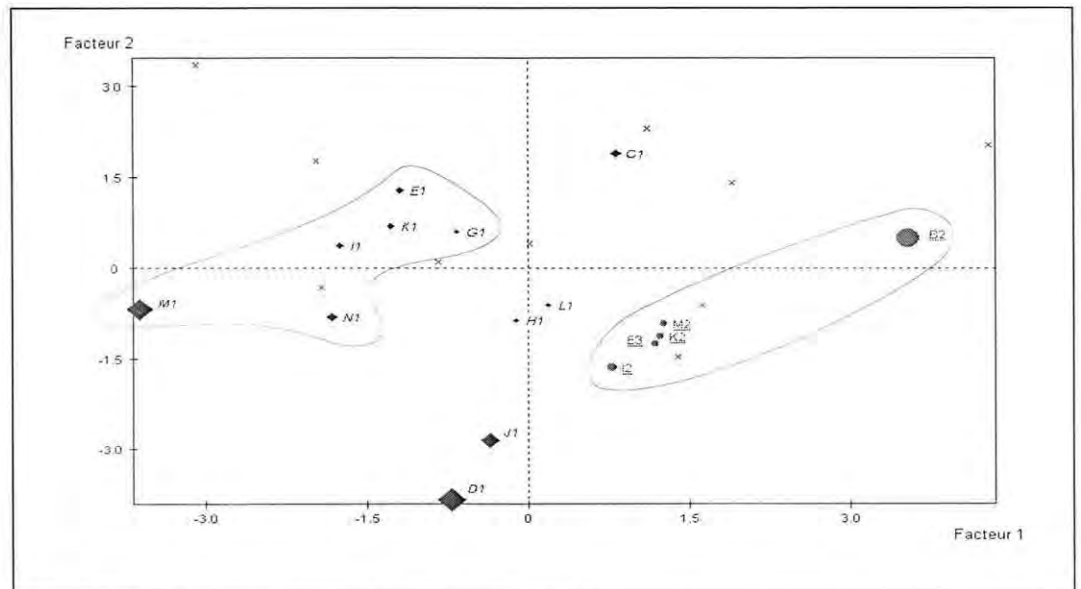


Figure 15 : Comparaison des femelles stimulées (losanges) et restimulées (ronds) au stade B (taille des points proportionnelle à la contribution des individus au plan).

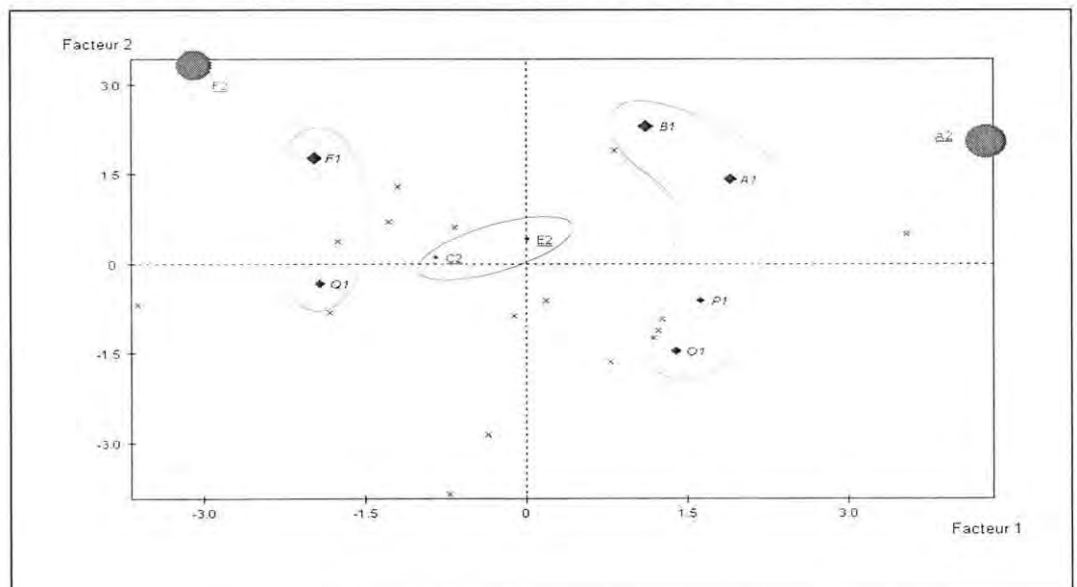


Figure 16 : Comparaison des femelles stimulées (losanges) et restimulées (ronds) au stade C (taille des points proportionnelle à la contribution des individus au plan).

La figure 15 met en évidence que les restimulations effectuées au stade B n'ont jamais donné de bons résultats. La qualité de la ponte, la survie des larves sont moins bonnes, les volumes plus faibles et/ou le temps de réponse plus long en restimulation. Cela permet donc d'appuyer l'hypothèse émise au 3.4. d'une mauvaise adéquation du stade B aux restimulations.

