

N° d'ordre : 2828

THÈSE

Présentée

devant L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : BIOLOGIE

par

Frédéric GLASSER

Équipe d'accueil : Institut National de la Recherche Agronomique, Station Commune de Recherches en Ichtyophysiologie, Biodiversité et Environnement (INRA-SCRIBE – Rennes).

École Doctorale : Vie-Agro-Santé

Composante universitaire : UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

TITRE DE LA THÈSE :

**L'influence des facteurs externes sur la reproduction de la carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella*) en zone tropicale :
une approche descriptive et expérimentale**

SOUTENUE LE 23 AVRIL 2003 devant la commission d'examen

COMPOSITION DU JURY :

M. Daniel Boujard, professeur à l'Université de Rennes 1, président

M. Roland Billard, professeur honoraire au Muséum National d'Histoire Naturelle, rapporteur

Mme Sylvie Dufour, directeur de recherche au CNRS, rapporteur

M. Bernard Breton, directeur de recherches

M. Bernard Jalabert, directeur de recherches à l'INRA

M. Tomasz Mikolajczyk, enseignant-chercheur à l'Académie d'Agriculture de Cracovie

Remerciements

Ces travaux ont associé de nombreux partenaires en France, en Côte d'Ivoire et en Pologne, sans lesquels ils n'auraient pu être menés à bien.

Le Cirad (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) et l'Apdra-f (Association Pisciculture et Développement Rural en Afrique tropicale humide – France) sont à l'origine de la collaboration entre ces différents acteurs.

En France, je souhaite remercier Bernard Breton, Bernard Jalabert (Inra) et Jean-François Baroiller (Cirad) pour avoir encadré mes travaux, ainsi que le personnel de la station Inra-Scribe pour leur soutien ; l'aide de Chantal Cauty, Brigitte Mourot, Hélène Rime et Elisabeth Sambroni a été particulièrement précieuse. Je remercie Alexis Fostier pour la mise à disposition des dosages de stéroïdes. L'Apdra-f a également participé à leur financement et sa réflexion autour des problématiques de développement de la pisciculture artisanale a été une base pour ma démarche. Merci à Marc Oswald, son directeur à l'époque, pour avoir encadré mes travaux et apporté un regard extérieur éclairant. Je suis reconnaissant à Sylvie Dufour et Roland Billard d'avoir été les rapporteurs de ma thèse, à Christian Saligaut d'avoir accepté de participer au jury de soutenance. Daniel Boujard a accepté de présider le jury malgré ses nombreuses occupations, qu'il en soit remercié. Je tiens à remercier également Jean-Pierre Masson (ENSAR) qui m'a conseillé pour les analyses statistiques, Agnès Girard et Claudine Weil pour la relecture du manuscrit.

De la même façon, je souhaite remercier tous les participants ivoiriens à ces travaux. Mes recherches en Côte d'Ivoire ont été conduites au sein de l'Apdra-CI (APDRA – Côte d'Ivoire), à qui va toute ma reconnaissance, en particulier à Daouda Bambara, responsable de la station de recherches de Gagnoa, et à Dramane Coulibaly, son directeur, ainsi qu'à toute l'équipe de l'association pour leur soutien. Les autorités ivoiriennes ont permis la poursuite du projet pendant toutes ces années, et j'espère que le développement de l'élevage de la carpe herbivore sera profitable pour le pays. La Coopération française à Abidjan a apporté une aide précieuse, financière et morale, au projet, en particulier Philippe Rémy, Philippe Steinmetz et François Champanhet. La délégation du Cirad à Abidjan a suivi le projet avec attention. L'Université de Cocody à Abidjan a également collaboré à ce projet, merci au Professeur Kouassi N'Guessan pour son accueil, j'espère que cette collaboration se poursuivra. J'ai également bénéficié de l'hospitalité de L'Association Française des Volontaires du Progrès.

En Pologne, j'ai été accueilli dans le laboratoire d'ichtyologie de l'Académie d'Agriculture à Mydlniki (Cracovie). Merci à Tomek Mikolajczyk, Jarek Chyb, Magda Socha et Mirka Sokolowska-Mikolajczyk pour leur accueil et leur aide pour les manips.

Enfin, je souhaite remercier mes parents et amis, de Rennes et d'ailleurs, qui m'ont permis de passer des moments si agréables en dehors de la thèse.

Sommaire

Introduction.....	7
1. la pisciculture artisanale en Côte d'Ivoire et l'intégration de la carpe herbivore	9
1.1 le contexte économique de la filière.....	9
1.2 le milieu naturel et le système agraire local	10
1.3 l'intégration de la pisciculture	11
1.4 les bases techniques de la production.....	15
1.5 l'opportunité d'intégrer une espèce végétarienne et le choix de la carpe herbivore	16
1.6 les premières données sur la carpe herbivore dans le contexte ivoirien.....	19
2. la biologie de la carpe herbivore	19
2.1 l'aire de répartition.....	20
2.2 l'alimentation et la croissance.....	20
2.3 la maturité sexuelle et les cycles reproducteurs	21
2.4 la reproduction en milieu naturel.....	22
3. la reproduction chez les poissons.....	23
3.1 le déroulement des cycles sexuels femelles	23
3.2 le contrôle endocrinien des cycles sexuels	27
3.3 l'influence des conditions du milieu	39
3.4 la maîtrise de la reproduction en élevage	41
4. la démarche de travail retenue	42
4.1 les objectifs pour le développement	42
4.2 les premiers constats sur les cycles sexuels en Côte d'Ivoire.....	43
4.3 la démarche retenue pour les recherches	44
Chapitre 1 Description des cycles sexuels	47
1. Introduction.....	49
2. Matériel et méthodes.....	49
2.1 les poissons et structures expérimentales	49
2.2 la description des stades sexuels	51
2.3 le suivi des cycles.....	52
2.4 le dosage de la vitellogénine	52
2.5 les incubations d'ovaires in vitro	60
2.6 le dosage des stéroïdes	61
2.7 les analyses statistiques	62
3. Résultats.....	63
3.1 les stades ovariens	63
3.2 les caractéristiques endocriniennes des différents stades	66
3.3 les cycles sexuels.....	68
3.4 l'effet de la température sur les ovaires en début de vitellogénèse.....	69
4. Discussion.....	70
4.1 sur les stades ovariens	70
4.2 sur le déroulement des cycles.....	71
4.3 sur la dynamique de la population.....	73

Chapitre 2 Influence des hautes températures sur la reproduction.....75

1. Introduction.....	77
2. Matériel et méthodes.....	78
2.1 les inductions artificielles de pontes.....	78
2.2 la culture de cellules hypophysaires.....	84
2.3 les incubations d'ovaires in vitro.....	84
2.4 les analyses statistiques.....	85
3. Résultats.....	86
3.1 l'effet de la température sur l'induction artificielle de la ponte.....	86
3.2 l'effet de la température sur la sécrétion hypophysaire de LH.....	97
3.3 l'effet de la température sur les ovaires.....	98
4. Discussion.....	103
4.1 sur la libération de LH.....	103
4.2 sur les phénomènes intervenant au niveau ovarien.....	105
4.3 conclusion.....	109

Chapitre 3 Influence du régime alimentaire sur la reproduction 111

1. Introduction.....	113
2. Matériel et méthodes.....	115
2.1 les poissons et structures expérimentales.....	115
2.2 le suivi de la croissance, de la puberté et des cycles sexuels.....	117
2.3 la qualité des géniteurs femelles.....	118
2.4 le dosage du GnRH.....	118
2.5 les analyses statistiques.....	119
3. Résultats.....	119
3.1 la croissance et la consommation alimentaire.....	119
3.2 la puberté.....	122
3.3 les caractéristiques des stades sexuels.....	128
3.4 la qualité des géniteurs femelles.....	129
4. Discussion.....	131
4.1 sur la consommation alimentaire et la croissance.....	131
4.2 sur la puberté et le déroulement des cycles.....	132
4.3 sur la qualité des géniteurs femelles.....	137
4.4 conclusion et perspectives.....	138

Chapitre 4 Technologies de la reproduction artificielle 141

1. Introduction.....	143
2. Matériel et méthodes.....	144
2.1 les protocoles d'induction de pontes.....	144
2.2 la détermination des taux de LH plasmatique.....	146
2.3 les analyses statistiques.....	146
3. Résultats.....	146
4. Discussion.....	149

Conclusion et perspectives	153
1. les données apportées par l'étude	155
2. les conséquences pour la conception d'écloseries	157
3. les perspectives en termes de recherches	159
Liste des figures	163
Glossaire.....	167
Références bibliographiques.....	169

Introduction

1. la pisciculture artisanale en Côte d'Ivoire et l'intégration de la carpe herbivore

1.1 le contexte économique de la filière

En Côte d'Ivoire (voir carte Figure 1) comme dans de nombreux pays côtiers d'Afrique subsaharienne, le poisson est la première protéine consommée par la population (15,4 kg/hab./an en 2000) et souvent le premier poste de dépenses alimentaires pour les ménages ruraux. Malgré sa façade maritime, la balance commerciale du pays est largement déficitaire pour le poisson : sur un total de 246 000 t consommées en 2000, seules 77 000 t sont pêchées par le pays, le reste étant importé (FAO, 2003b). La majorité du poisson consommé est donc importé congelé, puis vendu dans le pays sous forme congelée ou fumée. La contribution du poisson frais à la consommation est très faible, et de plus la qualité de ce dernier souffre des conditions de transport et des délais souvent longs entre la pêche et la consommation. Il y a ainsi une forte demande pour du poisson frais de bonne qualité, les principales ressources à l'intérieur du pays étant constituées par les pêcheries sur les grands barrages hydroélectriques, qui sont loin de pouvoir subvenir aux besoins de la population.

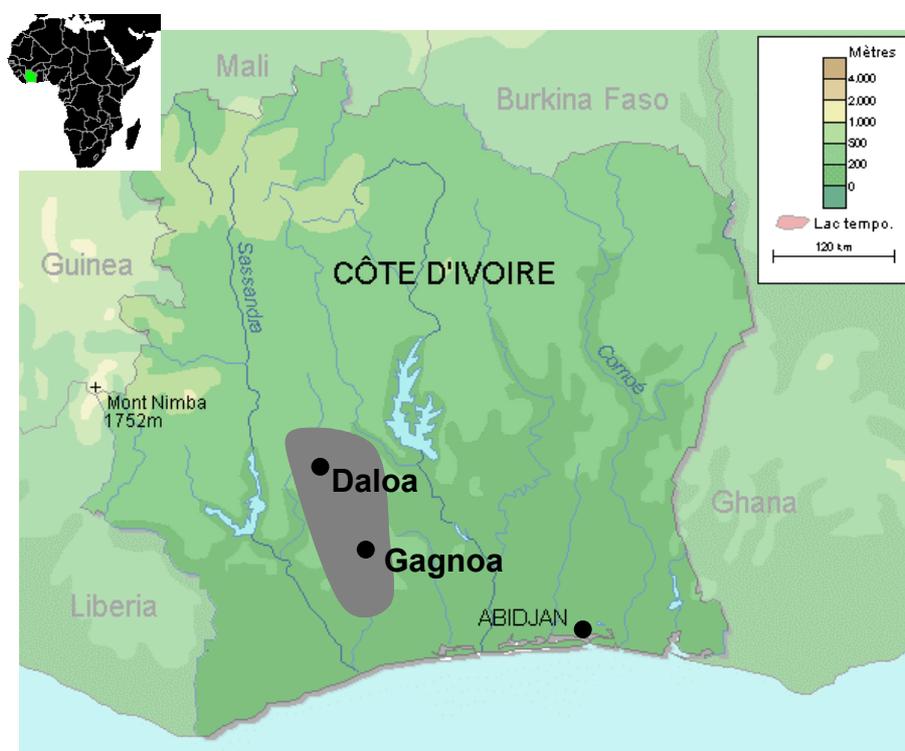


Figure 1. Carte de la Côte d'Ivoire. La zone en grisé correspond à la zone principale d'intervention de l'Apdra-ci pour le développement de la pisciculture artisanale.

1.2 le milieu naturel et le système agraire local

La partie sud de la Côte d'Ivoire (Figure 1) bénéficie d'un climat soudanien, avec deux saisons des pluies (la grande saison des pluies d'avril à juillet et la petite de septembre à novembre) et deux saisons sèches (Figure 2). Les précipitations annuelles sont de l'ordre de 1400 mm. L'activité économique de ces régions est essentiellement basée sur l'agriculture, sur la culture du café et surtout du cacao, dont la Côte d'Ivoire est le premier producteur mondial avec 40% de la production, soit 1,2 millions de tonnes environ (FAO, 2003a). La production est basée sur de petites exploitations familiales de quelques dizaines d'hectares au maximum, employant de la main d'œuvre familiale et/ou salariée. La production de café-cacao s'est développée suivant un front pionnier^{*1}, ce qui en a fait une zone de forte immigration de populations en provenance d'autres régions de la Côte d'Ivoire ou des pays sahéliens limitrophes (Mali, Burkina Faso) (Oswald, 1997).

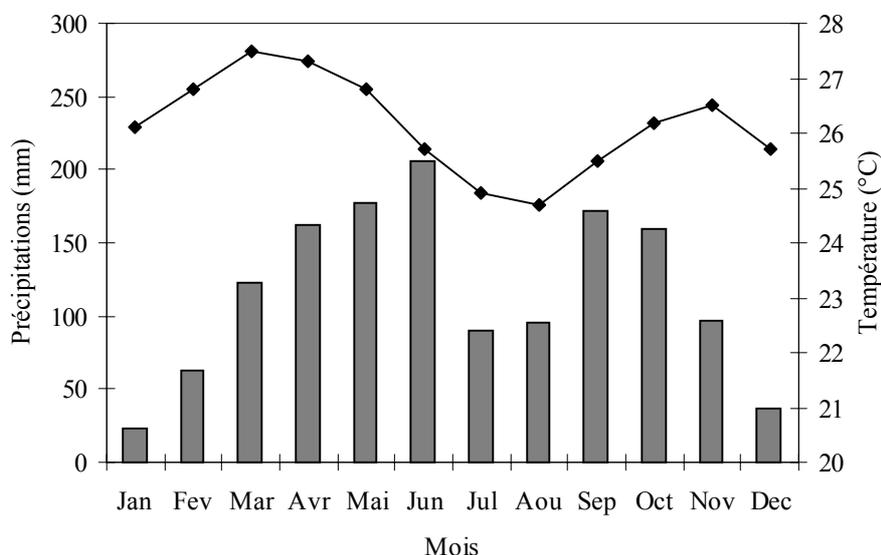


Figure 2. Températures (—◆—) et précipitations (■) moyennes mensuelles à Gagnoa (moyenne 1961-1990).

Le relief est une alternance de plateaux et de bas-fonds (vallées avec un écoulement temporaire ou permanent). Les plantations de café-cacao sont situées majoritairement sur les plateaux. Les principales cultures vivrières sont le riz, le maïs, le manioc, l'igname et la banane plantain. Toutes ces cultures sont également pratiquées sur les plateaux ou les coteaux, souvent en cultures associées ou dans les vergers de café-cacao pendant les premières années suivant la plantation. Seul le riz

¹ les mots suivis d'un astérisque (*) figurent dans le glossaire à la fin du document.

peut être cultivé dans les bas-fonds (en association avec le maïs), en alternance avec des jachères. Ainsi, bien que la pression foncière soit forte sur les plateaux du fait de la croissance démographique (les réserves de friches anciennes ou de forêt secondaire ont presque totalement disparu), l'utilisation des bas-fonds est encore assez extensive. Le pic d'installation des plantations est intervenu entre les années 1960 (au nord de la zone) et les années 1980 (au sud-ouest du pays). Les plantations arrivent aujourd'hui en fin de vie, les rendements ont donc tendance à diminuer et les paysans sont confrontés à des cours en diminution structurelle (du moins de 1989 à 1999). Les planteurs sont donc très demandeurs de productions de diversification, parmi lesquelles la pisciculture. La pisciculture est un nouveau mode d'exploitation des bas-fonds qui le sont peu dans le système agraire actuel, permettant de produire des protéines animales très demandées et offrant une opportunité d'investissement pour les revenus tirés des plantations.

1.3 *l'intégration de la pisciculture*

Le développement de la pisciculture en Afrique subsaharienne a fait l'objet de nombreuses tentatives depuis les années 1950 (Lazard *et al.*, 1991). La plupart (pour ne pas dire la totalité) de ces expériences se sont soldées par des échecs, les pisciculteurs étant incapables de poursuivre leur activité après la fin du projet de développement dans le cadre duquel ils avaient été installés. De nombreuses raisons ont été invoquées, des plus contestables (l'absence de "culture piscicole" en Afrique) aux plus justifiées (l'absence de prise en compte des autres activités des paysans). Il est sûr que toutes ces raisons justifient au moins partiellement l'échec de telle ou telle tentative, mais elles doivent surtout aider à définir de nouvelles approches pour la conception d'opérations de développement. Les approches de type "système agraire" (Mazoyer et Roudart, 1997) ont servi de base de réflexion dans la conception d'une nouvelle approche de développement de la pisciculture en Côte d'Ivoire (Oswald, 1997). A partir de la fin des années 1980, de petits projets ont été développés à la périphérie des villes du Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire (Daloa, Gagnoa), sur un modèle semi-intensif de production de tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* (mâles sexés manuellement) en association avec un poisson carnassier (*Hemichromis fasciatus*, un cichlidé) pour éviter la prolifération des alevins de tilapia. L'élevage se pratique dans de petits étangs en terre (400 m² environ) et les paysans sont autonomes pour la production d'alevins. La production est basée sur la fertilisation organique des étangs avec des sous-produits agricoles. Ces systèmes se sont développés assez rapidement dans les zones périurbaines de la région, principalement du fait de paysans riziculteurs (exploitant des bas-fonds aménagés pour le riz inondé) qui y trouvaient une activité de diversification. Cependant, ce développement souffre de la forte pression foncière sur les zones périurbaines (pour la riziculture, le maraîchage ou l'urbanisation) et de la concurrence avec d'autres productions agricoles pour l'utilisation des sous-produits agricoles.

Parallèlement au développement de la pisciculture périurbaine, des actions de recherche ont été menées pour trouver un système praticable en zones rurales, quasiment dépourvues d'intrants. Diverses solutions envisagées pour augmenter la productivité des étangs n'ont pas reçu d'écho favorable des paysans : implantation de bambous dans les étangs pour augmenter la biomasse de périphyton* (technique de l'acadja), association pisciculture-élevage... (Morissens *et al.*, 1993)

Finalement, la seule solution qui ait été retenue par les paysans consiste en une extensification du milieu : la production piscicole est conduite dans des étangs de barrage (Figure 3) de plus grande surface (0,3 à 1 ha), quasiment sans apport de fertilisant ou d'aliment. Les pisciculteurs plantent souvent du riz dans les parties peu profondes du barrage.



Figure 3. Un aménagement piscicole en zone rurale. Au premier plan, un petit "étang de service" destiné à la production d'alevins ou au stockage de poisson marchand, au second plan le barrage dont les parties les moins profondes (à droite) sont plantées en riz pendant une partie du cycle d'élevage (Photo Apdra-f).

Les disponibilités foncières en zones rurales ne sont pas trop limitantes du fait de la faible utilisation des bas-fonds. Les rendements obtenus sont de l'ordre de 500 kg à 1,5 t/ha/an (contre 5 à 10 t/ha/an dans les petits étangs périurbains). L'intégration de la pisciculture au système de production se fait sans recours à de la force de travail supplémentaire sur les exploitations. Les bénéfices de cette diversification se font sentir à différents niveaux selon les exploitations : facilité

de gestion de la trésorerie, car la pisciculture permet de dégager des liquidités en dehors des périodes de récolte du café-cacao ; diminution des dépenses liées à l'achat de poisson, un des principaux postes de dépense des exploitations, en particulier pendant les chantiers collectifs de récolte du cacao ; amélioration de l'alimentation des familles ; amélioration de la valorisation du travail sur l'exploitation ; amélioration de la valorisation du foncier de l'exploitation (Glasser *et al.*, 1998).

Aujourd'hui c'est le modèle de développement extensif de la pisciculture en zone rurale qui est le plus dynamique. La mise au point de ce système technique a été accompagnée de la conception d'une démarche d'intervention des services en charge du développement, sans laquelle la diffusion de ces techniques n'aurait pu avoir lieu. Les animateurs-conseillers piscicoles se rendent dans des zones où plusieurs candidats se déclarent intéressés par la pisciculture. L'animateur s'appuie pour la vulgarisation sur un "groupe de formation", groupe de pisciculteurs qui s'engagent à se former ensemble aux différentes techniques (topographie, construction d'étangs, techniques de production...) et à intégrer les nouveaux candidats de la zone. Cette approche permet d'avoir toutes les compétences nécessaires disponibles sur place (Figure 4), et donc d'assurer une autonomie locale dans la production (voire dans l'installation de nouveaux candidats si les compétences en aménagement de bas-fonds sont disponibles). Cette autonomie est un atout pour la pérennité de l'activité, et permet une démultiplication des efforts de formation par les pisciculteurs eux-mêmes. Ce groupe de formation peut également être à l'origine de la constitution d'une organisation de producteurs locale, qui leur permet d'acheter du matériel en commun (coffrages pour les ouvrages de vidange, filets...), d'échanger des alevins, de s'entraider pour certains travaux...

Le poisson produit est commercialisé sur les marchés locaux. Malgré sa bonne qualité comparativement au poisson congelé ou fumé habituellement disponible, il ne se négocie pas à un prix supérieur : il doit être vendu à un prix de l'ordre de 500 FCFA²/kg pour pouvoir être écoulé en grandes quantités, et donc être produit à un coût de revient inférieur. Le prix de revient moyen du tilapia produit en pisciculture extensive est de 125 FCFA/kg (Oswald, *comm. pers.*).

² 100 FCFA = 1 FF = 0,15 €

**ENVIRONNEMENT INSTITUTIONNEL
NATIONAL OU INTERNATIONAL**

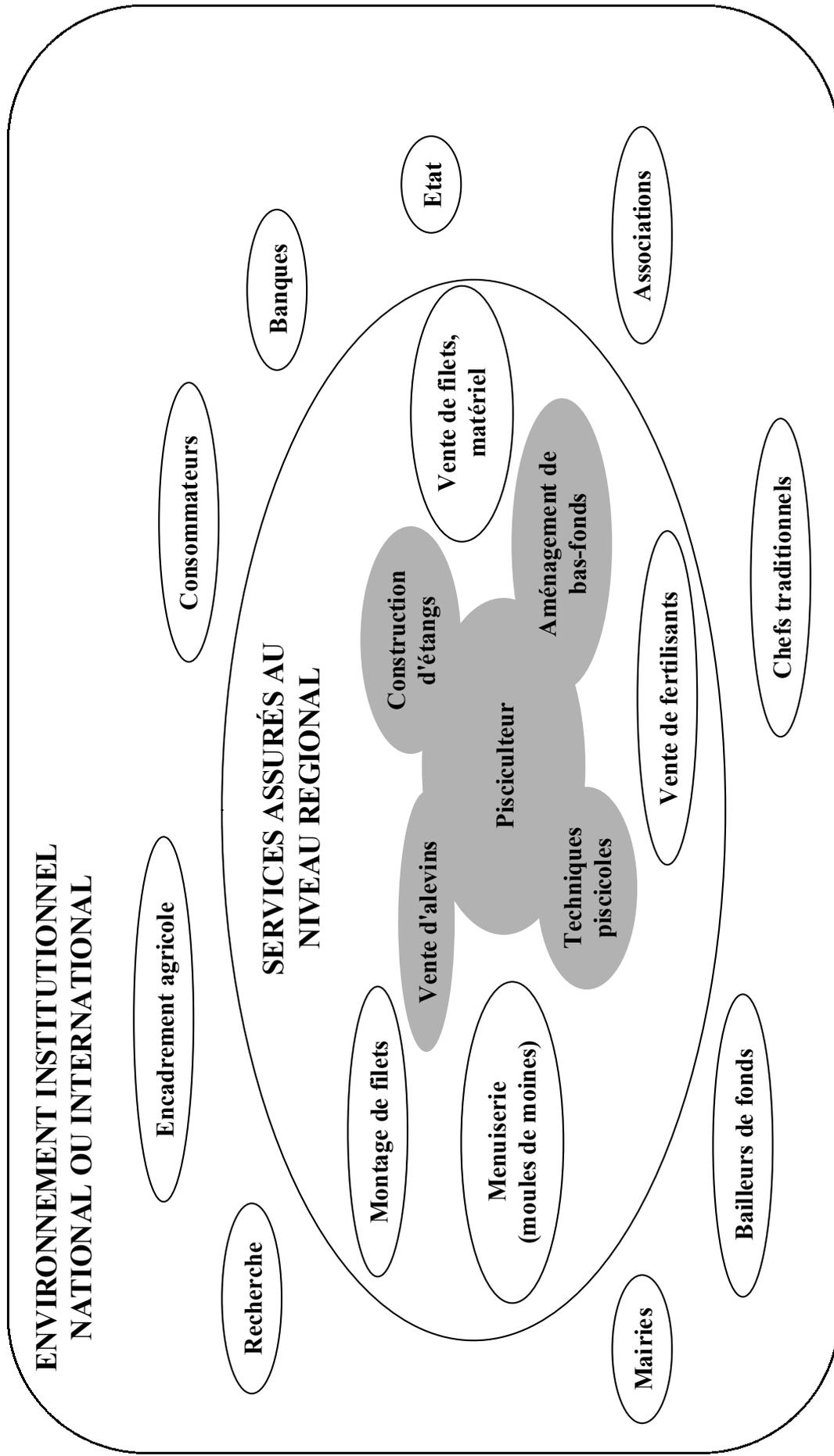


Figure 4 : La filière piscicole dans le Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire. Un premier niveau (en grisé ■) concerne directement la production piscicole : chaque zone (rayon de 10-20 km) est autonome pour les compétences considérées, et ces fonctions sont souvent assurées par des pisciculteurs spécialisés. Un second cercle comprend les services disponibles au niveau de la région (30-100 km). Enfin, l'environnement institutionnel de la filière au niveau régional, national ou international (adapté à partir de A.F.V.P., 1998).

La mise au point des systèmes techniques extensifs associée à la nouvelle démarche d'intervention a permis d'installer massivement des pisciculteurs en zone rurale entre 1996 et 2000 : début 2000, il y avait environ 360 pisciculteurs sur les zones du Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire, pour une surface d'étangs de 130 ha et une production annuelle de 125 t (APDRA-CI, 2001). La recherche de l'autonomie des producteurs dans chaque zone est le principal atout pour le succès de ce développement.

Les actions de développement étaient assurées jusqu'en 1999 par le Projet Piscicole du Centre-Ouest, mis en œuvre par l'A.F.V.P. (Association Française des Volontaires du Progrès, ONG française). Depuis, le relais est assuré par l'APDRA-CI (Association Pisciculture et Développement Rural en Afrique tropicale humide – Côte d'Ivoire). Depuis 2000, vu les problèmes politico-économiques auxquels a été confronté le pays, les financements ont fait défaut pour la poursuite du suivi des pisciculteurs dans les zones rurales. Les informations disponibles sur l'évolution de la situation sur le terrain font état d'un développement de l'activité par les pisciculteurs déjà installés (agrandissement des exploitations, meilleure maîtrise ou intensification de la production). De nouveaux pisciculteurs s'installent spontanément, mais on déplore une baisse de qualité des aménagements, à cause du manque de compétences en topographie sur les zones concernées. Toutefois, la dynamique se poursuit malgré l'absence d'encadrement pendant 3 ans, ce qui est suffisamment rare pour être souligné.

1.4 les bases techniques de la production

La production piscicole est basée sur la polyculture, qui est l'élevage simultané de plusieurs espèces dans un même étang (Figure 5). L'espèce principale est le tilapia du Nil *Oreochromis niloticus*. Sa reproduction spontanée dans les étangs conduit à une surpopulation et à l'arrêt de la croissance par saturation des ressources alimentaires. Les pisciculteurs n'élèvent donc que les mâles (qui possèdent de meilleures performances de croissance), triés par sexage* manuel. Cette technique étant toujours imparfaite (environ 5% d'erreur), il est nécessaire d'introduire un poisson carnassier pour éliminer les alevins au fur et à mesure de leur apparition : c'est l'*Hemichromis fasciatus* qui est utilisé à cette fin en Côte d'Ivoire. Le recours à un aliment composé pour l'alimentation des poissons est rendu difficile pour plusieurs raisons : difficultés d'approvisionnement en matières premières importées, variabilité de la composition, coût élevé, problèmes de conservation en milieu tropical humide, difficultés de transport ... Pour ces raisons, les pisciculteurs s'appuient entièrement sur la fertilisation organique avec des sous-produits végétaux (son de riz, de maïs, farine basse de riz...) ou d'élevage (fientes de volailles, déjections de porc, bovins, déchets d'abattoir...). Ces fertilisants stimulent les différents compartiments du réseau trophique des étangs, à partir de sources

autotrophes (algues, phytoplancton, macrophytes) ou hétérotrophes (dégradation bactérienne de la matière organique apportée) (Dabbadie, 1996). Pour valoriser au mieux toutes les ressources disponibles, d'autres espèces de poissons sont associées au tilapia : un silure (*Heterobranchus isopterus*, claridés) et *Heterotis niloticus* (ostéoglossidés) (voir Figure 5). Leurs régimes alimentaires diffèrent de celui du tilapia : c'est le principe de la polyculture, qui permet d'augmenter le rendement global de l'étang en exploitant différentes ressources trophiques, particulièrement pour les milieux extensifs. En étang de barrage avec très peu d'intrants, l'*Heterotis niloticus* peut représenter 50% du rendement en tilapia.



Figure 5. Les différentes espèces élevées en polyculture en Côte d'Ivoire. 1 : *Heterobranchus isopterus* (silure) ; 2 : *Hemichromis fasciatus* (carnassier) ; 3 : *Oreochromis niloticus* (tilapia) ; 4 : *Heterotis niloticus* (Photo Apdra-f).

1.5 *l'opportunité d'intégrer une espèce végétarienne et le choix de la carpe herbivore*

Dans les étangs de barrage qui, rappelons-le, sont à la base du développement actuel, les zones peu profondes sont envahies par des macrophytes*, qui constituent une "impasse trophique" dans l'état actuel de la pisciculture : elles prélèvent des éléments minéraux dans le milieu (au détriment du phytoplancton) et ne sont consommées par aucune des espèces présentes dans les étangs. Cela exige également un surcroît de travail de la part du pisciculteur pour le désherbage et l'entretien des

aménagements. De ce constat est venue l'idée d'intégrer une espèce herbivore à la polyculture pratiquée jusque là.

L'identification d'espèces potentielles pour la pisciculture a fait l'objet de nombreuses réflexions ces dernières décennies, bien qu'il n'y ait pas de consensus sur le sujet et que les critères diffèrent assurément selon le contexte socio-économique. Selon nous, un des critères principaux est le potentiel de croissance, qui avant même la maîtrise de la reproduction, est un caractère essentiel pour la viabilité économique de l'élevage à destination de la consommation locale dans les pays en voie de développement. Un régime alimentaire "herbivore" au sens large (incluant planctonophages, détritivores et éventuellement omnivores) permet de valoriser les ressources les plus facilement accessibles et les moins coûteuses (sous-produits agricoles). Une bonne représentation de l'espèce dans les statistiques de la pêche continentale peut également constituer un indice d'une bonne aptitude à la pisciculture. Parmi les espèces locales de "grande" taille (taille maximale connue supérieure à 40 cm, supposées à croissance rapide), les seules identifiées comme "herbivores" sont *Tilapia zillii*, *Labeo coubie*, *Distichodus rostratus* et *Citharinus sp.* (auxquelles il faut ajouter différentes espèces de tilapias et *Heterotis niloticus*, déjà utilisés) (Daget et Iltis, 1965; Lévêque et Paugy, 1984).

Le *Tilapia zillii* est largement présent dans la zone : il est considéré comme une espèce nuisible pour la pisciculture, du fait de ses performances de croissance très faibles et de sa forte capacité d'invasion du milieu d'élevage. Concernant le *Labeo coubie*, des essais ont été réalisés chez plusieurs pisciculteurs pour le grossissement de juvéniles de prélevés dans le milieu naturel. Ces essais ont révélé des performances de croissance très médiocres (quelques centaines de grammes en plus d'une année de grossissement) et une incapacité à contrôler les macrophytes dans les barrages : l'espèce ne répondait donc pas aux besoins identifiés. *Distichodus rostratus*, qui est une espèce réellement macrophytophage, a fait l'objet de plusieurs tentatives d'élevage (dont la dernière en date dans le cadre d'un projet FED³ en Côte d'Ivoire), qui se sont toutes soldées par des échecs, car il présente de forts taux de mortalité dans les étangs, même en l'absence de manipulations. *Citharinus sp.* est devenu très rare en Côte d'Ivoire et quasiment impossible à trouver dans le milieu naturel, et c'est probablement une espèce majoritairement planctonophage.

³ Fonds Européen de Développement

Devant ce constat d'échec⁴, la possibilité d'utiliser une espèce exotique a été envisagée. La carpe chinoise herbivore ou carpe Amour, *Ctenopharyngodon idella* (Figure 6) a été choisie pour plusieurs raisons :

- sa capacité à consommer des macrophytes (Kilgen et Smitherman, 1971; George, 1982; Zonneveld et Van Zon, 1985),
- ses bonnes performances de croissance et sa large utilisation en pisciculture (FAO, 2003c),
- l'absence de reproduction naturelle enregistrée en climat tropical, qui limite les risques de naturalisation de l'espèce (Shireman et Smith, 1983),
- le pouvoir fertilisant de ses déjections, qui permet de stimuler la production des autres espèces de poissons présentes dans l'étang (Sen *et al.*, 1978),
- l'existence de nombreuses données bibliographiques sur l'élevage de cette espèce et d'autres cyprinidés proches (Shireman et Smith, 1983; Billard et Marcel, 1986; Billard, 1995).



Figure 6. Pêche à la senne de carpes herbivores lors d'essais à la station piscicole de Gagnoa (Photo Apdra-f).

⁴ qui n'est pas définitif, puisque des recherches doivent être relancées en collaboration entre l'APDRA-CI et l'Université de Cocody-Abidjan sur les potentialités piscicoles de *Distichodus rostratus*.

C'est ainsi que la Direction des Pêches du Ministère de l'Agriculture et des Ressources Animales de Côte d'Ivoire a autorisé en août 1994 l'importation d'un stock d'alevins en provenance d'une éclosérie marocaine.

1.6 les premières données sur la carpe herbivore dans le contexte ivoirien

Une première introduction de cette espèce avait eu lieu en 1980 dans le cadre d'un projet de développement PNUD/FAO⁵ dans un but d'élevage et de contrôle des macrophytes dans les barrages hydroélectriques. En l'absence de reproduction, le stock avait disparu quelques années plus tard (Dabbadie, 1994). L'hypothèse selon laquelle elle se serait reproduite naturellement dans les "lacs artificiels" de Bouaké (Moreau *et al.*, 1988) est maintenant rejetée (Moreau et Costa Pierce, 1997).

Le stock d'alevins importé en 1994 a été placé en quarantaine avec un suivi sanitaire par le Laboratoire de Pathologie Aquacole (Abidjan), avant d'être mis en grossissement chez quelques pisciculteurs. La première reproduction artificielle par injection d'extrait hypophysaire de carpe commune a été obtenue en 1997, et les alevins ont été confiés à des pisciculteurs confirmés pour le grossissement.

Les données recueillies en Côte d'Ivoire font apparaître des croissances conformes à ce qui était attendu, soit des croissances moyennes de plus de 10 g/jour, permettant d'obtenir des poissons de 1,5 à 2 kg en 6 mois de grossissement, à faible densité d'élevage dans des barrages avec un apport de végétaux. Les rendements associés sont compris entre 0,4 à 1 t/ha/an, équivalents aux rendements cumulés des tilapias et *Heterotis* en étangs extensifs.

2. la biologie de la carpe herbivore

La carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella*) fait partie de la famille des cyprinidés et de la sous-famille des Leuciscinés, comme les autres espèces du groupe des carpes chinoises, dont elle est très proche. Elle est très largement utilisée en pisciculture à travers le monde, c'est la seconde espèce produite en tonnage au niveau mondial avec une production de 3,4 millions de tonnes en 2000 (FAO, 2003c). Malgré cela, sa biologie n'est pas très bien connue, au moins par les scientifiques occidentaux. Elle a cependant donné lieu à de nombreux travaux de recherche menés en zone tempérée (Europe de l'Est, U.R.S.S., Chine) à partir des années 1960 (Shireman et Smith, 1983).

⁵ Programme des Nations Unies pour le Développement/ Food and Agriculture Organization.

2.1 *l'aire de répartition*

L'aire de répartition originelle de la carpe herbivore s'étend le long de la côte Pacifique de la Chine et de la Russie, dans des rivières et des lacs d'altitude inférieure à 1000 m, entre les latitudes 23 et 50°N. Les extrêmes annuels de température varient de 15°C en janvier à 30°C en juillet (dans le sud de la zone de répartition) et de -22°C à 22°C aux mêmes mois dans le nord de la zone (Shireman et Smith, 1983). Ces zones étant sous climat de mousson (minimum de précipitations en janvier et maximum en juillet), elles subissent des crues annuelles ou bisannuelles. La carpe herbivore a été largement introduite sur tous les continents (plus de 50 pays) mais ne s'est jamais reproduite naturellement en deçà du 18ème parallèle (Shireman et Smith, 1983).

2.2 *l'alimentation et la croissance*

La carpe herbivore est connue comme étant très majoritairement consommatrice de végétaux frais à l'âge adulte (Kilgen et Smitherman, 1971). Les alevins consomment des organismes planctoniques (rotifères), puis un mélange de végétaux et de proies animales à partir de 2 cm, et les macrophytes aquatiques deviennent de plus en plus importantes dans le régime au fur et à mesure de la croissance.

Les données sur les capacités de dégradation de la cellulose chez la carpe herbivore sont assez ambiguës. Certains auteurs mettent en évidence une activité cellulolytique propre (Das et Tripathi, 1991), et d'autres non (Lesel *et al.*, 1986). Il semble également qu'une flore bactérienne capable de dégrader la cellulose puisse se développer si les conditions environnementales (température, présence d'une telle flore dans le milieu) sont favorables (Lesel, 1993). La carpe herbivore est en tout cas incapable d'hydrolyser les constituants des parois végétales (à la différence de certains tilapias au pH stomacal très faible). Elle possède des dents pharyngiennes très développées qui lui permettent de broyer les cellules pour en rendre le contenu digestible. Ce contenu est très digestible, mais représente une faible proportion du matériel ingéré, d'où une efficacité alimentaire limitée et la nécessité d'ingérer de grandes quantités de végétaux. La carpe herbivore est dépourvue d'estomac et son intestin est très court pour une espèce herbivore (2,3 fois la longueur corporelle).

La croissance dépend beaucoup des conditions thermiques, et les croissances maximales peuvent atteindre 4 à 5 kg par an en climat tropical. Les fortes températures augmentent l'ingestion alimentaire et un peu l'assimilation (Cai et Curtis, 1990)

2.3 la maturité sexuelle et les cycles reproducteurs

On observe que les mâles sont en général matures un an plus tôt que les femelles et à un poids inférieur. Les climats chauds semblent diminuer à la fois l'âge et le poids à la première maturité (voir Tableau 1).

Tableau 1 : Age et poids à la maturité des carpes herbivores dans différentes zones climatiques (Bardach *et al.*, 1972).

	Femelles	Mâles
Pays	Age (ans) – Poids (kg)	Age (ans) – Poids (kg)
Chine-Sud	4-5 ans – 6-8 kg	3-4 ans
Chine-Centre	4-5 ans – 6-8 kg	3-4 ans
Chine-Nord-Est	6-7 ans – 6-8 kg	5-6 ans
Inde (Milieu naturel)	3 ans – 4-8 kg	3 ans – 4,5 kg
Inde (Etang)	2 ans – 1,5 kg	0,9 kg
Malaisie	1-2 ans – 2,3-3,2 kg	1-2 ans – 1,2-2 kg
Taiwan	4-5 ans – 3 kg ou plus	3-4 ans
Turkménistan	3-4 ans	2-3 ans
Ukraine	8-9 ans – 2,7-3,8 kg	7-8 ans – 2,7-3,8 kg
Sibérie	8-9 ans – 6,5-7 kg	8-9 ans – 6,5-7 kg
Moscou	10 ans	9 ans

En étang ou en environnement d'eau stagnante, la maturation finale et l'ovulation n'ont pas lieu. Jusque dans les années 1930, l'approvisionnement en alevins des piscicultures chinoises dépendait uniquement des captures d'alevins en milieu naturel (Bardach *et al.*, 1972).

En Egypte (températures de l'eau de 13 à 29°C au cours de l'année) une somme des températures physiologiques de 950 degrés.jours (°.j) à partir du 1^{er} janvier est considérée comme le minimum pour avoir une reproduction induite réussie (Zonneveld, 1984). Cet auteur distingue au cours de l'année une période pré-optimale (taux de réponse à l'hypophysation* de 60 à 80%, fort taux de fécondation, taux d'éclosion inférieurs à 30%), une période optimale (100% de réponse à

l'hypophysation, forts taux de fécondation et d'éclosion), et une période post-optimale (chute des taux de fécondation et d'éclosion). Des signes de régression peuvent également apparaître dans les phases plus précoces suite à une période de déficience en oxygène (Zonneveld et Van Zon, 1985), et la période de surmaturation* se traduit par une perte d'écaillés lors des manipulations.

Sous climat équatorial, des poissons en fin de vitellogénèse sont rencontrés toute l'année (Chen *et al.*, 1969; Makeyeva et Yemel'yanova, 1989), et les cycles sexuels ne semblent pas dépendre des cycles météorologiques locaux (périodicité des pluies).

La fécondité* dépend de nombreux facteurs : technique de reproduction induite, conditions d'alimentation, longueur, poids et âge des femelles (Makeyeva et Yemel'yanova, 1989). Les fécondités sont assez variables, avec des maxima de l'ordre de 120 000 œufs par kg de femelle (Gorbach, 1972; Zonneveld et Van Zon, 1985). La fécondité relative* en milieu naturel augmenterait avec l'âge et le poids moyen des femelles (Gorbach, 1972).

2.4 *la reproduction en milieu naturel*

La reproduction naturelle est précédée d'une migration vers l'amont de la rivière et les sites de fraie, qui semble essentielle à la réussite de la ponte (Aliyev, 1976). Les zones de fraie sont choisies particulièrement turbulentes, comme la confluence de deux cours d'eau (Aliyev, 1976), présentant un courant rapide (0,7 à 1,4 m/s) (Krykhtin et Gorbach, 1982) et un débit assez fort (350 à 460 m³/s) (Stanley *et al.*, 1978). La ponte a lieu à des températures de 17 à 26°C, avec un maximum de 21 à 26°C (Krykhtin et Gorbach, 1982). Une fois que le seuil de température est atteint, ce sont les variations de niveau de l'eau qui vont déclencher la fraie (Bardach *et al.*, 1972; Aliyev, 1976; Krykhtin et Gorbach, 1982). Une hausse de quelques dizaines de centimètres la déclenche, et elle cesse dès qu'une baisse intervient (Krykhtin et Gorbach, 1982). Une température plus élevée se traduit par un avancement de la période de fraie. La ponte a lieu dans la rivière, dans les jours qui suivent une hausse du niveau de l'eau, le matin et le soir par temps calme. Les œufs, d'un diamètre initial de 0,8 à 1,2 mm, gonflent au contact de l'eau jusqu'à un diamètre de 3,7 à 5,3 mm (Billard, 1995). L'incubation se déroule pendant que les œufs dévalent la rivière, et les alevins gagnent ensuite des plaines d'inondation où ils se nourrissent d'organismes planctoniques pendant les premiers stades de développement. Après la reproduction, les géniteurs gagnent des zones inondées très riches en ressources alimentaires.

3. *la reproduction chez les poissons*

La vie sexuelle des poissons débute par un processus de différenciation sexuelle, suivi, chez les espèces itéropares^{*}, par un phénomène cyclique de production de gamètes matures au cours de la vie de l'animal.

La différenciation sexuelle se déroule différemment entre espèces et entre individus, et est très sensible aux influences environnementales chez certaines espèces (Baroiller *et al.*, 1999). Après la différenciation des gonies souches apparaît le caractère cyclique de la production de gamètes, succession de phases de gamétogenèse, d'émission des gamètes et/ou d'involution gonadique.

Dans cette partie introductive, nous décrivons le déroulement puis la régulation endocrinienne des cycles sexuels femelles, en faisant appel dans la mesure du possible aux données acquises chez les cyprinidés. La carpe commune *Cyprinus carpio* (par son importance économique) et le carassin⁶ *Carassius auratus* (par sa facilité d'élevage) sont des modèles largement utilisés en physiologie de la reproduction : de nombreux mécanismes endocriniens ont été décrits chez ces espèces. Il sera fait appel à des données obtenues chez d'autres espèces en cas de lacune chez les cyprinidés. Enfin, nous aborderons rapidement les influences environnementales sur la reproduction puis les techniques de maîtrise de la reproduction en élevage.

3.1 *le déroulement des cycles sexuels femelles*⁷

Le déroulement des cycles sexuels femelles a fait l'objet d'innombrables travaux scientifiques et de nombreuses synthèses bibliographiques (dont (de Vlaming, 1983; Mellinger, 2002)). Le fractionnement de cycles sexuels en plusieurs étapes varie selon les auteurs. La plupart du temps, le cycle est divisé entre une phase de prévitellogénèse et une phase de vitellogénèse. Ce dernier terme a différentes acceptations selon les auteurs (Mellinger, 2002) :

- phase de différenciation cellulaire du gamète femelle (y compris la prévitellogénèse),
- phase d'accumulation du vitellus (dans ce cas, elle commence avant la fin de ce qu'il est convenu d'appeler la prévitellogénèse),
- phase d'accumulation du vitellus lipoprotéique au sens strict.

⁶ dans la suite du texte, l'appellation 'carassin' fait référence au *Carassius auratus*, également appelé en français 'poisson rouge', 'cyprin doré' ou 'carassin doré' ('goldfish' en anglais).

⁷ les problèmes en Côte d'Ivoire se posent principalement sur les géniteurs femelles (voir paragraphe 4.2, p. 43), notre étude s'est centrée sur la régulation des cycles sexuels femelles.

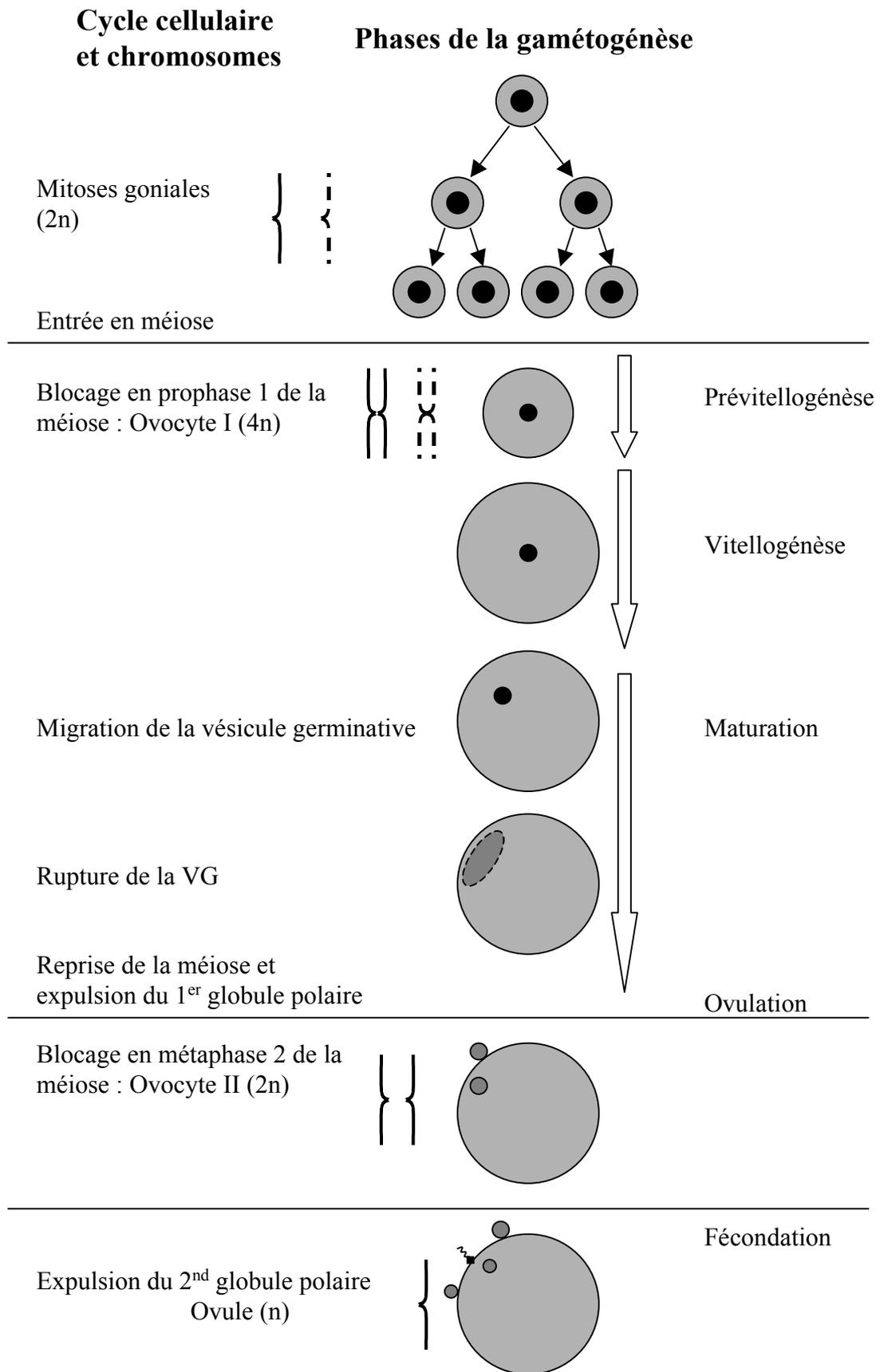


Figure 7. Schéma du déroulement des différentes étapes de la gamétogenèse femelle, figurant les événements au niveau chromosomique (cycle cellulaire) et les étapes correspondantes de la gamétogenèse.

On peut résumer le déroulement du cycle de la façon suivante (Figure 7). Pendant les premières étapes du cycle, lors d'une phase de croissance primaire, les ovogonies (diploïdes) se divisent par mitose, puis évoluent vers le stade ovocyte I, où intervient l'arrêt en prophase de la division réductionnelle de la méiose. Des cellules folliculaires entourent l'ovocyte. On assiste alors à une augmentation de volume, l'apparition de nucléoles dans le noyau par synthèses actives, et l'accumulation de matériel basophile dans le cytoplasme. L'enveloppe (ou chorion, *zona radiata*⁸) se met en place. La prévitellogénèse voit donc l'apparition dans le cytoplasme de l'ovocyte de gouttelettes lipidiques, d'alvéoles corticales, ainsi que du chorion (enveloppe de l'ovocyte). Les alvéoles corticales, ou granules corticaux, apparaissent dans le cytoplasme puis migrent en périphérie de l'ovocyte. Composées de mucopolysaccharides et de glycoprotéines, elles participent à la réaction corticale lors de la fécondation. Après ces premières phases, l'ovocyte subit une phase de croissance secondaire, ou vitellogénèse au sens strict, pendant laquelle il va intégrer de la vitellogénine par endocytose (médiée par des récepteurs spécifiques) (Stifani *et al.*, 1990). La vitellogénine est composée d'une chaîne polypeptidique phosphorylée, glycosylée et liée à des lipides par des liaisons faibles : elle est synthétisée dans le foie sous contrôle œstrogénique et sera scindée dans l'ovocyte en lipovitelline et phosvitines. Ces molécules sont stockées dans l'ovocyte des cyprinidés sous forme de plaquettes vitellines*. L'ovocyte est entouré par le chorion épaissi (*zona radiata*), puis par deux couches de cellules folliculaires : la granulosa et la thèque (Figure 8).

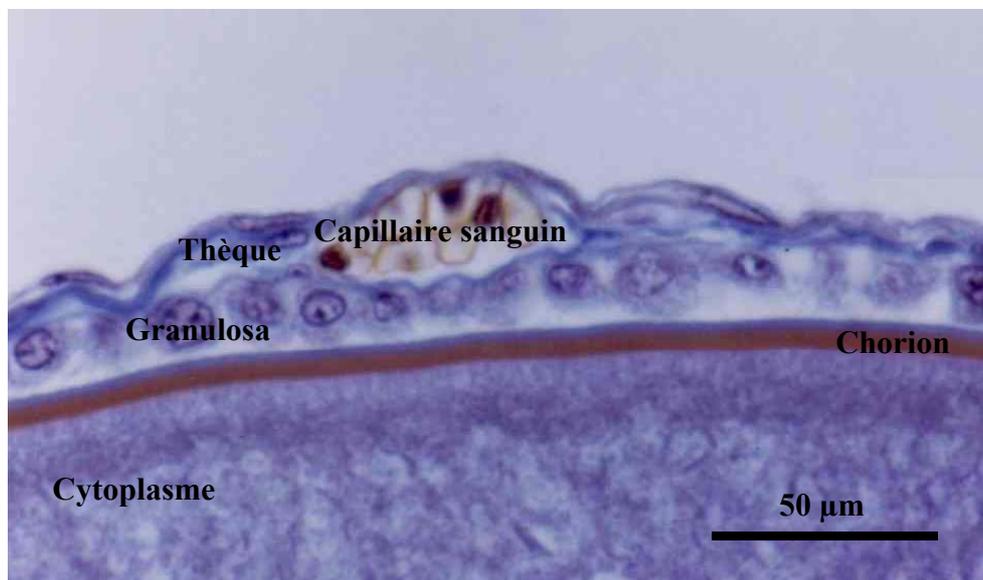


Figure 8. Vue des enveloppes folliculaires d'un ovocyte de carpe herbivore en début de vitellogénèse.

⁸ les termes latins ou anglais pour lesquels les équivalents français n'existent pas ou sont peu usités figurent en italique dans le texte.

La thèque comprend plusieurs couches de fibroblastes, des capillaires sanguins, des fibres de collagène et des cellules glandulaires (*special thecal cells*), tandis que la granulosa est composée d'une seule couche de cellules relativement homogènes (Nagahama *et al.*, 1994).

Les ovocytes ayant achevé la vitellogénèse (post-vitellogéniques) peuvent alors subir un arrêt de développement avant les phases terminales (la maturation). La maturation ovocytaire (ou maturation méiotique) débute par la migration de la Vésicule Germinative (VG ou noyau de l'ovocyte), qui est suivie de sa rupture (sa disparition, ou *GVBD* : *Germinal Vesicle Break-Down*) et de l'hydratation de l'ovocyte. La rupture de la VG correspond à la reprise de la méiose jusqu'en métaphase de seconde division et à l'expulsion du premier globule polaire, contenant un jeu de chromosomes. L'ovulation, qui est l'expulsion de l'ovocyte mûr hors de son enveloppe folliculaire, suit normalement la maturation. La ponte (oviposition) peut alors intervenir. L'expulsion du second globule polaire interviendra au moment de la fécondation.

On peut observer des différences selon les espèces dans les dernières étapes : chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, la maturation et l'ovulation semblent être la résultante "automatique" des dernières étapes de la vitellogénèse, et les ovules peuvent se conserver plusieurs jours dans l'ovaire sans perte notable de fécondabilité*, alors que chez de nombreuses espèces de cyprinidés le déclenchement de la maturation et l'ovulation supposent des stimuli spécifiques et les ovules ont une durée de vie très courte dans le tractus génital femelle en l'absence de ponte (ils perdent leur fécondabilité en quelques heures). Chez la truite arc-en-ciel, la ponte nécessite cependant des stimuli spécifiques.

Les aspects dynamiques de l'ovogénèse permettent de distinguer 3 grands types de développement selon les espèces (de Vlaming, 1983) :

- synchrone : tous les ovocytes mûrent et ovulent en même temps. C'est le cas des salmonidés sémelpares* et de quelques groupes primitifs,
- groupe-synchrone : c'est le plus courant, où des vagues d'ovocytes synchrones mûrent successivement dans l'ovaire, comme chez les cyprinidés. Il diffère entre espèces par le nombre de groupes synchrones présents en même temps dans l'ovaire,
- asynchrone : tous les stades ovocytaires sont présents en quantités comparables.

Si la gamétogénèse n'est pas suivie par une expulsion totale des produits, intervient le phénomène de régression. Visiblement, les processus regroupés sous cette appellation sont assez divers, et peuvent traduire un arrêt du recrutement d'ovocytes vers la vitellogénèse, un arrêt en cours de vitellogénèse ou une entrée massive en atresie en fin de période de reproduction. Les cellules

interstitielles et peut-être celles de la thèque absorbent l'ovocyte, qui peut former un *corpus atreticum* transitoire (quelques jours au maximum).

3.2 le contrôle endocrinien des cycles sexuels

Les différentes étapes de la reproduction sont sous le contrôle principal du complexe hypothalamo-hypophysaire interagissant avec les axes somatotrope et corticostéroïdien.

3.2.1 les gonadotropines

Les acteurs centraux du système sont les gonadotropines, hormones glycoprotéiques synthétisées par l'hypophyse (plus précisément dans la *pars distalis* proximale de l'adénohypophyse). L'existence de deux gonadotropines chez les poissons a été formellement démontrée pour la première fois chez le saumon chum *Oncorhynchus keta* (Suzuki *et al.*, 1988). Depuis, elle a été confirmée chez de très nombreuses espèces, et il est couramment admis que toutes les espèces de téléostéens possèdent deux gonadotropines, apparentées aux gonadotropines mammaliennes FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*) et LH (*Luteinizing Hormone*) (Quérat, 1994). Les gonadotropines sont constituées de deux sous-unités liées par des ponts disulfures : une sous-unité α commune et une sous-unité β spécifique de chaque hormone et responsable de son activité biologique. Les différentes hormones sont sécrétées chez les salmonidés par des cellules différentes (Nozaki *et al.*, 1990), où elles sont stockées sous forme de granules.

La séquence en acides aminés des sous-unités des gonadotropines a été déterminée entre autres chez la carpe commune (Chang *et al.*, 1988), chez la carpe argentée *Hypophthalmichthys molitrix* (Chang *et al.*, 1990) et chez le carassin (Yoshiura *et al.*, 1997). Ces derniers auteurs montrent que plusieurs espèces de cyprinidés, dont la carpe herbivore, ont des gènes homologues de FSH et LH, et que la dualité des gonadotropines donc est valable chez cette espèce. Chez les cyprinidés, des dosages immunologiques sont disponibles uniquement pour la LH (Breton *et al.*, 1983; Kah *et al.*, 1989b).

Nous allons aborder successivement les profils de synthèse et de sécrétion des gonadotropines et leurs effets sur les gonades, puis la régulation de la production des gonadotropines.

Le profil de sécrétion de la FSH n'est pas connu chez les cyprinidés faute de technique de dosage spécifique (Yaron, 1995). Chez les salmonidés, les profils de sécrétion des deux gonadotropines sont clairement distincts : chez la truite arc-en-ciel, il y a une augmentation de FSH plasmatique en début de vitellogénèse et une seconde augmentation lors de l'ovulation, tandis que la LH plasmatique n'augmente qu'à partir de la migration de la VG pour atteindre un maximum lors de la

maturation méiotique (Breton *et al.*, 1998; Gomez *et al.*, 1999b). Chez le carassin, les niveaux de LH⁹ restent relativement hauts (plusieurs ng/ml) pendant tout le cycle (Kobayashi *et al.*, 1986; Sohn *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 2001), et il y a un pic très prononcé dans les heures qui précèdent l'ovulation (Stacey *et al.*, 1979a), caractéristique partagée par de nombreux cyprinidés (Santos *et al.*, 1986; Aida, 1988).

La différence entre les deux familles (salmonidés et cyprinidés) se retrouve dans les profils d'expression des ARNm* des sous-unités des gonadotropines dans l'hypophyse : chez la truite arc-en-ciel, les niveaux d'ARNm de la β -FSH présentent également deux pics (un en début de vitellogénèse et un en fin), tandis que les quantités d'ARNm de β -LH restent faibles jusqu'à la maturation (Gomez *et al.*, 1999b). Chez le carassin, les profils d'expression des deux sous-unités dans l'hypophyse sont parallèles et augmentent régulièrement du début à la fin du cycle (Yoshiura *et al.*, 1997; Sohn *et al.*, 1999).

Les activités biologiques des deux gonadotropines chez la carpe et le carassin semblent proches (Van der Kraak *et al.*, 1992) : les deux stimulent la production de stéroïdes par les gonades (bien que la LH soit environ deux fois plus puissante que la FSH), leur activité est équivalente pour stimuler la capture de vitellogénine par les ovocytes et la maturation intrafolliculaire des ovocytes (rupture de la vésicule germinative).

3.2.2 l'action des gonadotropines sur les gonades

Les gonadotropines libérées dans la circulation générale vont agir par l'intermédiaire de récepteurs sur les gonades. Le principal effet des gonadotropines est la régulation de la production de stéroïdes par les gonades.

La Figure 9 reprend les principales voies de synthèse des stéroïdes sexuels des femelles (le détail des différentes étapes est décrit ci-dessous), dont les principaux sont la testostérone, l'œstradiol-17 β (abrégé en "œstradiol"), la 17 α -progestérone (abrégée en "17 α P") et la 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (ou 17 α ,20 β -dihydroprogestérone, abrégée en "17 α 20 β ").

⁹ il faut rappeler que chez les cyprinidés, les données antérieures à 1983 (Breton *et al.*, 1983) n'utilisent pas de dosages des sous-unités des gonadotropines, et mesurent vraisemblablement la FSH et la LH en même temps, ce qui est également le cas des données des équipes canadiennes.

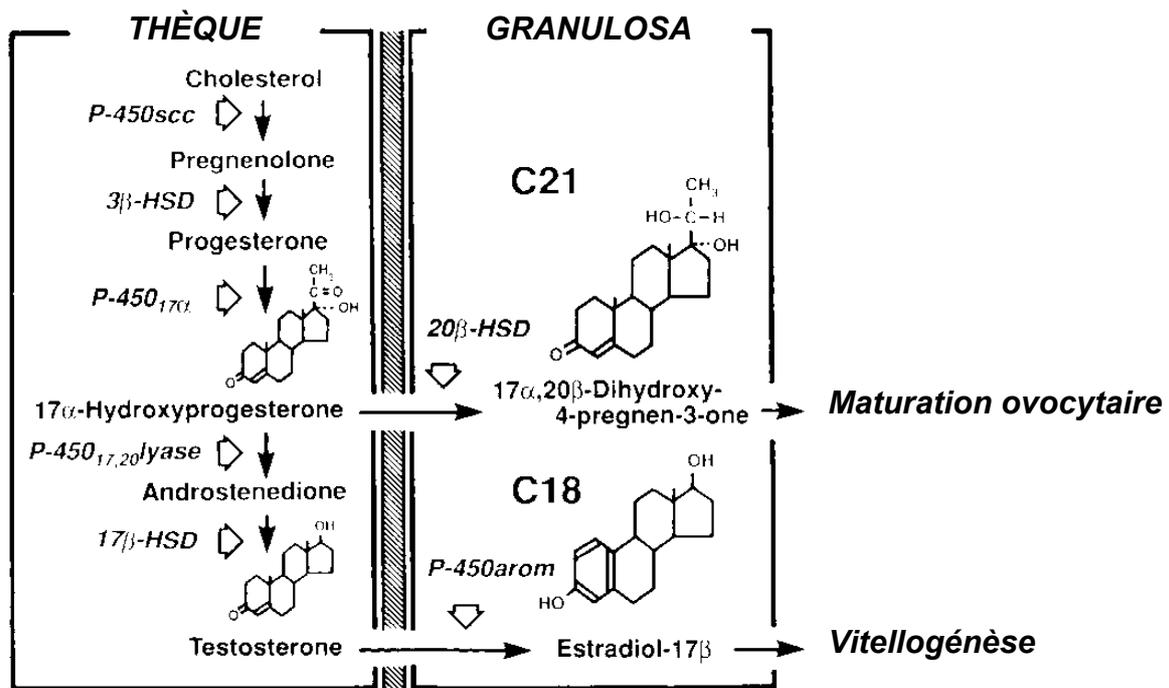


Figure 9. Les stéroïdes sexuels et le modèle à deux cellules (d'après Nagahama, 1994). Légende : les enzymes de la stéroïdogénèse : P-450 : cytochrome 450 ; scc : side-chain clivage (clivage de la chaîne latérale du cholestérol) ; 3b-HSD : 3b-Hydroxy-Stéroïde-Déshydrogénase ; P-450 17a : 17a-hydroxydesmolase ; P-450 17,20 lyase : C17-C20 lyase ; 17b-HSD : 17b-Hydroxy-Stéroïde-Déshydrogénase ; 20b-HSD : 20b-Hydroxy-Stéroïde-Déshydrogénase ; P-450 arom : aromatase

Les profils stéroïdiens observés chez les animaux au cours des cycles sexuels sont le résultat de la réponse des follicules aux gonadotropines, qui varie selon leurs stades. Ces profils ont été décrits chez plusieurs espèces, dont le carassin : pendant la gamétogénèse, les niveaux d'œstradiol et de testostérone augmentent progressivement (Kagawa *et al.*, 1983; Kobayashi *et al.*, 1986; Razani *et al.*, 1988). Lors de la maturation finale, les profils hormonaux changent brutalement chez les cyprinidés : on observe un pic de testostérone, suivi d'un pic de 17αP puis d'un pic de 17α20β (Kagawa *et al.*, 1983; Santos *et al.*, 1986; Aida, 1988) (voir Figure 10). Les niveaux d'œstradiol restent constants et assez faibles pendant cette période, mais on peut également observer une augmentation dans certains cas (Santos *et al.*, 1986). Chez la truite arc-en-ciel en revanche, on assiste à une forte diminution de l'œstradiol pendant la phase de migration de la VG (Fostier *et al.*, 1978; Fostier et Jalabert, 1986).

Le modèle mécaniste retenu pour expliquer la stéroïdogénèse ovarienne est un "modèle à deux cellules" fondé sur une coopération entre les cellules de la thèque et celles de la granulosa (Figure 9). Les cellules de la thèque seraient le lieu de la synthèse de 17αP ou de testostérone à partir du cholestérol, tandis que les cellules de la granulosa seraient chargées de transformer ces précurseurs

en stéroïdes "actifs", œstradiol pendant la vitellogénèse et $17\alpha,20\beta$ pendant la maturation finale. Ce modèle à deux cellules a été proposé pour le saumon amago *Oncorhynchus rhodurus* pendant la vitellogénèse (Kagawa *et al.*, 1982) et pendant la maturation finale (Young *et al.*, 1986). Cependant, ce modèle à 2 cellules est sans doute trop simpliste, et il n'est d'ailleurs pas valable chez le médaka *Oryzias latipes* et chez *Fundulus heteroclitus* où la synthèse de stéroïdes actifs est possible dans la granulosa sans thèque (Onitake et Iwamatsu, 1986; Petrino *et al.*, 1989). Chez les cyprinidés, les difficultés pour séparer les différentes enveloppes folliculaires rendent difficile une telle distinction. Une synthèse de stéroïdes par d'autres tissus est d'ailleurs possible : les cellules interstitielles de l'ovaire peuvent synthétiser de grandes quantités d'androgènes chez la carpe commune (Epler *et al.*, 1987a), ainsi que le tissu adipeux rétropéritonéal chez la carpe noire *Mylopharyngodon piceus* (Gur *et al.*, 2000).

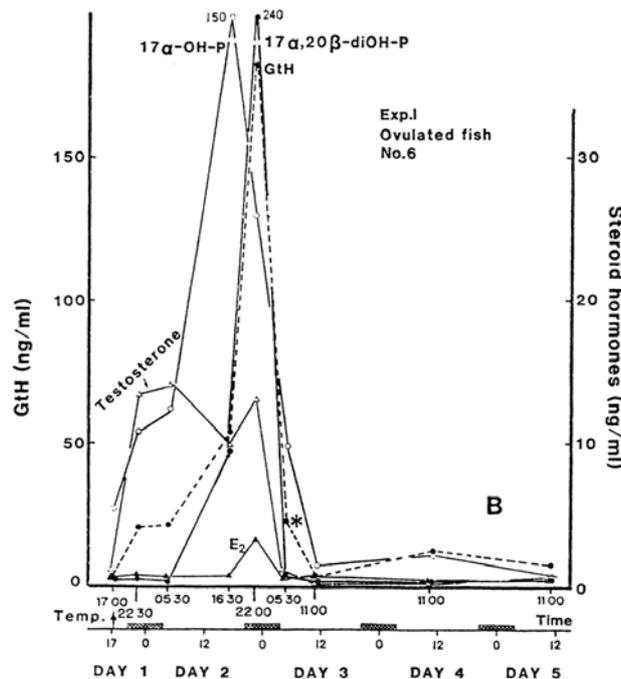


Figure 10. Profils de gonadotropine (GtH) et de stéroïdes lors de l'ovulation chez la carpe commune. 17α -OH : 17α -hydroxyprogestérone ; $17\alpha,20\beta$ -diOH-P : $17,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha,20\beta$ ou MIS) (d'après Santos *et al.*, 1986).

Un modèle à deux récepteurs a été proposé pour l'action des gonadotropines chez le saumon coho *Oncorhynchus kisutch* (Yan *et al.*, 1992). Il y aurait deux récepteurs aux gonadotropines : un récepteur de type 1 auquel peuvent se lier les deux gonadotropines mais préférentiellement FSH et un récepteur de type 2 hautement spécifique de LH (interaction très limitée avec FSH). Le récepteur

de type 1 est présent sur les cellules de la thèque et de la granulosa, le récepteur de type 2 uniquement sur la granulosa. La distribution des récepteurs varie selon le stade du cycle sexuel : le récepteur 1 disparaît presque de la granulosa avant l'ovulation, tandis que le récepteur 2 n'apparaît que sur la granulosa et avant la maturation (Miwa *et al.*, 1994). Depuis, les deux récepteurs ont été clonés chez le saumon amago *O. rhodurus* (Oba *et al.*, 1999a; Oba *et al.*, 1999b). Récemment, deux types de récepteurs aux gonadotropines ont été purifiés chez la carpe indienne *Labeo rohita* (Basu et Bhattacharya, 2002), chacun se liant préférentiellement à FSH ou LH (mais le récepteur de type 1 est moins spécifique de son ligand). Le récepteur 1 est à un niveau élevé pendant la gamétogénèse et en fin de vitellogénèse (*prespawning*), tandis que le récepteur 2 est à un niveau élevé en fin de vitellogénèse et pendant la reproduction. Les niveaux des deux récepteurs sont faibles après la période de ponte. Il semblerait donc que le système soit similaire chez cette espèce, avec peut-être un recouvrement plus important des caractéristiques de deux types de récepteurs, mais leur localisation n'est pas encore connue.

L'action des gonadotropines pendant la vitellogénèse se traduit par une production d'œstradiol par les follicules. L'œstradiol provoque la synthèse par le foie de vitellogénine et des protéines de la *zona radiata*. La vitellogénine est intégrée par endocytose dans l'ovocyte, grâce à des récepteurs spécifiques. Les ARNm de ces récepteurs seraient transcrits pendant la prévitellogénèse, et disparaissent des ovocytes par la suite : les récepteurs seraient donc sans doute recyclés pendant toute la vitellogénèse (Perazzolo *et al.*, 1999).

3.2.3 la maturation finale des ovocytes et l'ovulation

Le phénomène de la maturation finale des ovocytes a été très largement étudié chez différentes espèces, puisque c'est de la réussite de ce phénomène que dépendra dans une large mesure la réussite de la reproduction.

La maturation finale des ovocytes est un phénomène rapide chez les cyprinidés (quelques heures), caractérisé par une modification très rapide et drastique des profils hormonaux. Les profils ont été décrits chez le carassin (Stacey *et al.*, 1979a; Kagawa *et al.*, 1983), chez la carpe commune (Santos *et al.*, 1986), et revus chez divers cyprinidés (Aida, 1988). Au cours de la maturation se produit généralement un pic de la LH plasmatique, un pic de testostérone suivi d'un pic de $17\alpha P$ puis d'un pic de $17\alpha 20\beta$ (Figure 10). Il y a cependant des différences entre familles sur les profils des gonadotropines : les pics très aigus observés chez les cyprinidés sont beaucoup moins prononcés chez les salmonidés (Nagahama *et al.*, 1994).

La $17\alpha 20\beta$ serait le stéroïde inducteur de la maturation (MIS : *Maturation-Inducing Steroid*). La nature chimique du MIS n'a été formellement démontrée que chez quelques espèces (Nagahama *et*

al., 1994), mais il semble y avoir un consensus autour du fait que les poissons d'eau douce auraient la $17\alpha 20\beta$ comme MIS et les espèces marines la $17,20\beta$, 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20β -S) (bien que chez la daurade japonaise *Pagrus major* les deux substances agiraient simultanément pour déclencher la maturation (Ohta *et al.*, 2002). Nous suivons la plupart des auteurs qui font l'hypothèse que le MIS des cyprinidés (dont la carpe commune et le carassin) est la $17\alpha 20\beta$ (Jalabert, 1976; Jalabert *et al.*, 1977; Kime *et al.*, 1987).

La chronologie précise de la maturation a été décrite il y a plusieurs années (Jalabert, 1976).

Le déclenchement de la maturation ovocytaire et de l'ovulation implique un certain nombre de relais, selon la séquence suivante : gonadotropines, récepteurs aux gonadotropines, activation de la production de MIS par le follicule, récepteurs ovocytaires au MIS.

L'augmentation des récepteurs à la LH interviendrait en fin de vitellogénèse (Breton et Sambroni, 1989; Miwa *et al.*, 1994; Planas *et al.*, 2000) et précède la maturation.

La compétence du follicule à maturer a plusieurs composantes :

- l'aptitude des cellules folliculaires à "répondre" aux gonadotropines en produisant du MIS,
- la compétence de l'ovocyte proprement dit à répondre au signal du MIS, qui se traduit par la rupture de la VG (Jalabert *et al.*, 1977).

Au niveau morphologique, la fin de l'acquisition de la compétence est caractérisée par la migration de la vésicule germinative, et ne dépend pas de l'action du MIS (Jalabert *et al.*, 1977).

Lors du déclenchement de la maturation, la gonadotropine¹⁰ (abrégée en "GtH") interviendrait sur les enzymes de la stéroïdogénèse dans la thèque et la granulosa via une augmentation des taux d'AMPc¹¹ (adénosine monophosphate cyclique). Chez les salmonidés, le follicule répond à la GtH par la synthèse de l'enzyme 20β -HSD responsable de la production de $17\alpha 20\beta$ jusqu'à 2 mois avant la maturation (mais faiblement) (Young *et al.*, 1983a; Kanamori *et al.*, 1988; Nagahama et Yamashita, 1989). Le facteur limitant serait donc la capacité de production de son substrat, la 17α P, par la thèque (qui ne répond à la GtH que juste avant ou pendant la maturation) (Nagahama et

¹⁰ on utilise GtH comme terme générique pour faire référence à des préparations de gonadotropines imparfaitement purifiées qui sont le plus souvent utilisées dans la bibliographie, et qui peuvent contenir les deux types de gonadotropines (FSH et LH).

¹¹ les gonadotropines agissent sur des récepteurs couplés à des protéines G qui peuvent stimuler une adénylate-cyclase, responsable de la production d'AMPc, qui déclenchera à son tour des processus cellulaires de transcription ou de traduction.

Yamashita, 1989). L'action de la gonadotropine sur la production de MIS passe par une augmentation de l'AMPC intrafolliculaire (Nagahama *et al.*, 1985; Fostier et Jalabert, 1986). Lors de la maturation, il y a modification du nombre de récepteurs aux gonadotropines, mais aussi des phénomènes post-AMPC qui sont amplifiés (mais pas de modification du couplage GtH-AMPC) (Nagahama et Yamashita, 1989). Dans la thèse, les phénomènes rapportés sont une activation du cytochrome 450sc, une baisse de la 17,20 lyase et/ou de la 17 β -HSD (Nagahama *et al.*, 1994; Ohta *et al.*, 2002).

Il y aurait donc un basculement de la stéroïdogénèse de l'œstradiol vers le MIS dans la granulosa des ovocytes en maturation (Figure 9), sans doute par une diminution de l'activité du cytochrome P450-aromatase (Young *et al.*, 1983b; Kanamori *et al.*, 1988; Nagahama, 1997) et une augmentation de l'activité de la 20 β -HSD. Chez la truite arc-en-ciel, on observe ainsi une diminution de l'œstradiol plasmatique à partir du stade "VG périphérique" et une augmentation du MIS à partir du stade "VG subpériphérique", encore accrue lors de la rupture de la VG (Fostier et Jalabert, 1986). Il faut rappeler que ce basculement est difficilement observable chez les cyprinidés, probablement du fait de la coexistence dans l'ovaire d'ovocytes à différents stades : les taux d'œstradiol restent assez élevés pendant toute la maturation, et la supplémentation en œstradiol ne bloque pas la maturation (Kobayashi *et al.*, 1987). Même chez les salmonidés, le basculement n'est pas toujours observé *in vitro* sur des follicules intacts (Planas *et al.*, 2000). Cette différence pourrait être liée au caractère de pondeur unique (baisse de l'œstradiol), ou de pondeur multiple (taux plus constants) des espèces (Rinhard *et al.*, 1998).

Outre les enzymes de la stéroïdogénèse, d'autres protéines sont impliquées dans l'acquisition de la compétence, comme les connexines (responsables des jonctions-gap entre cellules) et les récepteurs au MIS. Cette acquisition de compétence est caractérisée par l'augmentation des jonctions-gap entre les cellules de la granulosa et entre granulosa et ovocyte (permettant le passage d'AMPC, de Ca²⁺...) (Patino *et al.*, 2001). Le MIS agit par un récepteur membranaire de l'ovocyte (Nagahama, 1987). Ce récepteur a été identifié chez plusieurs espèces dont la truite arc-en-ciel (Yoshikuni *et al.*, 1993), et caractérisé chez *Cynoscion nebulosus* (Thomas et Das, 1997). Chez cette espèce, la LH (comme l'AMPC) est responsable d'une augmentation des récepteurs au MIS avant la maturation (Thomas *et al.*, 2001), contribuant à l'acquisition de la compétence de l'ovocyte.

Une fois les capacités de synthèse et de réponse au MIS établies, la maturation proprement dite peut être déclenchée, avec synthèse active du MIS et reprise de la méiose.

La maturation est inhibée par une augmentation de l'AMPC intra ovocytaire ou de ses agonistes (Jalabert et Finet, 1986), et ces mêmes auteurs observent une corrélation négative entre l'AMPC et la

dose médiane efficace¹² du MIS. *In vitro*, le MIS provoque une diminution de l'AMPc, mais il existe de grandes différences entre femelles (Jalabert et Finet, 1986). Le MIS déclencherait un signal d'inhibition de l'adénylate-cyclase : une protéine G inhibitrice est à l'origine de la baisse de l'AMPc intraovocytaire induite par le MIS (Yoshikuni et Nagahama, 1994; Thomas *et al.*, 2002).

La maturation ovocytaire requiert la synthèse de protéines mais pas d'ARN (Jalabert, 1976). La transduction du signal du MIS (Figure 11) a été étudiée chez le carassin (Nagahama, 1997) et met en jeu un facteur particulièrement étudié chez de nombreux vertébrés, le MPF (*Maturation Promoting Factor*). Le MPF est composé de deux protéines associées : la cdc2 et la cycline B (protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire chez les eucaryotes). Chez le carassin, la cycline B est traduite sous l'effet du MIS pendant la maturation, juste avant la rupture de la VG, et s'associe avec la forme inactive de la cdc2kinase pour former un MPF inactif. Ce MPF est activé par une phosphorylation de la cdc2. Le MPF actif déclenche la reprise des phénomènes cellulaires.

D'autres facteurs peuvent en outre exercer un effet direct ou indirect sur la maturation ovocytaire : les IGF (*Insuline-like Growth Factor*) (Fostier *et al.*, 1994; Maestro *et al.*, 1997), le GnRH (Habibi *et al.*, 1988) peuvent induire la compétence et directement la méiose sur l'ovocyte, et la sérotonine en revanche inhibe ces mécanismes (Patino *et al.*, 2001). Les mécanismes d'action de ces facteurs ne sont pas très bien connus.

Les phénomènes d'acquisition de la compétence et de maturation ovocytaire ont été récemment décrits chez d'autres cyprinidés : la carpe indienne *Labeo rohita* (Sen *et al.*, 2002) et *Danio rerio* (Pang et Ge, 2002). Ces auteurs démontrent également que les activines A et B stimulent fortement la compétence des ovocytes.

Le phénomène de l'ovulation comprend la séparation de l'ovocyte des enveloppes folliculaires, puis la rupture de ces enveloppes pour expluser l'ovocyte. L'ovulation suit normalement la maturation, mais en est indépendante puisque l'on peut obtenir expérimentalement des ovulations sans maturation (Jalabert *et al.*, 1972). L'ovulation est la résultante de phénomènes complexes incluant divers facteurs au niveau du follicule, parmi lesquels les prostaglandines semblent jouer un rôle clé (Jalabert, 1976; Goetz et Theofan, 1979; Epler *et al.*, 1985). Elle est sans doute également déclenchée par l'action du MIS (Goetz et Theofan, 1979), et nécessite des synthèses d'ARN et de protéines. Les prostaglandines seraient synthétisées sous l'influence du MIS, peut-être par l'intermédiaire d'un récepteur nucléaire aux progestagènes (Pinter et Thomas, 1999). Les

¹² c'est la dose de MIS qui provoque la maturation de 50% des ovocytes *in vitro*, elle est donc inversement corrélée à la compétence.

concentrations de MIS nécessaires sont sans doute plus élevées que pour la maturation (Jalabert, 1978).

Outre les effets majeurs des gonadotropines, d'autres substances (activines, inhibines, GnRH, IGF, hormone de croissance...) sont susceptibles d'intervenir sur les mécanismes ovariens par des effets endocrines ou paracrines, dont l'importance relative au cours des processus *in vivo* est mal connue.

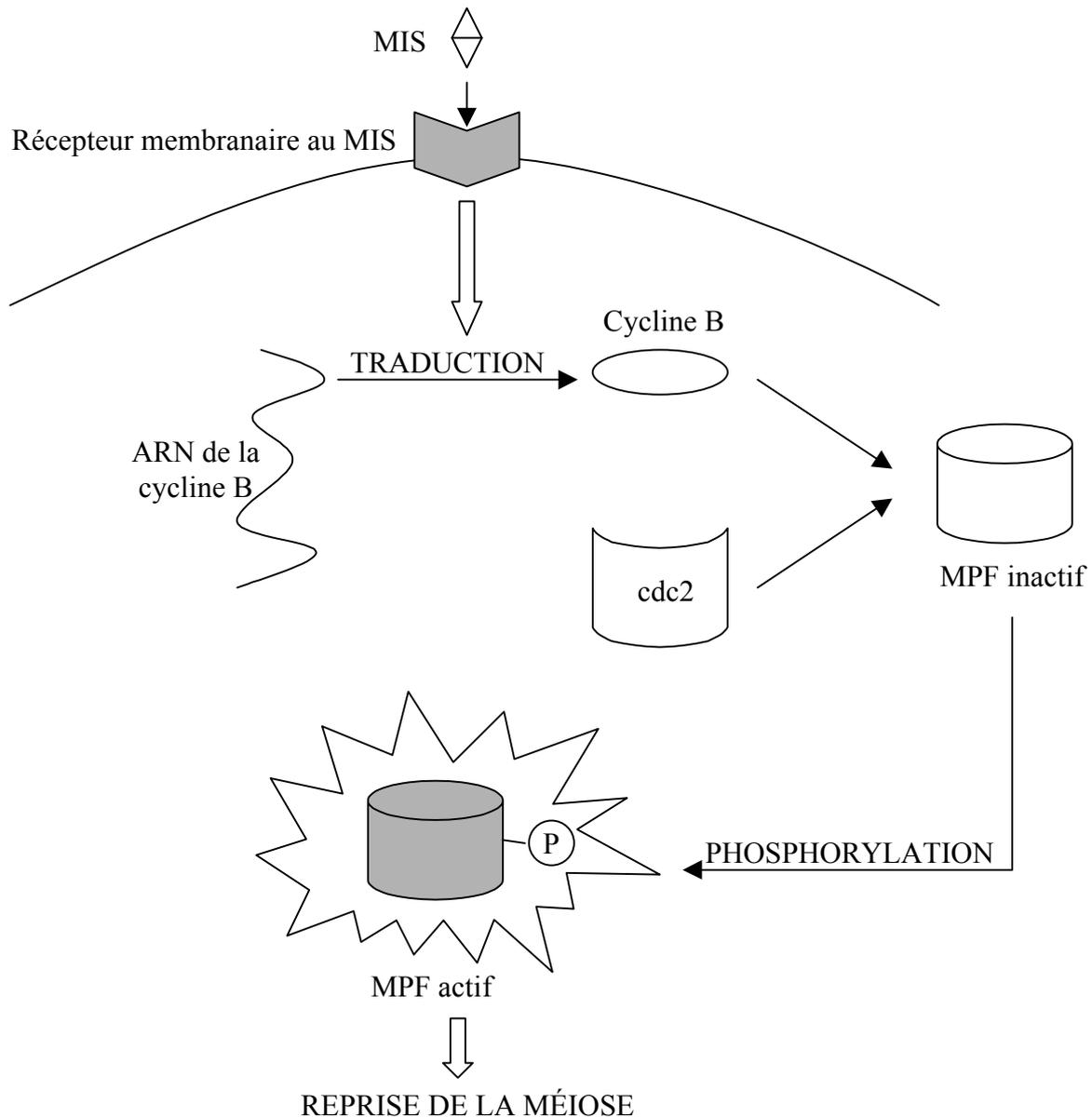


Figure 11. Mécanismes moléculaires de l'activation du MPF (*Maturation-Promoting Factor*) par le MIS (*Maturation-Inducing Steroid*) chez le carassin (d'après Nagahama, 1997).

3.2.4 les régulations centrales

Nous avons vu que les gonadotropines sont les principales responsables de la croissance ovocytaire puis de la maturation. Ainsi, la régulation de la synthèse, puis de la libération de ces hormones par le système nerveux central va déterminer le déroulement des cycles sexuels.

Chez les poissons, il n'y a pas de système porte entre l'hypothalamus et l'hypophyse, cette dernière est directement innervée par des neurones en provenance de diverses zones du cerveau, qui vont donc directement réguler les différentes étapes de la synthèse et de la libération des gonadotropines. Ces phénomènes seront de plus modulés par diverses autres substances.

L'étude de la régulation centrale des cycles sexuels a fait bien entendu l'objet de très nombreuses publications, et de très nombreux effecteurs ont été mis en évidence, ainsi que des interactions entre ces différents effecteurs. La difficulté consiste à évaluer l'importance biologique *in vivo* des différents mécanismes, ainsi que les conditions (en particulier le moment du cycle) dans lesquelles ils interviennent. Il s'agit d'un réseau complexe et imbriqué, et une même substance peut avoir des effets opposés selon le contexte endocrinien.

Le principal facteur de libération des gonadotropines est le GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*). Le GnRH est un décapeptide qui est présent avec peu de variations chez tous les vertébrés. Il y a 16 formes connues à ce jour, dont 10 sont présentes chez les poissons (Dubois *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2002), dénommées selon l'espèce chez laquelle elles ont été isolées pour la première fois. Il semble qu'il y ait 3 populations distinctes de neurones à GnRH chez tous les téléostéens, qui sécrètent différentes formes de GnRH (Montero et Dufour, 1996; Parhar *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 2002). Une population dans le Nerf Terminal (*Terminal Nerve*), qui sécrète du sGnRH (salmon-GnRH) ; une population dans le cerveau antérieur ventral (aire préoptique) sécrétant du sGnRH ou une forme spécifique de l'espèce considérée ; une population dans le cerveau moyen, sécrétant la forme cGnRH-II (chicken-II) (Dubois *et al.*, 2002).

Chez le carassin, deux formes de GnRH ont été identifiées pour le moment : le sGnRH (séquence en acides aminés pGlu – His – Trp – Ser – Tyr – Gly – Trp – Leu – Pro – Gly – NH₂) et le cGnRH-II (pGlu – His – Trp – Ser – His – Gly – Trp – Tyr – Pro – Gly – NH₂).

L'innervation de l'hypophyse par les neurones des différentes populations varie beaucoup selon les espèces (Montero et Dufour, 1996). Chez le carassin, il semble que les deux formes, sGnRH et cGnRH-II, soient présentes en quantités équivalentes dans l'hypophyse. La majorité du cGnRH-II dans le cerveau du carassin provient du Nerf terminal, mais ne semble pas impliquée dans la reproduction. Par contre, on n'observe pas de variation du GnRH dans les autres zones du cerveau au cours de la reproduction, ce qui démontre que la mesure de GnRH par dosage radio-

immunologique n'est pas appropriée pour évaluer l'activité des neurones à GnRH. Les données chez d'autres espèces tendent à prouver que c'est le GnRH de l'aire préoptique qui est important pour la reproduction (Kobayashi *et al.*, 1997).

Deux récepteurs au GnRH ont été clonés chez le carassin, avec des affinités différentes pour les différentes formes de GnRH et une répartition différente : ils sont exprimés tous les deux dans l'hypophyse et le cerveau, par contre, un seul est exprimé dans le foie et les gonades (Illing *et al.*, 1999; Dubois *et al.*, 2002). Par des expériences de liaison, Habibi *et al.* (1989) ont démontré l'existence de deux sites de liaison au GnRH dans le cerveau du carassin (un à haute affinité et un à basse affinité, alors qu'un seul a été mis en évidence chez le silure africain), dont les capacités de liaison augmentent en fin de cycle sexuel (mars-avril), correspondant à la plus grande réceptivité des poissons au GnRH et aussi aux plus forts taux de LH basale. Ils observent également une petite augmentation du récepteur à haute affinité en octobre-novembre. Seuls les récepteurs à haute affinité semblent impliqués dans la réponse des gonadotropines (Habibi *et al.*, 1989).

Les deux GnRH ont une activité stimulatrice des gonadotropines, mais selon des mécanismes de transduction apparemment différents. Des analogues plus puissants ont été synthétisés par substitution de certains acides aminés (voir le chapitre sur la maîtrise de la reproduction en élevage ci-dessous). Les effets du GnRH semblent différer selon les stades du cycle sexuel. Chez la carpe commune femelle (Kandel-Kfir *et al.*, 2002), l'injection d'un analogue du sGnRH (sGnRH-A) chez les juvéniles n'a d'effet ni sur les niveaux d'ARNm des gonadotropines dans l'hypophyse, ni sur la LH plasmatique. Cela pourrait être dû à une absence de récepteurs au GnRH chez les immatures (Yaron, 1995). En début de vitellogénèse, le sGnRH-A provoque une augmentation temporaire (qui disparaît en 24 heures) des ARNm de la β -FSH et de la β -LH, ainsi qu'une libération de LH de l'hypophyse et une augmentation de l'œstradiol plasmatique. En fin de vitellogénèse, les effets sur les ARNm de la β -FSH disparaissent, par contre les effets stimulants sur les ARNm de β -LH, la libération de LH (la FSH n'est pas dosée) et l'augmentation de l'œstradiol sont fortement accrus. Le GnRH déclenche la libération de LH (vidange du stock) en 6 à 12 h, puis une synthèse qui remet les réserves à leur niveau initial 24 h plus tard (Kandel-Kfir *et al.*, 2002). On voit donc que chez la femelle la LH semble stimulée par le GnRH à tous les moments du cycle, alors que la FSH l'est seulement en début de cycle.

Le principal mécanisme central inhibiteur de la sécrétion des gonadotropines est le système dopaminergique : des neurones à dopamine inhibiteurs de l'hypophyse sont situés dans l'aire préoptique. La dopamine intervient par plusieurs mécanismes : elle diminue directement la sécrétion de LH (via les récepteurs D2), inhibe la libération du GnRH dans l'hypophyse, diminue la liaison du GnRH à son récepteur et peut aussi interférer avec le signal intracellulaire du GnRH

(Trudeau, 1997). La dopamine ne semble pas avoir d'effet sur les niveaux d'ARN des deux gonadotropines (Melamed *et al.*, 1998).

De nombreuses autres substances ont un effet plus ou moins démontré sur la sécrétion de LH chez le carassin (Trudeau, 1997) : des amines comme la noradrénaline (petit effet positif), la 5-hydroxytryptamine (petit effet positif) ; des acides aminés comme le NMDA (*N-méthyl-D,L-aspartic acid*, un agoniste du glutamate), qui stimule la libération de LH, comme la taurine, l'hypotaurine et la β -alanine. Enfin, plusieurs neuropeptides ont également des effets gonadotropes positifs, comme la CCK (cholécystokinine), le neuropeptide Y (NPY) (Kah *et al.*, 1989a; Breton *et al.*, 1991), l'inhibine et l'activine.

Le GABA (*Gamma-AminoButyric Acid*), un acide aminé, a un effet plus nuancé. Il augmente la sécrétion de LH en début et milieu de cycle, mais pas en fin de cycle, sans doute en favorisant la libération de GnRH dans l'hypophyse (Kah *et al.*, 1992).

Les stéroïdes ont également une action sur la synthèse et la libération des gonadotropines, mais leur rôle paraît différent selon les conditions expérimentales (gonadectomie ou supplémentation, effets à plus ou moins long terme...), les stades sexuels et les espèces de poissons.

On a longtemps pensé que les stéroïdes avaient une action inhibitrice sur la libération de LH, puisque les expériences de gonadectomie (supprimant les gonades et donc les sources de stéroïdes) mettaient en évidence une augmentation des taux de LH circulante (Trudeau, 1997; Kobayashi *et al.*, 2000). Cependant, d'autres approches mettent en évidence un effet plutôt stimulateur des stéroïdes sur l'action de plusieurs neuropeptides et neurotransmetteurs : la testostérone agit directement sur l'hypophyse pour augmenter la réceptivité au GnRH et stimuler le pic de gonadotropine chez le carassin ; l'effet stimulateur du NPY est accru par la testostérone et l'œstradiol ; les stéroïdes augmentent l'inhibition dopaminergique ; l'œstradiol diminue la stimulation du GABA, mais pas la testostérone, ce qui pourrait avoir un rôle séquentiel au cours du développement des gonades (Kah *et al.*, 1992). Il y a différents éléments de réponse aux stéroïdes en amont des gènes de la sous-unité α des gonadotropines, parmi lesquels un demi-élément de réponse aux androgènes et un demi-élément de réponse aux œstrogènes (Sohn *et al.*, 1998a). Il semble que les stéroïdes aient des effets différentiels selon le stade de développement des animaux. Chez le carassin, la testostérone, l'œstradiol et la 11-kétotestostérone provoquent une diminution des quantités d'ARNm de la β -FSH hypophysaire à tous les stades (juvéniles et adultes). En revanche la testostérone et l'œstradiol (mais pas la 11-kétotestostérone) stimulent la transcription de la β -LH chez les juvéniles seulement (peut-être à cause d'une baisse de sensibilité chez les adultes) (Kobayashi *et al.*, 2000). Ces auteurs observent un effet négatif des stéroïdes sur les niveaux

circulants de LH, mais aucun impact sur les contenus en LH hypophysaire ou les niveaux d'ARNm. Toutefois à court terme (*in vivo*), on peut observer une stimulation des ARNm de β -LH par la testostérone. Chez la truite arc-en-ciel, l'œstradiol inhibe la sécrétion de FSH, mais pas de LH (Saligaut *et al.*, 1998). Il apparaît clairement que les mécanismes de synthèse et de libération des gonadotropines sont régulés de façon différente, et ceci apparaît particulièrement dans les effets des stéroïdes (Breton *et al.*, 1997), mais aussi pour les effets de la température et de l'alimentation (Sohn *et al.*, 1998b).