Au stade C (figure 16), il est par contre très difficile de conclure en raison d'un fort étalement des individus des deux populations à la fois sur le facteur 1 et le

facteur 2. Ces résultats sont néanmoins intéressants car, alors que les restimulations au stade B ne donnent pas de bons résultats, les restimulations au stade C peuvent donner de très bons résultats.

Le tableau 13 présente les résultats de pontes obtenus en stimulation et en restimulation aux stades B et C.

Variables	Stade B				Stade C			
	Stimulation (n=11)		Restimulation (n=5)		Stimulation (n=6)		Restimulation (n=4)	
	Moy	Etype	Moy.	Etype	Moy.	Etype	Moy.	Etype
Temps de réponse (h)	28,3	4,5	27	2,5	25,6	3,4	26,1	2,2
Volume (ml)	430	244	355	68	539	243	613	214
Nb œufs émis (milliers)	179	97	174	52	243	88	426	203
Taux de fécondation (%)	34,5	23	5	7,9	33,8	33	35,7	32,8
Taux d'éclosion (%)	40,5	27,8	10,4	14,2	23,7	30,7	34,1	25,5
Survie Larvaire Totale (j)	6,3	3,9	0	0	2,8	3,9	8,8	0,7
Taux mortalité à 6 jours (%)	30	37,6	0	0	71,6	44,1	24,5	19,7
% d'œufs à 1 Globule lipidique	91,5	8	76,6	19,8	70,8	16,8	82,5	16,6
Diamètre moyen des œufs (µm)	868	15	809	21	867	23	846	41

**Tableau 13 : Moyennes et écart-types des variables relatives aux résultats des pontes des femelles en première stimulation et en restimulation aux stades B et C.**

L'analyse de variance réalisée sur ces quatre populations confirme les mauvais résultats de ponte obtenus lors des restimulations au stade B : la taille des œufs ( $P < 0,05$ ), le taux de fécondation ( $P < 0,05$ ), le taux d'éclosion ( $P < 0,05$ ), le pourcentage d'œufs à 1 globule lipidique ( $P < 0,05$ ) et la survie larvaire ( $P < 0,01$ ) sont inférieurs à ceux observés en stimulation au même stade ; le nombre d'œufs émis ( $P < 0,05$ ), le taux de fécondation ( $P < 0,05$ ) et la survie larvaire ( $P < 0,01$ ) sont également inférieurs à ceux observés en restimulation au stade C. Il est important de noter qu'aucune larve n'a été obtenue lors des restimulations au stade B. Au stade C en revanche, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les stimulations et les restimulations.

### 3.4.5. CARACTERISATION DE L'EFFET MALE RENCONTRE

Il est à noter en outre que les mâles utilisés au cours de ces expériences ont bien souvent été les facteurs limitant des manipulations en raison d'une réponse relativement moyenne au conditionnement réalisé. L'idée d'un " effet mâle " est ainsi apparue au cours des expériences, en raison de taux de fécondation parfois surprenants les uns par rapport aux autres pour un même traitement. Si l'étude de la spermiation des mâles sort du sujet de ce travail, il semble en revanche intéressant de mettre en évidence, de façon statistique, que cet " effet mâle " a pu masquer une partie de l'information relative à la qualité des pontes étudiées.

Grâce à l'identification des couples, il a été possible d'associer à chaque ponte le niveau de spermiation du mâle au moment de son isolement avec la femelle dans le bac d'induction (cf. 2.4.). Une analyse de variance a ainsi pu être réalisée entre trois sous-populations de pontes caractérisées par des niveaux croissants de spermiation (1, 2, 3). Cette étude met en évidence que plus les mâles sont spermiant, meilleure est la fécondation ( $P < 0,05$ ).

En outre une analyse de variance réalisée sur le taux d'éclosion a permis de mettre en évidence qu'il n'y a pas de différence significative en matière de taux de fécondation, entre les populations formées par les taux d'éclosion supérieurs et inférieurs à la moyenne. Une influence du taux de fécondation sur les variables relatives aux larves peut donc être écartée.

L'effet mâle a selon toute vraisemblance masqué une partie des résultats ou "dilué" certaines différences entre les populations, mais on peut considérer qu'il n'a pas modifié les tendances lourdes observées au cours des différentes analyses, puisqu'il s'est réparti aléatoirement dans l'ensemble de la population étudiée. Le taux de fécondation demeure un critère d'évaluation de l'influence des traitements étudiés sur la qualité des pontes.