Les interactions entre stéroïdes et inhibition par la dopamine sont encore mal connues. L'inhibition dopaminergique, bien que faible, est présente chez la truite arc-en-ciel, et est exprimée en présence d'œstradiol (Saligaut *et al.*, 1999). Chez ce poisson, la baisse d'œstradiol pendant l'ovulation permettrait la levée de l'inhibition dopaminergique. Cet effet n'est pas mis en évidence chez les cyprinidés : les taux d'œstradiol restent plus ou moins constants pendant l'ovulation chez la carpe (Santos *et al.*, 1986; Levavi-Zermonsky et Yaron, 1986) et la balnéation avec de l'œstradiol ne modifie pas les taux d'ovulation chez le carassin (Kobayashi *et al.*, 1987).

L'intégration de ces différents signaux pour la régulation des cycles est encore très peu abordée. La contribution des différents mécanismes et les rapports entre signaux inducteurs et inhibiteurs détermine les profils hormonaux observés. Une revue chez le carassin (Trudeau, 1997), évoque une boucle positive GnRH-GtH-stéroïdes (avec peut-être une contribution du NPY) en hiver, sous inhibition dopaminergique. Le GABA serait peut-être responsable de l'augmentation lente des taux de LH plasmatique au cours du cycle. Le pic de LH préovulatoire serait provoqué par un pic de GnRH et une suppression du blocage dopaminergique. La régression des tissus après la reproduction serait provoquée par une disparition de la boucle positive, car à ce stade l'inhibition dopaminergique est très faible.

3.3 *l'influence des conditions du milieu*

La sélection naturelle sur la descendance agit par le succès reproducteur des différents individus, qui dépend de l'âge à la première reproduction, de l'intervalle entre saisons de reproduction, du nombre de pontes par saison, du nombre d'œufs par ponte, des taille et qualité des gamètes (Wooton, 1982) et de la survie des alevins. Pour chacun de ces paramètres, des influences environnementales ont été démontrées. Ces influences ont donné lieu à de nombreuses revues (de Vlaming, 1972; Lowe-McConnell, 1979; Scott, 1979; Wooton, 1982; Lam, 1983; Billard et Gillet, 1984; Legendre et Jalabert, 1988; Munro *et al.*, 1990; Bromage *et al.*, 2001).

Le modèle bioénergétique permet une approche globale, basée sur les interactions croissance/reproduction : étant donné une ressource énergétique disponible, le système

neuroendocrinien la répartit entre maintenance, soma, réserves, gonades, et cela correspond à un emploi du temps entre activités reproductrices et non reproductrices. Le contenu énergétique moyen des œufs, estimé à partir des données de 50 téléostéens, est de 23 kJ/g MS (Wooton, 1979), auquel il faut ajouter l'énergie nécessaire au développement ovarien et à la production des œufs. Selon le même auteur, chez *Gasterosteus aculeatus*, l'énergie contenue dans les ovaires peut dépasser 20% de l'énergie corporelle, et environ 6,5% de l'énergie ingérée va vers les ovaires. La reproduction est associée à une perte d'énergie du soma (transfert vers les ovaires). L'effort de reproduction est estimé de 5 à 25% chez le médaka, jusqu'à 40% chez le tilapia (Mironova, 1977) et 70% chez les salmonidés semelpares (Wooton, 1982).

Ainsi, la reproduction est un grand investissement en termes énergétiques (surtout pour la femelle), donc il est essentiel pour l'animal de "choisir le bon moment". D'autre part, les milieux d'eau douce sont très variables et présentent de grandes différences annuelles pour la survie des alevins. On peut ainsi distinguer les facteurs proximaux (responsables du déclenchement de la reproduction) des facteurs ultimes (qui déterminent la survie des alevins et donc le succès de la reproduction) (Lam, 1983). La plupart des auteurs soulignent le fait qu'il y a probablement une interaction entre un cycle reproducteur endogène et les cycles climatiques pour déclencher les différentes étapes de la reproduction, le cycle environnemental jouant le rôle de "synchroniseur" (*zeitgeber*) du cycle endogène. Ces relations sont toutefois mal connues et sont davantage le produit d'inférences que de démonstrations expérimentales.

Les différents stades de la gamétogénèse semblent répondre à des stimuli environnementaux différents et les stades les plus consommateurs d'énergie semblent les plus dépendants de l'environnement (Wooton, 1982). Le poisson doit trouver le bon moment pour développer ses gonades : trop tôt, il perd de la croissance somatique potentielle et donc du potentiel de reproduction (relation taille/fécondité), trop tard il met en cause la survie des alevins ; il s'agit donc de maximiser la croissance avant reproduction (Munro, 1990).

La température est considérée comme un facteur majeur d'action sur le métabolisme, quelle que soit la fonction physiologique considérée, du fait de la poécilothermie des poissons (Reynolds et Casterlin, 1977; Lam, 1983; Stacey, 1984). Les tolérances thermiques pour la reproduction sont plus étroites que pour la croissance (Gerking, 1980) et la température peut agir à tous les niveaux du contrôle de la reproduction, aussi bien au niveau central que périphérique (Stacey, 1984), et également via le métabolisme général ou l'axe somatotrope par exemple. Nous reviendrons en détail sur les effets de la température dans le chapitre 2.

Le second facteur par ordre d'importance est la photopériode, qui a donné lieu à de nombreuses études et revues (Bromage *et al.*, 2001), mais qui est considéré comme secondaire chez les cyprinidés (Billard *et al.*, 1978).

L'alimentation influe sur toutes les fonctions physiologiques des poissons, et donc en particulier sur la reproduction. Les effets potentiels peuvent être très nombreux : directs sur l'axe gonadotrope, au niveau du foie (synthèse des constituants ovocytaires), des ovaires, mais également indirects, via la croissance (et donc la taille et/ou les réserves énergétiques des individus) ou via des modulations de l'axe endocrinien somatotrope. Plusieurs auteurs distinguent les espèces selon que la gamétogénèse se fait à partir des réserves corporelles (*capital breeders*) ou de la consommation instantanée de nourriture (*income breeders*) (Henderson *et al.*, 1996; Ali et Wootton, 1999). Il est bien entendu que les situations intermédiaires existent, qui vont déterminer la réponse des poissons aux fluctuations de l'environnement. La position d'une espèce sur ce continuum et ses besoins en nutriments particuliers vont déterminer l'impact plus ou moins important du régime alimentaire sur le déroulement de la gamétogénèse et la qualité des gamètes produits.

L'alimentation peut avoir une influence sur les différents critères reproducteurs des poissons (Izquierdo *et al.*, 2001) : la puberté, le déclenchement de la reproduction, la fécondité, la fertilité, le développement des embryons et des larves... Différentes caractéristiques de l'aliment peuvent exercer cette influence : les quantités ingérées, les proportions et la nature des différents constituants (lipides, glucides, protéines, vitamines...). Toutefois, les effets dépendent beaucoup des espèces considérées, et de nombreuses études sont conduites chez des poissons marins carnivores (bar, daurade), qui ont probablement des exigences assez différentes d'autres espèces. L'importance de la composition en acides gras du régime, en particulier, semble moindre chez les cyprinidés (Farkas *et al.*, 1980; Domaizon *et al.*, 2000) que chez d'autres espèces comme les sparidés (Izquierdo *et al.*, 2001), du fait de leurs capacités plus importantes de synthèse hépatique (élongation et désaturation). Nous reviendrons de façon plus détaillée sur les effets de l'alimentation dans le chapitre 3.

3.4 *la maîtrise de la reproduction en élevage*

Les poissons maintenus en élevage sont dans un environnement artificiel qui la plupart du temps ne leur assure pas les conditions nécessaires aux différentes étapes de la gamétogénèse. Des blocages peuvent donc apparaître lors de la gamétogénèse, mais pour la plupart des espèces ils concernent uniquement les dernières étapes du cycle, c'est à dire la maturation finale et/ou l'ovulation (Zohar et Mylonas, 2001).

La maîtrise de la reproduction des poissons en élevage peut se faire par deux grandes voies : des manipulations volontaires des conditions de l'environnement peuvent déclencher, bloquer ou décaler les reproductions ; et d'autre part des techniques de supplémentation hormonale sont utilisées pour déclencher ou synchroniser les pontes (induction de ponte).

Les techniques de manipulations de l'environnement sont utilisées pour moduler les cycles sexuels, particulièrement des modifications de photopériode chez les salmonidés (Bromage *et al.*, 2001), ou des variations de températures pour induire la ponte chez les cyprinidés (Stacey *et al.*, 1979b; Davies *et al.*, 1986). La supplémentation hormonale en revanche n'est pas encore maîtrisée pour manipuler les phases initiales des cycles sexuels, mais quasi-uniquement pour déclencher la maturation finale et la ponte chez presque toutes les espèces d'élevage, en particulier celles de la famille des cyprinidés (Zohar et Mylonas, 2001).

Les techniques d'induction artificielle de la ponte sont connues depuis les années 1930. Auparavant, l'approvisionnement en alevins de carpes chinoises (comme de nombreuses autres espèces) provenait uniquement des captures d'alevins dans le milieu naturel.

Les premières techniques utilisaient des injections d'extraits hypophysaires, puis, à partir des années 1970 a commencé l'utilisation de GnRH (Breton et Weil, 1973), et enfin l'utilisation d'une combinaison de GnRH et d'un antidopaminergique fut de plus en plus utilisée (Peter *et al.*, 1988). Enfin, la mise au point d'analogues superactifs du GnRH accrut encore l'efficacité de ces traitements. L'analogue [des-Gly¹⁰,D-Arg⁶]-sGnRH Ethylamide, ou sGnRH-A (pGlu – His – Trp – Ser – Tyr – DArg – Trp – Leu – Pro –NH₂Ethylamide) est reconnu comme étant l'un des plus puissants chez le carassin (Peter *et al.*, 1987) et chez de nombreuses espèces de cyprinidés (Peter *et al.*, 1988). Les analogues ont des substitutions d'acides aminés en position 6 et n'ont plus le 10^{ème} résidu, ce qui les rend plus résistants à la dégradation (Zohar *et al.*, 1990) et leur permet d'augmenter la durée et l'amplitude des pics de LH lors des inductions (Weil *et al.*, 1992).

4. la démarche de travail retenue

4.1 les objectifs pour le développement

Pour le développement de l'élevage de la carpe herbivore dans le contexte ivoirien, il semble qu'il faille s'orienter vers la mise en place d'écloseries privées, petites ou moyennes. La reproduction naturelle de cette espèce n'ayant jamais été observée en zone tropicale, ni en étang, il paraît nécessaire de recourir à la reproduction artificielle pour la production d'alevins. La technique d'induction de ponte par injection d'extraits hypophysaires est déjà maîtrisée par certains pisciculteurs pour l'induction de la ponte du silure *Heterobranchus isopterus*. Les pisciculteurs sont

parfaitement capables de maîtriser des techniques compliquées dans un contexte "rustique" pourvu que les matériels nécessaires soient facilement accessibles. La taille de ces écloseries artisanales et les moyens de leur mise en œuvre (pisciculteurs individuels, groupements, etc.) se définiront au fur et à mesure du développement de cet élevage, mais cette solution permet d'envisager un développement pérenne :

- elle évite les faillites systématiquement observées en Afrique des grosses écloseries publiques,
- elle limite les coûts de transport de l'écloserie aux pisciculteurs et les risques de mortalité,
- elle limite les besoins en investissements et trésorerie pour le fonctionnement,
- elle permet une souplesse d'utilisation des infrastructures (étangs) et leur reconversion éventuelle en étangs de grossissement quand le marché n'est pas favorable,
- elle permet une adaptation rapide aux évolutions du marché (volume, localisation),
- elle a des coûts de production faibles (main d'œuvre, coûts fixes des infrastructures...),
- elle garantit le contrôle de la production par les pisciculteurs et évite le risque de monopoles.

Cette approche nécessite donc de mettre au point des techniques peu coûteuses, robustes, économes en matériel technique élaboré, et susceptibles d'être mises en œuvre en conditions difficiles. L'objectif de ces travaux était donc de fournir des données pour concevoir des écloseries autonomes pour leur production, sans a priori sur le type ou la taille de ces structures.

4.2 les premiers constats sur les cycles sexuels en Côte d'Ivoire

Les premières observations réalisées sur les poissons élevés en Côte d'Ivoire ont montré de fortes capacités de croissance, conformes à ce qui est décrit dans la bibliographie : obtention de poissons de 1,5 à 2 kg en 6 à 7 mois de grossissement dans de bonnes conditions d'alimentation (apport de végétaux dans les étangs ou barrages). En revanche, le suivi de géniteurs en étangs a fait apparaître des dysfonctionnements au niveau de la reproduction. Si des mâles matures, caractérisés par des nageoires pectorales rugueuses (Shireman et Smith, 1983), et spermiantes, étaient facilement obtenus, seule une très faible proportion de femelles atteignaient la fin de vitellogénèse, quelle que soit la saison. Des femelles en fin de vitellogénèse étaient observées tout au long de l'année, mais le contrôle d'un grand nombre de géniteurs était nécessaire pour en trouver quelques-unes pour pratiquer l'induction de ponte. Des reproductions artificielles par injection d'extrait hypophysaire de carpe commune ont été obtenues, mais les taux de réponse étaient très faibles pendant une grande partie de l'année (de janvier à juin-juillet), et des mortalités totales des œufs avant l'éclosion ont parfois été observées. Tous ces éléments rendent problématique la production d'alevins : il est

nécessaire de disposer d'un gros stock de géniteurs, de les suivre régulièrement pour déterminer le stade de maturité des femelles, et de pratiquer de nombreuses tentatives de reproduction artificielle avant d'obtenir des alevins à prégressir.

4.3 la démarche retenue pour les recherches

Le problème de déroulement des cycles sexuels se posait donc principalement pour les femelles. Nous avons fait l'hypothèse que ces dysfonctionnements étaient liés aux conditions d'élevage des poissons, puisqu'il ne semblait pas que le stock d'origine au Maroc rencontre de problèmes de reproduction. Les conditions climatiques (température et photopériode) de la Côte d'Ivoire sont très différentes des conditions d'origine de l'espèce, et sans doute supérieures ou égales à la limite thermique supérieure pour la reproduction naturelle de cette espèce (26°C, voir paragraphe 2.4). Par ailleurs, l'alimentation des poissons repose uniquement sur des végétaux, croissant naturellement dans les étangs et/ou apportés par les pisciculteurs. Ces conditions d'élevage pourraient donc être à l'origine des perturbations ou des blocages de la fonction de reproduction femelle.

La démarche s'est donc structurée selon 4 axes (voir Figure 12).

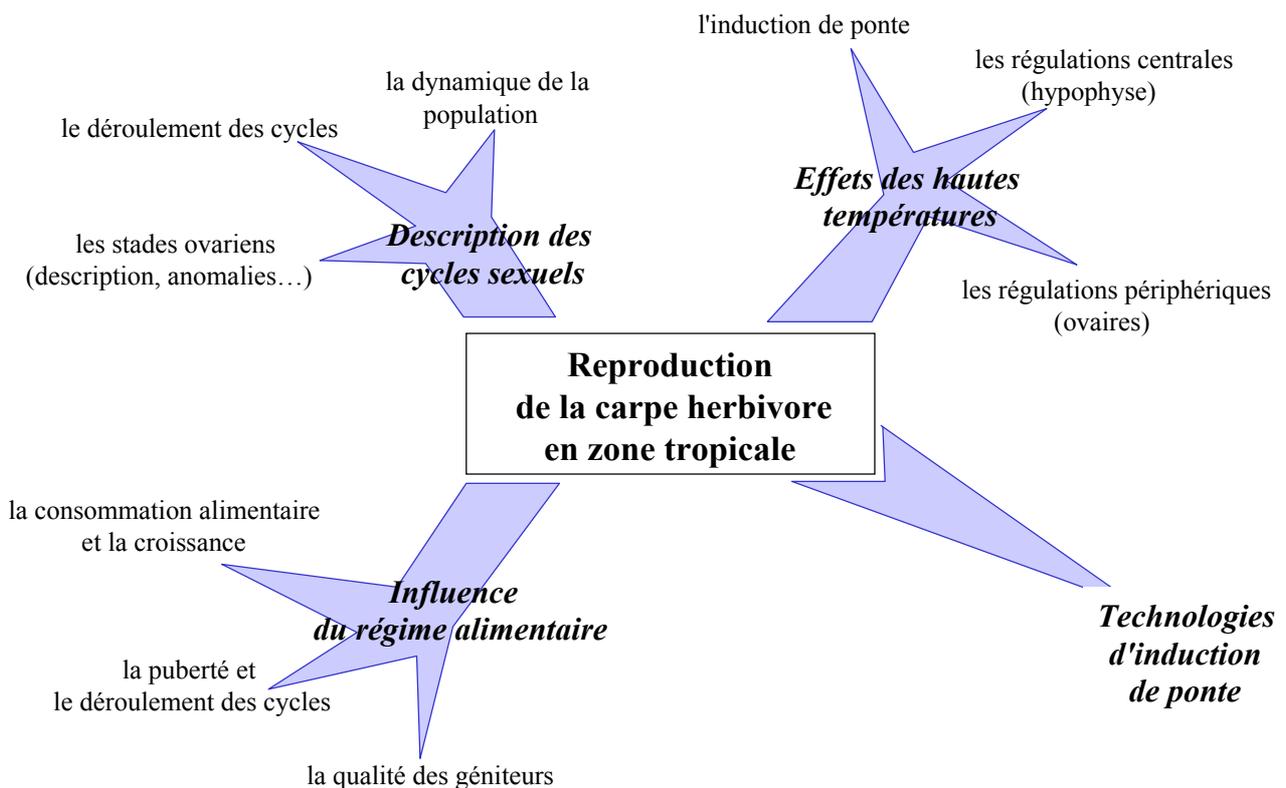


Figure 12. Plan de la démarche de recherche.

D'abord nous avons choisi de décrire précisément le déroulement et les caractéristiques des cycles sexuels dans les conditions d'élevage en Côte d'Ivoire, pour déterminer les éventuels points de blocages, c'est-à-dire les stades sensibles à ces conditions d'élevage.

Ensuite, nous avons étudié expérimentalement l'impact des températures élevées *in vivo* sur les inductions de ponte et *in vitro* sur les différents niveaux de régulation hormonale responsables de l'ovulation.

Le second facteur externe testé a été l'alimentation : nous avons comparé l'impact de différents régimes alimentaires sur la puberté, le développement sexuel et la qualité des géniteurs femelles.

Enfin, nous avons comparé les résultats de différents protocoles d'induction de ponte, en fonction d'hypothèses liées aux régulations hormonales en conditions de température élevée.

Ces quatre volets constituent chacun un des chapitres de ce document.

La mise en œuvre des expérimentations s'est faite sur le terrain en Côte d'Ivoire et en Pologne dans des écloseries disposant d'installations thermorégulées. Les analyses des prélèvements et l'exploitation des résultats ont été effectuées à la station Scribe de l'Inra de Rennes.

Chapitre 1

Description des cycles sexuels¹³

¹³ Ce chapitre reprend en grande partie le contenu de l'article "Disrupted sexual cycles in female grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) raised in tropical conditions", de F. Glasser, C. Cauty, B. Mourot, et B. Breton, 2003, publié dans *Aquaculture*, vol. 220, pp. 857-868.

1. Introduction

Les caractéristiques climatiques sont reconnues comme étant les principaux déterminants du déroulement des cycles sexuels chez les poissons. De ce point de vue, les conditions en Côte d'Ivoire sont très différentes de celles des zones d'origine de la carpe herbivore (voir ci-dessus le paragraphe sur la biologie de la carpe herbivore). Les premiers constats réalisés en Côte d'Ivoire mettaient en évidence un certain nombre de dysfonctionnements de la fonction reproductrice chez ces poissons, tels qu'un très faible taux de femelles en fin de vitellogénèse et de faibles taux de réponse à l'induction de ponte par extraits hypophysaires de carpe commune. Comme préalable à l'amélioration des conditions de la reproduction artificielle, il était donc nécessaire de décrire précisément le déroulement et les caractéristiques des cycles sexuels dans nos conditions, afin de cerner les points éventuels de blocage à résoudre.

Nous avons donc mené une étude descriptive sur les stades sexuels et le déroulement des cycles. A cette fin, nous avons notamment développé une méthode de dosage de la vitellogénine plasmatique de carpe herbivore afin de caractériser le déroulement de la vitellogénèse. Enfin, pour les femelles en fin de vitellogénèse, les caractéristiques observées en Côte d'Ivoire ont été comparées à celles de femelles au même stade en Pologne, élevées dans des conditions climatiques proches de celles de l'aire de répartition naturelle de l'espèce.

2. Matériel et méthodes

2.1 les poissons et structures expérimentales

Les carpes herbivores utilisées en Côte d'Ivoire sont issues d'un stock importé du Maroc en 1994. Tous les poissons présents en Côte d'Ivoire sont issus de reproductions artificielles à partir de ce stock d'origine. Les poissons ont été maintenus dans les étangs (270 à 370 m²) de la station piscicole de Gagnoa (Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire, 5° lat. N, voir Figure 1), et nourris aux herbes à éléphant (*Pennisetum purpureum*, voir Figure 13). Les poissons ont été marqués individuellement au Dermojet (avec du bleu Alcyan) sur les nageoires, pour permettre un suivi individuel du déroulement des cycles sexuels.



Figure 13. Plants d'herbe à éléphant *Pennisetum purpureum*.

Pour comparer les critères histologiques et endocriniens des femelles en fin de vitellogénèse en Côte d'Ivoire avec ceux de poissons élevés en conditions tempérées, nous avons utilisé des carpes herbivores de la pisciculture de l'Institut des Pêches Continentales de Żabieniec (près de Varsovie, Pologne, 52° lat. N, voir Figure 14). Les carpes ont été pêchées dans les étangs puis maintenues pendant deux semaines avant la période normale de reproduction (début juin) dans des bacs à température contrôlée et sous photopériode naturelle. Les poissons ont été séparés en deux groupes, un groupe maintenu à 24±1°C (température habituellement utilisée pour l'induction de ponte) et l'autre à 28±1°C (température moyenne en Côte d'Ivoire).



Figure 14. Carte de la Pologne, indiquant les piscicultures où ont été réalisées les expérimentations (Żabieniec et Goslawice).

Les températures moyennes mensuelles des étangs et les photopériodes dans les deux localités (Gagnoa et Žabieniec) sont détaillées Figure 15.

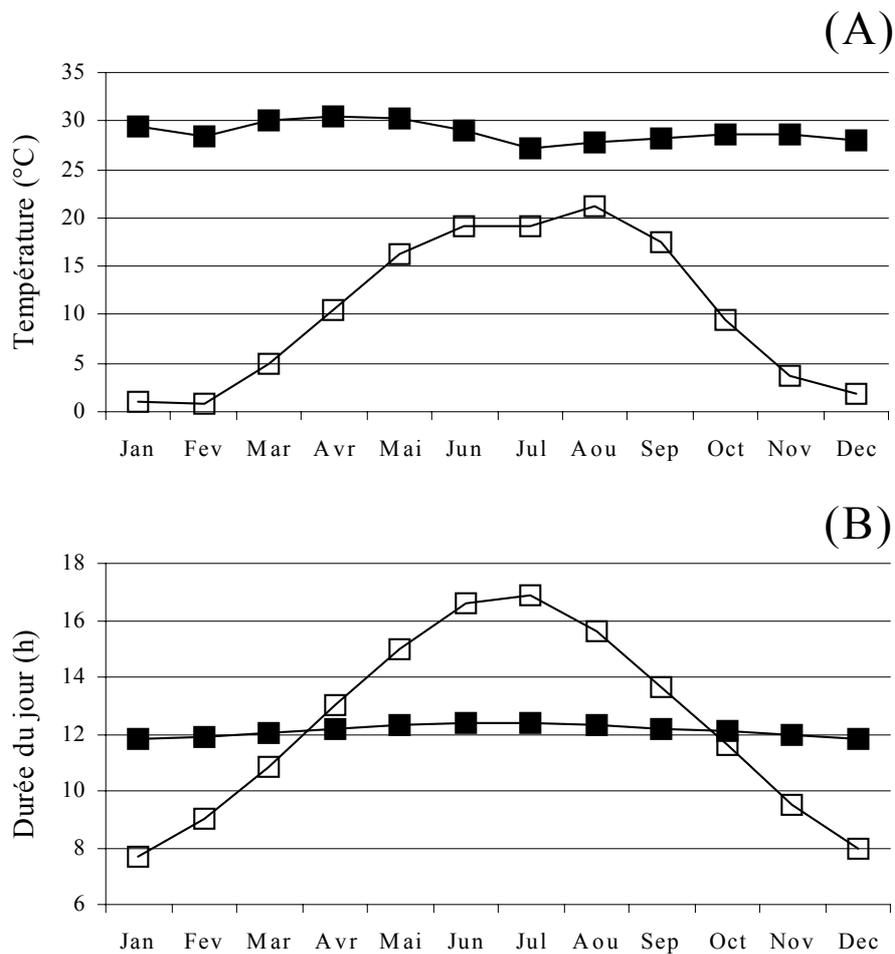


Figure 15. Température moyenne mensuelle des étangs (A) et durée de la photopériode (B) à Gagnoa (■) et Žabieniec (□).

2.2 la description des stades sexuels

La description des stades de la gamétogénèse a fait l'objet d'un mémoire de fin de DEA (Glasser, 1999). Des prélèvements d'ovaires (obtenus par sacrifice des animaux ou biopsie intraovarienne à la pipelle de Cornier) ont été fixés dans du liquide de Bouin Hollande, puis déshydratés et inclus dans la paraffine. Les coupes histologiques obtenues ont été colorées par la méthode de l'Azan de Heidenhain (Gabe, 1968). Les stades ovocytaires ont été déterminés et corrélés avec les diamètres ovocytaires (calculés à partir des périmètres des ovocytes mesurés avec le logiciel Optimas).

2.3 *le suivi des cycles*

Les cycles sexuels des femelles (effectifs variables de 15 à 50 femelles) ont été suivis sur trois ans (1998 à 2000) par biopsie intraovarienne à la pipelle de Cornier tous les 10 à 30 jours. Toutes les manipulations ont été effectuées sous anesthésie au 2-phénoxyéthanol à 200 ppm. Les prélèvements étaient recouverts de liquide physiologique (NaCl 0,9%) pour éviter le dessèchement et 100 ovocytes mesurés sous loupe binoculaire. Les stades ovariens ont ensuite été déterminés sur la base de la distribution des diamètres ovocytaires (les ovocytes de moins de 40 μm de diamètre étaient ignorés).

La position de la vésicule germinative a été déterminée sur 50 ovocytes post-vitellogéniques, éclaircis au liquide de Stockard. Les ovocytes qui devenaient translucides en moins de 3 min ont été considérés comme atrétiques.

Les prélèvements de sang ont été réalisés avec des seringues héparinisées (solution d'héparinate de lithium à 2 mg/ml), centrifugés et congelés à -20°C jusqu'à analyse.

2.4 *le dosage de la vitellogénine*

Nous avons mis au point un dosage immuno-enzymatique (ELISA) spécifique de la vitellogénine de carpe herbivore. La production de vitellogénine a été induite chez des mâles, puis la vitellogénine a été purifiée à partir de leur plasma (schéma Figure 16). Des anticorps ont été produits chez un lapin et nous avons optimisé les caractéristiques du dosage sur la base de celui développé pour la truite arc-en-ciel (Mourot et Le Bail, 1995).

2.4.1 l'induction de la production de vitellogénine

La production de vitellogénine a été induite chez des mâles de carpe herbivore, par injections intrapéritonéales d'œstradiol-17 β (5 mg/kg), à 3 jours d'intervalle pendant 2 semaines. Le sang a été prélevé en présence d'héparine et d'aprotinine, centrifugé puis congelé à -20°C . Des prélèvements de sang ont été réalisés de la même façon chez des mâles témoins non oestrogénisés.

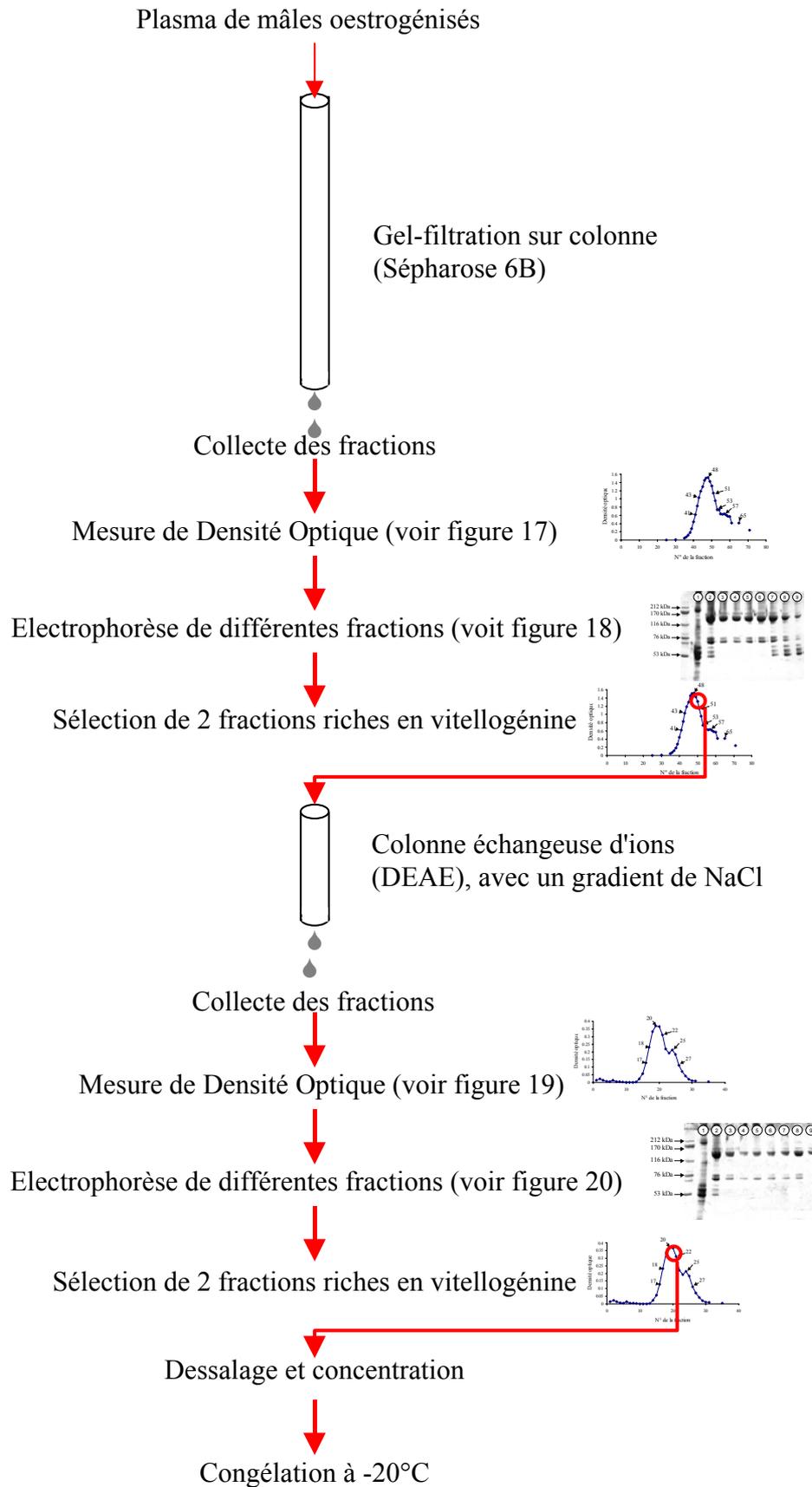


Figure 16. Protocole de purification de la vitellogénine de carpe herbivore.

2.4.2 la purification

Tout d'abord, l'électrophorèse des plasmas sur gel d'acrylamide 7% en conditions dénaturantes (*SDS-PAGE*) permet de mettre en évidence, après coloration au bleu de coomassie, plusieurs bandes présentes chez les mâles oestrogénisés et absentes chez les mâles témoins (Figure 18, puits 1 et 2) : une bande fortement marquée à 125 kDa, et trois bandes plus faiblement marquées à 72, 76 et 79 kDa. La masse molaire de la bande principale est du même ordre que celles des "monomères" de vitellogénine obtenus chez d'autres espèces par cette technique, comprises entre 110 et 180 kDa (Mananos *et al.*, 1994; Nunez-Rodriguez *et al.*, 1997; Parks *et al.*, 1999; Fukada *et al.*, 2003). Tous les auteurs constatent également l'apparition de bandes de masse molaire inférieure, considérées comme des produits de dégradation de la molécule. C'est sans doute également le cas ici, puisque quand on repasse en électrophorèse un fragment de gel découpé dans la bande principale, les bandes secondaires réapparaissent.

La purification s'est faite en deux étapes, selon le protocole utilisé pour la carpe commune (Tyler et Sumpter, 1990) (Figure 16).

La première étape est une gel-filtration, sur colonne de Sépharose 6B (700 x 27 mm), dans un tampon Tris 100mM, CaCl₂ 2mM, Azide de Sodium 0,1%, à pH 7,8. Après un rinçage de la colonne avec du tampon contenant de l'aprotinine à 5 mg/l (inhibiteur de protéases), 2 ml de plasma de mâle oestrogénisé ont été passés sur la colonne, avec un débit de 75 ml/h. La densité optique des fractions collectées (7,5 ml) a été mesurée à 280 nm (voir Figure 17) pour détecter les pics de protéines.

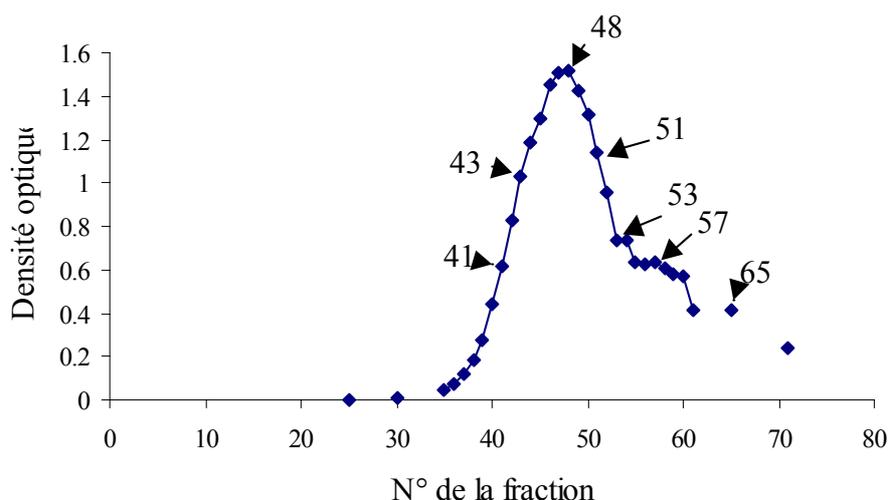


Figure 17. Densité optique des différentes fractions collectées à la sortie de la gel-filtration.

Ensuite, différentes fractions ont été passées en électrophorèse sur un gel d'acrylamide à 7% en conditions dénaturantes (voir Figure 18), pour détecter celles contenant de la vitellogénine.

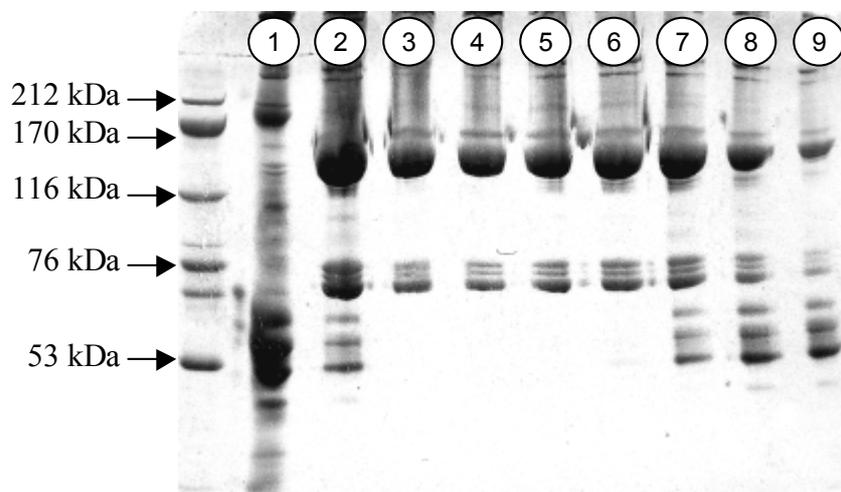


Figure 18. Gel d'électrophorèse des différentes fractions à la sortie de la gel-filtration. Le puits de gauche est un marqueur de taille (HMW-SDS calibration kit, Pharmacia). Les différents échantillons ont été dilués pour obtenir une charge de protéines de l'ordre de 4 à 5 µg/puits. Puits 1: plasma de mâle témoin; 2: plasma de mâle oestrogénisé; 3: fraction 41; 4: fraction 43; 5: fraction 48 ; 6: fraction 51 ; 7: fraction 53 ; 8: fraction 57 ; 9: fraction 65.

Les fractions 46 et 47, contenant la bande intéressante et parmi les plus concentrées en protéines, ont ensuite subi la seconde étape, une chromatographie sur colonne échangeuse d'ions : après équilibrage, un pool de ces deux fractions (non concentrées) a été passé sur une colonne de DEAE (80 x 25 mm) dans du tampon Tris 100 mM, CaCl₂ 2 mM à pH 7,8 avec un débit de 40 ml/h. Les fractions étaient collectées toutes les 12 min (8 ml). Après le passage d'un premier front (fractions 1 à 5) a débuté le gradient de NaCl, jusqu'à une concentration de 0,4 M. La densité optique des fractions collectées a été mesurée à 280 nm (voir Figure 19), puis différentes fractions ont été passées en électrophorèse en conditions dénaturantes (voir Figure 20). Deux pools correspondant aux deux pics ont été conservés (pool 1 : fractions 18 à 23, et pool 2 : fractions 24 à 27). Ils ont été dessalés par 2 concentrations (Centricon 10) suivies de redilutions dans un tampon Tris-CaCl₂ sans NaCl. Le contenu protéique des pools a été déterminé par un dosage BCA (Pierce), étalonné par une gamme de sérum-albumine bovine, puis ils ont été dilués pour obtenir une concentration finale de 200 µg/ml avant stockage à -20°C. Ces solutions ont servi de vitellogénine purifiée de référence pour le test ELISA (voir plus loin).

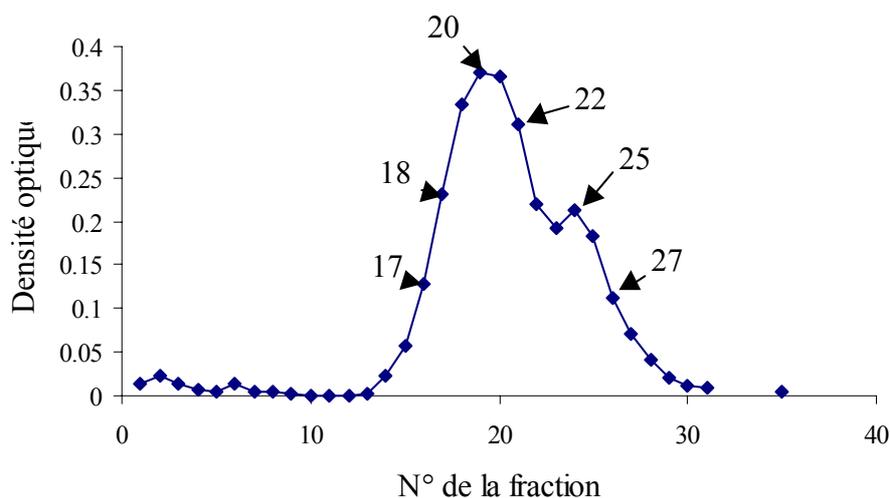


Figure 19. Densité optique des différentes fractions à la sortie de la colonne échangeuse d'ions.

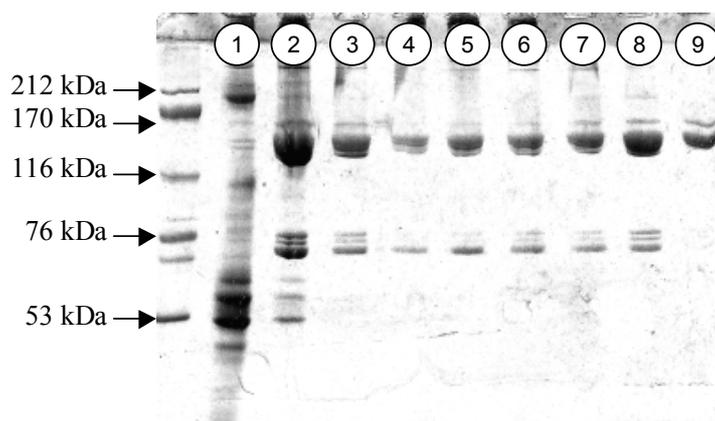


Figure 20. Gel d'électrophorèse des différentes fractions à la sortie de la colonne échangeuse d'ions. Le puits de gauche est un marqueur de taille (HMW-SDS calibration kit, Pharmacia). Les différents échantillons ont été dilués pour obtenir une charge de protéines de l'ordre de 4 à 5 µg/puits. Puits 1: plasma de mâle; 2 : plasma de mâle oestrogénisé ; 3: fractions 46-47 (en sortie de gel-filtration, avant échange d'ions) ; 4: fraction 17 ; 5: fraction 18 ; 6: fraction 20 ; 7: fraction 22 ; 8: fraction 25 ; 9: fraction 27.

2.4.3 la production d'anticorps

La production d'anticorps a été réalisée par injections multipoints d'un lapin, alternativement sur les deux flancs, de la bande de gel acrylamide correspondant à la vitellogénine, écrasée (après une électrophorèse préparative), avec de l'adjuvant de Freund complet. Des injections ont été pratiquées à J0 (1,5 mg de protéines), J15 (1,1 mg), J40 (0,7 mg), J60 (0,7 mg). Le lapin a été abattu à J75, le sang a été centrifugé et le plasma congelé à -20°C.

2.4.4 la mise au point du dosage ELISA

Le dosage immuno-enzymatique a été développé selon le protocole mis au point pour la vitellogénine de truite arc-en-ciel (Mourot et Le Bail, 1995). Le dosage est basé sur la compétition, pour la liaison à l'anticorps, entre la vitellogénine greffée sur la microplaque et la vitellogénine des échantillons dosés. On mesure la quantité d'anticorps liés à la vitellogénine greffée par une réaction enzymatique donnant un produit coloré.

Protocole ELISA :

Lavage : après chaque étape, les plaques sont lavées 3 fois avec un tampon Tris-HCl (10 mM, pH 7,5), contenant 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20 et 5 mg/l de gentamycine (TBS-T).

Greffage : 150µl d'une solution de vitellogénine dans un tampon carbonate (50mM, pH 9,6) sont incubés 3 h à 37°C.

Saturation: les sites libres de la plaque sont bloqués par du sérum de porc à 2% dans le tampon de lavage (TBS-T-P), pendant 30 min à 37°C.

Incubation : 75µl d'échantillon ou de standard sont incubés avec 75 µl de la solution d'anticorps anti-vitellogénine, pendant 16 h à 37°C.

Incubation de l'anticorps secondaire : 150µl sérum de mouton anti-lapin dilué à 1:5000 sont incubé 2 h à 37°C.

Incubation de peroxydase-anti-peroxydase (PAP) : 150 µl de PAP diluée à 1:5000 dans le TBS-T-P sont incubés 1 h à 37°C.

Révélation : L'activité peroxydase est révélée par 200µl d'une solution contenant de l'OPD (o-phénylènediamine à 0,5 g/l) et 0,05% de peroxyde d'hydrogène (30%) dans un tampon ammonium (50mM, pH 5) pendant 15 min à l'obscurité. La réaction est stoppée par l'ajout de 50µl d'acide sulfurique 5M.

La densité optique est mesurée à 490 nm (Microplate autoreader EL 311, Bio-Tek Instruments).

Dans un premier temps, nous avons testé différentes combinaisons de solutions de greffage et dilutions d'anticorps anti-vitellogénine, en l'absence de vitellogénine libre dans les puits (liaison maximale B₀). Les résultats sont repris dans la Figure 21.

Nous avons retenu la combinaison d'un greffage de 100 ng/ml de vitellogénine avec l'anticorps dilué au 1:200 000, donnant une densité optique maximale de l'ordre de 2, une faible liaison non-spécifique et la plus faible variabilité.

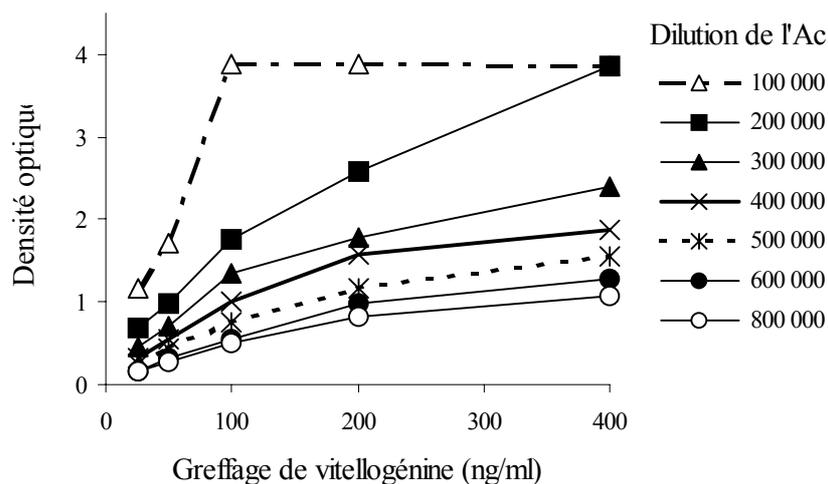


Figure 21. Comparaison de la liaison maximale (B_0) pour différentes combinaisons de greffages et de dilutions des anticorps pour le dosage ELISA de la vitellogénine (Ac : anticorps).

Nous avons testé les interactions avec les autres constituants du plasma : une gamme de dilution d'un plasma de carpe herbivore mâle (dilutions de 1:2 à 1:64) ne met en évidence aucune liaison pour des dilutions supérieures à 1:8 (Figure 22). Il n'y a pas d'interaction entre notre anticorps et la vitellogénine de truite arc-en-ciel purifiée au laboratoire (Mourot et Le Bail, 1995) de 300 ng/ml à 100 000 ng/ml (Figure 22).