#### 4. DISCUSSION GENERALE

L'utilisation des trois méthodes d'analyse (ACP, CAH, ANOVA) a été utile pour évaluer l'effet des différents traitements expérimentaux sur la qualité des pontes induites. Les buts associés à chacune d'entre-elles ont permis d'identifier des liens entre les variables, entre les individus et entre les variables et les individus. Les analyses factorielles ont conduit à la proposition d'hypothèses concernant les résultats des différentes expériences. Ces hypothèses ont ensuite été confirmées, voire approfondies par les analyses de variance.

L'évaluation de la qualité des œufs grâce à l'utilisation de plusieurs paramètres s'est révélée être une méthode efficace. Cependant, comme KJORSVIK *et al.* (1990) l'ont suggéré, cette évaluation devrait également inclure des tests comparatifs d'autres paramètres tels que la flottabilité des œufs pélagiques, la morphologie (symétrie des divisions...), certaines spécificités de la composition chimique (acides gras, acides aminés libres, minéraux, vitamines), la résistance du chorion, le taux d'embryons et d'alevins normaux, voire même les aberrations chromosomiques. Il faut en revanche souligner que l'étude de l'ensemble de ces paramètres est impossible et que des choix doivent être réalisés en fonction des objectifs poursuivis.

La capacité de stimulation et de synchronisation des pontes de la LH-RHa, présentée pour d'autres espèces (voir introduction) est également vérifiée pour l'ombrine. Ces expériences permettent en outre une diminution importante des doses nécessaires à l'induction hormonale chez l'ombrine puisque la seule dose vraiment étudiée était  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (GOYARD *et al.*, 1993 ; THOMAS *et al.*, 1995). Au cours de ce travail, 25 des 26 stimulations hormonales ont conduit à des pontes, alors qu'aucune ponte spontanée n'a eu lieu parmi les femelles non injectées (témoins) placées dans les mêmes conditions environnementales.

Ainsi, l'augmentation de température durant les expériences ne peut pas être considéré comme un facteur de ponte. En revanche, on peut proposer l'hypothèse que le " choc chaud " subi par les femelles dans les bacs de  $2 \text{ m}^3$  (cf. 2.1.) a entraîné une accélération supplémentaire du processus de maturation finale. Ce choc peut être considéré comme un facteur favorisant la cinétique du processus, mais pas comme un facteur déclenchant.

Une influence de la stimulation hormonale sur le processus de maturation finale a aussi été observé en matière de temps de réponse à la stimulation, de quantités produites et de qualité des pontes. Les pontes sont réparties trois heures autour du temps de réponse moyen. Comme cela a été montré par BRETON *et al.* (1990) chez *Oncorhynchus mykiss* et MYLONAS *et al.* (1992) chez *Salmo trutta*, au cours de nos expériences le temps de réponse a été d'autant plus court que la dose hormonale était élevée et un temps de réponse significativement plus court a été observé lors des stimulations à la dose de  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  ( $22 \text{ h } 30 \pm 3 \text{ h}$ ) par rapport à celles réalisées à la dose  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$  ( $28 \text{ h}$



$\pm 3$  h). Les temps de réponse proposés pour des doses plus fortes ( $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) par GOYARD *et al.* (1993) dans les conditions tropicales martiniquaises et THOMAS *et al.* (1995) sont plus longs (26 à 40 heures et 30 à 35 heures respectivement). Comme cela a été proposé précédemment, cette différence peut-être liée à la température de l'eau durant le processus de maturation finale puisque ces autres travaux ont été réalisés à température inférieure (23 à 24 °C), température correspondant à celle de notre bac de  $16 \text{ m}^3$ .

Des quantités d'œufs significativement plus grandes ont été produites avec les injections à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  par rapport à la dose plus faible. Ce résultat semble aller dans le sens de ceux de THOMAS *et al.* (1995) qui ont obtenu des pontes importantes à la dose de  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . En revanche, FRANCESCON *et al.* (1994) et HARALDSON *et al.* (1993) n'ont pas trouvé de différence significative entre les volumes d'œufs produits aux fortes et aux faibles doses chez *Sparus aurata* et *Salvelinus alpinus* respectivement. Chez *Sciaenops ocellatus*, l'induction à la dose forte semble conduire à la maturation rapide d'un grand nombre d'œufs, comme le mettent en évidence les quantités d'œufs produites. On peut proposer que l'induction à faible dose accélère seulement la cinétique de maturation des ovocytes dont le développement est déjà avancé, alors que les inductions hormonales réalisées à des doses plus fortes engendrent, en plus, la maturation finale d'œufs dont le stade de développement initial est moins avancé. Les résultats de nos expériences sembleraient confirmer cette hypothèse puisqu'en matière de volume, nous avons observé que les femelles stimulées à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  effectuent une première ponte de volume important puis des pontes plus modérées, mais supérieures à la moyenne, lors des restimulations. Les femelles stimulées à la dose  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$  en revanche, ont donné des pontes moins abondantes et n'ont pas présenté de différence sensible entre stimulation et restimulation. La stimulation à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  semble agir comme un catalyseur beaucoup plus puissant. Cet effet dose-dépendant de la LH-RHa a été proposé par GARCIA (1989) qui a observé une augmentation du nombre de réponses pour des doses allant de  $4,75$  à  $75 \mu\text{g.kg}^{-1}$  chez le *Lates calcarifer*. Cette proposition va par ailleurs dans le sens des observations relatives à l'état de développement de l'ovaire des femelles suite aux injections. En effet, les biopsies ont permis de mettre en évidence le maintien d'un niveau de développement ovocytaire avancé pour les femelles initialement stimulées à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Il a ainsi été possible de réaliser sur ce lot des restimulations très rapides (15 jours, délai minimal imposé), voire même une seconde restimulation, quatre semaines après la première injection. Les femelles stimulées initialement à la dose de  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , ont en revanche présenté des cinétiques d'évolution de l'ovaire post-injection beaucoup plus variées. Certaines femelles sont revenues en quinze jours à un stade de développement suffisant, mais la plupart d'entre-elles ont nécessité un délai plus important, de l'ordre de 3 à 4 semaines (supérieur au mois dans certains cas). Cette dépression des stades ovocytaires post-injection



est cependant relatée dans la bibliographie (FRANCESCON *et al.*, 1994). L'induction à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  semble ainsi induire de manière durable la mise en place du processus hormonal de maturation finale des ovocytes. Les travaux de BILLARD *et al.* (1987), BRETON *et al.* (1990) et CRIM *et al.* (1988) relatifs à l'étude des niveaux d'hormones gonadotropes circulantes suite aux injections à la LH-RH sembleraient eux aussi confirmer la vraisemblance de cette hypothèse.

En ce qui concerne la qualité, une plus grande fragmentation du globule lipidique a été observée à la dose  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  et au stade B en restimulation. Grâce aux travaux de CARRILLO *et al.* (1995) et FAUVEL et SUQUET (1998) sur le bar, *Dicentrarchus labrax*, ce phénomène peut être considéré comme un critère d'évaluation de la qualité de la ponte : plus la fragmentation est élevée, moins la ponte est de bonne qualité. Ce résultat est aussi en accord avec ceux de FRANCESCON *et al.* (1994) qui ont montré chez la daurade une corrélation directe entre la dose de LH-RH injectée et le fractionnement du globule. GILLET *et al.* (1996) ont aussi montré une corrélation négative entre le niveau de gonadotrophines plasmatiques (GtH2) et la survie des œufs. Comme cela a été proposé précédemment, cette baisse de qualité des œufs peut être mise en rapport avec la perturbation de la cinétique de maturation finale et d'ovulation engendrée par l'injection de LH-RH (MYLONAS *et al.*, 1992). En revanche, si l'influence de la stimulation hormonale sur les œufs et la descendance ne peut pas être écartée, elle doit tout de même être discutée puisque certains auteurs n'ont pas observé d'influence sur la taille des œufs, les taux de mortalité et d'éclosion ou la longueur des alevins (HARALDSON *et al.*, 1993 ; HARMIN *et al.*, 1992 ; MYLONAS *et al.*, 1996 ; WOODS *et al.*, 1993). De nombreux autres facteurs influencent cependant la qualité des œufs (BROOKS *et al.*, 1997 ; KJORSVIK *et al.*, 1990).

En matière de taux de fécondation, l'influence de la stimulation hormonale proposée par différents auteurs (GARCIA, 1989 ; MYLONAS *et al.*, 1992 ; HARALDSSON *et al.*, 1993) a été vérifiée au cours de ce travail, mais la variabilité observée peut aussi être associée aux femelles et aux mâles eux-mêmes (" effet mâle " présenté).

L'influence de l'état initial (état de développement ovarien et homogénéité, rang de stimulation) sur la qualité des pontes induites a été mise en évidence dans certains cas particuliers. Les injections au stade C ont conduit à des pontes significativement plus importantes et plus constantes qu'au stade B. Cette influence du stade de développement ovocytaire a été relatée pour la première fois par WEIL *et al.* (1978) qui ont observé une meilleure réponse à la stimulation hormonale chez des femelles en période de maturation vitelline que chez des femelles immatures ou aux premiers stades de la maturation ovocytaire. Nos résultats sont aussi conformes à ceux présentés par THOMAS *et al.* (1995) qui ont obtenu de bons résultats en travaillant sur des ovocytes d'un diamètre supérieur ou égal à  $600 \mu\text{m}$ . En effet, ces ovocytes doivent être

au stade C puisque les biopsies réalisées ont permis d'établir que ce type d'ovocytes présentent des diamètres de l'ordre de 570 à 650  $\mu\text{m}$  alors que le stade B n'a pas été observé à un diamètre supérieur à 580  $\mu\text{m}$ . FAUVEL et SUQUET (1998) observent également cette influence du stade développement et montrent que les injections au stade C conduisent à des volumes d'œufs plus grands et à des pourcentages d'œufs à un globule lipidique supérieurs, par rapport à celles réalisées au stade B. Ce second résultat n'a pas été observé au cours de nos expériences.