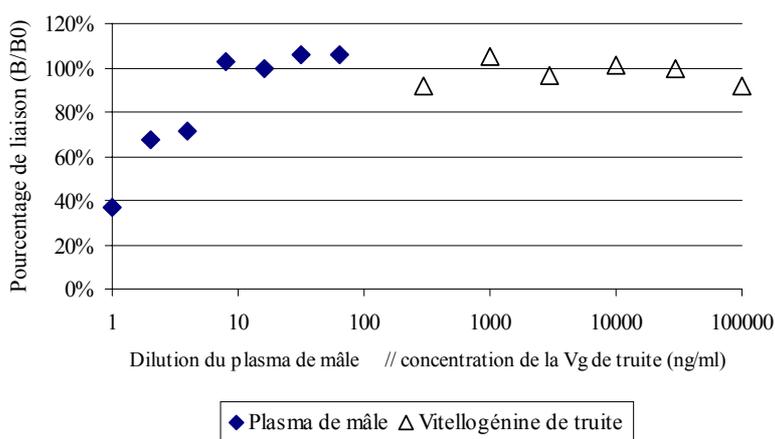


Figure 22. Pourcentage de liaison de l'anticorps à la vitellogénine greffée (B/B_0), en présence de sérum de carpe herbivore mâle (pur ou dilué de 2 à 64 fois) ou de vitellogénine de truite (300 ng/ml à 100 μ g/ml).

Une gamme de dilutions de vitellogénine purifiée (de 30 ng/ml à 200 000 ng/ml) est bien linéaire après une transformation par la fonction logit^{14} , et n'est pas modifiée par l'ajout de plasma de mâle dilué à 1:64 (Figure 23). Ceci prouve la spécificité de notre anticorps et confirme l'absence d'interactions avec d'autres constituants du plasma dilué. La borne inférieure correspond à un B/B_0 de 95% (significativement différent de B_0 étant donné la faible variabilité de B_0), et la borne supérieure à un B/B_0 de 5%.

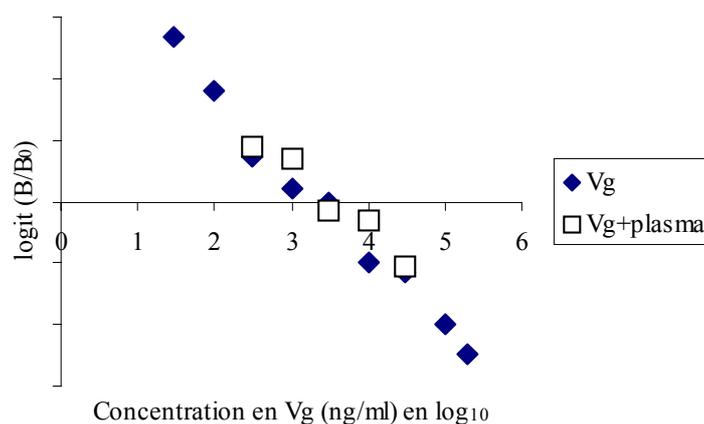


Figure 23. Pourcentage de liaison d'une gamme de vitellogénine pure ou surchargée avec du sérum de carpe mâle (transformation par *logit*).

Enfin, nous avons comparé la courbe standard avec une gamme de dilutions de plasma de mâle oestrogénisé (de 1:300 à 1:100 000) et une gamme de dilutions de plasma de femelle (de 1:30 à 1:3000) (Figure 24). Les profils obtenus sont parallèles à la courbe standard pour des dilutions entre 300 et 1000 fois. Au-delà, d'autres phénomènes (dissociation spontanée de la molécule...) doivent perturber l'interaction anticorps-vitellogénine.

Finalement, les caractéristiques du dosage sont les suivantes :

- on n'observe pas d'interaction avec les autres constituants du plasma, pour une dilution supérieure au 1:8^{ème} (Figure 22),
- on n'observe pas de croisement avec la vitellogénine de truite arc-en-ciel (Figure 22),
- les courbes de dilution des plasmas de mâle oestrogénisé et de femelle sont parallèles à la courbe standard au moins pour des dilutions comprises entre 1:300 et 1:1000 (Figure 24),
- le coefficient de variation intraplaque est de 11% (n=5),

¹⁴ $\text{logit} (B/B_0) = \ln (B/B_0/(1-B/B_0))$, où B/B_0 est le pourcentage de liaison de l'anticorps à la vitellogénine greffée en présence de l'échantillon (par rapport à la liaison maximale B_0 en l'absence d'échantillon).

- le coefficient de variation interplaque est de 20% (n=5),
- la limite de détection est de 30 ng/ml d'échantillon, soit 9 µg/ml dans du plasma de femelle à la dilution habituellement utilisée (1:300).

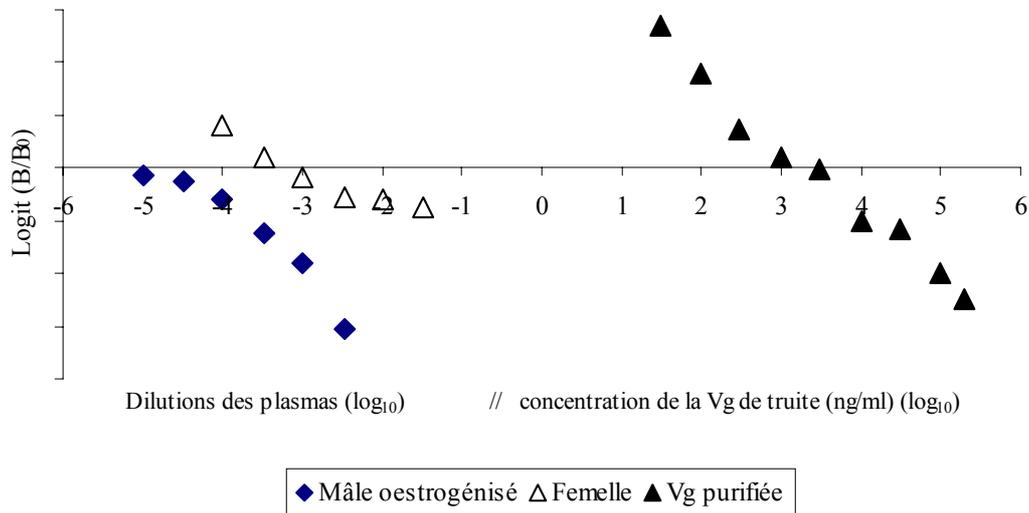


Figure 24. Pourcentage de liaison de l'anticorps à la vitellogénine greffée, en présence de plasma de mâle œstrogénisé (dilué de 300 à 100 000 fois), de plasma de femelle (dilué de 30 à 10 000 fois) ou de vitellogénine purifiée (30 ng/ml à 200 µg/ml). La courbe est transformée par la fonction *logit*. (Vg : vitellogénine).

2.5 les incubations d'ovaires *in vitro*

Les effets de la température sur la production d'œstradiol par les ovaires ont été déterminés par des incubations de fragments d'ovaires *in vitro* en présence d'extraits hypophysaires de carpe commune. Les extraits hypophysaires ont été préparés par broyage d'un pool d'hypophyses (préalablement séchées après délipidation à l'acétone) dans du NaCl à 0,9%, suivi d'une centrifugation. Les surnageants ont été prélevés et congelés à -20°C jusqu'à utilisation. Les concentrations sont exprimées en fonction du poids sec d'hypophyses broyées ramené au volume de solution de NaCl utilisé pour l'extraction.

Ces expériences ont été menées sur des femelles en début de vitellogénèse. Les ovaires ont été prélevés et conservés sur glace dans un tampon d'incubation (Jalabert, 1976). Ils ont été découpés en petits fragments avant pesée.

Nous avons étudié la cinétique des niveaux d'œstradiol et la réponse des ovaires à différentes doses d'extrait hypophysaire en fonction de la température.

Pour la cinétique des niveaux d'œstradiol, nous avons utilisé une dose de 10 µg/ml d'extrait hypophysaire sec. Les incubations ont été réalisées en triplicats sur microplaques 24 puits, chaque puits contenant 1,5 ml de tampon et 250 mg d'ovaire. L'extrait hypophysaire de carpe commune a été rajouté au milieu avant le démarrage de l'incubation. Les plaques ont ensuite été incubées dans une étuve ventilée ou des bains-marie aux températures étudiées (24, 28 et 32°C). Toutes les deux heures, 250 µl de milieu ont été prélevés et remplacés par du milieu contenant de l'extrait hypophysaire à la concentration initiale.

L'influence de la dose d'extrait sur la réponse a été évaluée pour un temps d'incubation de 12 heures, pour des fragments de 180 µg d'ovaire dans 800 µl de milieu. Les doses d'extrait hypophysaire sec étaient de 0 (témoin) ; 1,25 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 µg/ml de milieu.

Chaque protocole a été réalisé sur 3 femelles.

Après prélèvement et congélation des milieux d'incubation, les stéroïdes ont été dosés directement dans les milieux selon la procédure décrite ci-dessous.

2.6 *le dosage des stéroïdes*

La testostérone et l'œstradiol plasmatiques ont été mesurés par le dosage radio-immunologique développé pour la truite arc-en-ciel (Fostier *et al.*, 1978).

Les stéroïdes ont été dosés directement dans les milieux d'incubation *in vitro*, et après extraction pour les prélèvements de plasma sanguin.

2.6.1 l'extraction des stéroïdes des plasmas

Les stéroïdes ont été extraits à partir de 250 µl de plasma par 2 ml d'une solution de cyclohexane-acétate d'éthyle (v/v) en tubes de verre. Après vortexage (2 fois 30 s), la phase aqueuse a été congelée et le surnageant organique versé dans un tube pour évaporation. L'extraction a été réalisée une seconde fois sur la phase aqueuse et les surnageants regroupés avant évaporation à sec.

Si le dosage devait intervenir plus de 2 jours après extraction, les culots étaient repris dans 1 ml d'éthanol, congelés à -20°C et évaporés de nouveau juste avant le dosage. Sinon, les culots ont été conservés secs à 4°C jusqu'au dosage.

2.6.2 le dosage RIA des stéroïdes

Le dosage est basé sur le déplacement, par des stéroïdes marqués au tritium, de la liaison entre l'anticorps et les stéroïdes présents dans l'échantillon. On mesure la quantité de stéroïdes marqués liés à l'anticorps.

Les résidus secs des extractions ont été dissous dans 500 ou 750 µl de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,25) contenant 1 g/l de gélatine (TPG), les milieux d'incubation ont été dosés directement.

Préincubation : 100µl des standards et des échantillons sont incubés avec 100 µl de l'anticorps spécifique (dilué dans le TPG contenant des gammaglobulines de lapin), dans des tubes en polypropylène pendant 2 h à 4°C.

Incubation : 100 µl de stéroïde marqué au tritium (dilué dans le TPG) sont ajoutés dans chaque tube et incubés 3 h à 4°C.

Séparation des fractions : la précipitation est réalisée par l'addition de 2 ml de tampon phosphate contenant 25% de polyéthylène glycol 6000. La précipitation dure 16 h à 4°C. L'immunoprécipité est séparé par centrifugation à 3000 g pendant 1 h. Les surnageants sont éliminés par retournement. Les tubes sont ensuite rincés par 2 ml de tampon de précipitation et centrifugés 45 min à 3000 g. Les surnageants sont de nouveau éliminés par retournement. 100 µl d'éthanol sont ajoutés, les tubes vortexés et 2,5 ml de liquide à scintillation (Instafluor Packard) ajoutés. Après 30 min à 40°C, le comptage est réalisé par un compteur Tri-Carb 2100 TR (Packard) pendant 5 min par tube.

2.7 *les analyses statistiques*

L'existence de différences de niveau plasmatique des hormones entre stades sexuels a été testée par Analyse de la variance non paramétrique de Kruskal-Wallis, et les comparaisons de moyennes deux à deux par des tests U de Mann-Whitney. Les différences de sécrétion d'œstradiol dans les essais *in vitro* ont été évaluées par analyse de la variance multivariable (MANOVA), pour dissocier un effet de la température d'un effet "femelle". Les différences entre groupes ont été analysées par un test de Scheffé. Les niveaux inférieurs aux limites de détection ont été égalisés aux limites de détection pour le calcul des moyennes et les tests statistiques. Le niveau de risque retenu est de 5%. Toutes les données sont présentées comme moyenne ± écart-type.

3. Résultats

3.1 les stades ovariens

A partir des observations histologiques, les diamètres des différents stades ovocytaires ont été déterminés en utilisant la nomenclature de (Makeyeva et Yemel'yanova, 1989). Ces données figurent sur le Tableau 2 et la Figure 26.

Tableau 2 : Détermination des diamètres ovocytaires correspondant aux différents stades ovocytaires décrit chez la carpe herbivore (Makeyeva et Yemel'yanova, 1989).

Stade ovocytaire	Phase	Caractéristiques	Diamètre (μm)
II (prévitellogénèse)			40-200
	5	Début de vacuolisation du cytoplasme	200-400
III (vitellogénèse)	6	Poursuite de la formation des vacuoles et apparition des granules vitellins	400-500
	7	Accumulation intense des granules vitellins	500-700
	8	Ovocyte rempli de vitellus	700-1300

A partir de ces données et des histogrammes de fréquence des diamètres d'ovocytes obtenus par les observations à la loupe binoculaire, quatre stades ovariens ont été définis :

- Prévitellogénèse : tous les diamètres sont inférieurs à 400 μm , tous les ovocytes sont en prévitellogénèse ou en début de vacuolisation du cytoplasme (Figure 25-A).
- Début de vitellogénèse : la plupart des ovocytes sont encore en prévitellogénèse, apparition d'ovocytes en vitellogénèse (vacuolisation, début d'accumulation du vitellus), qui représentent moins de 30% du nombre total d'ovocytes (Figure 25-B).
- Fin de vitellogénèse : répartition bimodale des diamètres d'ovocytes, avec un mode correspondant aux stades de prévitellogénèse et un mode correspondant aux ovocytes en fin de vitellogénèse (diamètres de 700 à 1300 μm) (Figure 25-D).
- Surmature : Les ovocytes en fin de vitellogénèse sont moins nombreux, on trouve de gros ovocytes en atresie et des ovocytes de tous les stades intermédiaires (un nouveau groupe d'ovocytes entre en vitellogénèse) (Figure 25-E).

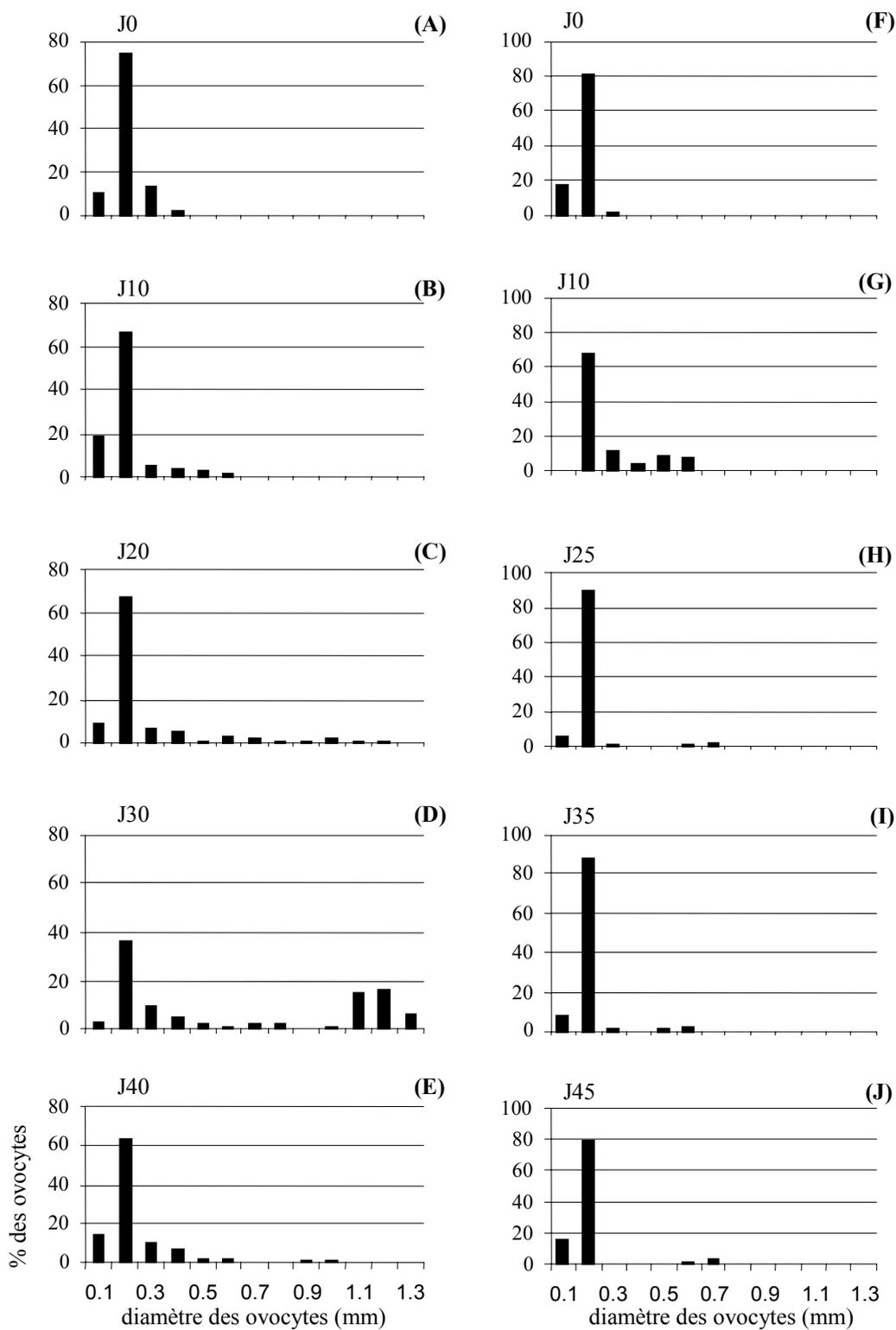


Figure 25. Histogrammes de fréquence des diamètres d'ovocytes dans un cycle normal (A-E) et chez une femelle bloquée en début de vitellogenèse (F-J) (J0 à J45 : dates des biopsies intraovariennes).

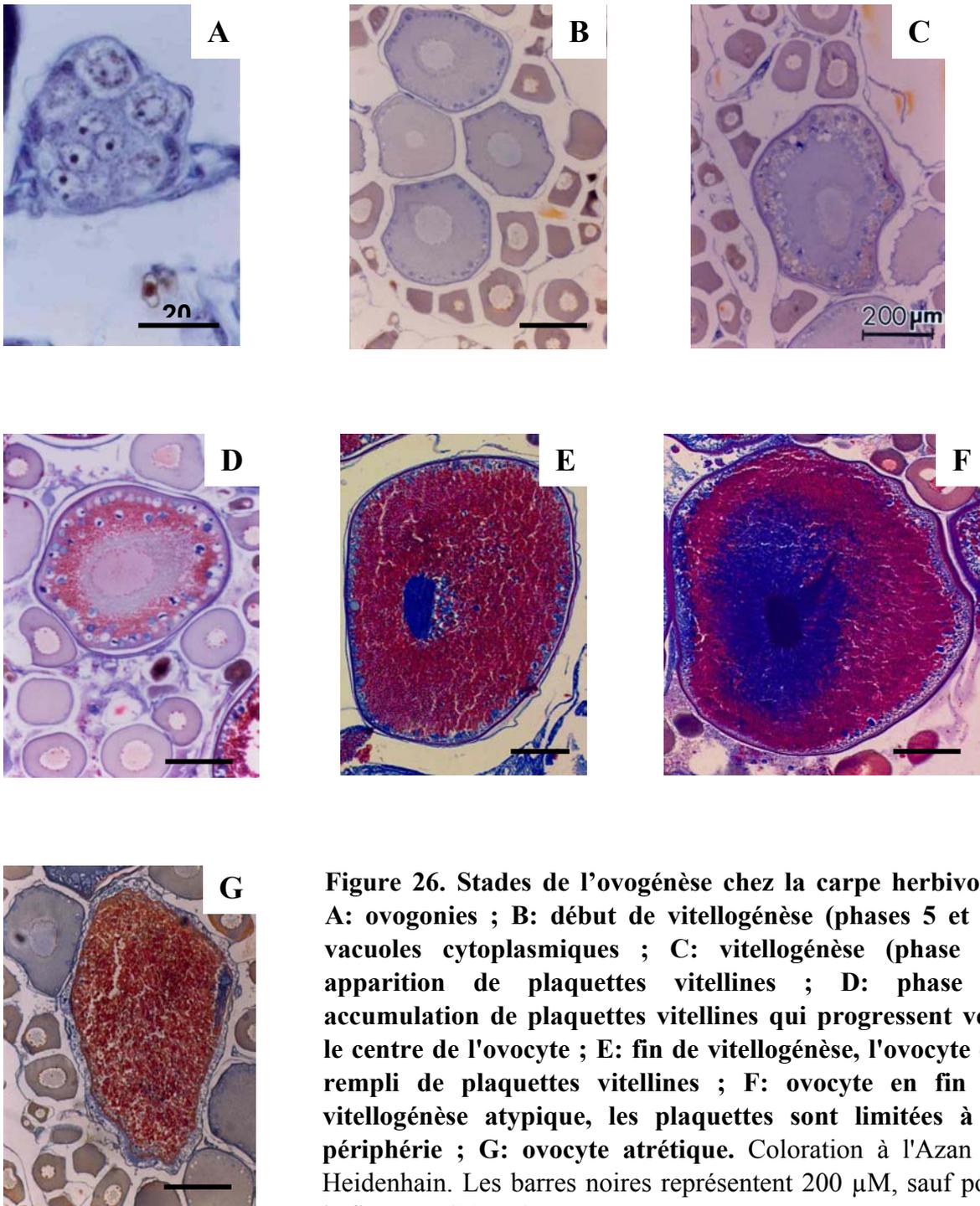


Figure 26. Stades de l'ovogénèse chez la carpe herbivore. A: oogonies ; B: début de vitellogénèse (phases 5 et 6), vacuoles cytoplasmiques ; C: vitellogénèse (phase 7), apparition de plaquettes vitellines ; D: phase 7, accumulation de plaquettes vitellines qui progressent vers le centre de l'ovocyte ; E: fin de vitellogénèse, l'ovocyte est rempli de plaquettes vitellines ; F: ovocyte en fin de vitellogénèse atypique, les plaquettes sont limitées à la périphérie ; G: ovocyte atrétique. Coloration à l'Azan de Heidenhain. Les barres noires représentent 200 µM, sauf pour la figure A (20 µm).

Nous n'avons pas observé de maturation spontanée (rupture de la vésicule germinative) dans les ovaires de carpe herbivore : le stade le plus avancé était la migration de la vésicule germinative. Tous les ovaires en fin de vitellogénèse contenaient des ovocytes en atrésie (moins de 15%).

Des ovocytes en fin de vitellogénèse "atypiques" ont été observés chez de nombreuses femelles en Côte d'Ivoire : de même diamètre que les ovocytes en fin de vitellogénèse normaux, ils sont translucides à l'observation sous la loupe binoculaire. Sur les coupes histologiques, la zone centrale de ces ovocytes est constituée de vésicules colorées en bleu par l'Azan de Heidenhain, contrairement aux ovocytes normaux remplis de plaquettes vitellines colorées en rouge (Figure 26). Les plaquettes vitellines étaient cantonnées à une couche périphérique de l'ovocyte. Les colorations en histo-immunologie avec l'anticorps anti-vitellogénine ont montré une plus faible affinité de ces ovocytes pour l'anticorps (Figure 27). Chez les femelles concernées (jusqu'à 80% du stock à certains moments), ces ovocytes étaient largement majoritaires dans l'ovaire.

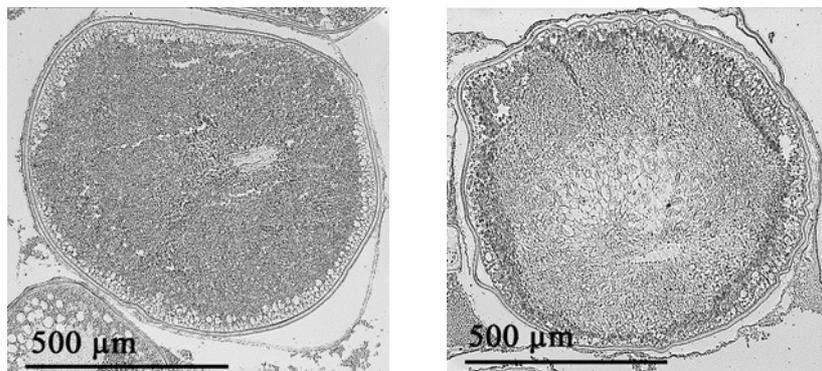


Figure 27. Ovocytes normal (à gauche) et atypique (à droite) après histo-immunologie avec un anticorps anti-vitellogénine.

Pour les ovocytes normaux, aucune différence n'a été observée entre les coupes histologiques des femelles ivoiriennes et celles des femelles de Pologne.

3.2 *les caractéristiques endocriniennes des différents stades*

Les niveaux de vitellogénine et de stéroïdes plasmatiques ont été déterminés pour 140 échantillons de sang représentatifs des différents stades en Côte d'Ivoire et pour 30 femelles en fin de vitellogénèse en Pologne.

Les niveaux de vitellogénine ont augmenté pendant la vitellogénèse de $14 \pm 9 \mu\text{g/ml}$ à $742 \pm 224 \mu\text{g/ml}$ (Figure 28). Le stade "surmature" n'a pas entraîné de chute des niveaux, et il n'y avait aucune différence entre les femelles avec des ovocytes normaux ou "atypiques". Les niveaux de vitellogénine des femelles de Pologne étaient significativement plus faibles, quelle que soit la température. Il y avait une différence significative entre les femelles bloquées en début de vitellogénèse ($30 \pm 24 \mu\text{g/ml}$) et celles dont la vitellogénèse se poursuivait normalement ($225 \pm 229 \mu\text{g/ml}$).

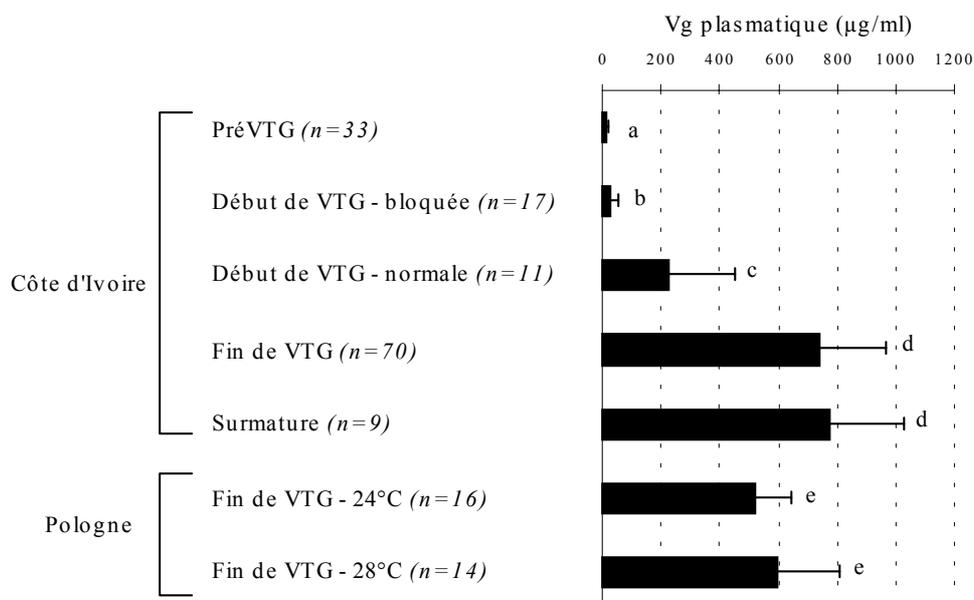


Figure 28. Niveaux de vitellogénine plasmatique (Moyenne ± écart-type) selon le stade ovarien chez des femelles de Côte d'Ivoire et de Pologne (VTG: vitellogénèse; les mêmes lettres indiquent des différences non-significatives).

Les niveaux d'œstradiol sont restés bas pendant la prévitellogénèse, et ensuite constamment hauts du début à la fin de la vitellogénèse (Figure 29). Il n'y a pas de différence entre les femelles avec des ovocytes normaux ou atypiques. Les niveaux des femelles de Pologne étaient inférieurs à ceux des femelles de Côte d'Ivoire, quelle que soit la température. Les femelles bloquées en début de vitellogénèse ont des taux d'œstradiol significativement plus bas que les autres (0,5 ng/ml vs. 1,4 ng/ml).

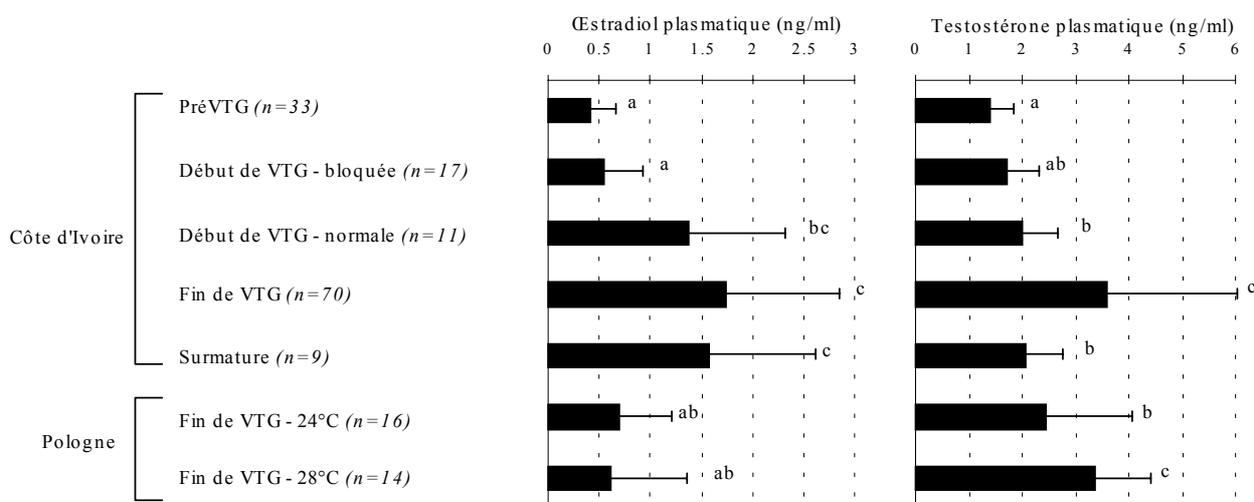


Figure 29. Niveaux de stéroïdes plasmatiques (Moyenne ± écart-type) selon le stade ovarien chez des femelles de Côte d'Ivoire et de Pologne.

Les niveaux de testostérone ont augmenté pendant la vitellogénèse, culminé en fin de vitellogénèse puis diminué chez les femelles surmatures. Le maintien à haute température a augmenté le niveau de testostérone des femelles polonaises (Figure 29).

Chez les femelles en fin de vitellogénèse, aucune relation n'a été trouvée entre les caractéristiques plasmatiques et le degré de migration de la vésicule ou le nombre d'ovocytes atrétiques.

3.3 *les cycles sexuels*

Le suivi individuel des cycles réalisé chez les femelles en Côte d'Ivoire a révélé une grande variété de types de cycles :

- des cycles "normaux" : les profils successifs de fréquence des diamètres d'ovocytes durant un cycle normal sont montrés sur la Figure 25 A-E. Dans la majorité des cas, la vitellogénèse durait environ 20 jours. Même pour ces cycles normaux, l'arrêt des femelles en fin de vitellogénèse était très variable : certaines femelles restaient à ce stade pendant plusieurs semaines, tandis que d'autres devenaient surmatures en quelques jours. Lors de biopsies successives de femelles en fin de vitellogénèse, nous n'avons observé ni modification des diamètres ovocytaires, ni progression de la migration de la vésicule germinative, mais des oscillations de ces critères.
- certaines femelles sont restées bloquées en début de vitellogénèse pendant plusieurs semaines, avant de reprendre leur vitellogénèse ou au contraire de régresser en prévitellogénèse (Figure 25 F-J). Ces femelles représentaient environ 10% du cheptel.
- certaines femelles en fin de vitellogénèse présentaient une large majorité d'ovocytes en fin de vitellogénèse atypiques, translucides (Figure 27). Ce phénomène a concerné jusqu'à 80% des femelles en fin de vitellogénèse en 2000. La moitié d'entre elles ont retrouvé des ovocytes normaux après quelques semaines, tandis que les autres ont conservé ces ovocytes atypiques jusqu'à la fin de leur cycle.

Après une induction de ponte à l'extrait hypophysaire, les femelles recommençaient rapidement un cycle, et l'une d'entre elles a été induite trois fois à intervalles d'un mois, donnant à chaque fois une ponte de bonne qualité.

Au niveau du stock de géniteurs, il n'y avait pas de synchronisation des cycles sexuels : des femelles à tous les stades ont été observées tout au long de l'année. La plupart du temps, la proportion de femelles en fin de vitellogénèse était faible (5 à 43%), mais des taux plus élevés ont été observés en fin de saison des pluies (octobre), atteignant 68% en 2000. Il a été impossible d'identifier une période principale de redémarrage des cycles, la plus forte proportion des femelles en fin de vitellogénèse en fin de saison des pluies étant due à l'allongement de la durée du stade de

fin de vitellogénèse à cette période (moins de femelles surmatures). En Pologne, 90% des femelles examinées, quel que soit le conditionnement thermique (24 ou 28°C) étaient en fin de vitellogénèse début juin.

3.4 l'effet de la température sur les ovaires en début de vitellogénèse

Les cinétiques des niveaux d'œstradiol produits par les ovaires en début de vitellogénèse sont représentées sur la Figure 30. Il apparaît une grande variabilité entre données, qui n'est pas seulement liée à des différences entre femelles, mais aussi à une forte variation entre réplicats pour une même femelle. L'analyse de variance sur les niveaux aux différentes durées d'incubation ne met en évidence de différence significative qu'au bout de 24 heures, avec une inhibition à 28°C et 32°C par rapport à 24°C.

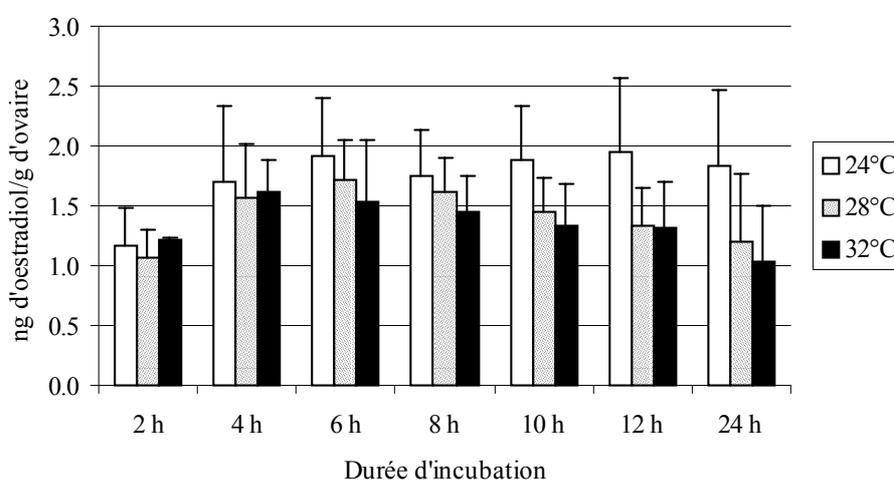


Figure 30. Cinétique de concentration d'œstradiol *in vitro* par des ovaires en début de vitellogénèse, incubés à 24°C, 28°C ou 32°C en présence d'extrait hypophysaire à 10 µg/ml (moyenne ± écart-type des données obtenues sur 3 femelles).

La relation stimulation / réponse est représentée Figure 31. Aucun effet significatif de la température n'est mis en évidence, sauf sur la dose de 2,5 µg/ml d'extrait hypophysaire, où la sécrétion à 32°C est inférieure à celle obtenue à 24 ou 28°C.

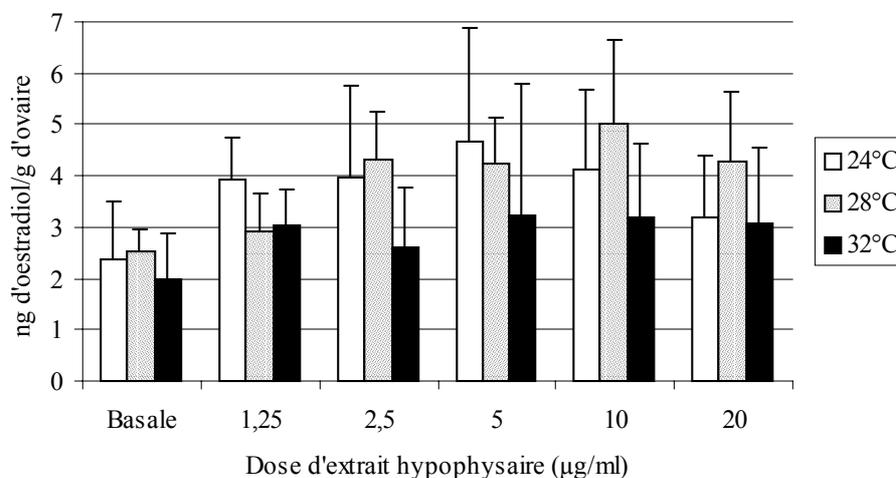


Figure 31. Sécrétion d'œstradiol *in vitro* par des ovaires en début de vitellogénèse, incubés pendant 12 heures à 24°C, 28°C ou 32°C en présence de différentes doses d'extrait hypophysaire (moyenne ± écart-type des données obtenues sur 3 femelles). La sécrétion basale est obtenue en absence d'extrait hypophysaire dans le milieu d'incubation.

4. Discussion

4.1 sur les stades ovariens

Les stades ovocytaires décrits pour les cyprinidés (Makeyeva et Yemel'yanova, 1989) et pour la carpe herbivore (Chen *et al.*, 1969) ont été retrouvés en Côte d'Ivoire. Les biopsies intraovariennes et les mesures de diamètre ovocytaire ont permis le suivi des cycles sexuels individuels. La vitellogénèse est du type "groupe-synchrone" (de Vlaming, 1983), comme le démontre le profil bimodal de la répartition des diamètres d'ovocytes. Les stades ovariens décrits dans cette étude sont identiques à ceux décrits chez la carpe commune (Gupta, 1975), mis à part le stade 5 de Gupta (ovaire mûr) qui n'a jamais été observé dans nos conditions. La présence de follicules atrétiques chez toutes les femelles en fin de vitellogénèse fait supposer un renouvellement continu des ovocytes en fin de vitellogénèse. L'absence de progression dans la migration de la VG au cours de biopsies successives de la même femelle va dans le même sens. Pour l'histologie, les femelles ivoiriennes "normales" en fin de vitellogénèse étaient en tout point identiques aux femelles en fin de vitellogénèse de Pologne. Les taux de vitellogénine sont similaires à ceux obtenus chez la carpe

commune (Tyler et Sumpter, 1990). Les profils stéroïdiens montraient une grande variabilité interindividuelle pour le même stade ovarien, comme chez la carpe commune (Manning et Kime, 1984). Les niveaux plasmatiques moyens d'œstradiol et de testostérone étaient du même ordre que ceux observés chez le carassin (Razani *et al.*, 1988), le goujon *Gobio gobio* (Rinchart *et al.*, 1993) et la carpe commune (Manning et Kime, 1984), mais inférieurs à ceux d'autres auteurs (Kagawa *et al.*, 1983) chez le carassin. Les niveaux plasmatiques associés aux différents stades ovariens sont similaires aux profils stéroïdiens du goujon (Rinchart *et al.*, 1993), à l'exception de la chute des taux d'œstradiol en fin de vitellogénèse que nous n'avons pas observée chez nos poissons. De plus, les niveaux d'œstradiol et de vitellogénine étaient significativement plus élevés chez les femelles ivoiriennes que chez les polonaises. L'hypothèse la plus probable est qu'en Côte d'Ivoire l'ovogenèse est interrompue à un stade plus précoce qu'en Pologne (bien qu'on ne puisse exclure un effet de l'origine génétique différente des deux populations). Chez le carassin en période de reproduction, les courtes photopériodes (12L:12D) diminuent les niveaux d'œstradiol par rapport aux longues photopériodes (16L:8D) (Razani *et al.*, 1988). L'effet de la photopériode n'est donc probablement pas responsable des niveaux d'œstradiol plus élevés en Côte d'Ivoire. Chez la carpe commune des niveaux d'œstradiol plasmatique plus élevés reflètent un développement ovarien moins avancé (Manning et Kime, 1984). Ce phénomène pourrait donc expliquer les niveaux plus élevés d'œstradiol et de vitellogénine observés en Côte d'Ivoire.

Des ovocytes en fin de vitellogénèse atypiques ont été observés en grand nombre chez beaucoup de femelles en Côte d'Ivoire. Ces femelles étaient identiques aux femelles "normales" pour les paramètres endocriniens mesurés dans cette étude, la seule différence étant l'aspect à la coloration à l'Azan et la moindre affinité du contenu de l'ovocyte pour l'anticorps anti-vitellogénine. L'aspect histologique de ces ovocytes était complètement différent des ovocytes en atresie (pas de fragmentation de la membrane, pas de vitellus au centre de l'ovocyte). Nous n'avons pas trouvé de description similaire chez d'autres espèces. Les figures histologiques permettent d'envisager plusieurs hypothèses, que nous n'avons pas pu tester par d'autres moyens : un problème d'incorporation ou de répartition de la vitellogénine dans les ovocytes, ou de qualité de la vitellogénine (en particulier des lipides associés).

4.2 *sur le déroulement des cycles*

Le déroulement des cycles individuels des femelles était également inhabituel : la durée des cycles était très variable, certaines femelles subissant une régression rapide tandis que d'autres restaient en fin de vitellogénèse pendant plusieurs semaines ; certaines femelles étaient parfois bloquées en début de vitellogénèse. Chez la carpe herbivore, la reproduction naturelle intervient à partir de 17,5

à 20°C, mais la température optimale pour la reproduction artificielle semble être de 22 à 26°C (Bardach *et al.*, 1972). Cette espèce est originaire de zones tempérées, avec des amplitudes annuelles de photopériode de 3 h (23°N.) à 8 h (50°N.). Les amplitudes thermiques annuelles sont également fortes (de 15 à 44°C). Les conditions climatiques ivoiriennes doivent être proches de la limite thermique supérieure pour la reproduction (température moyenne des étangs de 26 à 31°C) et l'amplitude photopériodique est très faible (moins de 30 min). Ceci pourrait expliquer certaines singularités des cycles observées dans cette étude. Le développement gonadique des carpes herbivores à l'état sauvage se déroule au printemps, en conditions de température et photopériode croissantes (Gorbach, 1972), et la fraie de mars à juillet selon le régime thermique (Shireman et Smith, 1983). Il ne semble pas y avoir de période réfractaire après la ponte en Côte d'Ivoire, les poissons peuvent recommencer rapidement une nouvelle vitellogénèse.

L'interruption de la vitellogénèse observée chez certaines femelles était corrélée avec des déficits en œstradiol et vitellogénine : elle pourrait résulter d'une déplétion de la gonadotropine, d'une diminution de la réceptivité gonadique ou de la perturbation des capacités stéroïdogènes des ovaires. Chez les cyprinidés, il est possible que les deux gonadotropines contrôlent la vitellogénèse (Nunez-Rodriguez *et al.*, 1992). La LH plasmatique était indétectable chez les femelles de Côte d'Ivoire (même en fin de vitellogénèse), et l'impossibilité de doser la FSH chez cette espèce ne nous permet pas d'aller plus loin dans les hypothèses. Chez la carpe commune, on observe une forte variabilité entre individus, y compris au même stade ovarien, pour la production de stéroïdes à différentes températures (Manning et Kime, 1984). Dans notre cas, les essais *in vitro* ont abouti au même résultat, amplifié par une variabilité entre réplicats pour une même femelle. Il apparaît tout de même une petite inhibition des niveaux d'œstradiol aux températures élevées (28°C et 32°C) par rapport à 24°C, qui est due à une épuration plus rapide du stéroïde à haute température. Cette inhibition, qui est également observée chez la carpe commune (Manning et Kime, 1984) pourrait expliquer le blocage de certaines femelles en début de vitellogénèse, au moment du début de l'incorporation de vitellogénine dans les ovocytes. Il ne semble pas y avoir de modification de l'activité de l'aromatase (enzyme responsable de la synthèse d'œstradiol) par la température, puisque les profils en début de cinétique sont similaires.

La durée des cycles sexuels des femelles est très variable. De même, chez le goujon élevé en conditions de température et photopériode constantes (20°C, 12L:12D), le développement gonadique est variable : certaines femelles accumulent des vésicules vitellines (mais ont des ovocytes plus petits que les témoins), alors que d'autres régressent (Kestemont, 1990). La combinaison de hautes températures et courtes photopériodes (25°C, 9L:15D) provoque la régression des ovaires de *Notemigonus chrysoleucas* (de Vlaming, 1975). Ces conditions pourraient

expliquer la régression rapide observée chez certaines femelles en Côte d'Ivoire. Cependant, d'autres individus restent au stade de fin de vitellogénèse et réceptifs à l'induction de ponte pendant plusieurs semaines, alors que la période de reproduction en éclosérie en zone tempérée est très courte (moins de deux semaines). Ce phénomène a également été observé chez la carpe commune maintenue constamment à haute température (24°C) et courte photopériode (12L:12D) (Davies et Hanyu, 1986).

4.3 *sur la dynamique de la population*

Au niveau global du cheptel en Côte d'Ivoire, les principales caractéristiques observées sont le faible taux de femelles achevant la vitellogénèse et la désynchronisation des cycles. En milieu naturel (et en élevage sous climat tempéré), il y a une saison de reproduction bien définie (Shireman et Smith, 1983), dépendant des conditions thermiques. Même en Egypte, où les amplitudes saisonnières de température (13 à 29°C) et de photopériode sont moins prononcées que dans leur aire d'origine (mais tout de même davantage qu'en Côte d'Ivoire), les carpes herbivores introduites montrent une saison de reproduction marquée (avril à juin) (Zonneveld, 1984). Les photopériodes constantes et les fortes températures sont les responsables les plus probables de la désynchronisation des cycles en Côte d'Ivoire. A haute température (24°C) et courte photopériode (12L:12D, inférieure à la "photopériode critique" supposée égale à 13-14 h pour les cyprinidés), les ovulations de la carpe commune sont moins simultanées et plus partielles que sous une photopériode de 16L:8D (Davies et Hanyu, 1986).

En conclusion, il apparaît que l'ovogenèse de la carpe herbivore est possible en petits étangs en conditions tropicales. Elle est bloquée au stade de migration de la vésicule germinative, ce qui empêche toute reproduction naturelle. Les cycles sexuels normaux sont quasiment identiques à ceux d'autres cyprinidés en zone tempérée, sauf qu'ils semblent bloqués à un stade plus précoce, en maintenant des taux d'œstradiol et de vitellogénine plus élevés. La mesure des diamètres ovocytaires après biopsie intraovarienne permet de déterminer les stades sexuels des femelles. Cependant, les cycles sexuels femelles ont des caractéristiques atypiques : le taux de femelles achevant la vitellogénèse était assez faible (moins de 40% la plupart du temps) ; la durée des cycles était très variable ; les cycles étaient parfois bloqués en début de vitellogénèse ; des ovocytes atypiques étaient observés chez de nombreuses femelles en fin de vitellogénèse. Le faible taux de femelles en fin de vitellogénèse est un handicap pour des écloséries artisanales : il nécessite d'élever un stock important de géniteurs pour avoir des femelles réceptives à l'induction de ponte. La désynchronisation des cycles pose le même problème, et impose de contrôler régulièrement le cheptel par biopsies intraovariennes. Cependant, cela peut être un avantage pour permettre la

production d'alevins tout au long de l'année, pourvu que les femelles en fin de vitellogénèse soient réceptives en toutes saisons. Il reste à établir l'origine physiologique de ces dysfonctionnements, qui sont probablement dus aux conditions environnementales inhabituelles pour l'espèce : température, photopériode, alimentation... La nature et la cause de l'apparition des ovocytes atypiques restent également à élucider.