L'homogénéité ovarienne observée dans l'échantillon d'ovocytes prélevé au cours des biopsies est enfin apparue comme un nouveau critère intéressant pour prévoir les possibilités de succès ou d'échec d'une stimulation hormonale.

Des différences significatives ont été observées entre les premières stimulations et les restimulations en matière de taille des œufs, les secondes produisant dans l'ensemble de plus petits œufs. Ce résultat est conforme à ceux observés par HARALDSSON *et al.* (1993) pour l'omble chevalier, *Salvelinus alpinus* et par McEVOY *et al.* (1991) pour le turbot, *Scophthalmus maximus* en pontes naturelles successives. Par ailleurs, le stade B apparaît inadéquat aux restimulations, alors que le stade C a donné de bons résultats.

En dépit de la grande diversité observée en matière de taux d'éclosion et de survie larvaire, les analyses n'ont pas permis de conclure à des différences significatives entre les traitements, exception faite du stade C qui est apparu comme un facteur de succès des stimulations hétérologues.

## CONCLUSION

Les doses  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$  et  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de [D-Trp<sup>6</sup>] LHRHa ont permis d'induire et synchroniser les pontes de l'ombrine, *Sciaenops ocellatus*. L'accélération des processus de maturation finale des ovocytes et d'ovulation consécutive à la stimulation hormonale a eu une influence sur la qualité des œufs, puis sur la possibilité d'obtenir des larves. L'utilisation de la dose " forte " ( $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) est intéressante en raison de l'importance des volumes d'œufs produits et du maintien des femelles dans un état de développement ovocytaire avancé. En revanche, les stimulations à la dose de  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$  ont en général conduit à des pontes de meilleure qualité et nous recommandons ainsi l'utilisation de cette dose dans une optique de production. La bonne qualité et la plus grande régularité des pontes obtenues lors des stimulations au stade C met en évidence une influence du stade de développement sur la qualité de la réponse à la stimulation hormonale. L'homogénéité de développement des ovocytes observée au sein de l'ovaire lors des biopsies apparaît comme un critère intéressant pour prévoir les possibilités de succès ou d'échec d'une stimulation hormonale. Enfin, un potentiel intéressant a été observé en matière de restimulation. Les femelles présentant des ovocytes ayant au moins atteint le stade C peuvent être restimulées avec succès.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier tout particulièrement Marc Taquet (Ifremer, Martinique) pour ses conseils et son aide, Marc Suquet (Ifremer, Brest) pour sa contribution à l'amélioration du manuscrit et la Région Martinique pour le financement de ce travail dans le cadre du Contrat de Plan Etat-Région 1994 - 1998.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKO H., TAMARU C.S., CHENG SHENG L. 1994. Chemical and physical differences in milkfish (*Chanos chanos*) eggs from natural and hormonally induced spawns. *Aquaculture*. **Vol. 127**, pp. 157-167.
- ANONYME. 1977. A new highly effective ovulating agent for fish production - Practical application of LH-RH analogue for the induction of spawning of farm fishes. *Scientia Sinica*. **Vol. 20**, No. 4, pp. 469-474.
- ARIMURA A., VILCHEZ-MARTINEZ J.A., COY D.H., COY E.J., HIROTSU Y., SCHALLY A.V. 1974. D-Ala<sup>6</sup>, Des-Gly<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>-LH-RH ethylamide : a new analogue with unusually high LH-RH / FSH-RH activity. *Endocrinology*. **Vol. 95**, pp.1174-1177.
- ARNOLD C.R. 1988. Controlled year-round spawning of red drum (*Sciaenops ocellatus*) in captivity. *Contribution in Marine Science*. **Vol. 30**, pp. 65-70.
- ARNOLD C.R. 1991 Precocious spawning of red drum. *The Progressive Fish-Culturist*. **Vol. 53**, pp. 50-51.
- BARNABE G., BARNABE-QUET R. 1985. Avancement et amélioration de la ponte induite chez le loup (*Dicentrarchus labrax*) à l'aide d'un analogue de LH-RH injecté. *Aquaculture*. **Vol. 49**, pp. 125-132.
- BECKMAN D.W., WILSON C.A., STANLEY A.L. 1988. Age and growth of red drum, *Sciaenops ocellatus*, from offshore waters of the northern Gulf of Mexico. *Fishery Bulletin*. **Vol. 87**, pp. 17-28.
- BERLINSKY D.L., KING W.V., SMITH T.I.J., HAMILTON R.D., HOLLOWAY J., SULLIVAN C.V. 1996. Induced ovulation of southern flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants. *Journal of the World Aquaculture Society*. **Vol. 27**, pp.143-152.
- BILLARD R., BIENIARZ K., POPEK W., EPLER P., BRETON B., ALAGARSWAMI K. 1987. Stimulation of gonadotropin secretion and spermiation in carp by pimozone-LH-RH treatment : effects of dose and time of day. *Aquaculture*. **Vol. 62**, pp. 161-171.



---

BRETON B., WEIL C., SAMBONI E., ZOHAR Y. 1990. Effects of acute versus sustained administration of GnRHa on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. **Vol. 91**, pp. 373-383.

BROOKS S., TYLER C.R., SUMPTER J.P. 1997. Egg quality in fish : what makes a good egg ? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. **Vol. 7**, pp. 387-416.

BROWN-PETERSON N., THOMAS P., ARNOLD C.R. 1988. Reproductive biology of the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) in south Texas. *Fishery bulletin*. **Vol. 86**, No 2, pp. 373-388.

CARRILLO M., ZANUY S., PRAT F., CERDA J., RAMOS J., MANANOS E., BROMAGE N. 1995. Seabass (*Dicentrarchus labrax*), in : Broodstock management and egg and larval quality, London : Blackwell Science, pp. 138-168.

CAROLSFELD J., RAMOS S.M., ORMANEZI R., GOMES J.H., BARBOSA J.M., HARVEY B. 1988. Analysis of protocols for application of an LHRH analog for induced final maturation and ovulation of female pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*. **Vol.74**, pp. 49-55.

CHUDA H., MATSUYAMA M., IKEDA Y., MATUSURA S. 1997. Development of the maturation and ovulation induction method in cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes*, by hormonal treatments. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **Vol. 63**, pp. 728-733.

CRIM L.W., EVANS D.M., VICKERY B.H. 1983. Manipulation of the seasonal reproductive cycle of the landlocked atlantic salmon (*Salmo salar*) by LH-RH analogs administered at various stages of gonadal development. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **Vol. 40**, pp. 61-67.

CRIM L.W., GLEBE B.D., SCOTT A.P. 1986. The influence of LHRH analog on oocyte development and spawning of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. **Vol. 56**, pp.139-149.

CRIM L.W., SHERWOOD N.M., WILSON C.E. 1988. Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH analog (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture*. **Vol. 74**, pp. 87-95.



- 
- DAGNELIE P. 1975. Théories et méthodes statistiques. Applications agronomiques. Vol. 2. Les méthodes de l'inférence statistique. Gembloux : Les Presses Agronomiques de Gembloux. 463 p.
- DEROZIER C. 1989. L'anesthésie du poisson au phénoxy-2 éthanol. Thèse de docteur vétérinaire. Nantes : Ecole Nationale Vétérinaire. 100p.
- DONALDSON E.M., HUNTER G.A., DYE H.M. 1982. Induced ovulation in coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*). Preliminary study of the use of LH-RH and two high potency LH-RH analogues. *Aquaculture*. Vol. 26, pp. 129-141.
- DYUBIN V.P., BAYUNOVA N.N. 1993. Physiological condition of juvenile chum salmon, *Oncorhynchus keta*, reared from hormonally stimulated females. *Journal of Ichthyology*. Vol. 33, pp. 127-133.
- ESCOFIER B., PAGES J. 1997. Initiation aux traitements statistiques Méthodes, méthodologie. Rennes : Presses Universitaires de Rennes. 263p.
- FASQUEL A.C. 1997. Recherche d'un éventuel effet de la stimulation hétérologue de la ponte sur la qualité des œufs du bar (*Dicentrarchus labrax*). Mémoire de maîtrise. Lille : Université des Sciences et Technologies. 31p.
- FAUVEL C, SUQUET M. 1998. La qualité des gamètes chez le bar et son déterminisme en aquaculture. in: Proceedings of Avancées récentes en reproduction et élevage larvaire des espèces aquacoles (Atelier professionnel ENITA-IFREMER), Bordeaux Aquaculture 1998, Bordeaux, France, 5p (in press).
- FERMIN A.C., LARON M.A., REYES D.M. 1991. Multiple gonadal maturation and re-maturation after hormone-induced spawning in bighead carp, *Aristichthys nobilis*. *Philipp. Sci.* Vol. 28, pp. 77-88.
- FITZHUGH G.R., SNIDER T.G., THOMPSON B.A. 1988. Measurement of ovarian development in red drum (*Sciaenops ocellatus*) from offshore stocks. *Contributions in Marine Science*. Vol. 30, pp. 79-86.
- FRANCESCON A. BARBARO A. COLOMBO L. BOZZATO G. CHIEREGHIN S. BELVEDERE P. 1994. Induction of multiple spawning in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) by LH-RH analogue treatments and their influence on egg quality. *Riv. Ital. Acquacolt.* Vol. 29, pp. 109-120.