Chapitre 2

Influence des hautes températures sur la
reproduction

1. Introduction

La température est le principal facteur environnemental ayant une influence sur le déroulement des différentes étapes de la reproduction chez les cyprinidés (Billard *et al.*, 1978). C'est l'une des causes possibles des dysfonctionnements des cycles sexuels observés en Côte d'Ivoire (voir chapitre précédent). Par ailleurs, les tentatives de reproduction induite par extrait hypophysaire en Côte d'Ivoire se sont traduites par des taux de réussite très faibles (moins de 15%) pendant les mois les plus chauds de l'année, même sur des femelles présentant des caractères favorables (fin de vitellogénèse, abdomen gonflé, début de migration de la vésicule germinative). Ce n'est qu'à partir du mois de juillet (soit quand la température descendait en dessous de 28°C environ, voir Figure 32) que des reproductions artificielles sont réalisables avec des chances de succès.

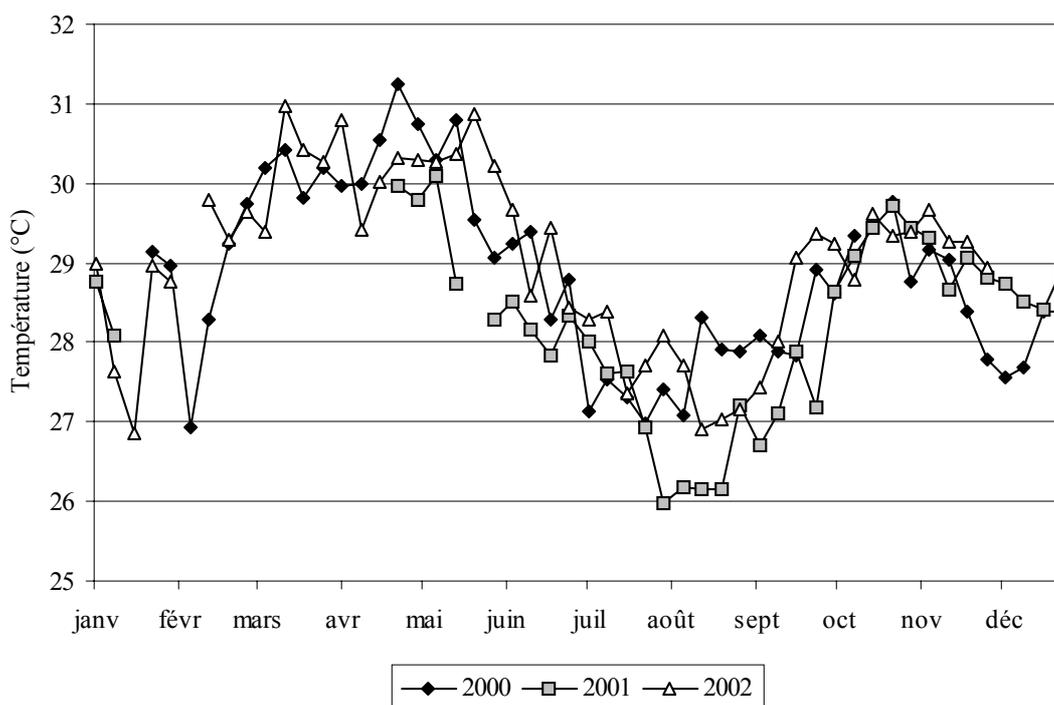


Figure 32. Moyennes hebdomadaires des températures relevées dans les étangs de la station piscicole de Gagnoa pendant les trois années d'expérimentations (certaines données sont manquantes du fait de pannes des capteurs).

Cette observation nous a amené à faire l'hypothèse d'un effet possible de la température lors des inductions de ponte. Cette hypothèse est renforcée par les données bibliographiques : la reproduction naturelle chez la carpe herbivore se déroule entre 17 et 26°C (Krykhtin et Gorbach,

1982), et les températures optimales pour la reproduction artificielle sont de 22 à 24°C (Horvath *et al.*, 1984) ou de 23 à 26°C (Bardach *et al.*, 1972). En Egypte, la reproduction cesse lorsque les températures atteignent 30°C (Zonneveld, 1984), et une chute des taux d'ovulation après induction de ponte est observée au-dessus de 27°C (Rottman et Shireman, 1985). Chez la carpe commune également, la reproduction ralentit lorsque la température atteint 26°C et cesse à totalement à 28°C (Horvath, 1986).

L'objectif de ce volet de l'étude est de tester l'existence de perturbations thermiques à différents niveaux de l'axe reproducteur. L'existence possible d'un seuil thermique entre 24°C et 28°C (voir ci-dessus) nous a amené à comparer le fonctionnement de l'axe reproducteur à ces deux températures. Pour tester cet impact de la température sur la reproduction de la carpe herbivore, nous avons combiné des expérimentations *in vivo* en conditions de températures contrôlées et *in vitro* sur des ovaires et hypophyses.

L'induction de ponte par la méthode LINPE (Peter *et al.*, 1988), qui associe du GnRH avec un antidopaminergique, est largement pratiquée et documentée dans la bibliographie. Nous avons privilégié cette méthode qui est susceptible de mettre en évidence des blocages au niveau central (libération des gonadotropines), à la différence de l'injection d'extraits hypophysaires supposés agir directement au niveau des gonades. L'efficacité de cette méthode est encore renforcée par l'utilisation d'analogues du GnRH, en particulier le D-Arg⁶-GnRH-A, qui a une action plus longue que le sGnRH natif.

2. Matériel et méthodes

2.1 les inductions artificielles de pontes

Trois expériences d'induction de ponte ont été menées : deux en conditions de température contrôlée ont été conduites à deux reprises en Pologne, et une en Côte d'Ivoire pour y comparer les profils hormonaux.

La première expérience, comparant l'effet d'une induction au GnRH et pimozide (un antidopaminergique) à l'effet du pimozide seul, a été menée à l'Institut des Pêches continentales à Żabieniec (proche de Varsovie) en 2001. Une induction selon le même protocole a été pratiquée en Côte d'Ivoire pour comparer les profils hormonaux. En 2002, une expérience comparant 4 traitements hormonaux à deux températures a été conduite à la pisciculture de Gosławice (300 km à l'ouest de Varsovie).

2.1.1 la première expérience en température contrôlée (Żabieniec, juin 2001)

La première expérience avait pour but de tester l'influence d'un conditionnement à haute (28°C) et basse (24°C) températures sur la réponse à deux traitements d'induction de ponte : un antidopaminergique (pimozide, Sigma) seul ou combiné avec une gonadolibérine (des-Gly¹⁰,D-Arg⁶-sGnRH-Ethylamine, Saxon Biochemicals GMBH, Hanover, abrégé dans la suite par GnRH). Le pimozide a été dilué dans du propylène glycol et le GnRH dans du NaCl 0,9 %. Les injections ont été réalisées par la voie intrapéritonéale.

Des carpes herbivores femelles issues de la pisciculture de Żabieniec ont été conditionnées pendant deux semaines à 24 et 28°C, en bacs de 4 m³ environ (densité d'élevage 12 kg/m³ environ, avec un renouvellement permanent en eau), sous photopériode naturelle. L'expérience d'induction a eu lieu à la période habituelle de reproduction de cette espèce en Pologne (première semaine de juin).

Les poissons ont été répartis en 4 groupes, correspondant aux 4 traitements expérimentaux : 2 températures et deux protocoles d'induction. Les groupes maintenus à 24°C comprenaient 8 individus, les groupes maintenus à 28°C comprenaient 7 individus.

Pour chaque température, un groupe a été injecté au pimozide seul (5 mg/kg de poids vif) et le second avec une combinaison de pimozide (5 mg/kg) et de GnRH (20 µg/kg). L'injection de pimozide a été réalisée en une seule fois à t₀ dans tous les groupes. L'injection de GnRH a été effectuée en deux fois à 12 heures d'intervalle (un *priming* de 10% de la dose totale à t₀, suivi d'une seconde injection de 90%), et a été remplacée par une injection de NaCl 0,9% dans les groupes pimozide seul.

Protocole :

Temps	Groupe 1 24°C – Pim	Groupe 2 28°C – Pim	Groupe 3 24°C – Pim+GnRH	Groupe 4 28°C – Pim+GnRH
t ₀ (13:00)	Biopsie, prélèvement de sang, injection 100% Pim+NaCl		Biopsie, prélèvement de sang, injection 100% Pim+10%GnRH	
t ₀ +6h (19:00)	Prélèvement de sang			
t ₀ +12h (01:00)	Prélèvement de sang, injection NaCl		Prélèvement de sang, injection 90% GnRH	
t ₀ +18h (07:00)	Prélèvement de sang, contrôle des ovulations			

Les femelles ont été pesées (poids de 4,4 à 9,8 kg, poids moyen $7,0 \pm 1,3$ kg) et marquées individuellement par des marques "*floy-tag*" en début d'expérience.

Une biopsie a été réalisée en début d'expérience, afin de comparer le degré de migration des vésicules germinatives des différents groupes après éclaircissement des ovocytes au liquide de Serra.

Les prélèvements de sang, effectués dans le pédoncule caudal à la seringue héparinée ont été centrifugés et congelés à -20°C jusqu'aux analyses.

Les ovulations ont été contrôlées pendant 6 heures à partir du temps de latence* estimé. Le poids des ovules a été déterminé chez les femelles ovulantes. Les ovulations ont été considérées comme complètes quand le poids d'ovules recueilli était supérieur à 5% du poids de la femelle.

Les taux d'œstradiol et de testostérone ont été déterminés pour tous les poissons à t_0 , ainsi que les taux de LH et de $17\alpha 20\beta$ pendant toute la durée de l'expérience.

2.1.2 l'expérience de validation en Côte d'Ivoire

Une expérience suivant un protocole d'induction comparable a été conduite à la station piscicole de Gagnoa en Côte d'Ivoire.

Dans les conditions thermiques locales, nous avons réalisé l'induction de ponte de 9 femelles avec du pimozide et GnRH, comparées à 9 femelles témoins injectées au NaCl à 0,9%. Le protocole d'injection et de prélèvement était le même que celui pratiqué en Pologne (mis à part le fait que le groupe injecté au pimozide seul a été remplacé par un groupe témoin injecté au NaCl). Les femelles ont été pesées en début d'expérience (poids moyen $2,6 \pm 0,7$ kg), elles étaient marquées individuellement avec des marques magnétiques (*PIT-tag*). Des prélèvements d'ovocytes pour dosage de l'AMPC (voir procédure ci-dessous) ont été réalisés en même temps que les prélèvements de sang.

2.1.3 la seconde expérience en température contrôlée (Gosławice, juin 2002)

Cette expérience avait pour but de compléter celle de 2001 en ajoutant deux traitements d'injection : un groupe témoin injecté au NaCl, et un groupe injecté au GnRH seul (sans pimozide).

Des carpes herbivores femelles issues de la pisciculture de Gosławice ont été conditionnées pendant une semaine à 24 et 28°C , en bacs de 1 m^3 environ (densité d'élevage 45 kg/m^3 environ, avec un renouvellement permanent en eau), sous photopériode naturelle. L'expérience d'induction a eu lieu à la période habituelle de reproduction de cette espèce en Pologne (première semaine de juin). Les poissons étaient issus des étangs de l'écloserie, en eau réchauffée à une température de 30 à 32°C .

Les poissons ont été répartis en 8 groupes de 5 ou 6 poissons, correspondant aux 8 traitements expérimentaux : 2 températures et quatre protocoles d'induction.

Il y avait 4 groupes pour chaque température : un témoin (NaCl 0,9%), le pimozide seul (5 mg/kg de poids vif), le GnRH seul (20µg/kg) et une combinaison pimozide (5 mg/kg) et GnRH (20 µg/kg). Toutes les inductions ont été réalisées en deux fois à 24 heures d'intervalle (un *priming* de 10% de la dose totale, suivi d'une seconde injection de 90%). Nous avons également utilisé l'analogue D-Arg⁶-sGnRH-A.

Protocole (répété pour chacune des deux températures) :

Temps	Groupe 1 Témoin	Groupe 2 Pimozide	Groupe 3 GnRH	Groupe 4 Pim+GnRH
t ₀ (06:00)	Biopsie, prélèvement de sang, injection de 10% de la dose totale			
t ₀ +6h (12:00)	Prélèvement de sang			
t ₀ +12h (18:00)	Prélèvement de sang			
t ₀ +24h (06:00)	Biopsie, prélèvement de sang, injection de 90% de la dose totale			
t ₀ +30h (12:00)	Prélèvement de sang, contrôle des ovulations			

Les femelles ont été pesées (poids de 4,1 à 15,4 kg, poids moyen 7,9 ± 2,1 kg) et marquées individuellement (*floy-tag*) en début d'expérience.

Une biopsie a été réalisée en début d'expérience, afin de comparer le degré de migration des vésicules germinatives des différents groupes après éclaircissement des ovocytes au liquide de Serra. En début d'expérience et avant la seconde injection, des prélèvements d'ovaires ont été réalisés pour le dosage de l'AMPc (voir procédure ci-dessous).

Les prélèvements de sang ont été centrifugés et congelés à -20°C jusqu'aux analyses. Les taux d'œstradiol et de testostérone ont été déterminés pour tous les poissons à t₀, ainsi que les taux de LH et de 17α20β pendant toute la durée de l'expérience.

Les ovulations ont été contrôlées pendant 6 heures à partir du temps de latence* estimé. Le poids des ovules a été déterminé chez les femelles ovulantes.

2.1.4 les dosages des prélèvements sanguins

Le protocole utilisé pour le dosage de la LH est celui développé pour le carassin (Kah *et al.*, 1989b). Il s'agit d'un dosage ELISA par déplacement d'équilibre, réalisé sur microplaques 96 puits Maxisorb®. Nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la sous-unité β de la LH de carpe commune (Breton *et al.*, 1983), dont la validité pour la carpe herbivore avait été testée en RIA (Glasser, 1999) : la courbe des pourcentages de liaison (B/B_0) de dilutions de plasma de carpe herbivore femelle est parallèle à la celle de dilutions de LH de carpe commune purifiée (après linéarisation par la fonction *logit*, voir Figure 33).

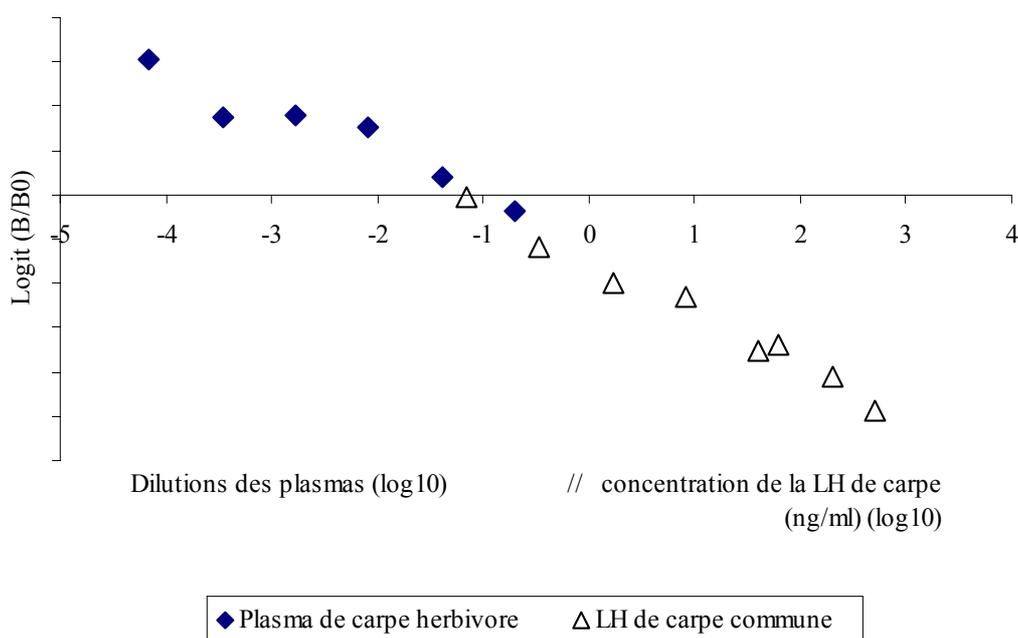


Figure 33. Pourcentage de liaison de l'anticorps dirigé contre la sous-unité β de la LH de carpe commune, en présence de dilutions de plasma de carpe herbivore femelle (1:2 à 1:64) ou de LH de carpe commune purifiée (0,31 ng/ml à 15 ng/ml). Les courbes sont transformées par la fonction *logit*.

Le greffage se fait dans un tampon carbonate (0,05 M, pH 9,6), avec de la LH à 4 ng/ml (200 μ l/puits), pendant 14-16 h à 4°C.

La préincubation se déroule en tubes : 50 μ l de standard ou échantillon de plasma sont préincubés avec 450 μ l de PBS-T-P (tampon phosphate 0,01M, pH 7,2, NaCl 0,15 M, 0,5 % de Tween 20, gentamycine 25 mg/l, 2% de sérum de porc) contenant une solution d'anticorps spécifiques anti-sous-unité β de la LH de carpe commune (n°2031) au 1:150 000, pendant 14-16 h à 4°C.

La saturation des plaques est réalisée par 200 μ l/puits de PBS-T-P, pendant 30 min à 37°C, suivie par 3 lavages au PBS-T.

L'incubation des échantillons préincubés (200 µl/puits) dure 2 h à 37°C, et est suivie par 3 lavages au PBS-T.

Le second anticorps, du sérum de mouton anti-lapin (200 µl/puits) est utilisé au 1:4000, pendant 45 à 60 min à 37°C (suivi par 3 lavages).

La peroxydase anti-peroxydase (200 µl/puits au 1:5000) est incubée pendant 30 à 45 min à 37°C (suivi par 3 lavages).

La révélation est réalisée par 200 µl/puits d'OPD (o-phénylènediamine) à 0,5 mg/ml dans un tampon citrate (acide citrique 0,1 M, NaHPO₄ 0,2 M, pH 5), auquel on ajoute extemporanément 0,25 µl/ml de H₂O₂. La révélation se fait à l'obscurité, et est stoppée par l'ajout de 50 µl/puits de H₂SO₄ 2 M (après environ 20 min). La densité optique est mesurée à 490 nm (Microplate autoreader EL 311, Bio-Tek Instruments).

Les dosages de stéroïdes ont été réalisés selon la technique décrite chapitre 1, paragraphe 2.6 après extraction des plasmas. Les dosages de la 17α20β ont été réalisés selon le protocole mis au point chez la truite arc-en-ciel (Fostier *et al.*, 1981).

2.1.5 le dosage de l'AMPC

Conditionnement des échantillons : sur le terrain, des prélèvements de 200 µl d'ovocytes ont été réalisés par biopsie intraovarienne, et broyés dans un tube Eppendorf avec 1 ml de tampon d'extraction (mélange extemporané (v/v) de HCl 0,4 N et d'une solution d'EDTA à 20mM et de théophylline à 2mM), puis congelés à -20°C.

L'extraction a été poursuivie au laboratoire selon le protocole décrit pour la truite arc-en-ciel (Jalabert et Finet, 1986) (sauf indication, tout le protocole a été réalisé sur glace ou paillasse froide). Le broyat d'ovaire est prélevé dans un tube polypropylène de 15 ml, dans lequel on ajoute du tampon d'extraction jusqu'à un volume total de 10 ml. Après broyage à l'ultraturax, le contenu est vortexé avant centrifugation 15 min à 4000 g à 4°C. On prélève 2 ml de la phase intermédiaire (entre le culot et la couche lipidique) dans un tube de verre de 5 ml, qui sont ensuite chauffés 3 min à 100°C, puis refroidis sur glace. On neutralise par ajout de CaCO₃ jusqu'à saturation, puis les tubes sont vortexés. Les tubes sont laissés reposer 1 h à température ambiante avant centrifugation 30 min à 4000 g et 4°C. On prélève ensuite 700 µl dans un Eppendorf, que l'on met en ultracentrifugation à 12000 g, pendant 15 min à 4°C. Finalement, 500 µl du surnageant sont prélevés et congelés à -20°C.

Le dosage de l'AMPC est un dosage radio-immunologique par un kit APM cyclique Immunotech (Beckman Coulter), réalisé sur les échantillons après extraction, non dilués.

2.2 *la culture de cellules hypophysaires*

Pour tester l'effet de la température sur la sécrétion de LH par l'hypophyse, nous avons réalisé des cultures de cellules hypophysaires à différentes températures en présence de doses croissantes de GnRH.

La culture de cellules hypophysaires a été réalisée selon le protocole mis au point pour la truite arc-en-ciel (Weil *et al.*, 1986).

Quatre hypophyses ont été prélevées sur les poissons du groupe témoin à 28°C de l'expérimentation de 2002 (poids moyen 8,5 kg), et mises dans du NaCl 0,8% à 4°C, avant le transport (durée 6 heures). Elles ont été ensuite découpées au scalpel puis dispersées pendant 5 h à température ambiante, dans un milieu (MEM Eagle + Hepes 15 mM + bicarbonate de Sodium 9 mM) supplémenté avec 0,1% de collagénase H et 1% de sérum albumine bovine. La dispersion a été achevée par aspiration dans une seringue avec une aiguille métallique (3-6 aspirations), avant une centrifugation à 200 g pendant 10 min. Les cellules ont été rincées dans 50 ml de milieu de préincubation (milieu+2% d'Ultrosor+1% d'antibiotique Sigma), puis recentrifugées à 200 g pendant 10 min. Un second cycle de rinçage-centrifugation a été réalisé avant le comptage des cellules à la cellule de Thoma. Les cellules ont été diluées dans du milieu de préincubation puis distribuées (à raison de 50 000 cellules dans 250 µl, pour un puits) sur des microplaques 96 puits coatées à la polylysine. Les cellules ont été préincubées 48 h à 32 °C, puis les plaques rincées deux fois. Les cellules ont ensuite été mises en préincubation respectivement à 24°C et 28°C, pendant 12 h. Après deux rinçages, les cellules ont été mises en incubation en présence de GnRH aux deux températures.

Pour chaque température, nous avons comparé un témoin sans GnRH avec six doses croissantes de sGnRH et deux doses d'analogue D-Arg⁶-sGnRH-A (6 réplicats par point). Pour chaque combinaison température x traitement, nous avons effectué une incubation de 3 heures et une incubation de 12 heures. Les milieux ont été prélevés après centrifugation 10 min à 200 g, pour mesurer la LH sécrétée dans le milieu. Une lyse des cellules par du Triton X-100 (24 h à 4°C) a été réalisée pour mesurer la LH intracellulaire.

La LH a été dosée directement dans les milieux, selon le protocole décrit ci-dessus (2.1.4).

2.3 *les incubations d'ovaires in vitro*

Les effets de la température sur la production de stéroïdes par les ovaires ont été déterminés par des incubations de fragments d'ovaires *in vitro* en présence d'extraits hypophysaires.

Ces expériences ont été menées sur trois femelles en fin de vitellogénèse ayant subi un *priming* d'extrait hypophysaire de carpe commune (0,3 mg/kg) 12 h avant l'abattage. Les ovaires ont été prélevés et conservés sur glace dans un tampon d'incubation (Jalabert, 1976), découpés en petits fragments, pesés et mis en incubation.

Les incubations ont été réalisées sur microplaques 24 puits, chaque puits contenant 1 ml de tampon et 500 mg (\pm 50 mg) d'ovaire. L'extrait hypophysaire de carpe commune a été rajouté au milieu avant le démarrage de l'incubation. Les plaques ont ensuite été incubées dans une étuve ventilée ou des bains-marie aux températures étudiées (24, 28 et 32°C).

Nous avons étudié l'influence de la température sur la cinétique de la concentration de $17\alpha 20\beta$ dans le milieu d'incubation des ovaires stimulés par de l'extrait hypophysaire de carpe commune, ainsi que sur la réponse des ovaires à différentes doses d'extrait hypophysaire. Pour la cinétique de concentration, nous avons utilisé une dose de 20 μ g/ml d'extrait hypophysaire sec. Les prélèvements successifs étaient réalisés dans des puits différents et représentent donc les niveaux instantanés à l'issue de la durée d'incubation, la résultante des phénomènes de synthèse et de disparition du MIS. Les relations dose d'extrait / réponse ont été évaluées pour un temps d'incubation de 8 heures.

Nous avons mesuré l'évolution des taux d'AMPc ovariens pendant des incubations *in vitro* en présence de MIS ou d'extrait hypophysaire. Ces expériences ont été réalisées sur une femelle. Le MIS a été dilué dans l'éthanol et introduit dans le milieu d'incubation (à raison de 1%) à des taux de 100, 1000 ou 10 000 ng/ml. Les témoins étaient en présence d'éthanol pur à 1%. Les fragments d'ovaires ont été prélevés au bout de 8 heures d'incubation et traités pour le dosage de l'AMPc comme décrit au paragraphe 2.1.5 ci-dessus.

Les expériences concernant la maturation ovocytaire ont été effectuées en triplicats sur une femelle avec des fragments de 500 mg d'ovaire pour 500 μ l de milieu, ce rapport étant nécessaire pour observer des maturations *in vitro*, mais rendant difficile les prélèvements de milieu pour dosage des stéroïdes. Le taux de maturation a été déterminé au bout de 12 heures d'incubation par le pourcentage d'ovocytes maturés (translucides, ayant subi la rupture de la VG).

Après prélèvement et congélation, les stéroïdes ont été dosés directement dans les milieux d'incubation selon la procédure décrite au chapitre 1, paragraphe 2.6.

2.4 les analyses statistiques

Nous avons analysé les variations des taux de LH par groupe au cours de l'essai en étudiant les profils, c'est à dire les variations de taux d'un prélèvement au suivant. Ces valeurs sont positives

quand les taux augmentent entre deux prélèvements et négatives quand les taux diminuent. Les valeurs ont ensuite été comparées entre groupes par des tests non paramétriques. Cette technique permet de s'affranchir des valeurs absolues des taux pour étudier la dynamique des phénomènes.

Pour les incubations d'ovaires *in vitro*, les données ont été analysées par MANOVA sur les différences puis par un test *post-hoc* de Scheffé pour différencier les températures point par point.

Les données sont présentées comme moyennes \pm écart-type.

3. Résultats

3.1 l'effet de la température sur l'induction artificielle de la ponte

3.1.1 la première expérience en température contrôlée (Żabieniec, juin 2001)

Pour les caractéristiques des femelles avant l'induction, les taux de vitellogénine plasmatique et d'œstradiol étaient identiques aux deux températures (Tableau 3). Les taux de LH étaient presque tous inférieurs à la limite de détection du dosage (0,6 ng/ml) et il n'y avait pas de différence entre groupes. En revanche, les taux de testostérone étaient plus élevés chez les femelles maintenues à 28°C.

Tableau 3 : Caractéristiques plasmatiques (taux de vitellogénine, d'œstradiol et de testostérone) et histologiques (degré de migration de la vésicule germinative) des femelles avant l'induction, selon le conditionnement thermique (24 ou 28°C).

Température	24°C	28°C
Vitellogénine plasmatique ($\mu\text{g/ml}$)	522 \pm 123 ^a	594 \pm 213 ^a
Œstradiol plasmatique (ng/ml)	0,69 \pm 0,51 ^a	0,61 \pm 0,75 ^a
Testostérone plasmatique (ng/ml)	2,44 \pm 1,62 ^a	3,35 \pm 1,05 ^b
Migration de la V.G. : Centrale	34 \pm 10 %	28 \pm 9 %
Début de migration	63 \pm 9 %	68 \pm 8 %
Fin de migration	3 \pm 3 %	4 \pm 3 %

V.G. : vésicule germinative. Les chiffres suivis de lettres identiques ne sont pas significativement différents.

Il n'y avait pas de différence entre groupes dans les stades ovariens ou les degrés de migration des vésicules germinatives en début d'expérience (Tableau 3). Les femelles présentaient en moyenne 31% de vésicules centrales, 65% en début de migration, et 3% en fin de migration.

Des ovulations ont été obtenues pour 17 femelles sur 30, avec des fécondités relatives* très variables, de 0,1 à 11,5 %. Les résultats d'ovulation par groupe figurent dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Résultats d'ovulation de la première induction de ponte en conditions de température contrôlée (effectifs par groupe : 8 femelles pour les groupes à 24°C, 7 femelles pour les groupes à 28°C).

	Pimozide	Pim+GnRH
24°C	4 totales + 1 partielle	5 totales + 3 partielles
28°C	2 partielles	1 totale + 1 partielle

Contrairement à ce qu'il était attendu, des ovulations ont été obtenues avec du pimozide seul à 5 mg/kg en une seule injection.

Le principal déterminant du succès des inductions est la température : le taux d'ovulation à 24°C est supérieur à celui obtenu à 28°C. Le traitement d'induction (pimozide ou pimozide+GnRH) a une influence moins importante. En outre, à 28°C, trois des quatre ovulations sont intervenues au bout de 12 heures, avant même la seconde injection, ce qui n'est intervenu pour aucune des femelles injectées à 24°C. Il n'y a aucune corrélation entre le succès de l'induction et les taux individuels initiaux de testostérone et d'œstradiol, ou le degré de migration de la vésicule germinative.

Nous avons analysé les variations des taux de LH par groupe au cours de l'essai en étudiant les profils, c'est à dire les variations de taux d'un prélèvement à l'autre (Tableau 5). Les valeurs absolues individuelles sont sur la Figure 34.

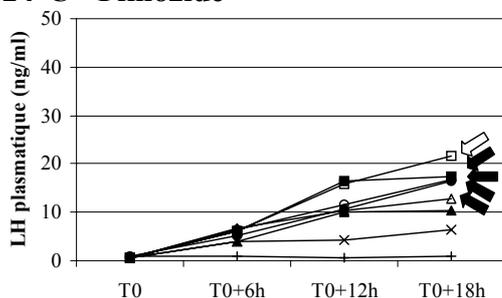
Tableau 5 : Profils des taux de LH (en ng/ml) des différents groupes au cours de l'essai (Żabieniec, 2001). Des valeurs positives signifient que les taux augmentent d'un prélèvement au suivant, et négatives que les taux diminuent.

	Entre t_0 et t_0+6 h	Entre t_0+6 h et t_0+12 h	Entre t_0+12 h et t_0+18 h
Pim à 24°C	+4,2 ± 2 ^a	+5,1 ± 3,9 ^a	+2,8 ± 2,4 ^a
Pim+GnRH à 24°C	+19,2 ± 9,4 ^{bc}	+0,3 ± 6,5 ^a	+16,4 ± 11,7 ^b
Pim à 28°C	+11,1 ± 8,6 ^b	+4,4 ± 4,2 ^a	-3,9 ± 3,5 ^c
Pim+GnRH à 28°C	+26,6 ± 5,6 ^{cd}	+3,8 ± 4,5 ^a	-6,9 ± 4,5 ^c

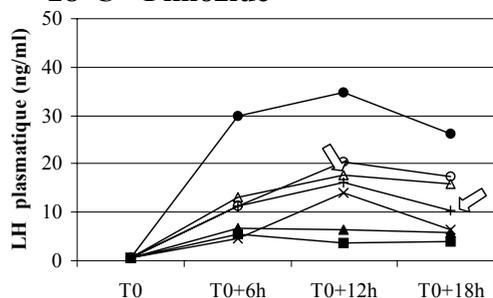
Les valeurs suivies de lettres identiques ne sont pas significativement différentes.

Pendant les 6 premières heures, la température de 28°C stimule les taux de LH pour les deux traitements et le GnRH stimule également les taux de LH plasmatique aux deux températures. De 6 à 12 heures post-injection, les profils sont similaires pour les deux températures (une légère hausse des taux). Après la seconde injection (entre 12 et 18 h) se situent les principales différences entre groupes : une augmentation de la LH circulante pour les groupes maintenus à 24°C, fortement accrue pour le groupe injecté au GnRH, et une diminution pour les groupes maintenus à 28°C.

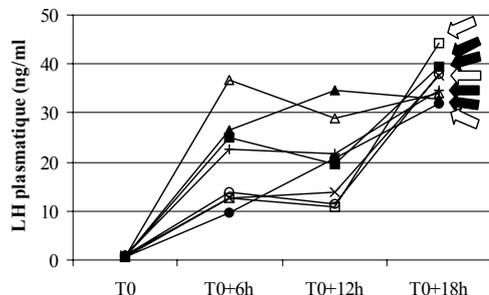
24°C - Pimozide



28°C - Pimozide



24°C - Pimozide+GnRH



28°C - Pimozide+GnRH

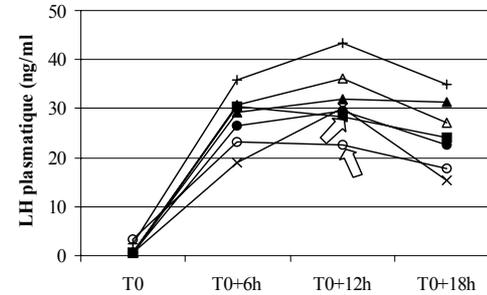


Figure 34. Evolution des taux de LH plasmatique individuels lors de l'induction de ponte réalisée en 2001 à Żabieniec. Une première injection (priming) a été effectuée à T_0 et la seconde à T_0+12 h. Les flèches indiquent les ovulations partielles (flèches blanches) ou complètes (flèches noires).

Cette approche par profil n'a pas été réalisée pour les taux de $17\alpha 20\beta$ en raison d'une variabilité trop élevée entre individus (voir Figure 35).

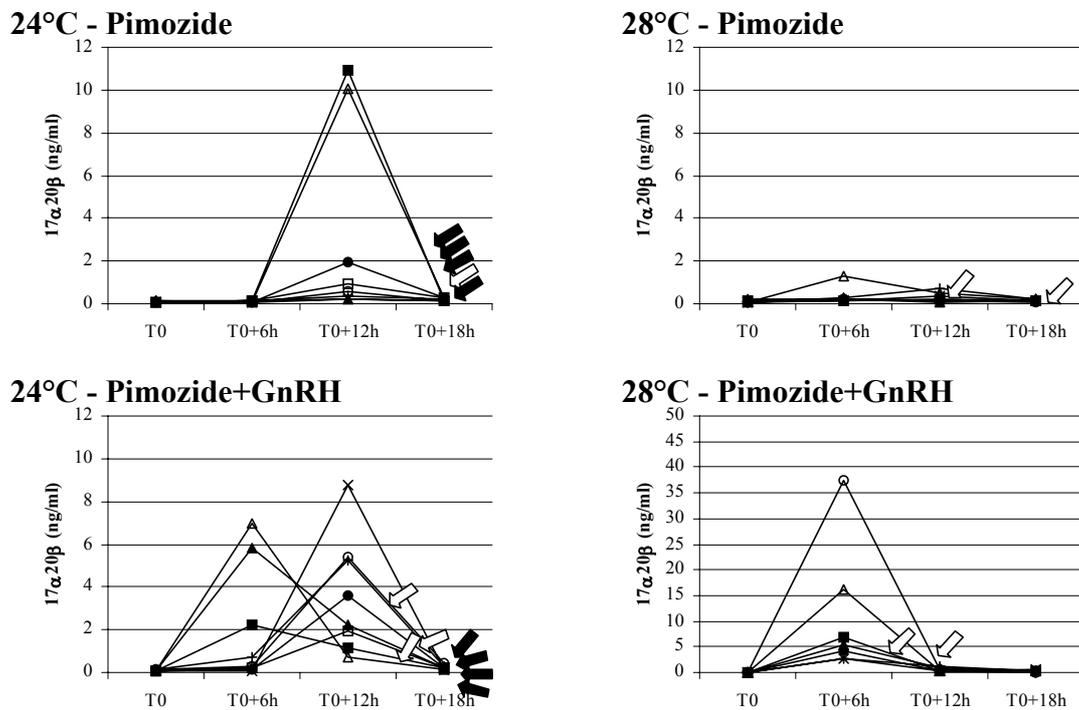


Figure 35. Evolution des taux de MIS plasmatique individuels lors de l'induction de ponte réalisée en 2001 à Żabieniec. Une première injection (priming) a été effectuée à T₀ et la seconde à T₀+12h. Les flèches indiquent les ovulations partielles (flèches blanches) ou complètes (flèches noires). Les individus sont repérés par les mêmes symboles que sur la Figure 34.

Pour les femelles injectées au pimozide, on observe un pic après 12 heures à 24°C, alors qu'à 28°C la production de $17\alpha 20\beta$ semble inhibée (tous les taux sont inférieurs à 2 ng/ml), malgré des taux de LH élevés. Pour les groupes injectés au pimozide et GnRH, on observe une bimodalité dans les taux de $17\alpha 20\beta$ à 24°C : 3 femelles présentent un pic après 6 heures et 5 femelles un pic après 12 heures. A 28°C, le pic intervient 6 h après la première injection pour toutes les femelles, certaines femelles ont des taux bien plus élevés que ceux observés à 24°C.

Les profils individuels de LH et de $17\alpha 20\beta$ plasmatiques ont été déterminés au cours de l'induction (Figure 34 et Figure 35). Pour les poissons induits au pimozide, il y a une relation entre les taux d'hormone et l'ovulation à 24°C : toutes les femelles dépassant 12 ng/ml en LH et 0,5 ng/ml en $17\alpha 20\beta$ ont ovulé. En revanche à 28°C, il n'y a aucun lien simple entre les titres hormonaux et l'ovulation : les deux poissons qui ovulent ne sont pas ceux qui ont les titres les plus élevés ni les

plus faibles. Toutes les femelles induites au pimozide+GnRH à 24°C ovulent, et les ovulations partielles ne sont pas caractérisées par des taux plus élevés ou plus faibles de gonadotropine ou de $17\alpha 20\beta$. A 28°C en revanche, ce sont les deux femelles qui ont les plus faibles taux de LH 12 heures après l'injection qui ovulent (précocement), qui sont d'autre part parmi les taux de $17\alpha 20\beta$ les plus élevés. Deux femelles de ce groupe atteignent les plus forts taux de LH de l'expérience (15 et 37 ng/ml). Le groupe maintenu à 28°C et injecté au pimozide+GnRH présente des taux de LH et $17\alpha 20\beta$ supérieurs ou égaux à ceux du groupe à 24°C injecté au pimozide seul, et malgré cela le taux d'ovulations est nettement inférieur.

3.1.2 l'expérience de validation en Côte d'Ivoire

La température moyenne au cours de l'essai était de 27,7°C.

Aucune ovulation n'a été observée pendant l'expérience, certaines femelles ont mûri, mais sans ovulation. Deux mortalités ont eu lieu dans le groupe induit, ce qui limite le nombre d'individus "exploitables" à 7 dans ce groupe.

Les profils hormonaux sont caractérisés par une très forte hétérogénéité entre individus (voir Tableau 6).

Tableau 6 : Profils des taux de LH (en ng/ml) des différents groupes au cours de l'essai (Gagnoa, 2001).

	Entre t_0 et t_0+6 h	Entre t_0+6 h et t_0+12 h	Entre t_0+12 h et t_0+18 h
Témoins	$+0,8 \pm 0,3^a$	$+0,8 \pm 0,4^a$	$+0,2 \pm 0^a$
Pim+GnRH	$+32,5 \pm 27,8^b$	$+13,9 \pm 22,3^a$	$+22,5 \pm 41,2^a$

Les valeurs représentent les variations de taux d'un prélèvement à l'autre. Ces valeurs sont positives quand les taux augmentent entre deux prélèvements et négatives quand les taux diminuent. Les valeurs suivies de lettres identiques ne sont pas significativement différentes.

En début d'expérience, seules trois femelles sur 18 avaient des taux de LH détectables, et ils étaient inférieurs à 1,2 ng/ml. L'induction provoque une augmentation significative des taux 6 heures après le *priming*, mais on n'observe pas d'évolution significative par la suite, essentiellement du fait de la grande variabilité des individus.

Les taux individuels sont repris sur la Figure 36. Les taux de LH plasmatique observés après la seconde injection en Côte d'Ivoire sont supérieurs à ceux observés en Pologne à 28°C (les autres

différences ne sont pas significatives). Concernant la $17\alpha 20\beta$, les profils sont identiques, il n'y a aucune différence significative entre les taux du pic à 28°C en Pologne et en Côte d'Ivoire. La légère hausse de MIS observée dans les prélèvements des témoins après 6 heures est probablement due à une contamination des seringues par le sérum des poissons induits.

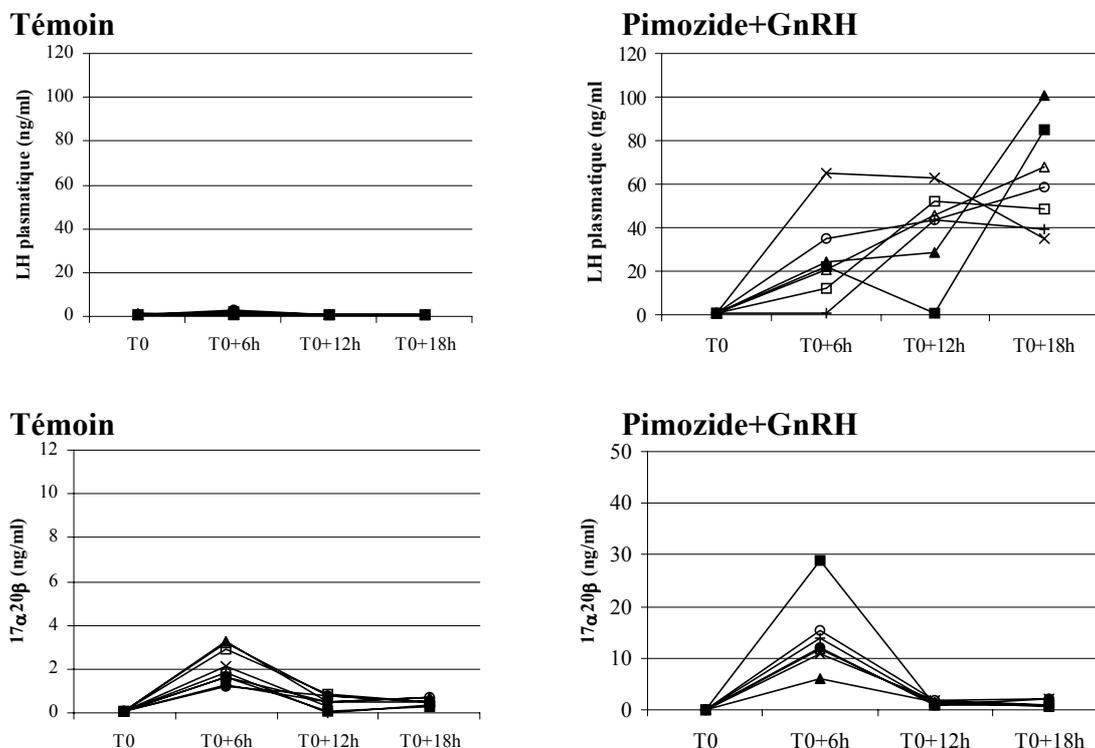


Figure 36. Evolution des taux individuels plasmatiques de LH (graphes du haut) et de MIS (graphes du bas) lors de l'induction de ponte réalisée en 2001 à Gagnoa (température moyenne de 27,7°C). Une première injection (priming) a été effectuée à T₀ et la seconde à T₀+12h.

Le suivi des taux d'AMPc des ovaires ne met pas en évidence de différence de profil entre induits et témoins (voir Tableau 7), mais une très grande variabilité entre individus est observée.

Tableau 7 : Etat initial et variations des taux d'AMPc ovariens (pmol d'AMPc / g d'ovaire) au cours de l'expérience d'induction en Côte d'Ivoire.

	Taux à t ₀	Variation entre t ₀ et t ₀ +6 h	Variation entre t ₀ +6h et t ₀ +12h	Variation entre t ₀ +12h et t ₀ +18h
Témoins	437 ± 58 ^a	-143 ± 64 ^a	-12 ± 146 ^a	-33 ± 140 ^a
Pim+GnRH	586 ± 200 ^a	-100 ± 176 ^a	33 ± 234 ^a	-49 ± 143 ^a

Les valeurs suivies de lettres identiques ne sont pas significativement différentes.

3.1.3 la seconde expérience en température contrôlée (Gosławice, juin 2002)

Les taux d'œstradiol, de testostérone et de LH plasmatique des femelles maintenues à 24°C étaient plus élevés que ceux des femelles maintenues à 28°C (Tableau 8). Il n'y avait pas de différence entre groupes dans les stades ovariens ou la migration des vésicules germinatives en début d'expérience. Les femelles présentaient en moyenne 18% de vésicules centrales, 74% en début de migration, et 8% en fin de migration.

Tableau 8 Caractéristiques plasmatiques (taux de vitellogénine, d'œstradiol et de testostérone) et histologiques (degré de migration de la vésicule germinative) des femelles avant l'induction, selon le conditionnement thermique (24 ou 28°C).

Température		24°C	28°C
Œstradiol plasmatique (ng/ml)		0,46 ± 0,37 ^a	0,35 ± 0,38 ^b
Testostérone plasmatique (ng/ml)		4,49 ± 2,28 ^a	2,42 ± 1,73 ^b
LH plasmatique (ng/ml)		8,1 ± 2,4 ^a	5,6 ± 1,9 ^b
Migration de la V. G. :	Centrale	19 ± 9% ^a	17 ± 11% ^a
	Début de migration	73 ± 7% ^a	76 ± 9% ^a
	Fin de migration	8 ± 6% ^a	7 ± 6% ^a

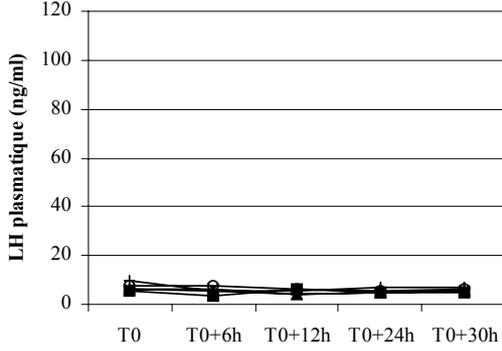
V.G. : vésicule germinative. Les valeurs suivies de lettres identiques ne sont pas significativement différentes.

En raison de mortalités au cours de l'expérience (sans doute liées aux manipulations répétées des poissons), les effectifs finaux des groupes sont différents (voir Tableau 9).

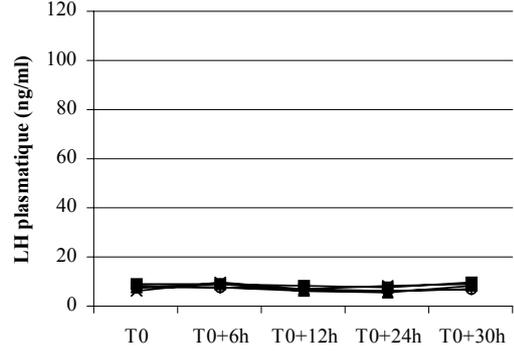
Tableau 9 : Résultats d'ovulation de la seconde induction de ponte en conditions de température contrôlée (femelles ovulées/effectif du groupe).

	Témoin	Pimozide	GnRH	Pim+GnRH
24°C	0 / 5	0 / 6	3 / 6	5 / 5 (dont 3 partielles)
28°C	0 / 5	0 / 6	0 / 6	2 / 4

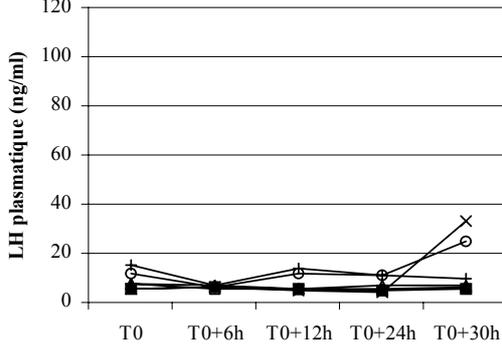
24°C - Témoin



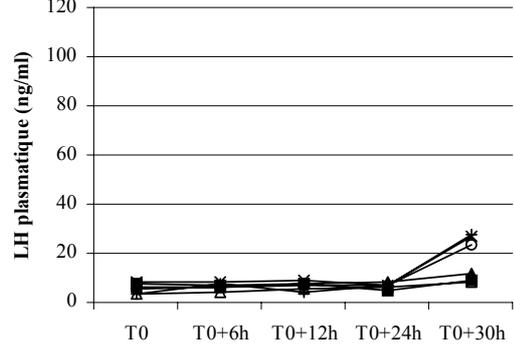
28°C - Témoin



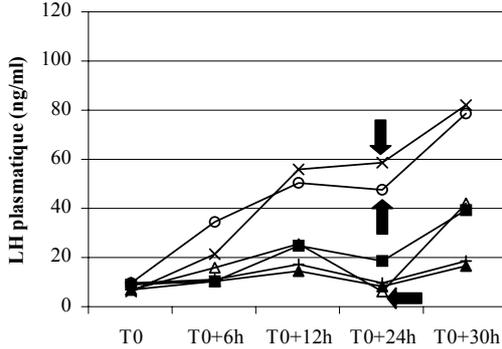
24°C - Pimozide



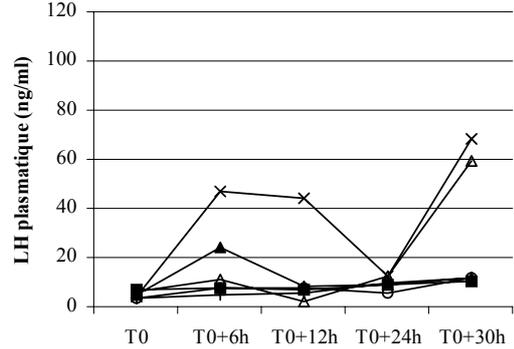
28°C - Pimozide



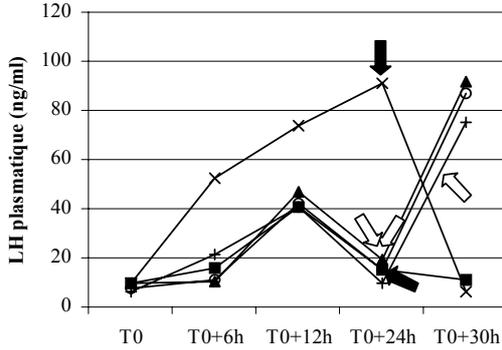
24°C - GnRH



28°C - GnRH



24°C - Pimozide+GnRH



28°C - Pimozide+GnRH

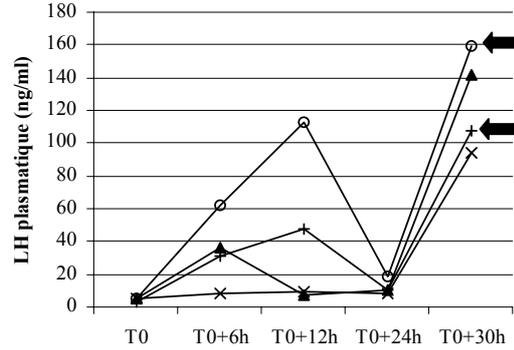


Figure 37. Evolution des taux individuels de LH plasmatique lors de l'induction de ponte réalisée en 2002 à Gosławice. Une première injection (priming) a été effectuée à T₀ et la seconde à T₀+24h. Les flèches indiquent les ovulations partielles (flèches blanches) ou complètes (flèches noires).

Globalement, on a obtenu 10 ovulations sur 33 individus injectés (hors témoins). Là encore, on observe le rôle prépondérant de la température, et une interaction avec les traitements d'induction : aux deux températures les injections de pimozide seul sont inefficaces pour induire la ponte, et en revanche le traitement par le GnRH seul est partiellement efficace à 24°C seulement. De nombreuses ovulations sont intervenues précocement, avant la seconde injection. Elles sont indiquées sur les Figure 37 et Figure 38.

Sur les profils de LH par groupe (Figure 37), on n'observe pas de différence entre températures pour les traitements témoin et pimozide seul. On n'analysera donc que les profils obtenus avec le GnRH ou la combinaison GnRH+pimozide (voir Tableau 10).

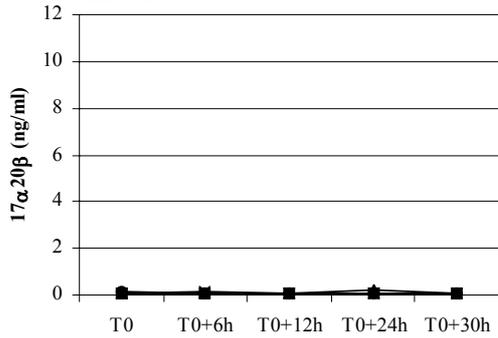
Tableau 10 : Profils des taux de LH (en ng/ml) des différents groupes au cours de l'essai (Gosławice, juin 2002). Les valeurs représentent les variations de taux d'un prélèvement à l'autre.

	Entre t ₀ et t ₀ +6h	Entre t ₀ +6h et t ₀ +12h	Entre t ₀ +12h et t ₀ +24h	Entre t ₀ +24h et t ₀ +30h
GnRH à 24°C	+9,2 ± 9,1 ^a	+14,1 ± 11,2 ^{ab}	-6,5 ± 7,4 ^a	+21,4 ± 11,3 ^a
Pim+GnRH à 24°C	+15,6 ± 16,3 ^a	+26,8 ± 7,1 ^{ab}	-18,8 ± 20,3 ^a	+24,1 ± 68,8 ^a
GnRH à 28°C	+12,1 ± 16,2 ^a	-4,6 ± 6,7 ^c	-2,8 ± 14,8 ^a	+19,3 ± 25 ^a
Pim+GnRH à 28°C	+30,2 ± 22,0 ^a	+9,6 ± 33,2 ^{bc}	-32,2 ± 45,1 ^a	+114 ± 26,5 ^b

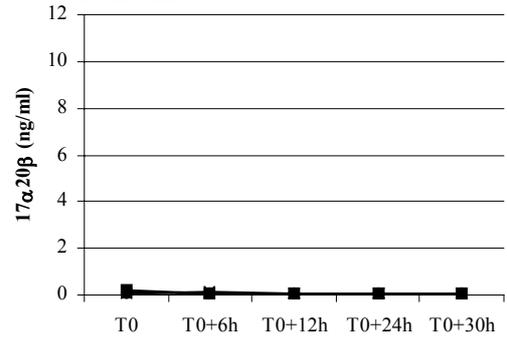
Ces valeurs sont positives quand les taux augmentent entre deux prélèvements et négatives quand les taux diminuent. Les valeurs suivies de lettres identiques ne sont pas significativement différentes (pour un même intervalle entre prélèvements).

A 24°C les profils hormonaux individuels sont moins variables qu'à 28°C. Pendant les 6 heures suivant la première injection, il n'y a pas de différence significative, mais l'effet du pimozide semble plus prononcé à 28°C qu'à 24°C. Entre 6 et 12 heures on observe un effet positif des basses températures (24°C) et également un effet positif du pimozide. Entre 12 et 24 heures post-injection, il n'y a pas de différence significative entre les groupes, tous les taux de LH plasmatique sont en chute ou stables pour quelques femelles. Après la seconde injection, on observe un effet positif du pimozide uniquement à 28°C et pas de différence significative entre températures.

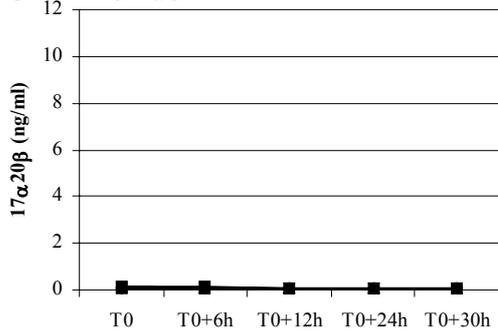
24°C - Témoin



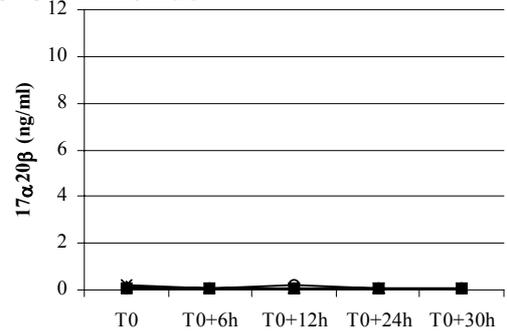
28°C - Témoin



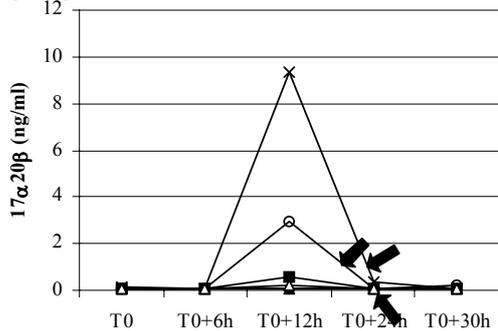
24°C - Pimozide



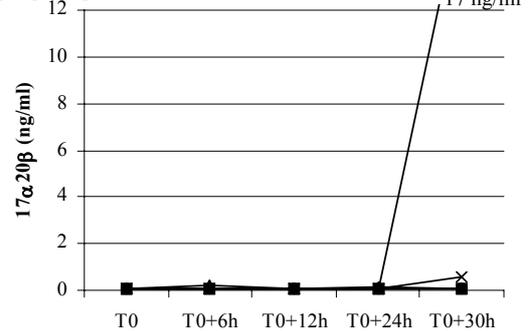
28°C - Pimozide



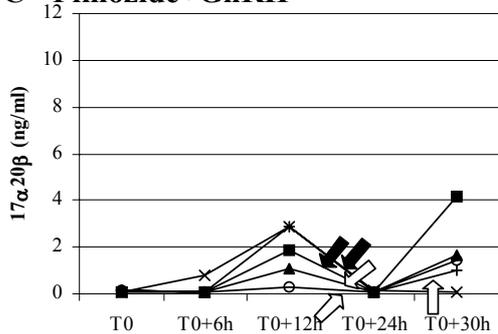
24°C - GnRH



28°C - GnRH



24°C - Pimozide+GnRH



28°C - Pimozide+GnRH

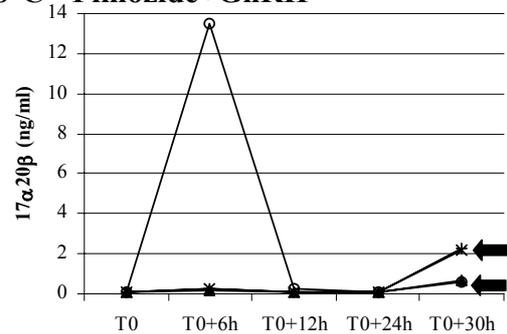


Figure 38. Evolution des taux individuels de MIS plasmatique lors de l'induction de ponte réalisée en 2002 à Goslawice. Une première injection (priming) a été effectuée à T0 et la seconde à T0+24h. Les flèches indiquent les ovulations partielles (flèches blanches) ou complètes (flèches noires). Les individus sont repérés par les mêmes symboles que sur la Figure 37.

Les taux de $17\alpha 20\beta$ (Figure 38) sont indétectables ou extrêmement faibles chez les groupes témoins et injectés au pimozide seul. Chez les poissons maintenus à 24°C on observe un pic de sécrétion 12 heures post-injection, tandis que chez les poissons maintenus à 28°C, on n'observe pas de sécrétion dans le groupe GnRH, et seul un poisson présente un pic dès 6 heures après l'injection dans le groupe GnRH+pim.

L'analyse des profils individuels (pour les groupes qui ovulent partiellement) montre que ce sont les poissons qui ont les plus forts taux de LH à 12 h qui ovulent à 24 h (c'était le cas à 24°C en 2001). Cette relation est également vraie pour les taux de $17\alpha 20\beta$. Là non plus, aucune corrélation entre les niveaux initiaux des stéroïdes ou le degré de migration de la V.G. et le succès de l'induction.

Les taux d'AMPc ovariens, mesurés en début d'expérimentation et avant la seconde injection (t_0+24h) n'ont montré aucune différence intergroupe à aucun de ces deux moments (voir Tableau 11). Les trois poissons qui ont ovulé dans le groupe induit au GnRH à 24°C sont ceux qui avaient les plus bas taux initiaux d'AMPc du groupe, mais cette relation n'est pas vérifiée pour le groupe induit au GnRH et pimozide à 28°C, il pourrait donc s'agir d'un artefact.

Tableau 11 : Taux d'AMPc ovariens, initiaux et lors de la seconde injection (t_0+24 h), en pmol d'AMPc/g d'ovaire – le nombre d'individus prélevés figure entre parenthèses.

Température	Traitement	Taux initial	Taux à t_0+24h
24°C	Témoin	309 ± 7 (n=5)	218 ± 54 (n=5)
	Pimozide	246 ± 30 (n=5)	224 ± 18 (n=4)
	GnRH	245 ± 27 (n=6)	266 ± 89 (n=2)
	Pim+GnRH	258 ± 24 (n=5)	195 ± 156 (n=2)
28°C	Témoin	255 ± 43 (n=4)	267 ± 51 (n=5)
	Pimozide	219 ± 55 (n=6)	287 ± 99 (n=5)
	GnRH	254 ± 40 (n=6)	331 ± 82 (n=6)
	Pim+GnRH	276 ± 95 (n=6)	342 ± 124 (n=4)

3.2 l'effet de la température sur la sécrétion hypophysaire de LH

La dispersion des quatre hypophyses utilisées a produit 10 300 000 cellules vivantes et 2 600 000 mortes, soit 206 puits à 50 000 cellules par puits.

Les résultats des cultures sont repris sur la Figure 39.

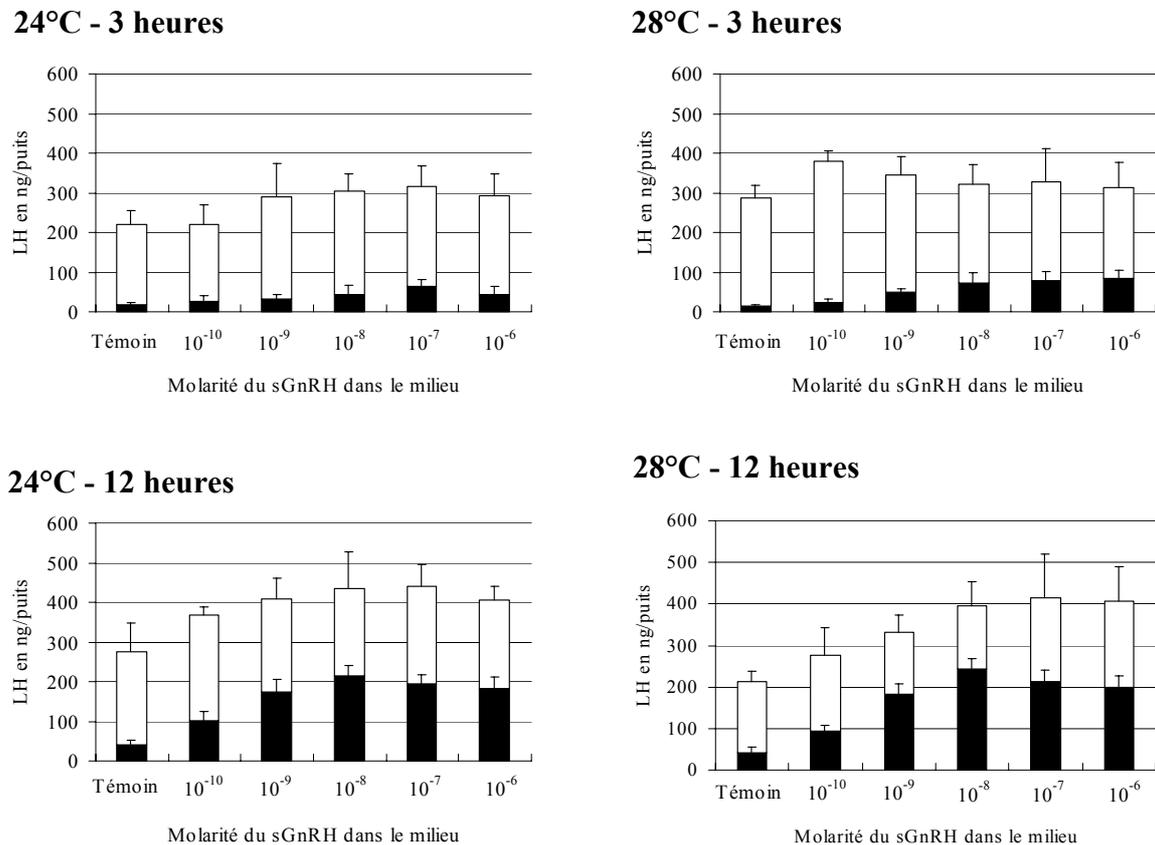


Figure 39. Culture de cellules hypophysaires : quantité de LH libérée dans le milieu (■) et contenu cellulaire en LH (□) en présence de différentes doses de sGnRH, selon la température d'incubation (24°C et 28°C) et la durée d'incubation (3 heures et 12 heures). Le témoin représente la sécrétion basale en absence de GnRH. Les valeurs sont indiquées comme moyennes ± écart-types.

Si l'on compare les niveaux de base (témoins), la sécrétion augmente significativement entre 3 et 12 heures, aux deux températures. Au bout de 3 heures, le contenu cellulaire est plus élevé à 28°C qu'à 24°C.

Au bout de 3 heures, la température de 28°C augmente la sensibilité des cellules au sGnRH : il y a un effet du sGnRH à partir de 10⁻⁹ M, alors qu'à 24°C il faut une dose cent fois plus élevée pour observer un effet. Au bout de 12 h, il n'y a plus de différence de sensibilité. Sur les contenus

cellulaires, la seule différence observée par rapport au témoin est une stimulation de la synthèse en 3 heures par la plus faible dose de GnRH à 28°C.

Si l'on compare les données rapportées au niveau de base (en % du témoin), on observe encore une augmentation à 28°C par rapport à 24°C au bout de trois heures d'incubation (augmentation de la sécrétion pour des doses de sGnRH de 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-6} M, augmentation du contenu à 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M de sGnRH). Après 12 heures de culture, aucune différence significative n'est décelable entre les deux températures.

L'analogue (sGnRH-A) stimule la sécrétion par rapport au sGnRH uniquement après 3 heures de culture et pour les doses les plus faibles (10^{-9} M) : la différence est significative à 28°C et en limite de signification à 24°C ($p=0,051$). Pour des doses plus élevées, des temps de culture de 12 heures ou sur le contenu cellulaire, aucune différence n'est observée entre l'analogue et le sGnRH.

3.3 *l'effet de la température sur les ovaires*

Le contenu en LH de l'extrait hypophysaire utilisé dans les incubations *in vitro* a été déterminé : cet extrait contenait 0,29 mg de LH par mg d'extrait sec. Les résultats pour les femelles en fin de vitellogénèse ont été obtenus sur 3 femelles différentes. Des essais préliminaires menés sur des femelles n'ayant pas subi de *priming* d'extrait hypophysaire ont montré une sécrétion de $17\alpha 20\beta$ très faible, le plus souvent inférieure à la limite de détection du dosage. Ces résultats ne sont pas repris ici.

3.3.1 la relation stimulation / réponse

L'effet principal des fortes températures sur la production de $17\alpha 20\beta$ par les ovaires est une diminution de la réponse aux faibles doses : pour une dose de 10 $\mu\text{g/ml}$ (la plus faible dose donnant une réponse significative), la sécrétion à 32°C est inhibée par rapport à 24 et 28°C (Figure 40). Pour la dose immédiatement inférieure, soit 5 $\mu\text{g/ml}$, nous nous trouvons en limite de signification ($p=0,06$) pour une sécrétion plus importante à 24°C. Pour les doses plus fortes, les différences entre températures s'estompent, principalement du fait d'une grande variabilité entre femelles pour ces courbes de réponse. La production maximale est indépendante de la température d'incubation. Il n'y a pas de différence entre les températures pour les incubations témoins sans extraits hypophysaires.

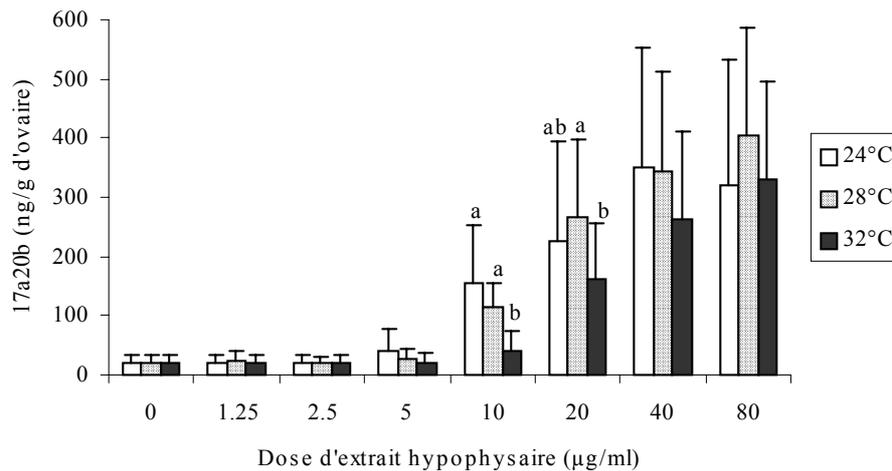


Figure 40. Sécrétion de MIS *in vitro* par les ovaires en fin de vitellogénèse pendant 8 heures, en fonction de la dose d'extrait hypophysaire de carpe commune (moyenne ± écart-type, les lettres différentes indiquent une différence significative pour une même dose – nous n'avons pas comparé les doses entre elles).

3.3.2 la cinétique de concentration

Les courbes de cinétique de concentration diffèrent notablement selon la température d'incubation sur plusieurs points (Figure 41) :

- le démarrage de la sécrétion de $17\alpha 20\beta$: au bout de deux heures, il n'y a qu'à 32°C que la sécrétion est significative, et au bout de 4 heures, la sécrétion à 24°C est plus faible qu'aux températures plus élevées,
- le moment de la sécrétion maximale : un pic est atteint après 4 à 6 heures à 32°C, après 6 heures à 28°C, et après 8 heures à 24°C,
- Les niveaux maximaux atteints : à 32°C, les niveaux maximaux atteints dans le milieu sont inférieurs à ceux de 24 et 28°C (pas de différence significative entre ces deux derniers),
- la vitesse de décroissance des taux : à 28°C et 32°C, les taux de $17\alpha 20\beta$ dans le milieu décroissent plus rapidement qu'à 24°C. Cette différence est particulièrement frappante après 24 h d'incubation, quand les taux à 24°C sont quatre fois plus élevés qu'aux plus hautes températures.

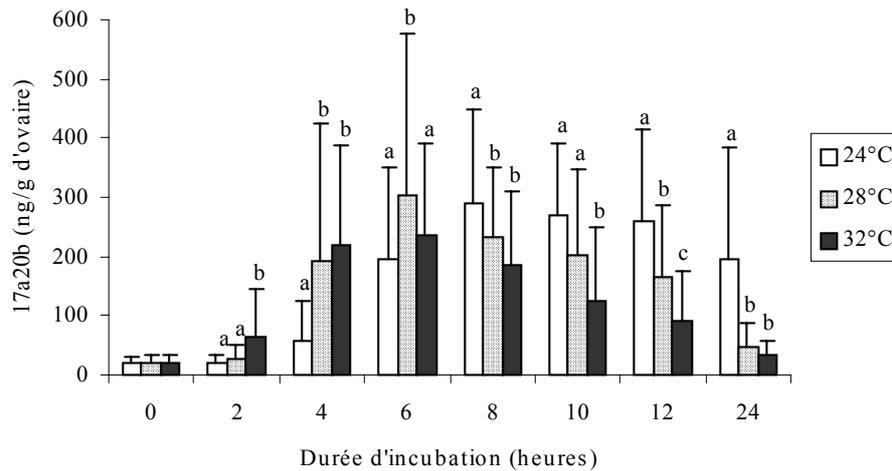


Figure 41. Cinétique de concentration de MIS *in vitro* par des ovaires en fin de vitellogénèse, incubés à 24°C, 28°C ou 32°C en présence d'extrait hypophysaire de carpe commune à 20 µg/ml (moyenne ± écart-type, les lettres différentes indiquent une différence significative pour une même dose).

L'AMPc a été dosé sur des fragments d'ovaires incubés *in vitro* (voir Figure 42 et Figure 43). On observe une décroissance spontanée de l'AMPc au cours de l'incubation, qui n'est modifiée ni par la température, ni par la dose de 17α20β du milieu d'incubation, sauf à 32°C, où la décroissance est accrue au bout de 12 h en présence de MIS à fortes doses.

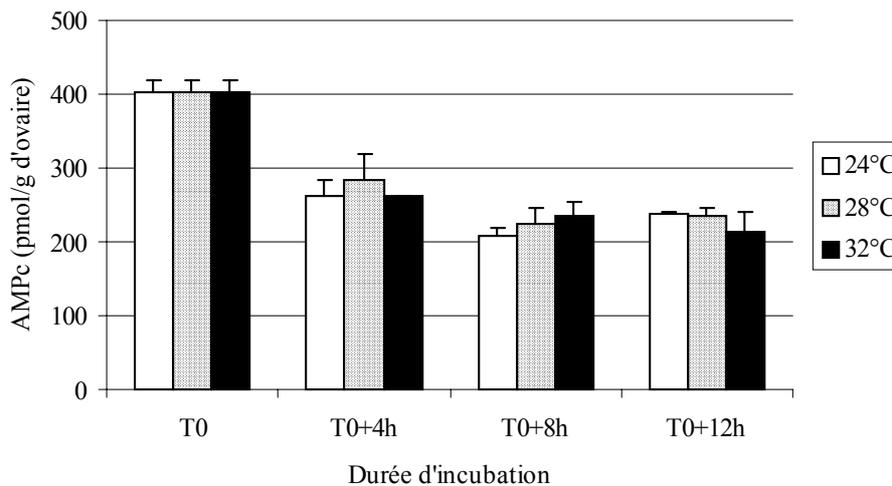


Figure 42. Evolution au cours du temps du contenu en AMPc des fragments d'ovaires incubés *in vitro* avec des extraits hypophysaires à 24°C, 28°C et 32°C (moyenne ± écart-type).

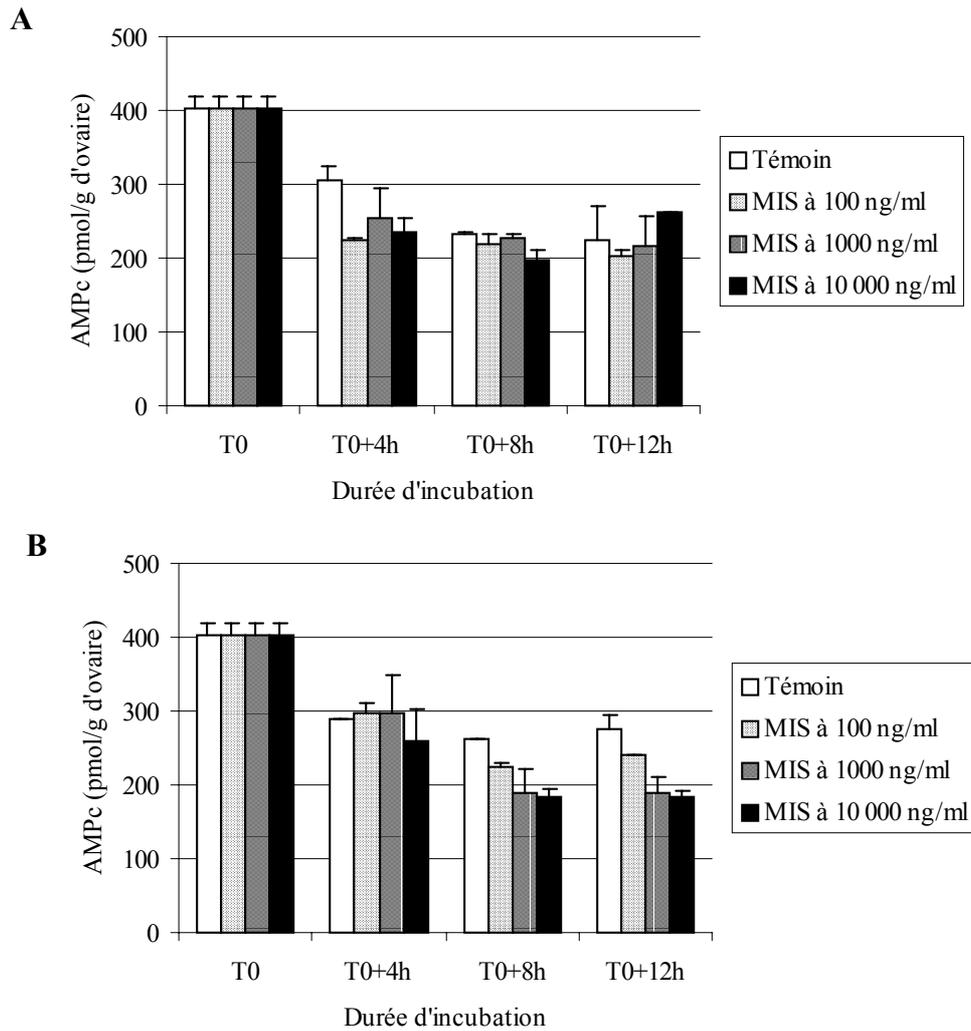


Figure 43. Contenu en AMPc des fragments d'ovaires incubés *in vitro* en présence de différentes doses de MIS pendant 8 heures à 24°C (A) et 32°C (B) (moyenne ± écart-type).

3.3.3 les maturations ovocytaires

In vitro, des maturations ont été obtenues uniquement pour des fragments d'ovaires incubés dans de très faibles quantités de milieu (500 mg d'ovaire dans 500 ml de milieu), ce qui rendait problématique le prélèvement de milieu pour dosage de la 17 α 20 β .

Les données de maturation obtenues sur une femelle sont détaillées sur la Figure 44.

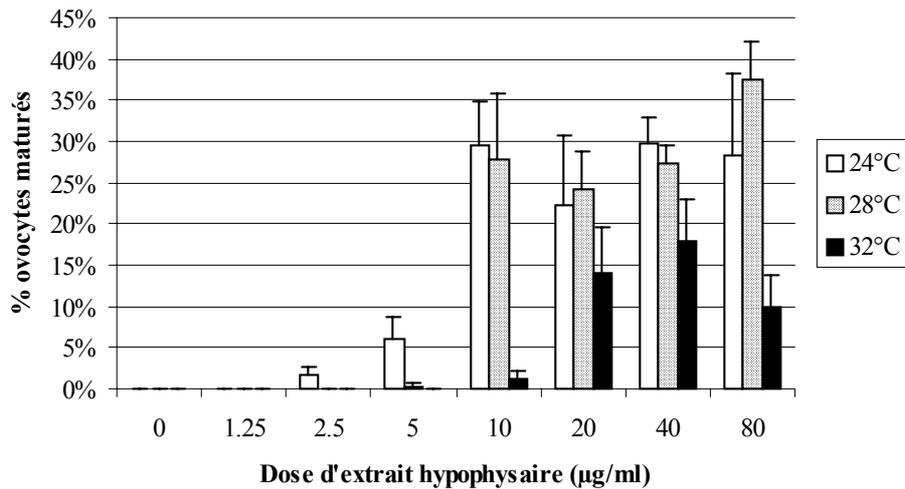


Figure 44. Pourcentage de maturation des ovocytes *in vitro* en 12 heures, en fonction de la dose d'extrait hypophysaire (moyenne ± écart-type).

On observe une diminution de la sensibilité aux extraits hypophysaires avec la température (premières maturations pour 2,5 µg/ml d'extrait à 24°C, 10 µg/ml à 28°C et 20 µg/ml à 32°C). Enfin, le taux maximal de maturation est inférieur à 32 °C (moins de 20%) par rapport à 24 et 28°C (30 à 40%). Quand on confronte les taux de maturation avec les titres en 17α20β (Figure 45), on observe un taux de maturation inférieur à 32°C par rapport à 24°C, malgré des taux de MIS similaires.

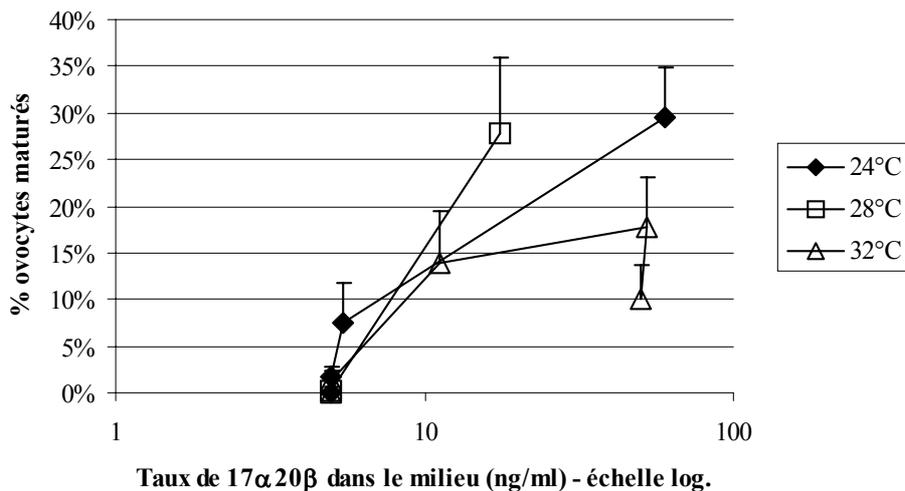


Figure 45. Pourcentage de maturation des ovocytes *in vitro* en fonction du taux de MIS sécrété dans le milieu d'incubation par les ovocytes stimulés par des extraits hypophysaires.

4. Discussion

Les températures choisies pour les expérimentations correspondent à une température considérée comme optimale pour la ponte naturelle ou artificielle : 24°C (Bardach *et al.*, 1972; Krykhtin et Gorbach, 1982), une température seuil au-delà de laquelle il semble y avoir des problèmes de reproduction (28°C) et pour les expériences *in vitro* une température dont on suppose qu'elle doit bloquer la reproduction (32°C).

La variation des taux de base des stéroïdes avec la température est opposée lors des deux essais successifs : cela peut être dû à l'origine génétique des poissons (Weil *et al.*, 1980), à leur stade de maturité ou à leur histoire thermique. Les taux basaux de LH étaient plus élevés chez les poissons de Gosławice, sans doute du fait de leur stade de maturité plus avancé (confirmé par la plus forte proportion d'ovocytes à V.G. en migration).

Sur les expériences d'induction de ponte, les principales différences entre températures sont observées sur les résultats d'ovulation et sont bien plus importantes que les différences de niveaux hormonaux : le nombre d'ovulations est 3 à 4 fois plus élevé à 24°C qu'à 28°C. On obtient 100% d'ovulation chez les poissons injectés avec du pimozide et GnRH à 24°C, ce qui est conforme aux résultats obtenus par d'autres auteurs (Drori *et al.*, 1994). On a obtenu des ovulations partielles chez plusieurs individus, et de nombreuses femelles ont ovulé de façon précoce après la première injection (uniquement à 28°C en 2001), et des ovulations ont été obtenues avec des injections de pimozide seul aux deux températures ou de GnRH seul à 24°C uniquement.

Aucun des caractères mesurés individuellement chez les femelles lors de la première injection (taux des stéroïdes ou de LH basale, degré de migration de la VG, AMPc intraovarien) n'est corrélé avec le succès de l'induction de ponte : ce ne sont pas de bons prédicteurs de la réceptivité de la femelle, comme constaté chez le bar rayé (Weber *et al.*, 2000).

Nous allons commencer par analyser les résultats des gonadotropines, avant d'analyser les résultats concernant les effets des gonadotropines sur les ovaires, qui pourront éclairer les résultats d'ovulation.

4.1 sur la libération de LH

Sur les cultures de cellules hypophysaires, on observe une sensibilité au GnRH plus forte à 28°C pendant les 3 premières heures, qui disparaît au bout de 12 heures. Au bout de 12 heures, ni la synthèse ni la libération de LH ne sont influencées par la température. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus chez la carpe commune, où la libération basale de LH et la réponse au GnRH par des cellules hypophysaires en perfusion sont constantes entre 20 et 25°C (Lin *et al.*, 1996). Les niveaux

basaux de LH sont en revanche plus élevés à 24°C qu'à 28°C en 2002, alors que la plupart des auteurs observent plutôt une corrélation positive entre la température et les taux de LH plasmatique (Gillet *et al.*, 1977a; Gillet *et al.*, 1977b; Sohn *et al.*, 1998b). Cette différence pourrait être due à l'histoire thermique des poissons, qui étaient stockés à une température élevée avant d'être transférés dans l'écloserie, alors que la plupart des données publiées font référence à des augmentations de température.

Les profils de LH plasmatique obtenus avec le GnRH et pimozide en 2002 sont assez proches de ceux de 2001 avec tout de même des différences probablement dues à la différence de protocole d'injection, puisqu'en 2001 on a injecté la totalité de la dose de pimozide à t_0 , et seulement 10% de la dose en 2002. Par ailleurs, la variabilité individuelle est plus élevée en 2002.

Pendant les 6 premières heures après le *priming*, on observe un effet positif des fortes températures (non significatif en 2002) sur la LH circulante. L'influence de la température *in vivo* sur la stimulation de la LH par le GnRH lors de la première injection n'est pas nette : en 2001, en présence de pimozide, l'effet du GnRH semble plus prononcé à 24°C (le GnRH augmente les taux d'un facteur 4,5 à 24°C et seulement 2,4 à 28°C) ; en 2002, en l'absence de pimozide, on n'observe pas de différence significative entre les températures pour le GnRH seul. Toutefois, cette absence d'effet peut être le résultat d'une inhibition par la dopamine qui ne permet pas à la différence de s'exprimer : chez la carpe commune, la différence d'effets entre LHRH et GnRH ne s'exprime qu'en présence d'un antidopaminergique (Lin *et al.*, 1988). Le comportement *in vivo* diffère donc de l'effet du GnRH *in vitro*, sans doute du fait des interactions avec l'inhibition dopaminergique.

L'augmentation de l'inhibition dopaminergique par la température est plus claire : en 2002, le pimozide accroît davantage l'effet du GnRH à 28°C (x 2,5, contre x 1,7 à 24°C). Cet effet avait déjà été évoqué chez l'omble *Salvelinus alpinus* (Gillet *et al.*, 1996). Cette même différence est encore plus flagrante lors de la seconde injection : aucun effet amplificateur du pimozide à 24°C, multiplication par un facteur 6 à 28°C. L'augmentation de l'inhibition dopaminergique peut expliquer la chute des taux d'ovulation des carpes herbivores induite à la LHRH-A quand la température dépasse 27°C (Rottman et Shireman, 1985). La dopamine intervient par plusieurs mécanismes : elle diminue directement la sécrétion de LH (via les récepteurs D2), inhibe la libération du GnRH dans l'hypophyse, diminue la liaison du GnRH à son récepteur et peut aussi interférer avec le signal intracellulaire du GnRH (Trudeau, 1997). L'antidopaminergique augmente la capacité des sites de liaison à haute affinité du GnRH. En comparant les profils des deux expériences, il apparaît que le pimozide à 5 mg/kg est capable de lever l'inhibition dopaminergique, mais pas à 0,5 mg/ml. Ceci avait déjà été constaté chez le carassin (Peter *et al.*, 1986), et confirme le fort tonus inhibiteur dopaminergique chez cette espèce comme chez beaucoup de cyprinidés, qui

est supérieur aux salmonidés et à la loche (Lin *et al.*, 1988). L'effet supérieur à 28°C du pimozide seul sur la sécrétion de LH (d'un facteur 2,5 en 2001) peut être le résultat d'une inhibition dopaminergique plus forte, et/ou d'une quantité plus élevée de gonadotropine dans l'hypophyse à 28°C. Chez la carpe commune, l'action de l'antidopaminergique sur la sécrétion de gonadotropine augmente au cours du cycle sexuel, mais sans modification de la dose moyenne efficace (Omeljaniuk *et al.*, 1989), ce qui signifie que cette action est uniquement due à l'augmentation du contenu hypophysaire. Chez le carassin femelle mature, on n'observe cependant pas d'augmentation des niveaux d'ARNm des sous-unités des gonadotropines par la température, c'est la sécrétion seule qui est accrue (Sohn *et al.*, 1998b). Dans notre cas, l'augmentation du blocage dopaminergique à haute température est démontrée, mais on ne peut pas exclure un effet complémentaire de la charge hypophysaire en gonadotropines, vu par exemple la très forte sécrétion à 28°C lors de la seconde injection de GnRH+pimozide en 2002. L'ampleur du blocage pourrait être démontrée par la comparaison de doses croissantes d'antidopaminergique aux deux températures. En présence d'un antidopaminergique, les taux de LH 6 heures après les injections sont au moins aussi élevés à 28°C qu'à 24°C.

La tendance s'inverse rapidement (entre 6 et 12 h post-injection) en 2002, et plus tardivement (après 12 heures) en 2001, où la baisse de LH se poursuit malgré la seconde injection. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées : une différence du taux de métabolisation selon la température (Cook et Peter, 1980a) (mais ces auteurs ne voient pas de différence entre 12°C et 20°C pour des carassins matures) et également des différences de fixation de GtH par les ovaires (Cook et Peter, 1980b), mais là non plus sans différences à long terme entre 12 et 20°C. On peut aussi invoquer un phénomène de décharge rapide à 28°C, le stock hypophysaire de LH étant épuisé rapidement et ne permettant plus la libération jusqu'à sa reconstitution par synthèse (qui interviennent plus tardivement). A 28°C, il semble que 12 heures après la première injection, les hypophyses ne soient plus stimulables (en 2001), alors que la réceptivité semble restaurée après 24 heures (en 2002). Ce dernier phénomène pourrait aussi être dû à une désensibilisation temporaire des cellules gonadotrophes au GnRH (Habibi, 1991). Nos données ne permettent cependant pas de hiérarchiser ces phénomènes. Les profils de LH relevés sur les poissons induits en Côte d'Ivoire (température moyenne de 27,7°C pendant l'induction) sont intermédiaires entre les profils observés à 24°C et 28°C, et caractérisés par une très grande variabilité entre individus.

4.2 *sur les phénomènes intervenant au niveau ovarien*

La synthèse *in vitro* de 17 α 20 β (le MIS) en réponse à de l'extrait hypophysaire était presque nulle en l'absence de *priming* d'extrait hypophysaire, un phénomène déjà largement documenté (Epler *et*

al., 1987b; Sen *et al.*, 2002), et qui peut être expliqué par la nécessité d'acquisition de la compétence folliculaire, qui nécessite au préalable la mise en place des capacités de production du MIS sous l'effet des gonadotropines. Le *priming* de gonadotropines aurait pour effet de développer cette compétence et de permettre la production du MIS et la réceptivité des ovocytes à ce signal. Sur les poissons ayant subi un *priming*, il faut souligner que les doses d'hormone utilisées *in vitro* sont très supérieures aux doses *in vivo* : *in vitro*, la dose la plus basse induisant une production détectable de $17\alpha 20\beta$ était de l'ordre de 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de LH, alors que les taux plasmatiques rencontrés chez les femelles ovulantes étaient au moins trente fois plus faibles. Toutefois ces doses sont du même ordre que celles utilisées par d'autres auteurs dans des incubations *in vitro* (Kime *et al.*, 1987; Epler *et al.*, 1987b).

Le principal effet des hautes températures est une baisse de la sensibilité des gonades aux faibles doses d'extrait hypophysaire. En revanche, la production maximale induite par de fortes doses de gonadotropines semble indépendante de la température. Au niveau cinétique, les fortes températures induisent une apparition plus précoce de la production de $17\alpha 20\beta$, un pic de production atteint plus rapidement (en 6 heures à 28°C contre 8 h à 24°C), un niveau maximal inférieur et une décroissance plus rapide des taux de $17\alpha 20\beta$. Ces trois dernières caractéristiques sont sans doute le résultat d'une métabolisation plus rapide du MIS à haute température, qui pourrait être rapprochée de la stimulation de la glucuronidation des androgènes par les fortes températures dans le testicule du carassin (Kime, 1980). Cet effet stimulant des hautes températures sur le métabolisme des stéroïdes a été démontré chez plusieurs espèces (Fostier *et al.*, 1983).

Des maturations ovocytaires n'ont été observées que pour des fragments d'ovaires incubés dans des quantités très faibles de milieu (500 μl de milieu pour 500 mg d'ovaire). Le protocole "standard" qui comprenait deux fois plus de milieu ne permettait pas d'obtenir de maturation, bien que les taux de $17\alpha 20\beta$ soient du même ordre de grandeur dans les deux cas. Ceci pourrait s'expliquer par la présence nécessaire d'une autre substance agissant sur la maturation (dont la concentration dans le milieu ne serait proportionnelle ni à la dose de LH ni à la concentration de $17\alpha 20\beta$), ou par de meilleures conditions d'incubation en petit volume (meilleure oxygénation du milieu, pH...). L'expérience sur la maturation démontre un effet inhibiteur des hautes températures sur un processus situé en aval par rapport au signal du MIS, comme chez le carassin (Gillet *et al.*, 1977b). Les dosages d'AMPc, effectués aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, ne permettent pas de mettre en évidence de différence à ce niveau, sauf *in vitro* à 32°C à des doses très supérieures aux conditions physiologiques. Il faut toutefois souligner que ces dosages étaient réalisés sur des fragments d'ovaires, comprenant des follicules à différents stades de maturité et toutes les enveloppes folliculaires pour les follicules matures. Ainsi, bien que les ovocytes en maturation représentent la

majorité du volume des prélèvements, il est possible que la contamination par d'autres compartiments ait masqué des différences de contenu ovocytaire en AMPc (puisque les niveaux d'AMPc sont présumés évoluer en sens contraire dans les enveloppes folliculaires et dans l'ovocyte). Il est également possible que la congélation des échantillons avant extraction, bien qu'elle ait été effectuée en milieu protecteur, n'ait pas empêché une dégradation de l'AMPc : les taux obtenus dans notre étude sont entre 2 et 10 fois plus faibles que ceux relevés chez la truite arc-en-ciel (Jalabert et Finet, 1986). Ces auteurs soulignent toutefois la grande variabilité des taux d'AMPc au cours des incubations *in vitro*, qui fait que les différences entre témoins et traités ne sont donc pas toujours discernables. Pendant les expériences d'induction de ponte, les résultats concernant les niveaux de $17\alpha 20\beta$ sont un peu différents entre les deux années d'expérimentation : en 2001, à 24°C les taux semblent corrélés avec ceux de LH : le pic de MIS est plus tardif pour les poissons injectés au pimozide seul, et les valeurs plus dispersées (2 poissons répondent très bien, les autres faiblement), correspondant à une élévation plus tardive de la LH. A 28°C en revanche, les poissons injectés au pimozide seul semblent complètement inhibés pour la production de MIS, tandis que les poissons injectés au Pim+GnRH ont un pic très précoce (6 heures post-injection) et d'ampleur plutôt supérieure aux poissons maintenus à 24°C. Le même comportement est observé chez les poissons induits en Côte d'Ivoire. En 2002, les deux groupes à 24°C présentent un pic de MIS après 12 h, le groupe injecté au GnRH seul a les mêmes caractéristiques que le groupe injecté au pimozide seul en 2001, et la production de MIS paraît fortement inhibée à 28°C pour tous les groupes, à l'exception d'un individu par groupe.