---

GARCIA L.M. 1989. Dose-dependent spawning response of mature female sea bass, *Lates calcarifer*, to pelleted Luteinizing Hormon Releasing Hormon analogue (LH-RHa). *Aquaculture*. **Vol.77**, pp. 85-96.

GILLET C., BRETON B., MIKOLAJCZYK T. 1996. Effects of GnRHa and pimozide treatments on the timing of ovulation and on egg quality in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) at 5 and 10°C. *Aquatic Living Ressources*. **Vol. 9**, pp. 257-263.

GOYARD E., FALGUIERE J.C., SOLETCHNIK P. 1993. L'élevage de l'ombrine (*Sciaenops ocellatus*) en Martinique : I - Maturation des géniteurs et production d'alevins. Le Robert : IFREMER, RIDRV n° 93017-RA / Martinique. 73 p.

HARALDSSON H., SVEINSSON T., SKULASON S. 1993. 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*. **Vol. 24**, pp. 145-150.

HARMIN S.A., CRIM L.W. 1992. Gonadotropic hormone-releasing hormone analog (GnRH-A) induced ovulation and spawning in female winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Aquaculture*. **Vol. 104**, pp. 375-390.

HOLT G.J., HOLT S.A., ARNOLD C.R. 1985. Diel periodicity of spawning in sciaenids. *Marine Ecology - Progress Series*. **Vol. 27**, pp. 1-7.

KJORSVIK E., MANGOR-JENSEN A., HOLMEFJORD I. 1990. Egg quality in fishes. *Advances in Marine Biology*. **Vol. 26**, pp. 71-113.

LEE C.S., TAMARU C.S., WEBER G.M. 1987a. Studies on the maturation and spawning of milkfish (*Chanos chanos*) in a photoperiod-controlled room. *Journal of the World Aquaculture Society*. **Vol. 18**, No. 4, pp. 253-259.

LEE C.S., TAMARU C.S., MIYAMOTO G.T. KELLEY C.D. 1987b. Induced spawning of grey mullet (*Mugil cephalus*) by LH-RHa. *Aquaculture*. **Vol. 62**, pp. 327-336.

McEVOY L.A., McEVOY J. 1991. Size fluctuation in the eggs and newly hatched larvae of captive turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biol. Assoc. U.K.* **Vol. 71**, pp.679-690.



---

MONAHAN M.W., AMOSS M.S., ANDERSON H.A., VALE W. 1973. Synthetic analogs of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor with increased agonist properties. *Biochemistry*. **Vol. 122**, pp. 4616-4620.

MORINEAU A. 1984. Note sur la caractérisation statistique d'une classe par les valeurs tests. *Bulletin du Centre International de Statistiques et d'Informatique Appliquée*. **Vol 2-1**, pp. 20-27.

MUGNIER C. 1996. Analyse morphologique et endocrinienne des dernières étapes de l'ovogénèse et recherche d'un traitement de l'induction de l'ovulation chez le turbot *Scophthalmus maximus*. (Thèse de Doctorat) Rennes : Université de Rennes I - U.F.R. Sciences de la vie et de l'environnement. 100 p.

MURPHY M.D., TAYLOR R.G. 1990. Reproduction, growth and mortality of red drum *Sciaenops ocellatus* in Florida waters. *Fishery Bulletin*. **Vol. 88**, pp. 531-542.

MYLONAS C.C., HINSHAW J.M., SULLIVAN C.V. 1992. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture*. **Vol. 106**, pp. 379-392.

MYLONAS C.C., ZOHAR Y., RICHARDSON B.M., MINKKINEN S.P. 1995. Induced spawning of wild american shad, *Alosa sapidissima*, using sustained administration of gonadotrophin-releasing hormone analog (GnRHa). *Journal of the World Aquaculture Society*. **Vol. 26**, No 3, pp. 210-217.

MYLONAS C.C., MAGNUS Y., GISSIS A., KLEBANOV Y., ZOHAR Y. 1996. Application of controlled-release, GnRHa-delivery systems in commercial production of white bass × striped bass hybrids (sunshine bass), using captive broodstocks. *Aquaculture*. **Vol. 140**, pp. 265-280.