Il semble donc que l'on ait une inhibition de la production de MIS dans plusieurs groupes à 28°C, malgré des taux de LH similaires à ceux observés à 24°C. Quand l'inhibition n'est pas observée, les pics sont beaucoup plus précoces et plus intenses qu'à 24°C. Bien qu'on ne puisse pas complètement exclure que le pic de MIS intervienne entre deux prélèvements successifs et donc ne figure pas sur les courbes, cela est peu probable du fait de la durée des pics observés *in vivo* aux autres températures et les profils de sécrétion *in vitro*. Les résultats *in vitro* obtenus sur des poissons ayant subi un *priming* de 12 heures montrent une certaine inhibition de la production de MIS aux fortes températures, mais sans commune mesure avec ce que l'on observe *in vivo* (sauf peut-être aux très faibles doses d'extrait hypophysaire). L'hypothèse la plus probable pour expliquer la forte inhibition *in vivo* est une perturbation par les hautes températures de l'acquisition de la compétence folliculaire, qui met en place les capacités de réponse de l'ovocyte à la gonadotropine par la production de MIS. Chez la carpe commune à 20°C, les capacités de production de MIS demandent 6 heures pour s'établir après un *priming* d'extrait hypophysaire, la migration de la VG se déroule entre 6 et 12 heures, et les taux de rupture de la VG sont d'autant plus élevés que l'intervalle après le

priming augmente (jusqu'à 24 h) (Kime *et al.*, 1987). Il est possible que le déroulement séquentiel de l'acquisition de la compétence soit modifié à 28°C. Une seconde possibilité serait la perturbation thermique de la libération et/ou de l'effet d'autres facteurs qui peuvent influencer sur la compétence ovarienne, comme la FSH, qui présente probablement une élévation au moment de la maturation et qui aurait un effet sur la maturation ovarienne (Van der Kraak *et al.*, 1992). Les quelques individus dont la production de MIS n'est pas inhibée à 28°C ont une réponse supérieure à celle des poissons maintenus à 24°C, ce qui prouve que si les capacités de production de MIS sont bien acquises, la réponse est plutôt accrue par la température. Chez la carpe, il semble que les différentes étapes aient des optimums de température différents : 15°C pour l'acquisition de la compétence (migration de la VG) et 20 à 25°C pour la maturation (Epler *et al.*, 1985).

Les relations entre les taux hormonaux individuels et les ovulations sont très difficiles à établir. Dans ce cas, il y a très probablement un effet des intervalles de prélèvements. Si l'on part du constat effectué *in vitro*, les pics de MIS sont beaucoup plus aigus aux fortes températures, ce qui voudrait dire que le prélèvement a toutes les chances d'intervenir juste avant ou après le pic et donc ne pas refléter l'ampleur réelle du pic. A 24°C, tous les poissons ayant atteint un certain niveau plasmatique de LH et/ou de MIS ovulent, alors que ce n'est pas le cas chez les poissons maintenus à 28°C : certains n'ovulent pas malgré de forts taux de MIS. D'autre part et à toutes les températures, on n'observe pas de corrélation entre les taux hormonaux et le fait d'obtenir des ovulations complètes ou partielles, mais ceci est peut-être dû également au fait que les prélèvements ne permettent pas de déterminer avec précision l'ampleur des pics hormonaux. En 2001, les poissons injectés au Pimozide et GnRH à 28°C avaient des taux de LH et MIS supérieurs à ceux de 24°C, et cependant le taux d'ovulation est nettement inférieur. Il semble donc qu'il y ait également un blocage en aval du signal MIS, comme cela a été détecté dans les incubations *in vitro* et également chez le carassin (Gillet *et al.*, 1977b) et la truite arc-en-ciel (Pankhurst *et al.*, 1996). Par ailleurs dans les essais menés en Côte d'Ivoire, les poissons ont mûri mais pas ovulé, ce qui démontre un blocage au niveau de l'ovulation, mais qui peut aussi être dû au stress des manipulations. L'inhibition pourrait intervenir au niveau de l'induction par le MIS de la synthèse de prostaglandines, ou au niveau de l'action des prostaglandines. L'effet des prostaglandines sur l'ovulation *in vitro* semble toutefois indépendant de la température entre 20 et 25°C chez la carpe commune (Epler *et al.*, 1985). L'action du MIS sur des stades trop précoces peut induire des maturations sans ovulation chez la truite arc-en-ciel (Jalabert *et al.*, 1978). On n'observe peut-être le même phénomène dans les inductions à 28°C, si le pic de MIS intervient trop précocement aux fortes températures par rapport à l'établissement de la réceptivité ovocytaire au MIS.

4.3 conclusion

Pour conclure, il semble y avoir des effets de la température à tous les niveaux de la cascade hormonale d'induction de l'ovulation. Au niveau central, l'effet des températures élevées sur la stimulation gonadotrope par le GnRH est contradictoire : on aurait un effet plutôt positif *in vitro*, et négatif ou nul *in vivo*. En revanche, l'inhibition dopaminergique semble accrue par les fortes températures. Même si l'utilisation d'un antidopaminergique permet d'obtenir des taux de LH similaires pour les poissons maintenus aux deux températures, il serait intéressant de confirmer le degré d'accroissement de l'inhibition dopaminergique par les hautes températures. A 28°C, la variabilité des taux de LH est plus importante, la cinétique d'épuration est accélérée et il semble y avoir une période réfractaire pour l'hypophyse, alors que les taux se maintiennent élevés à 24°C.

Au niveau périphérique (gonades), il y a manifestement des perturbations dans l'établissement de la compétence à la maturation, de la maturation et de l'ovulation :

- au niveau de la réponse aux gonadotropines par la production de MIS (au niveau des récepteurs aux gonadotropines ou de la régulation de la stéroïdogénèse) : on observe des inhibitions de la production de MIS à 28°C malgré des taux de LH plasmatique élevés, et une accélération de la cinétique (synthèse et dégradation),
- au niveau de la réponse ovocytaire au MIS par la maturation : cela pourrait être un problème de cinétique (production de MIS trop précoce ou trop fugace) ou de transduction du signal (voir les essais *in vitro*),
- au niveau de l'ovulation, puisqu'on observe beaucoup d'ovulations partielles alors que les ovocytes ont mûri.

Tous ces facteurs doivent contribuer à la forte inhibition des ovulations à 28°C. Les impacts de la température lors des inductions de ponte semblent donc se situer majoritairement au niveau des ovaires. Il serait intéressant de détailler davantage la cinétique et la régulation thermique des différentes étapes : acquisition de la compétence folliculaire, maturation ovocytaire et ovulation. Manifestement ces différentes étapes pourraient avoir différents optimums thermiques (Epler *et al.*, 1985), et donc être plus ou moins perturbées par les hautes températures. Déterminer la cinétique des différentes étapes pré-maturation à différentes températures (mise en place des capacités de production de MIS, migration de la VG, réceptivité au MIS...) (Kime *et al.*, 1987), permettrait de mieux ajuster les protocoles d'induction. La régulation de l'ovulation est également un aspect que nous n'avons pas pu aborder lors de notre étude mais qui manifestement est également affecté par la température.

Chapitre 3

Influence du régime alimentaire sur la
reproduction

1. Introduction

La carpe herbivore est connue comme étant très majoritairement consommatrice de végétaux frais (au moins après le stade juvénile) (Kilgen et Smitherman, 1971), mais plusieurs manuels d'élevage évoquent l'utilité d'une complémentation de l'alimentation des géniteurs par un aliment concentré pour de meilleures performances reproductrices. En Côte d'Ivoire, les carpes sont élevées soit à faible densité dans des barrages (en général naturellement enherbés) avec des apports limités de végétaux, soit à plus forte densité en étang, où les apports alimentaires sont principalement constitués par des herbes à éléphant (*Pennisetum purpureum*) (Figure 13). Cette graminée fourragère tropicale est largement présente à l'état sauvage en Côte d'Ivoire et est couramment utilisée pour nourrir les carpes herbivores (Hickling, 1960).

La carpe herbivore possède des dents pharyngiennes très développées qui lui permettent de broyer les cellules végétales pour en rendre le contenu digestible. Ce contenu a une très bonne digestibilité (van Dyke et Sutton, 1977), mais ne représente qu'une faible proportion du matériel ingéré. Pour les poissons d'eau douce herbivores, il semble que la consommation de végétaux se traduise par un déficit en énergie plutôt qu'en protéines (Yakupitiyage, 1993), et chez la carpe herbivore la consommation de différents aliments n'est pas liée à l'ingestion protéique (Shireman *et al.*, 1978). Bien que cette espèce soit censée être exclusivement macrophytophage, il est probable qu'elle consomme dans son milieu naturel d'autres types d'organismes, comme des organismes du périphyton*, fixés à la surface des végétaux qu'elle ingère (Shireman et Smith, 1983) ou des insectes (Kilgen et Smitherman, 1971), qui pourraient contribuer de façon qualitative à la ration. Il est donc possible que l'apport de végétaux terrestres induise également des carences par rapport à une alimentation à base de végétaux submergés.

Nous avons fait l'hypothèse que le régime alimentaire à base d'herbes à éléphant pourrait également être une des causes des anomalies des cycles sexuels détectées sur les individus élevés en étangs en Côte d'Ivoire.

L'alimentation a des effets sur plusieurs fonctions physiologiques des poissons, et en particulier sur la reproduction. Les effets sur la reproduction peuvent être directs et/ou dépendants de l'impact de l'alimentation sur la croissance. Les travaux réalisés sur cette thématique comprennent principalement des études "zootechniques" sur l'impact d'un régime particulier, des études descriptives sur les profils endocriniens durant la reproduction et des études "mécanistes" sur certaines régulations endocriniennes par exemple. Il reste cependant difficile de mettre en parallèle les unes et les autres.

Tableau 12 : Effet du régime alimentaire sur certains critères de la reproduction chez différentes espèces de poissons
 (– : diminution ; + : augmentation ; = : pas de modification).

Espèce	Facteur variant entre les régimes comparés	Effet du régime "imitant" sur :					Référence de l'étude
		la fécondité relative ¹	le RGS ²	la taille des ovocytes	l'intervalle inter-pontes	le taux de femelles matures	
Truite <i>Salmo trutta</i>	Taux de rationnement	–		–		–	(Bagenal, 1969)
Haddock <i>M. aeglefinus</i>	Taux de rationnement	–				=	(Hislop <i>et al.</i> , 1978)
Truite <i>Salmo trutta</i>	Taux de rationnement	+	+	–			(Billard et Fremont, 1980)
Silure <i>Clarias gariepinus</i>	Taux de rationnement	+	+	=			(Richter <i>et al.</i> , 1982)
Bar <i>D. labrax</i>	Taux de rationnement	+ ³		–			(Cerde <i>et al.</i> , 1994)
Truite <i>O. mykiss</i>	Taux de rationnement	–		–		–	(Bromage <i>et al.</i> , 1992)
Tilapia <i>O. niloticus</i>	Taux de rationnement	=		=	+		(Gunasekera <i>et al.</i> , 1996)
<i>Gambusia holbrooki</i>	Taux de rationnement	=		=			(Weeks et Meffe, 1996)
Tilapia <i>O. niloticus</i>	Taux de rationnement	+	=	=	+	=	(Siddiqui <i>et al.</i> , 1997)
Hareng <i>Clupea harengus</i>	Taux de rationnement	=		=			(Ma <i>et al.</i> , 1998)
Epinoche <i>G. aculeatus</i>	Taux de rationnement	–		=	+		(Ali et Wootton, 1999)
<i>Tilapia zillii</i>	Taux de rationnement		=	=	=		(Coward et Bromage, 1999)
Turbot <i>S. maximus</i>	Taux de rationnement	=		=			(Bromley <i>et al.</i> , 2000)
Tilapia <i>O. niloticus</i>	Taux de protéines	=			+		(Siddiqui <i>et al.</i> , 1998)
Tilapia <i>O. niloticus</i>	Taux de protéines	+		=		–	(Al Hatheh <i>et al.</i> , 1999)
Truite <i>O. mykiss</i>	Nature des lipides		=	– ⁴			(Corraze <i>et al.</i> , 1993)
Bar <i>D. labrax</i>	Nature des lipides	–					(Cerde <i>et al.</i> , 1995)
Silure <i>Clarias batrachus</i>	Nature des lipides		– ⁴				(Acharia <i>et al.</i> , 2000)
Carpe <i>Catla catla</i>	Nature des lipides	–				–	(Nandi <i>et al.</i> , 2001)
Saumon <i>Salmo salar</i>	Jeûne temporaire					–	(Thorpe <i>et al.</i> , 1990)
Morue <i>Gadus morhua</i>	Jeûne temporaire	=				=	(Karlsen <i>et al.</i> , 1995)

¹ Nombre d'ovocytes ou d'ovules par kg de femelle

² Rapport Gonado-Somatique (poids des gonades / poids du corps)

³ Uniquement en raison d'une saison de reproduction plus longue

⁴ Uniquement à haute température

Le Tableau 12 reprend les résultats principaux de plusieurs études de type zootechnique, étudiant l'impact de différents régimes alimentaires sur les performances de reproduction des poissons. Il apparaît que les effets sont très divers selon les études, et qu'il est difficile de mettre en évidence des tendances générales. Les résultats dépendent manifestement beaucoup des conditions spécifiques dans lesquelles a été menée chaque étude. Il est donc difficile de prévoir la réponse d'une espèce donnée dans un système d'élevage donné à partir des données bibliographiques.

L'objectif de notre étude était d'évaluer les conséquences des pratiques d'alimentation des carpes herbivores en Côte d'Ivoire sur les caractéristiques reproductives en vue d'une reproduction artificielle. Nous avons choisi de comparer l'impact de régimes alimentaires plus ou moins favorables, appliqués à partir du stade juvénile, sur l'entrée en puberté des poissons, sur le déroulement des cycles sexuels et sur les critères de reproduction des femelles (fécondité, poids des ovocytes). Nous avons également évalué l'état des réserves énergétiques des poissons pendant la croissance, qui ont une importance cruciale sur le déclenchement et le déroulement de la puberté chez certaines espèces (Henderson *et al.*, 1996; Silverstein *et al.*, 1997), et le contenu en GnRH du cerveau et de l'hypophyse, qui pourrait également varier selon le régime (Kah *et al.*, 1994) et être un des médiateurs des effets alimentaires sur la reproduction.

Les trois régimes alimentaires comparés ont été :

- un régime "standard" (herbes à éléphant *ad libitum*^{*}),
- un régime "amélioré" (herbes à éléphant *ad libitum* avec une complémentation en aliment composé),
- un régime "limitant" (herbes à éléphant en quantité rationnée).

Nous avons suivi la croissance et le développement sexuel des poissons soumis à ces trois régimes pendant 19 mois (de mars 2001 à octobre 2002).

2. Matériel et méthodes

2.1 les poissons et structures expérimentales

L'essai s'est déroulé dans les étangs de la station piscicole de Gagnoa. Les carpes herbivores utilisées dans cet essai étaient issues d'une reproduction artificielle et nées le 1^{er} août 2000. L'alevinage a eu lieu en étangs fertilisés, les alevins ont été alimentés avec de la farine basse de riz, puis un aliment artificiel en granulés. A l'issue du prégrossissement (à l'âge de 7 mois et demi), les juvéniles ont été répartis en lots dans les étangs d'expérimentation (270 à 370 m²). Pour limiter la

variabilité en poids et donc l'effet potentiel des interactions sociales, les poissons ont été divisés en deux lots par taille, et chaque lot réparti entre les trois régimes alimentaires.

Les régimes alimentaires comparés étaient les suivants :

- herbes à éléphant (*Pennisetum purpureum*) *ad libitum*, complétées avec un aliment composé en granulés pour tilapia (35% de protéine, produit par Ivograin, Abidjan), distribué à raison de 2% de la biomasse de poissons par jour,
- herbes à éléphant *ad libitum* sans apport de granulé,
- herbes à éléphant rationnées (75% de la ration *ad libitum* environ).

Le plan d'expérience comprenait donc 6 étangs (3 régimes x 2 "réplicats"¹⁵).

Les étangs ont été empoissonnés à une densité initiale de 0,17 carpe herbivore/m². Pour éviter une dégradation du milieu d'élevage, des tilapias *Oreochromis niloticus* mâles ont été introduits dans les étangs à la même densité (0,17/m²) avec un carnassier, *Hemichromis fasciatus*, destiné à empêcher la prolifération des tilapias. Quand les plus gros tilapias atteignaient 250 à 300 g (après 6 mois environ), ils étaient remplacés par un nouveau lot de *fingerlings** de 40 à 50 g de poids moyen. Les poissons étaient alimentés 6 jours sur 7, les quantités d'herbes distribuées et les surplus étaient pesés chaque jour. Un suivi hebdomadaire des taux d'oxygène dissous des étangs a été effectué pendant les 11 premiers mois de l'essai : aucune différence significative n'a été observée entre les différents étangs, mais les valeurs étaient extrêmement variables au cours du temps (de 0,1¹⁶ à 7,5 mg/l le matin et de 2,7 à 14,4 mg/l le soir, à 15 cm de profondeur). Un renouvellement permanent de l'eau des étangs a été maintenu à faible débit (de l'ordre de 1% du volume de l'étang par jour) pendant la durée de l'essai afin de limiter dans la mesure du possible des impacts des différences de régime alimentaire sur la qualité de l'eau.

¹⁵ les poissons ayant été répartis par taille, il ne s'agit pas de vrais réplicats, nous précisons donc "réplicats" entre guillemets dans la suite du texte.

¹⁶ les taux d'oxygène sont parfois très bas le matin, particulièrement suite à des précipitations ou par temps nuageux, et les poissons viennent dans ce cas à la surface de l'eau pour accéder à la couche superficielle mieux oxygénée (phénomène de "pipage"). Les carpes herbivores, comme beaucoup de cyprinidés sont résistantes à l'anoxie et supportent des taux d'oxygène dissous inférieurs à 1 mg/l (Billard, 1995). En tout état de cause, aucune mortalité liée directement à une anoxie n'a été observée pendant l'essai.

2.2 le suivi de la croissance, de la puberté et des cycles sexuels

Des pêches de contrôle régulières (toutes les 3 semaines, puis tous les mois) ont été pratiquées pendant toute la durée de l'essai. Les poissons étaient laissés à jeun pendant la nuit précédant la pêche, puis pesés individuellement au gramme près. La croissance a été évaluée par le Gain Moyen Quotidien (Variation de poids individuel / durée de la période, en g/individu/j).

Deux abattages (20% de l'effectif initial à chaque fois) ont été effectués 2 mois et demi puis 6 mois après le début de l'essai. A chaque abattage, les poissons ont été pesés, et l'on a déterminé le rapport gonado-somatique (RGS : poids des gonades ramené au poids du corps) et le rapport hépato-somatique (RHS : poids du foie ramené au poids du corps). Des mesures complémentaires ont été effectuées : lors du premier abattage, on a déterminé les taux plasmatiques d'œstradiol et de testostérone (voir protocoles p. 61). Lors du second abattage, on a déterminé l'état d'engraissement par pesée des graisses périviscérales, ainsi que les niveaux de sGnRH dans le cerveau et l'hypophyse des poissons.

A partir de l'âge de 18 mois et demi, des biopsies régulières à la pipelle de Cornier associées à des prélèvements de sang ont été réalisés sur toutes les femelles pour suivre le déroulement des cycles sexuels. Les stades ovariens ont été déterminés pour les femelles conformément à la procédure décrite p. 63. Le stade sexuel des mâles a également été déterminé : non mature, mature (nageoires pectorales rugueuses), ou spermiant.

L'essai a pris fin au bout de 19 mois, en octobre 2002. Les femelles en fin de vitellogénèse ou surmatures à cette date ont été abattues pour mesure du RGS et des échantillons d'ovaires ont été prélevés et conservés dans une solution de formol à 10% et NaCl à 0,9 %.

Le déroulement de l'essai et des prélèvements est résumé sur la Figure 46.

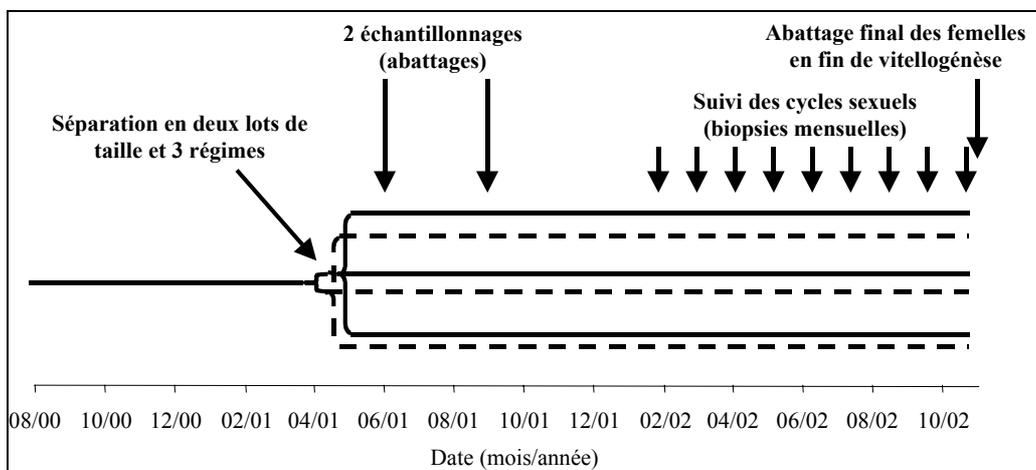


Figure 46. Déroulement de l'essai alimentation et des prélèvements réalisés.

2.3 *la qualité des géniteurs femelles*

La qualité des géniteurs femelles a été évaluée par une induction de ponte chez quelques individus issus des différents régimes, par la mesure du RGS et de la fécondité potentielle lors de l'abattage final à l'issue de l'essai.

L'expérience d'induction de ponte a été menée en août 2002 sur 10 femelles issues de différents étangs (4 femelles nourries aux herbes et granulés, 4 aux herbes *ad libitum* et 2 aux herbes rationnées). L'induction a été réalisée à l'extrait hypophysaire de carpe commune à 3 mg/kg de femelle, en deux injections espacées de 12 heures (10% puis 90% de la dose totale). Les ovulations ont été contrôlées régulièrement à partir de 7 heures après la seconde injection, et les ovules pesés lors de l'ovulation.

La fécondité potentielle des femelles a été déterminée pour les femelles en fin de vitellogénèse lors de l'abattage final : on a déterminé le nombre d'ovocytes en fin de vitellogénèse dans un échantillon de 0,3 à 0,4 g d'ovaire. Le poids moyen des ovocytes en fin de vitellogénèse a été déterminé par pesée de 20 ovocytes par femelle à 0,01 mg près.

2.4 *le dosage du GnRH*

2.4.1 l'extraction

Lors de l'abattage, les hypophyses et le télencéphale (partie médiane du cerveau) ont été prélevés et congelés à -20°C . L'extraction du GnRH a été poursuivie au laboratoire (Kah *et al.*, 1994) : les prélèvements ont été broyés (par sonication pour les hypophyses et broyage à l'Ultraturax pour les cerveaux) pendant 30 s dans l'acide acétique 2N (250 μl par hypophyse et 1,5 ml par cerveau). Les suspensions obtenues ont été ensuite chauffées 10 min à 80°C , avant une ultracentrifugation 20 min à 12000 g à 4°C . Les surnageants ont été prélevés, congelés à -70°C puis lyophilisés. Après lyophilisation, le résidu a été conservé à -20°C jusqu'au dosage.

Pour les cerveaux, la première extraction a été suivie d'une seconde dans les mêmes conditions et les deux surnageants regroupés avant lyophilisation.

2.4.2 le dosage

Le protocole utilisé est un dosage immuno-enzymatique développé pour le sGnRH (Kah *et al.*, 1994). La quantité de GnRH dosée a été ramenée au contenu protéique de l'échantillon, dosé par un kit BCA (Pierce) étalonné avec une courbe standard de sérum-albumine bovine (Sigma).

2.5 les analyses statistiques

Les résultats des abattages ont été analysés par MANOVA, intégrant les facteurs régime alimentaire, et le cas échéant la taille initiale, le sexe, et/ou le poids individuel comme covariable. Les taux de femelles aux différents stades ont été comparés par test du Chi².

3. Résultats

3.1 la croissance et la consommation alimentaire

Les courbes de croissance des différents lots sont reprises sur la Figure 47.

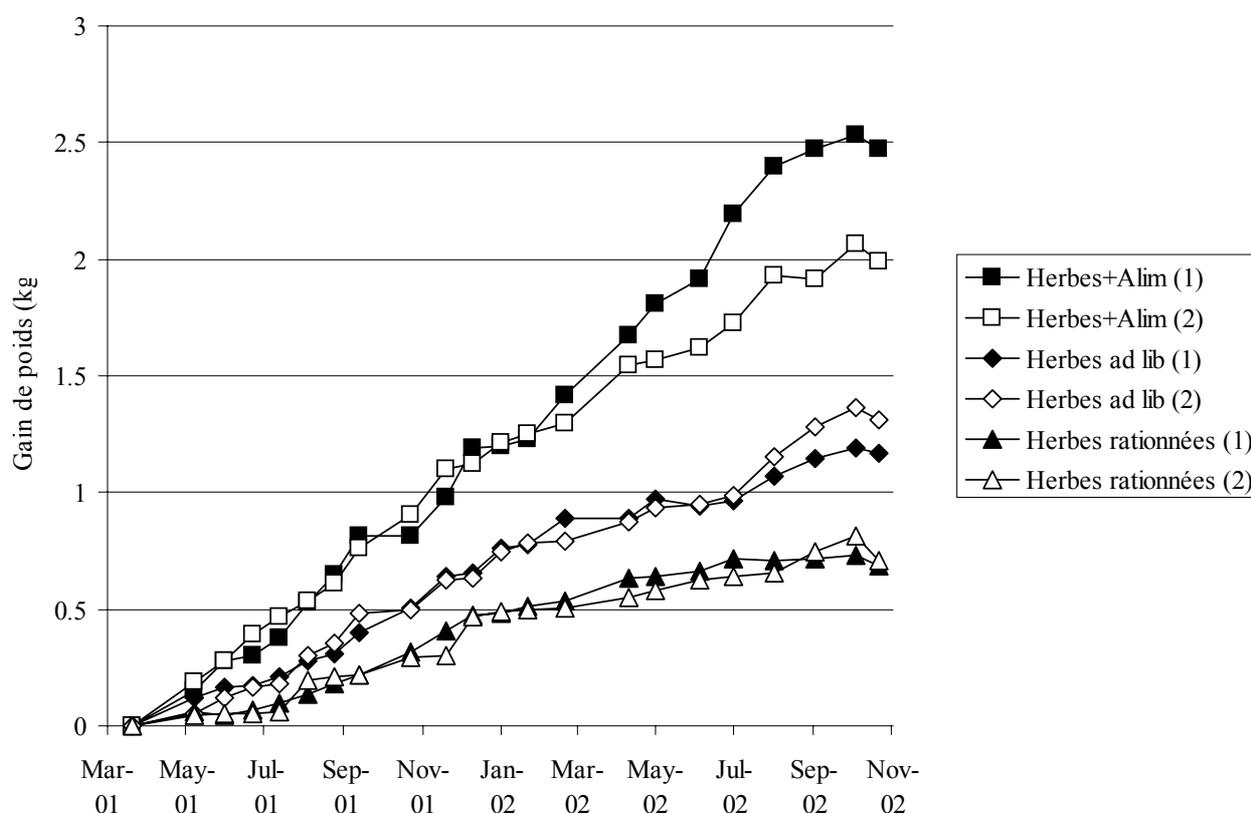


Figure 47. Gain de poids dans les 6 étangs de l'essai sur les régimes alimentaires. Le réplicat (1) correspond aux poissons de petite taille initiale (poids moyen 158 g) et le réplicat (2) aux poissons de grande taille initiale (poids moyen 326 g).

Les courbes de croissance ont été quasiment linéaires. La chute de poids à la fin de l'essai est due à des problèmes d'approvisionnement en herbes pendant deux semaines. Elle est significative et a concerné tous les lots, mais ne s'est pas traduite par une modification des stades sexuels. Les croissances moyennes figurent au Tableau 13. Aucun dimorphisme sexuel de la croissance n'est apparu.

Tableau 13 : Gains moyens quotidiens (en g/individu/j) dans les différents étangs.

	Poissons de petite taille (Pds moyen initial : 158±46 g)	Poissons de grande taille (Pds moyen initial : 326±62 g)
Herbes + aliment	4,24±0,64 ^a	3,45±0,58 ^b
Herbes <i>ad libitum</i>	2,03±0,41 ^c	2,26±0,41 ^c
Herbes rationnées	1,21±0,47 ^d	1,21±0,36 ^d

Les valeurs suivies de lettres identiques ne sont pas significativement différentes.

L'analyse de variance multivariable a donné des effets significatifs pour les régimes alimentaires et les "réplicats". La comparaison des moyennes par le test de Scheffé a montré qu'il n'y avait pas de différence entre "réplicats" pour les régimes Herbes *ad libitum* et Herbes rationnées. En revanche, les "réplicats" sont significativement différents pour le régime Herbes+aliment. La croissance plus rapide (à partir de février 2002) des poissons initialement plus petits pourrait s'expliquer par une densité plus faible (Shelton *et al.*, 1981) dans cet étang du fait de la mortalité de quelques individus suite à des manipulations.

La variabilité des poids individuels au sein d'un même étang a été estimée par le coefficient de variation (rapport de l'écart-type sur la moyenne). Entre le début et la fin de l'essai, la variabilité a augmenté dans les étangs rationnés, légèrement diminué dans les étangs alimentés en herbes *ad libitum*, et fortement diminué dans les étangs avec aliment.

Les herbes distribuées et retirées des étangs (rejets) ont été pesées chaque jour pendant la durée des essais, ce qui a permis d'évaluer la consommation de végétaux (en revanche, nous n'avons pas pu évaluer la consommation d'aliments composés). Les principaux résultats sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Caractéristiques de la consommation de végétaux selon le régime alimentaire.

Régime	Herbes + aliment		Herbes <i>ad libitum</i>		Herbes rationnées	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Taux de consommation des herbes distribuées	26%	28%	30%	32%	43%	44%
Taux d'ingestion journalier : consommation / biomasse	10%	9%	14%	14%	11%	10%
Taux d'ingestion relatif : (% du taux <i>ad libitum</i>)	70%	66%	(100%)	(100%)	78%	78%
Indice de conversion*	19	19	33	28	28	27

Les "réplicats" (1) correspondent aux poissons initialement de petite taille, et (2) aux poissons initialement de grande taille.

Les poissons des étangs alimentés *ad libitum* ont consommé 26 à 32% des herbes distribuées, tandis que dans les étangs rationnés plus de 40% des quantités distribuées ont été consommées (correspondant à la quantité maximale consommable sur le *Pennisetum*, le reste étant composé de parties trop dures).

Pendant les huit premiers mois, les taux d'ingestion journaliers ont augmenté plus vite que la biomasse : la quantité ingérée par kg de poids est passée de 8% en début d'essai pour atteindre 15% à 32% (selon les régimes) début décembre 2001. Par la suite, la quantité d'herbe ingérée *ad libitum* s'est ralentie (en l'absence de limitation par les quantités distribuées), ce qui s'est traduit par une baisse lente de l'ingestion rapportée à la biomasse, mais sans impact sur les taux de croissance. En moyenne sur la durée de l'essai, le taux moyen d'ingestion *ad libitum* a été de 14% de la biomasse par jour. Les poissons rationnés ont consommé 78% de la quantité *ad libitum* et les poissons nourris à l'aliment 66 à 70% de la quantité *ad libitum*. Les indices de consommation globaux (quantité d'herbes ingérées par kg de gain de poids) ont été de 19 pour les poissons nourris à l'aliment, 30 pour les poissons alimentés *ad libitum* et 27 pour les poissons rationnés.

3.2 la puberté

3.2.1 les données collectées lors des abattages avant la puberté

Lors du premier abattage, à l'âge de 10 mois (soit 2 mois et demi après le démarrage de l'essai), tous les individus échantillonnés (20% des effectifs, soit 8 à 11 individus par étang) étaient immatures.

Seul le RHS diffère significativement selon le régime alimentaire (Tableau 15). Ni la taille initiale (effet "réplicat"), ni le poids individuel n'ont d'effet sur les paramètres mesurés.

Tableau 15 : Effet du régime alimentaire sur le rapport hépato-somatique des poissons à l'âge de 10 mois (les "réplicats" n'étant pas différents, les données sont regroupées par régime).

	RHS (%)
Herbes+aliment	1,7 ± 0,2 ^a
Herbes <i>ad libitum</i>	1,2 ± 0,2 ^b
Herbes rationnées	1,1 ± 0,2 ^c

Les valeurs suivies de lettres identiques ne sont pas significativement différentes.

Le RGS et l'œstradiol plasmatique diffèrent significativement selon le sexe : les femelles ont un RGS moyen de $0,30 \pm 0,09$ % et un taux d'œstradiol plasmatique de $0,28 \pm 0,28$ ng/ml, contre $0,03 \pm 0,03$ % et $0,18 \pm 0,10$ ng/ml respectivement pour les mâles.

Lors du second abattage (à l'âge de 13,5 mois), tous les individus échantillonnés étaient encore immatures. Le régime alimentaire n'a pas d'effet significatif sur les paramètres morphologiques mesurés (RGS, RHS et graisses périviscérales), ni sur les contenus en GnRH du cerveau (Figure 48) et de l'hypophyse (Figure 49). Il y a des effets de la taille initiale et des interactions régime et taille sur les taux de GnRH dans le cerveau, mais aucun schéma cohérent ne peut être dégagé de ces données. La quantité de graisses périviscérales est plus élevée dans les régimes plus riches, mais cette relation peut être expliquée uniquement par les écarts de poids moyens, et ne dépend pas du régime. Le RGS diffère selon le sexe, les femelles ayant un RGS de $0,26 \pm 0,11$ % et les mâles de $0,05 \pm 0,01$ %. Le taux moyen de GnRH dans le cerveau était de $0,88$ µg/g protéines et dans l'hypophyse $3,37$ µg/g protéines. Le RHS moyen était de $1,2 \pm 0,2$ %.

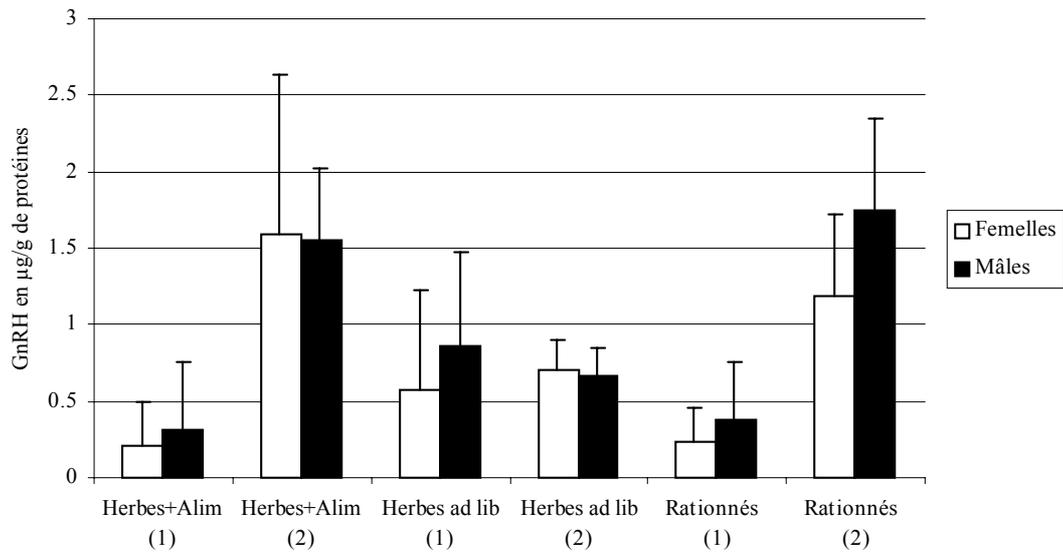


Figure 48. Contenu en GnRH des cerveaux selon le régime alimentaire (âge 13,5 mois) en µg de GnRH par g de protéine (moyenne ± écart-type).

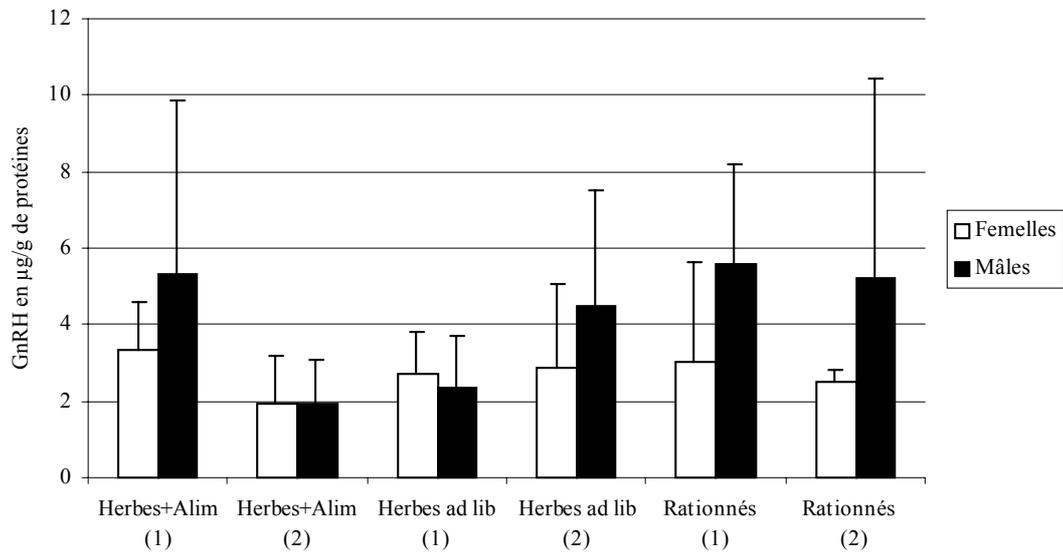


Figure 49. Contenu en GnRH des hypophyses selon le régime alimentaire (âge 13,5 mois) en µg de GnRH par g de protéine (moyenne ± écart-type).

3.2.2 l'apparition de la puberté

Les biopsies régulières ont débuté en février 2002, quand les poissons étaient âgés de 18 mois et demi. A cette date, quelques femelles étaient déjà en fin de vitellogénèse dans les étangs alimentés avec des aliments composés, ainsi que des mâles spermiant. Aucune femelle n'avait débuté la vitellogénèse dans les autres étangs. Le premier critère étudié est la date d'apparition des femelles en fin de vitellogénèse dans les différents étangs (Figure 50).

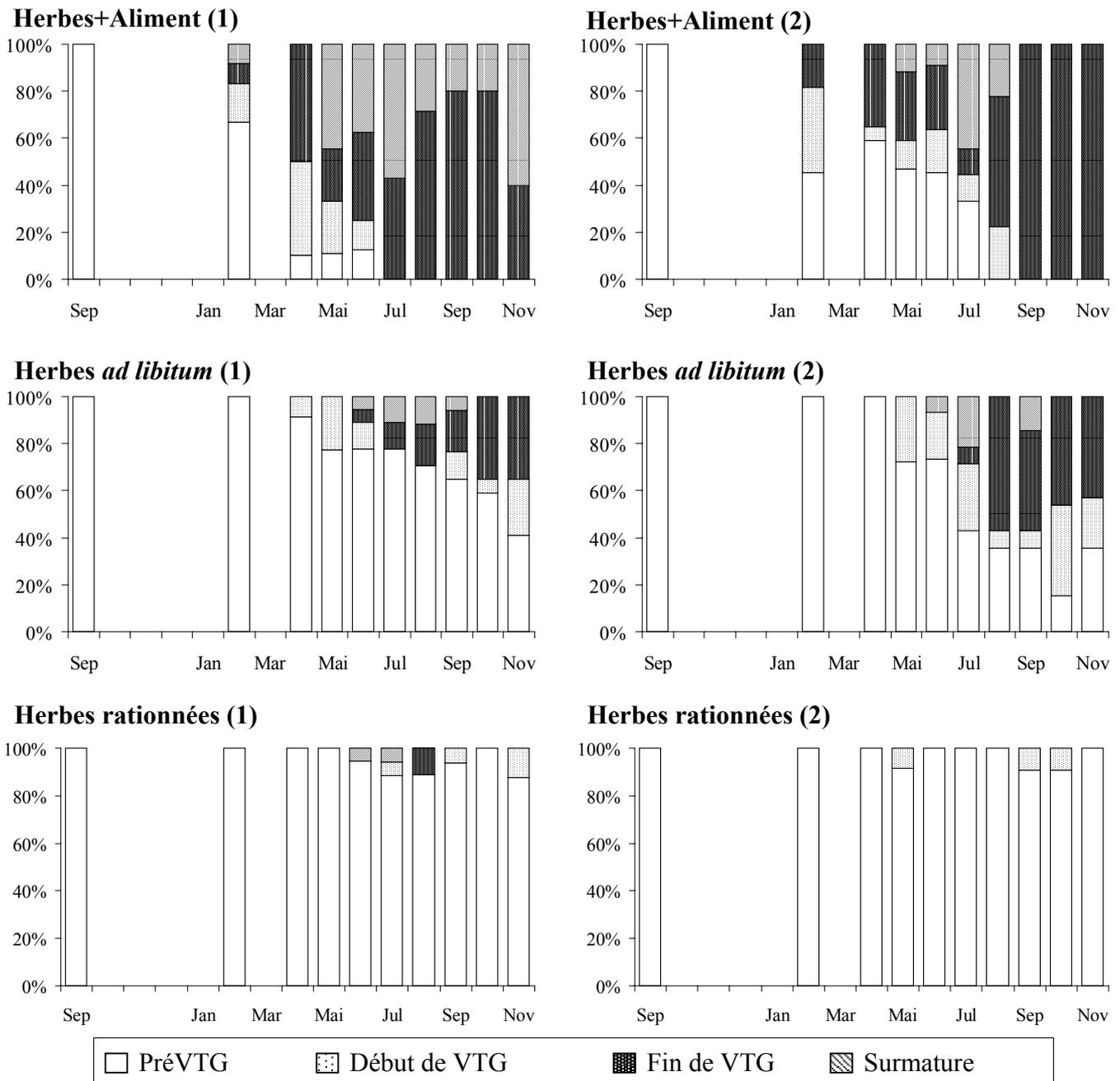


Figure 50. Proportion des différents stades sexuels femelles dans les étangs au cours du temps (VTG : vitellogénèse). Les graphes de gauche (1) sont les étangs initialement empoisonnés avec les individus de petite taille, les graphes de droite (2) les étangs empoisonnés avec les individus de grande taille.

L'apparition des premières femelles en fin de vitellogénèse est plus précoce dans les étangs avec de l'aliment composé. Aucune biopsie n'ayant eu lieu entre septembre 2001 et février 2002, il n'est pas possible de déterminer précisément la date d'apparition des premières femelles matures dans ces étangs, mais il est sûr que l'avance liée à l'aliment composé est d'au moins 105 jours par rapport aux régimes herbacés. Dans les étangs rationnés, les résultats diffèrent : dans un étang des femelles atteignent la fin de vitellogénèse en même temps que les poissons nourris *ad libitum*, tandis que dans l'autre étang on observe un retard important : aucune femelle en fin de vitellogénèse n'a été observée à la fin de l'essai, soit 8 mois après les étangs les plus précoces.

Pour les mâles (Figure 51), la tendance est la même : les mâles spermiant apparaissent d'abord dans les étangs les mieux alimentés, mais la variabilité est plus importante entre les deux étangs alimentés aux herbes : un des deux est très proche des étangs complémentés en granulés, tandis que l'autre est très retardé.

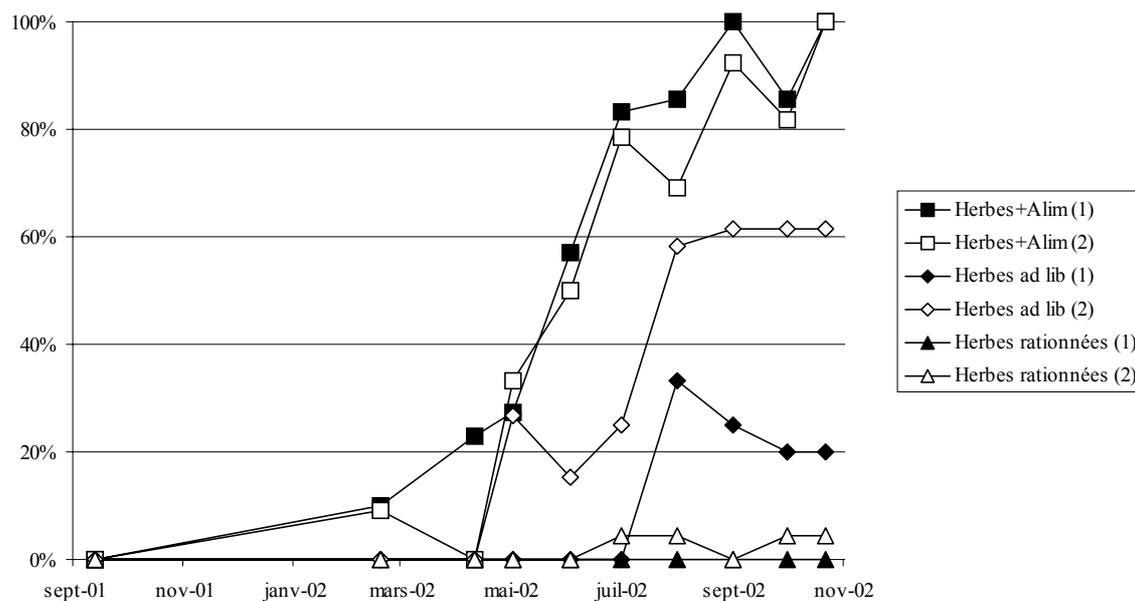


Figure 51. Proportion de mâles spermiant dans les différents étangs en fonction du temps. Les courbes marquées (1) sont les étangs initialement empoisonnés avec les individus de petite taille, les courbes (2) les étangs empoisonnés avec les individus de grande taille.

Le second critère est le poids auquel les poissons atteignent la puberté (Figure 52).