NACARIO J.F. 1983. Releasing hormones as an effective agent in the induction of spawning of the sea perch (*Lates calcarifer*) in captivity. Manila : Terramar Bay Farms INC. 10 p.

OVERSTREET R.M. 1983. Aspects of the biology of the red drum, *Sciaenops ocellatus*, in Mississippi. *Gulf Research Reports Supplement 1*. pp. 45-68.

PARFOURU D., FAUVEL C. 1997. Développement ovocytaire chez l'ombrine (*Sciaenops ocellatus*) en conditions tropicales martiniquaises, in : Proc. Gulf Carrib. Fish. Inst. 50th, 22 p (in press).



---

ROBERTS D.E. 1990. Photoperiod/Temperature control in the commercial production of red drum (*Sciaenops ocellatus*) eggs, in : Red drum aquaculture, Texas : G.W. Chamberlain, R.J. Miget et M.G. Haby éd., pp. 35-43.

ROBERTS D.E., HARPSTER B.V., HENDERSON G.E. 1978. Conditioning and induced spawning of the red drum (*Sciaenops ocellatus*) under varied conditions of photoperiod and temperature. *Proceeding of the World Mariculture Society*. Vol. 9, pp. 311-332.

ROSS J.L., STEVENS T.M., VAUGHAN D.S. 1995. Age, growth, Mortality and reproductive biology of red drums in north Carolina waters. *Transactions of the American Fisheries Society*. Vol. 124, pp. 37-54.

TAMARU C.S., LEE C.S., KELLEY C.D., BANNO J.E., HA P.Y., AIDA K., HANYU I. 1988. Characterizing the stage of maturity most receptive to an acute LHRH analogue therapy for inducing milkfish (*Chanos chanos*) to spawn. *Aquaculture*. Vol. 74, pp.147-163.

TAN-FERMIN J.D., PAGADOR R.R., CHAVEZ R.C. 1997. LHRHa and pimozide-induced spawning of asian catfish *Clarias macrocephalus* at different times during an annual reproductive cycle. *Aquaculture*. Vol. 148, pp.323-331.

THOMAS P., BOYD N.W. 1988. Induced spawning of spotted sea trout, red drum and orangemouth corvina (family : Scianidae) with Luteinizing Hormone-Releasing Hormone analog injection, in : Contributions in Marine Science. Red drum aquaculture. Proceedings of a symposium on the culture of red drum and other warm water fishes, Port Aransas : Marine Science Institute, Vol. 30, pp. 43-48.

THOMAS P., BOYD N.W. 1989. Dietary administration of an LH-RH analogue induces spawning of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Aquaculture*. Vol. 80, pp. 363-370.

THOMAS P., ARNOLD C.R., HOLT G.J. 1995. Red drum and other sciaenids, in : Broodstock management and egg and larval quality, Oxford : Blackwell Science Ltd, pp. 118-137.

WALLACE R.A., SELMAN K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist*. Vol. 21, pp. 325-343.

WALLACE R.A., SELMAN K., GREELEY M.S., BEGOVAC P.C., LIN Y.W., MCPHERSON R., PETRINO T.R. 1987. Current status of oocyte



---

growth, in : International Symposium on reproductive physiology of fish, St Johns : Memorial University of Newfoundland, pp. 167-177.

WARD J.H. 1963. Hierarchical grouping to optimize and objective function. *Journal of American Statistics Association*. **Vol. 58**.

WEIL C., BILLARD R., BRETON B., JALABERT B. 1978. Pituitary response to LH-RH at different stages of gametogenesis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*. **Vol. 18**, pp. 863-869.

WILSON C.A., NIELAND D.L. 1994. Reproductive biology of red drum, *Sciaenops ocellatus*, from the neritic waters of the northern Gulf of Mexico. *Fishery Bulletin*. **Vol. 92**, pp. 841-850.

WOODS L.C., SULLIVAN C.V. 1993. Reproduction of striped bass, *Morone saxatilis*, broodstock : monitoring maturation and hormonal induction of spawning. *Aquaculture and Fisheries Management*. **Vol. 24**, pp. 211-222.

YAMAMOTO K. 1956. Studies on the formation of fish eggs. I. Annual cycle in the development of ovarian eggs in the flounder (*Liopsetta obscura*). *J. Fac. Sci. Okkaido Univ. Ser. VI, Zool.* **Vol 12**, pp. 362-373.

ZIMMERMAN M. 1997. maturity and fecundity of arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) from the Gulf of Alaska. *Fishery Bulletin*. **Vol. 95**, pp. 598-611.

ZOHAR Y., BILLARD R., WEIL C. 1984. La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*) : connaissance du cycle sexuel et contrôle de la gamétogénèse et de la ponte, in : L'aquaculture du bar et des sparidés, Paris : INRA Publications, pp. 3-24.