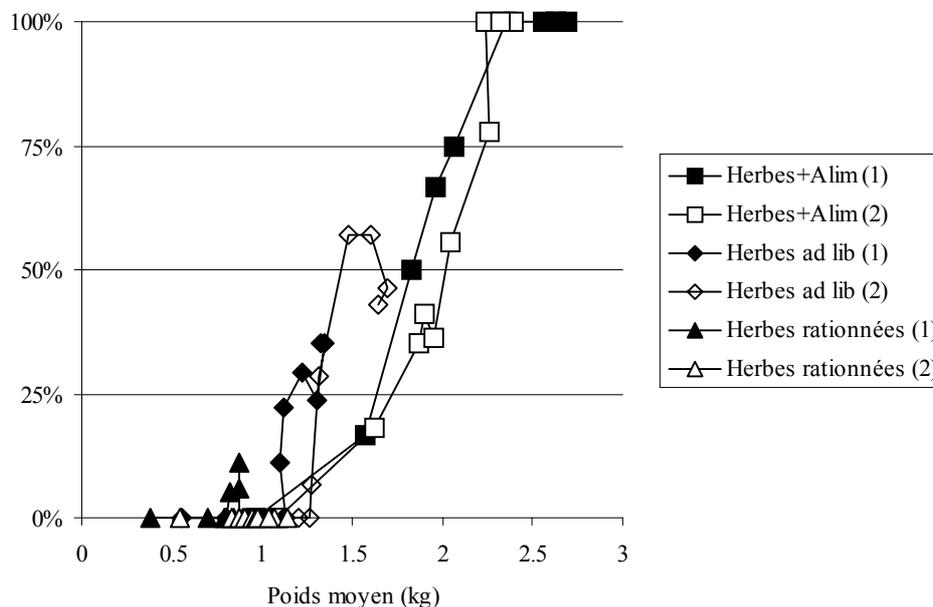


Figure 52. Proportion de femelles pubères en fonction du poids moyen des poissons dans les différents étangs. Les courbes marquées (1) sont les étangs initialement empoisonnés avec les individus de petite taille, les courbes (2) les étangs empoisonnés avec les individus de grande taille.

Pour les deux sexes, le poids est corrélé à la qualité de l'alimentation : les poissons les mieux alimentés sont pubères à un poids plus élevé que les autres. Les plus petites femelles matures ont été observées entre 1 et 1,1 kg dans les étangs alimentés à l'herbe (rationnés ou non), et 1,5 kg dans les étangs alimentés aux herbes et granulé (mais il faut rappeler que nous n'avons pas observé le début des cycles dans ces étangs). Les données sont là également similaires pour les mâles spermants (Figure 53), mais des mâles matures non spermants aux nageoires pectorales rugueuses ont été identifiés dès 500 g.

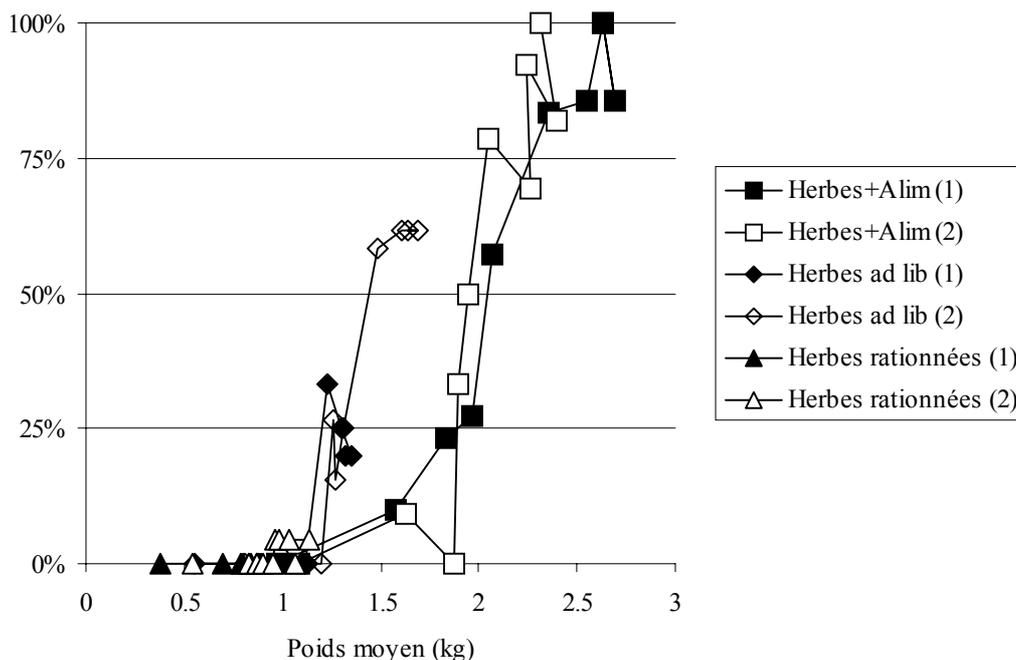


Figure 53. Proportion de mâles spermants en fonction du poids moyen des poissons dans les différents étangs. Les courbes marquées (1) sont les étangs initialement empoisonnés avec les individus de petite taille, les courbes (2) les étangs empoisonnés avec les individus de grande taille.

Nous avons également étudié le poids pour lequel au moins 50% des poissons étaient matures (Tableau 16).

Tableau 16 : Poids moyen (en kg) pour lequel au moins 50% des individus sont matures, selon l'étang (dans les autres étangs, le taux de poissons matures n'a jamais atteint 50%).

Régime	Femelles	Mâles
Herbes + aliment (1)	1,8 ± 0,2 kg ^b	2,2 ± 0,3 kg ^a
Herbes + aliment (2)	2,1 ± 0,2 kg ^a	1,9 ± 0,2 kg ^b
Herbes ad libitum (2)	1,5 ± 0,2 kg ^c	1,4 ± 0,2 kg ^c

Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes. Les "réplicats" (1) correspondent aux poissons initialement de petite taille, et (2) aux poissons initialement de grande taille.

On observe que les poissons sont matures à un poids inférieur dans l'étang alimenté uniquement aux herbes, mais les données des deux étangs alimentés aux herbes et aliments diffèrent : dans un des étangs les mâles mûrent à un poids inférieur aux femelles, et c'est l'opposé dans l'autre étang. Au

sein d'un même étang, il n'y a aucune corrélation entre le poids individuel et le stade sexuel : ce ne sont pas les plus grosses femelles qui mûrissent en premier lieu, ni celles qui ont eu la meilleure croissance pondérale.

Le troisième critère qui diffère significativement entre les régimes est la proportion de femelles qui ont débuté une vitellogénèse pendant la durée de l'essai : elles sont 96% dans les étangs complétés à l'aliment, 72% dans les étangs "herbes *ad libitum*" et 19% dans les étangs rationnés (données regroupées par régime, car il n'y a pas de différence significative entre "réplicats").

3.3 *les caractéristiques des stades sexuels*

3.3.1 la vitellogénine plasmatique

La vitellogénine plasmatique a été dosée chez 130 femelles représentant les différents stades sexuels (prévitellogénèse, début de vitellogénèse, fin de vitellogénèse et surmature) pour chacun des trois régimes. A stade donné, aucune différence entre régimes n'a été identifiée.

3.3.2 le déroulement des cycles

La principale différence observée entre les régimes est le taux maximal de femelles en fin de vitellogénèse (Figure 52) : on atteint 80% à 100% pour le régime complété à l'aliment, tandis que les étangs nourris uniquement avec des herbes ne dépassent pas 40 et 60%. La situation est identique pour les mâles (Figure 53). Deux femelles en fin de vitellogénèse et plusieurs en début de vitellogénèse ont été observées dans les étangs rationnés. Les deux femelles en fin de vitellogénèse de ce régime qui ont subi une induction de ponte n'ont pas repris leur vitellogénèse, à la différence de celles des autres régimes. Dans les deux étangs complétés à l'aliment, le suivi individuel des femelles met en évidence une oscillation des stades sexuels : les femelles en fin de vitellogénèse deviennent surmatures, puis atteignent de nouveau le stade de fin de vitellogénèse, etc. Ce phénomène se retrouve au niveau de la population (voir Figure 50). Dans trois étangs, on observe une augmentation du nombre de femelles en fin de vitellogénèse au mois d'août, qui est le mois le plus frais (voir Figure 32).

A part cette absence de reprise de cycle dans les étangs rationnés, il n'est pas possible de mettre en évidence des différences entre les régimes : la variabilité des cycles est plus élevée entre individus au sein d'un même étang qu'entre deux étangs différents, et on a observé de nombreux cycles atypiques dans tous les étangs. Sur les femelles qui ont débuté la vitellogénèse, on observe des taux similaires d'anomalies des cycles (blocages en début de vitellogénèse, faible recrutement en fin de

vitellogénèse), quel que soit le régime : 50% avec les aliments, 65% avec les herbes *ad libitum*, 50% chez les femelles rationnées (pas de différence significative selon le régime).

Les différences de taux de femelles en fin de vitellogénèse sont donc principalement liées au nombre de femelles qui débutent leur vitellogénèse, le déroulement du cycle étant similaire selon les régimes.

3.4 la qualité des géniteurs femelles

3.4.1 la réponse à l'induction de ponte

Les effectifs sont trop faibles pour tirer des conclusions valides statistiquement, mais il n'y a apparemment pas d'inhibition totale des ovulations pour un régime en particulier (Tableau 17). De la même façon, le poids d'ovules récoltés par kg de femelle semble plus élevé chez les femelles rationnées, mais il n'est pas possible de distinguer les effets respectifs du poids individuel et du régime.

Tableau 17 : Régime alimentaire et réponse à l'induction : taux d'ovulation (nombre de femelles ovulées/nombre de femelles induites), poids moyen des femelles induites issues des différents régimes alimentaires, et poids des ovules récoltés/kg de femelle pour les ovulations complètes (2 par régime).

Régime	Taux d'ovulation	Poids moyen des femelles	g d'ovules/kg de femelle
Herbes + aliment	2 / 4	2,4 kg	63 ; 95
Herbes <i>ad libitum</i>	3 / 4 (dont 1 partielle)	1,7 kg	73 ; 90
Herbes rationnées	2 / 2	1,1 kg	96 ; 142

3.4.2 les caractéristiques des gonades

Le RGS et la fécondité potentielle n'ont été évalués que pour les régimes herbes *ad libitum* et herbes + granulé (il n'y avait pas de femelle en fin de vitellogénèse pour le troisième régime à la fin de l'essai). On n'observe aucun effet du régime ou du poids individuel sur le RGS et la fécondité potentielle (Figure 54, A et B). Le RGS moyen des femelles en fin de vitellogénèse ($n=18$) est de $13,5 \pm 3,6\%$, et la fécondité potentielle de $158\,000 \pm 34\,000$ ovocytes/kg de femelle. Les femelles surmatures ont en revanche des RGS plus faibles ($6,3 \pm 0,7\%$, $n=3$).

De même, l'analyse de variance ne met en évidence aucun effet du régime alimentaire ni du poids final sur la taille des ovocytes en fin de vitellogénèse (Figure 54, C). En revanche, on observe un

effet du poids initial des poissons (les poissons qui avaient un faible poids initial ont des ovocytes plus petits).

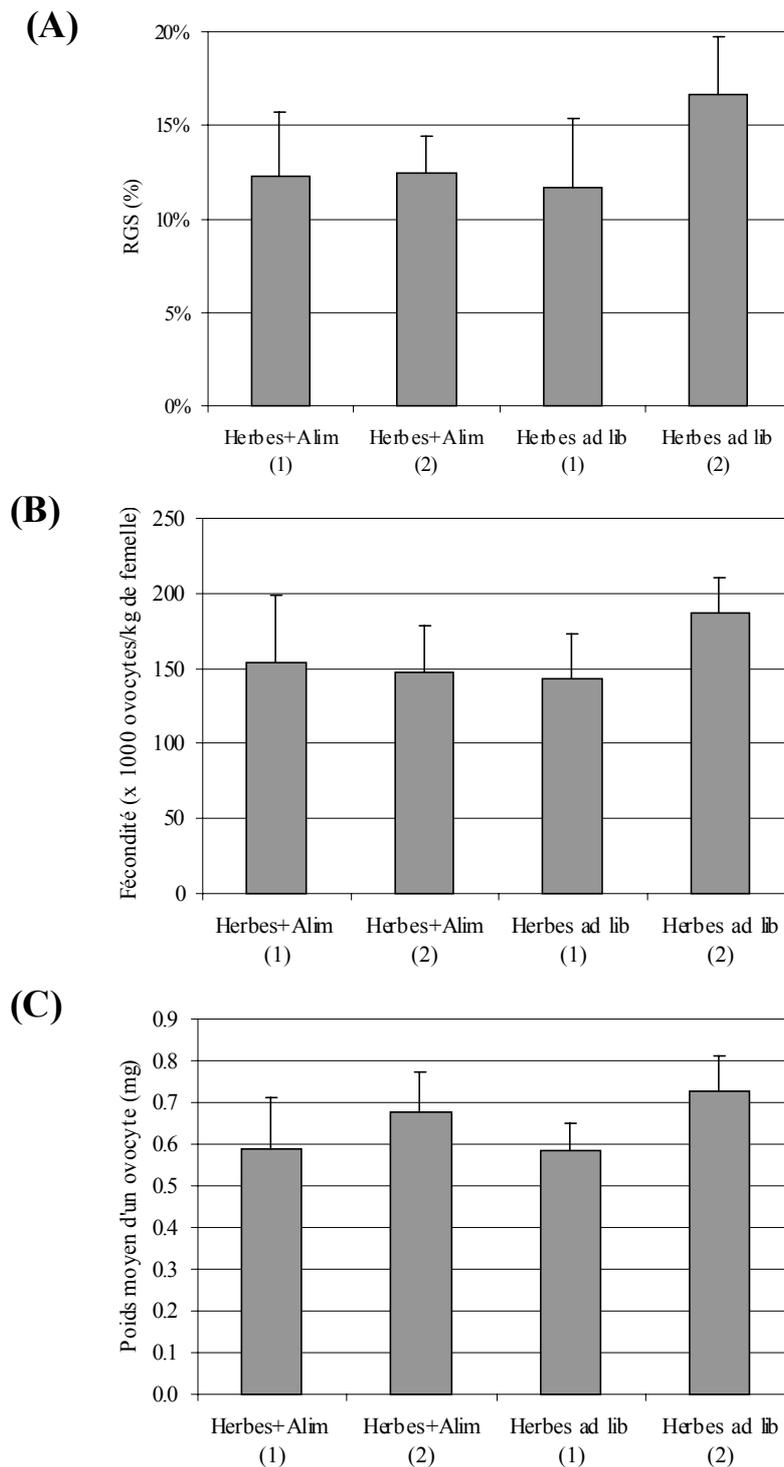


Figure 54. Caractéristiques des femelles en fin de vitellogénèse selon le régime alimentaire : Rapport Gonado-Somatique (RGS, graphe A), fécondité relative (B) et poids moyen des ovocytes (C) Toutes les valeurs sont indiquées comme moyenne \pm écart-type. Les "réplicats" marqués (1) sont les étangs initialement empoisonnés avec les individus de petite taille, et (2) les étangs empoisonnés avec les individus de grande taille.

4. Discussion

4.1 sur la consommation alimentaire et la croissance

La faible digestibilité des végétaux pour la carpe herbivore explique les forts taux d'ingestion (ingestion *ad libitum* de 14% du poids par jour en moyenne, avec des pointes à plus de 30%) et la faible efficacité alimentaire (Indice de conversion de 30 environ) observés dans notre essai, qui sont caractéristiques de cette espèce. Les températures élevées entraînent chez cette espèce une forte augmentation de l'ingestion et également (dans une moindre mesure) de l'indice de conversion (Cai et Curtis, 1990). Des *fingerlings* de carpe herbivore alimentés à la laitue consomment la même quantité de protéines mais sont déficitaires en énergie par rapport à ceux consommant des aliments granulés (Carter *et al.*, 1993). Dans le cas d'une alimentation à base de végétaux, les facteurs limitants peuvent être la capacité d'ingestion et/ou des problèmes liés à la dégradation du milieu d'élevage par de grandes quantités de végétaux déversés dans les étangs (Yakupitiyage, 1993). Les aliments composés peuvent être à la fois une source de glucides facilement assimilables, mais aussi de protéines et peut-être d'autres constituants comme des acides gras polyinsaturés issus de la farine de poisson dont l'effet sur la reproduction est avéré chez plusieurs espèces (Izquierdo *et al.*, 2001). Toutefois, la carpe herbivore possède des capacités d'élongation et de désaturation des acides gras et la composition de ses lipides corporels paraît assez indépendante de la ration alimentaire (Cai et Curtis, 1989). Les facteurs explicatifs potentiels des différences observées dans cet essai sont donc multiples.

La complémentation en aliment composé augmente nettement la croissance des poissons (le gain moyen quotidien est presque multiplié par deux par rapport au régime strictement herbivore). D'autre part, le rationnement, même faible, des poissons se traduit par une baisse notable de la croissance : avec une baisse de la ration de 22%, le gain de biomasse est inférieur de 40 à 45% à celui des poissons nourris *ad libitum*, mais les indices de consommation sont identiques entre poissons rationnés et nourris *ad libitum*. Les indices de consommation sont de l'ordre de 30, meilleurs que ceux relevés en Malaisie (I.C. = 48) avec la même source alimentaire (Hickling, 1960) et dans des conditions climatiques proches. Cette différence peut être due à l'origine génétique des poissons ou à d'autres différences dans la conduite de l'élevage. La consommation d'aliment composé (2% de la biomasse par jour) a entraîné par substitution une baisse de 30 à 35% de la quantité de végétaux consommés. Toutefois, il est possible que les tilapias élevés en polyculture dans nos essais aient consommé une partie de l'aliment distribué, ce qui est conforté par le fait que l'indice de conversion apparent de l'aliment dans nos essais est de 5 à 10 (en supposant un indice de conversion des végétaux de 30), ce qui est élevé, même si la carpe herbivore n'a pas de

bonnes capacités d'utilisation des aliments composés (Bardach *et al.*, 1972). Les données publiées pour les indices de conversion d'aliments composés chez cette espèce sont comprises entre 2 et 5 (Shireman *et al.*, 1978; Cai et Curtis, 1989; Cai et Curtis, 1990).

Cependant, même les meilleures croissances observées nos étangs sont inférieures au moins de moitié aux croissances observées en élevage extensif (étangs de barrage). Ceci peut être dû à plusieurs phénomènes : manifestement les *Pennisetum purpureum* distribuées dans notre essai pour des raisons de disponibilité sont moins favorables que d'autres végétaux, comme *Hydrilla verticillata* pour la croissance de la carpe herbivore (Tan, 1970) ; la qualité de l'eau (oxygène dissous, sels minéraux) dans les petits étangs est peut-être limitante : des taux d'oxygène inférieurs à 4 mg/ml réduisent la consommation alimentaire (Shireman *et al.*, 1977) ; l'apport de végétaux terrestres serait moins favorable que la consommation de végétaux submergés sur lesquels peut pousser du périphyton ; la forte densité des poissons dans notre essai pourrait d'autre part entraîner une compétition entre individus pour les ressources alimentaires (Shelton *et al.*, 1981). L'augmentation de la variabilité des poids moyens dans les étangs rationnés est un argument en faveur d'une probable compétition alimentaire (Post et McQueen, 1994).

Au début de l'essai, le régime alimentaire a induit des différences de RHS entre les poissons, le RHS étant un indicateur des réserves énergétiques facilement mobilisables. Cette différence tendrait à indiquer que l'apport d'aliment augmente le contenu énergétique du régime. En revanche, au bout de six mois, nos mesures des réserves énergétiques facilement mobilisables (par le RHS) ou stockées à plus long terme (par les graisses périviscérales) n'ont mis en évidence aucune différence selon le régime. Le poids relatif des graisses périviscérales était proportionnel au poids individuel quel que soit le régime, ce qui indique que les poissons les plus gros sont également ceux qui ont le plus de réserves lipidiques. Cette absence de différence pourrait être expliquée par le fait que nos régimes, en dépit des écarts induits au niveau de la croissance, n'étaient pas suffisamment distincts pour modifier sensiblement la répartition des ressources énergétiques des poissons.

Cet essai a donc montré que, par rapport au régime herbes *ad libitum*, une faible diminution de taux de rationnement a entraîné une baisse notable de la croissance, et qu'une supplémentation en aliment a presque doublé la croissance. Cependant, les différents régimes n'ont pas modifié notablement les réserves énergétiques des poissons, et les performances de croissance sont nettement inférieures à celle observées en conditions extensives.

4.2 sur la puberté et le déroulement des cycles

Les effets de l'alimentation sur la puberté et la reproduction sont potentiellement très nombreux, et peuvent passer par différentes voies : via l'action d'hormones liées au métabolisme sur l'axe

reproducteur, au niveau central ou périphérique, via l'influence de la croissance (Le Bail, 1988) ou via la constitution de réserves énergétiques (Thorpe *et al.*, 1990; Silverstein *et al.*, 1997; Dufour *et al.*, 2000). Parmi les substances liées au métabolisme de l'alimentation, de la croissance ou des réserves énergétiques, plusieurs ont un effet démontré sur la reproduction chez les poissons, comme la GH (*Growth Hormone*, hormone de croissance) (Le Gac *et al.*, 1993; Degani *et al.*, 1996; Gomez *et al.*, 1999b), les IGF (*Insulin-like Growth Factor*) (Maestro *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998; Weil *et al.*, 1999), le neuropeptide Y (Breton *et al.*, 1991), la leptine (Peyon *et al.*, 2001; Weil *et al.*, 2003) ou l'insuline (Dufour *et al.*, 2000). L'analyse des impacts de différents régimes alimentaires sur la reproduction passe donc par des hypothèses sur l'impact des régimes comparés sur la croissance et les hormones liées à l'axe somatotrope, puis sur l'impact de ces substances sur l'axe reproducteur. Réciproquement, l'axe reproducteur peut avoir des impacts sur les hormones somatotropes (Le Gac *et al.*, 1993), que nous ne détaillerons pas ici.

Le statut alimentaire et le régime alimentaire régulent l'axe somatotrope, dont les principaux composants sont la GH, sécrétée par l'hypophyse et les IGF, produits dans de nombreux tissus. La croissance est régulée principalement par l'IGF-I circulant, sécrété par le foie sous l'action de la GH. La libération de GH est inhibée par l'IGF-I (Blaise *et al.*, 1995; Weil *et al.*, 1999). Chez les poissons, un meilleur niveau de rationnement augmente les niveaux circulants d'IGF-I et diminue les niveaux circulants de GH (Perez-Sanchez et Bail, 1999; Pierce *et al.*, 2001). Le taux de protéines du régime influence aussi ces taux chez la daurade *Sparus aurata* (Perez-Sanchez *et al.*, 1995) et le taux de GH circulante chez la carpe (Fine *et al.*, 1996). La croissance est également positivement corrélée aux niveaux circulants d'IGF-I et négativement aux taux circulants de GH (Perez-Sanchez *et al.*, 1995; Toguyeni *et al.*, 1996). Toutefois, les IGF semblent répondre plus systématiquement aux modifications de régime ou de croissance que la GH, puisque certains auteurs n'observent pas de modification des taux de GH par les taux de rationnement (Valente *et al.*, 2003), ou une augmentation seulement temporaire suivant une baisse de la ration (Pierce *et al.*, 2001). De même, la GH n'est pas toujours corrélée au taux de croissance (Marchant et Peter, 1986). Les niveaux d'IGF-I circulant sont également augmentés par la température (entre 2,5 et 10°C) chez le saumon coho (Larsen *et al.*, 2001), alors qu'aucun effet thermique n'est mis en évidence sur la GH chez la carpe commune entre 17°C et 26°C (Fine *et al.*, 1996).

Les profils de GH plasmatique chez la carpe commune sont constants pendant la vitellogénèse, et diminuent fortement en fin de vitellogénèse (Degani *et al.*, 1996), et chez la truite arc-en-ciel les données sont divergentes : on observe soit une baisse régulière en cours de vitellogénèse (Gomez *et al.*, 1999a), soit une hausse (Holloway *et al.*, 1999). Toutefois, les taux rapportés par ces derniers auteurs sont très élevés (65 ng/ml) et les stades sexuels peu définis, ce qui remet en cause la validité

de leurs données. Chez les deux espèces, le contenu hypophysaire en GH augmente régulièrement au cours du cycle. Les profils plasmatiques des IGF chez la truite arc-en-ciel sont marqués par de grandes variations interindividuelles, mais tendent à augmenter entre le stade immature et les stades de gamétogénèse (Le Gac *et al.*, 2000).

Au niveau des gonades, la GH stimule la production de stéroïdes sous l'action des gonadotropines chez la carpe commune *in vitro* (Van der Kraak *et al.*, 1990). L'IGF-I a des effets sur les cellules hypophysaires gonadotropes : il augmente la sensibilité au GnRH *in vitro* chez la truite arc-en-ciel (Weil *et al.*, 1999), et augmente la sécrétion et la synthèse basales de LH chez l'anguille *Anguilla anguilla* (Huang *et al.*, 1998). Il a également des effets stimulants au niveau gonadique (Le Gac *et al.*, 1993; Maestro *et al.*, 1997; Gomez *et al.*, 1999a). L'effet stimulant de la leptine sur les sécrétions gonadotropes ne semble être effectif qu'après le début de la gamétogénèse chez la truite arc-en-ciel (Weil *et al.*, 2003). Globalement, les hormones de l'axe somatotrope semblent plutôt moduler les effets des hormones de la reproduction qu'avoir des effets propres sur l'activité basale des différents organes de l'axe reproducteur. Une augmentation des niveaux plasmatiques de LH par le jeûne a été démontrée chez le carassin femelle, mais sans augmentation des niveaux d'ARNm des sous-unités des gonadotropines (Sohn *et al.*, 1998b).

Les premiers poissons pubères ont été observés à un âge de 18 mois et demi, sachant qu'ils étaient probablement déjà matures depuis quelques semaines (l'échantillonnage des stades sexuels ayant été interrompu pendant quelques mois). Les plus petites femelles matures ont été observées entre 1 et 1,1 kg. Ces âges et poids sont caractéristiques des zones tropicales où la croissance est continue au cours de l'année (Horvath, 1986), et où la puberté est nettement plus précoce qu'en zone tempérée (voir Tableau 1, p.21). La puberté tardive (6-7 ans) chez la carpe noire *Mylopharyngodon piceus* a été associée au développement très lent de la réceptivité au niveau hypophysaire (récepteurs au GnRH) et au niveau gonadique (récepteurs aux gonadotropines) (Gur *et al.*, 2000). La différence considérable entre les âges et poids à la puberté selon les conditions thermiques (Horvath, 1986) pourrait être liée à un effet stimulateur direct des hautes températures sur la libération de gonadotropine(s) (Gillet *et al.*, 1977a; Gillet *et al.*, 1977b; Sohn *et al.*, 1998b) et/ou à un effet stimulateur indirect via la croissance ou les niveaux d'hormones somatotropes sur la sécrétion de gonadotropines (Huang *et al.*, 1998; Weil *et al.*, 1999; Larsen *et al.*, 2001). Aucune différence systématique n'a été observée entre mâles et femelles, ni pour l'âge ni pour la taille à la puberté, contrairement aux références bibliographiques (voir Tableau 1, p.21), qui en majorité rapportent une puberté plus précoce pour les mâles.

Aucun des critères liés à la reproduction mesurés lors des deux abattages préliminaires (à 10 mois puis 13 mois et demi : RGS, taux d'œstradiol plasmatique, contenu en GnRH du cerveau et de

l'hypophyse) ne différerait selon le régime. Les différences entre étangs pris individuellement et entre sexes étaient supérieures aux variations entre régimes alimentaires. Les taux de GnRH de notre étude sont inférieurs (d'un facteur 10 environ) à ceux déterminés chez le bar (Kah *et al.*, 1994), mais ces derniers ont été déterminés chez des poissons déjà pubères, ce qui pourrait expliquer cet écart. L'hypothèse que le régime alimentaire pourrait influencer le développement gonadique via un effet central sur le GnRH (Kah *et al.*, 1994) n'est pas vérifiable dans nos conditions. Il n'y a pas non plus de corrélation entre les niveaux de GnRH et l'entrée en puberté moins de 5 mois plus tard. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le stade étudié était trop précoce par rapport au déclenchement de la puberté (la vitellogénèse ne dure qu'une vingtaine de jours dans nos conditions) ou que le contenu en GnRH n'est pas forcément représentatif de la libération et de l'effet de ce peptide. Par ailleurs, il est possible que l'effet du régime alimentaire passe par une augmentation de la sensibilité des cellules hypophysaires gonadotropes au GnRH, ou un effet direct d'autres substances, comme l'IGF-I, sur l'hypophyse, sans conséquence sur les niveaux de GnRH.

L'accumulation des graisses périviscérales a une importance majeure comme source de lipides pour la vitellogénèse chez certaines espèces (Henderson *et al.*, 1996), et peut réguler la puberté, en particulier chez les salmonidés (Thorpe *et al.*, 1990; Silverstein *et al.*, 1997) mais n'explique pas les différences dans le déclenchement de la puberté dans notre essai. Dans le milieu naturel, la gamétogénèse de la carpe herbivore a lieu au printemps (Gorbach, 1972), alors que les poissons qui sont restés à jeun pendant tout l'hiver recommencent à s'alimenter. On peut donc faire l'hypothèse que le déroulement de la gamétogénèse dépend davantage des conditions d'alimentation instantanées (type *income breeder*, voir chapitre Introduction, paragraphe 3.3) que des réserves accumulées (bien que le niveau des réserves avant l'hiver détermine l'état des poissons lors de la reprise de l'alimentation et puisse donc avoir des conséquences indirectes).

La complémentation en granulé a avancé la puberté d'au moins trois mois et demi, et également augmenté le poids moyen des poissons à la puberté. Cette relation entre l'âge et le poids à la puberté est couramment observée chez de nombreuses espèces : les individus qui grossissent lentement atteignent la maturité à un âge plus avancé mais à une taille inférieure (Morita et Morita, 2002). Chez les poissons accumulant des réserves pour la vitellogénèse, il y aurait un seuil énergétique à franchir pour l'initiation de la gamétogénèse (Thorpe *et al.*, 1990), et dans cette hypothèse les relations entre âge et taille à la puberté pourraient s'expliquer par une variation de ce seuil selon l'âge des poissons. Chez le tilapia, cette relation âge/poids à la puberté est observée par certains auteurs sur des poissons nourris avec des aliments à différents taux de protéines (Al Hafedh *et al.*, 1999) ou à différents taux de rationnement (Siddiqui *et al.*, 1997), tandis que dans d'autres expériences la puberté ne dépend que de la taille finale des individus, quel que soit le régime

(Gunasekera *et al.*, 1995). Par ailleurs, on peut évoquer une action stimulatrice des taux d'IGF-I sur la réponse hypophysaire au GnRH qui déclencherait la puberté plus tôt dans le régime alimentaire enrichi. Cette relation poids et âge à la puberté a bien été observée en moyenne entre nos régimes, mais pas entre individus au sein d'un même étang : les dates de début de cycle étaient absolument indépendantes des poids individuels des poissons.

Si l'apport de granulé avance l'âge (et augmente le poids moyen) à la puberté, en revanche le taux de rationnement ne semble avoir aucun effet sur ces deux critères : les poissons alimentés à l'herbe, rationnés ou non, sont beaucoup plus variables pour l'âge et le poids d'apparition de la puberté et le rationnement ne provoque aucune différence significative. Cela confirme l'hypothèse issue de nos données sur les réserves énergétiques, à savoir que le taux de rationnement était probablement insuffisant pour modifier notablement le métabolisme des poissons.

L'impact de l'alimentation sur le déroulement des cycles sexuels dépend probablement du mode de régulation du recrutement des ovocytes, qui peut varier selon les espèces. Des contrôles doivent intervenir à différentes étapes-clés de la gamétogénèse : sur l'entrée en vitellogénèse puis sur le nombre d'ovocytes qui achèvent la vitellogénèse (Ali et Wooton, 1999), ou bien dès les multiplications goniales puis en début de vitellogénèse chez les salmonidés (Le Bail, 1988). Chez le saumon atlantique, un jeûne en février-mars au moment du démarrage du cycle sexuel est le plus efficace pour réduire les pubertés précoces chez les mâles (Thorpe *et al.*, 1990). Dans notre cas, c'est le taux d'entrée en vitellogénèse qui varie selon les régimes : par la suite, le déroulement des cycles est similaire quel que soit le régime. Il est donc probable que l'effet du régime se passe au niveau central par une stimulation de la libération de gonadotropine(s). Les taux de vitellogénine identiques pour les différents régimes (à stade comparable) confirment que la vitellogénèse doit se dérouler ensuite de façon similaire dans les différents étangs. Cependant, les cycles sont caractérisés par des anomalies dans la moitié des cas : blocages en début de vitellogénèse pendant plusieurs semaines ou mois, faibles taux d'ovocytes en fin de vitellogénèse pendant plusieurs semaines, etc. Toutefois, presque toutes les femelles ayant débuté leur cycle atteignent la fin de vitellogénèse au bout de quelques mois après l'amorce du cycle. Ceci se traduit donc par un plus fort taux de femelles achevant la vitellogénèse en régime alimentaire favorable, phénomène observé chez de nombreuses autres espèces, comme la carpe indienne *Catla catla* (Nandi *et al.*, 2001), le tilapia (Al Hafedh *et al.*, 1999) ou la truite arc-en-ciel (Bromage *et al.*, 1992).

Une fois que les femelles ont atteint la fin de vitellogénèse, la plupart d'entre elles subissent des cycles de surmaturation, retour en fin de vitellogénèse, surmaturation, etc. Le mois d'août, pendant lequel les températures sont minimales, voit une augmentation des femelles en fin de vitellogénèse dans 3 étangs, qui pourrait être expliquée par la diminution des surmaturations liées aux fortes

températures (de Vlaming, 1975; Davies *et al.*, 1986). Après les inductions de ponte, les femelles ont recommencé un cycle de vitellogénèse, à l'exception de celles de l'étang rationné en herbes. Cet effet du régime rationné peut être assimilé à une augmentation de l'intervalle entre pontes observé chez de nombreuses espèces en cas de régime rationné (Tableau 12).

Dans nos conditions, le régime alimentaire aurait donc un effet majeur sur la phase d'entrée en vitellogénèse, alors que nous ne mettons pas en évidence d'effet sur le déroulement des cycles. Les perturbations du déroulement des cycles proviendraient soit d'un effet des fortes températures, soit d'un autre facteur limitant, alimentaire (qui serait encore présent dans le régime le plus favorable) ou chimique (qualité de l'eau...) par exemple.

4.3 *sur la qualité des géniteurs femelles*

Les résultats de l'induction de ponte, menée sur des effectifs très faibles, ne permettent pas de mettre en évidence une différence liée au régime : les taux de réponse à l'induction de ponte sont compris entre 50 à 100%, ce qui est dans la norme pour les cyprinidés (Billard, 1995). Les poids d'ovules récoltés par kg de femelle sont similaires entre les deux régimes herbes *ad libitum* et herbes+aliment, et supérieurs ou égaux pour les femelles rationnées. En se basant sur une moyenne de 850 ovules au g (Billard, 1995), on obtient une fécondité relative après induction de $79\ 000 \pm 23\ 000$ ovules/kg de femelle (compris entre 53 000 à 120 000), ce qui est dans le haut de la fourchette relevée en Europe Centrale pour cette espèce : de 60 000 à 80 000 (Billard, 1995).

La fécondité potentielle relative de 158 000 ovocytes en fin de vitellogénèse/kg de femelle est indépendante du régime ou du poids des poissons. Cette valeur est supérieure aux données relevées pour l'espèce dans le milieu naturel, où la fécondité relative augmente avec l'âge et le poids des femelles (sur des poissons de 7 à 12 kg), et la moyenne est de 93 000 ovocytes/kg de femelle (Gorbach, 1972). Bien entendu, la fécondité absolue des poissons diffère selon le régime du fait des différences de poids moyen des poissons. Comme la fécondité relative, le RGS et le poids moyen des ovocytes sont indépendants du poids des poissons et du régime dans nos conditions. L'influence des conditions d'alimentation sur ces critères est très variable selon les espèces et les conditions dans la littérature (Tableau 12), mais les cas où ils ne sont pas modifiés par le régime sont courants. Ce sont manifestement des critères assez "résistants" aux conditions d'alimentation. Les différents régimes comparés dans notre étude, bien que modifiant significativement les performances de croissance, n'étaient sans doute pas suffisamment différenciés pour provoquer des modifications de l'allocation des ressources énergétiques entre la croissance et la reproduction. Les femelles ont manifestement réussi à maintenir un investissement à peu près constant dans les gonades.

La présence de femelles présentant des forts taux d'ovocytes atypiques n'est pas influencée par le régime : on les retrouve dans les deux régimes alimentaires herbes *ad libitum* et complétement au granulé. Ceci tendrait à confirmer l'hypothèse d'un dysfonctionnement dans l'incorporation de la vitellogénine, et rend peu probable l'hypothèse d'un problème de qualité de la vitellogénine (voir p. 71).

4.4 conclusion et perspectives

Cet essai a démontré que nos trois régimes (herbes rationnées, herbes *ad libitum* et complémentation en aliment composé) se sont traduits par des différences importantes en terme de croissance, mais peu en termes de réserves énergétiques après 6 mois d'élevage. Ils ont cependant eu des répercussions significatives sur la date et le poids d'entrée en puberté (suivant une relation souvent observée chez les poissons), et également sur la proportion de femelles entrant en vitellogénèse. L'effet du régime alimentaire se situe donc probablement au niveau central, et l'IGF-I est un candidat potentiel pour la médiation de cet effet (Huang *et al.*, 1998). Aucun impact du régime n'a pu être mis en évidence sur le déroulement de la vitellogénèse ou les caractéristiques des femelles en fin de vitellogénèse. Quel que soit le régime, les cycles ont présenté de nombreux blocages en cours de vitellogénèse, mais presque toutes les femelles qui avaient débuté un cycle l'ont achevé à plus ou moins long terme.

Finalement, dans nos conditions d'élevage (petits étangs à forte densité) la complémentation en granulé a permis de lever une des contraintes majeures pour la reproduction de cette espèce, à savoir le taux de femelles en fin de vitellogénèse. En revanche, les cycles sont toujours aussi désynchronisés et des ovocytes atypiques sont observés quel que soit le régime. L'alimentation en continu des poissons avec un aliment industriel est toutefois trop coûteuse pour être pratiquée par des pisciculteurs. Il serait utile de vérifier le bien-fondé des hypothèses de déficit en énergie de la ration végétale en essayant de complétement le régime herbacé avec des matières premières disponibles localement riches en protéines (comme des légumineuses) ou riches en énergie comme le maïs ou le manioc, qui ont des taux de digestibilité supérieurs à 85% chez la carpe commune (Schwarz et Kirchgessner, 1993). Le suivi des hormones de l'axe somatotrope ou du métabolisme permettrait d'émettre des hypothèses sur les mécanismes responsables des différences observées dans l'apparition de la puberté. Une autre voie à explorer serait l'effet d'une alimentation de meilleure qualité pendant quelques semaines avant la reproduction, qui pourrait également (et à moindre coût) avoir un impact positif sur la reproduction (Collins et Anderson, 1999) en termes de taux de femelles en fin de vitellogénèse et/ou de synchronisation des cycles.

Le régime alimentaire peut également avoir des répercussions sur le développement des œufs fécondés (Izquierdo *et al.*, 2001), en particulier du fait de sa composition en lipides, qui jouent sur la fluidité des membranes et donc les divisions cellulaires lors de l'embryogenèse. Cet impact du régime sur la qualité du développement embryonnaire mériterait d'être étudié puisque des mortalités massives des œufs en cours d'incubation (peu de temps avant l'éclosion) sont parfois observées en Côte d'Ivoire et restent inexplicables.

Chapitre 4

Technologies de la reproduction artificielle

1. Introduction

La carpe herbivore ne se reproduit pas en eau stagnante (étang), et aucune reproduction naturelle n'a été enregistrée sous climat tropical (Shireman et Smith, 1983). Comme chez de nombreux cyprinidés d'élevage, la vitellogénèse se produit en captivité, mais il y a un blocage sur la libération de LH en absence de stimuli environnementaux spécifiques (Zohar et Mylonas, 2001). Le pic de LH nécessaire au déclenchement de la maturation finale est donc bloqué, bien que la synthèse de LH ne soit manifestement pas affectée. Il est donc nécessaire de recourir à une induction artificielle de la ponte pour produire des alevins à destination des piscicultures.

Pour pouvoir concevoir une activité d'écloserie pour cette espèce, il faut disposer d'un protocole d'induction de ponte qui soit viable économiquement, du point de vue du matériel (préparations hormonales...), de la mise en œuvre et des résultats techniques.

Les protocoles d'induction figurant dans la bibliographie pour les carpes chinoises sont très variés (Shireman et Smith, 1983), combinant différentes préparations hormonales, des injections fractionnées, différents intervalles de temps entre injections, etc. Pour l'induction de la maturation finale et de l'ovulation, deux types de stratégie sont utilisés :

- stimuler directement la maturation finale et l'ovulation au niveau des ovaires par des injections de préparations gonadotropes plus ou moins purifiées, comme les extraits hypophysaires, homologues¹⁷ ou non, et l'hCG¹⁸,
- stimuler la libération des gonadotropines endogènes de l'hypophyse, par différentes formes de GnRH, associées ou non à des substances antidopaminergiques. La libération des gonadotropines endogènes provoque alors la maturation finale et l'ovulation.

Dans la plupart des cas, les préparations sont injectées en deux temps : une première injection (*priming*), censée accélérer (ou achever) la mise en place de la compétence des follicules, et une seconde injection (*resolving*), plus concentrée, pour déclencher la maturation finale des ovocytes.

Du point de vue d'une application en milieu rural africain, les inductions par extraits hypophysaires représentent des avantages, comme la possibilité de les prélever directement sur des géniteurs, la facilité de manipulation, mais également des inconvénients, comme le coût (coût du poisson abattu),

¹⁷ provenant de la même espèce

¹⁸ *human Chorionic Gonadotropin* : gonadotropine chorionique humaine

la variabilité du contenu en gonadotropines et la conservation éventuelle. L'induction par le GnRH et l'antidopaminergique sont également coûteux et forcément importés, donc plus difficiles à se procurer, mais leur activité biologique est fixe. La survie des ovules dans le tractus génital femelle est de très courte durée chez la carpe herbivore : 50% des ovules sont surmatures et non fécondables 30 à 40 min après ovulation (Horvath, 1978). Un des critères de choix du protocole est donc la possibilité de définir avec précision le moment des ovulations, et le fait d'obtenir des ovulations synchrones.

L'effet de la combinaison d'un analogue du sGnRH et d'un antidopaminergique a déjà été testé en conditions de température élevée en Pologne, et nous avons mis en évidence une accélération de la cinétique des niveaux plasmatiques de LH et de MIS qui pourrait être un élément explicatif des faibles taux d'ovulation observés dans les conditions de température élevée avec de longs intervalles entre les deux injections (12 ou 24 h). L'obtention d'ovulations précoces (avant la seconde injection), est régulièrement observée lors des inductions au GnRH et pimozide (avec un priming de 10% de la dose totale) et constitue également un facteur perturbant le déroulement de la reproduction artificielle (Yaron, 1995). L'intervalle entre les deux injections est susceptible de modifier la cinétique de la maturation et donc les résultats de l'induction.

Le but de cette étude était donc d'évaluer les différents critères de la réponse des carpes herbivores ivoiriennes à différents protocoles d'induction, afin de compléter l'analyse économique des avantages et inconvénients des différentes stratégies. Nous avons comparé les inductions par extraits hypophysaires (de carpe commune) et par combinaison GnRH + pimozide, et deux intervalles différents entre *priming* et *resolving*. Nous avons retenu une dose de priming très faible (2%) pour le GnRH et pimozide pour tenter d'éviter les ovulations précoces. Les critères de réponse évalués ont été les taux d'ovulation (complète ou partielle), les quantités d'ovules recueillis et les caractéristiques des temps de latence (intervalle entre la dernière injection et l'ovulation).

2. Matériel et méthodes

2.1 les protocoles d'induction de ponte

Les différents protocoles ont été conduits à la station piscicole de Gagnoa, à partir de géniteurs issus de la même fratrie et élevés dans un même étang.

Quatre protocoles ont été menés, pour comparer l'efficacité d'un extrait hypophysaire de carpe commune et de la combinaison GnRH+pimozide d'une part, et pour comparer deux intervalles entre la première injection préparatoire (*priming*) et la seconde injection déclenchante (*resolving*) : 6 heures ou 12 heures d'intervalle.

Des femelles en fin de vitellogénèse ont été réparties en 5 groupes, maintenus dans des bacs d'1 m³ aérés par une pompe à air sans renouvellement d'eau.

- Injections d'extrait hypophysaire : 8 femelles injectées à 6 h d'intervalle
8 femelles injectées à 12 h d'intervalle
- Injections de GnRH et pimozide : 8 femelles injectées à 6 h d'intervalle
8 femelles injectées à 12 h d'intervalle
- 6 femelles témoins injectées au NaCl 0,9%

Les deux premiers groupes ont été injectés à l'extrait hypophysaire de carpe commune en intramusculaire, la première injection comprenant 10% de la dose totale (0,3 mg d'extrait sec/kg) et la seconde 90% (2,7 mg extrait sec/kg). Les femelles étaient marquées individuellement.

Les deux groupes suivants ont été injectés avec une dose totale de 20 µg/kg de D-Arg⁶-sGnRH-A et 5 mg/kg de pimozide, en intrapéritonéal. La première injection était de 2% de la dose totale (pour les deux substances), et la seconde injection 98% de la dose totale. Cette faible dose de *priming* a été choisie afin d'éviter les ovulations précoces observées avec un *priming* de 10%. Le mode de préparation et d'injection des solutions était le même que celui adopté dans les expérimentations en Pologne (voir p. 80).

Les poissons étaient maintenus 24 heures à jeun dans les bacs avant l'induction de ponte. Le poids moyen des femelles utilisées était de 1,5 kg (compris entre 0,9 et 3,4 kg).

Le protocole suivi était le suivant :

	Groupes intervalle 12 h	Groupes intervalle 6 h
13h00	Prélèvement de sang, biopsie et 1 ^{ère} injection	
19h00	Prélèvement de sang	Prélèvement de sang, biopsie et 1 ^{ère} injection
01h00	Prélèvement de sang et 2 ^e injection	Prélèvement de sang et 2 ^e injection
08h00	Prélèvement de sang et contrôle des ovulations	Prélèvement de sang et contrôle des ovulations

Les ovulations étaient ensuite contrôlées régulièrement jusqu'à 13h00, et les ovules pesés. Les ovulations étaient considérées comme complètes lorsque le poids des ovules était supérieur à 5% du poids de la femelle.

La température moyenne dans les bacs pendant les inductions était comprise entre 25,2°C et 26,2°C.

2.2 la détermination des taux de LH plasmatique

Les prélèvements de sang ont été centrifugés et le plasma congelé à -20°C jusqu'à analyse. La détermination des taux de LH plasmatique a été effectuée par dosage immuno-enzymatique selon le protocole figurant au paragraphe 2.1.4, p.82.

2.3 les analyses statistiques

Les valeurs de LH plasmatique sont présentées comme moyenne \pm écart-type. Les différences entre traitements ont été évaluées par des tests U de Mann-Whitney. Les effectifs ont été comparés par test du Chi^2 .

3. Résultats

Les injections au pimozide et GnRH donnent de meilleurs taux d'ovulation complète que les injections d'extraits hypophysaires de carpe commune, et l'intervalle de 12 heures donne davantage d'ovulations complètes que l'intervalle de 6 heures (Tableau 18). Aucun des poissons témoins injectés au NaCl 0,9% n'a ovulé.

Tableau 18 : Nombre d'ovulations par protocole d'induction (groupes de 8 femelles) et médiane des temps de latence (intervalle de temps entre la seconde injection et le moment où la moitié des individus ont ovulé).

Préparation hormonale	Intervalle entre les 2 injections	Ovulations	Médiane des temps de latence
Extrait hypophysaire	6 heures	6 partielles	7 heures
	12 heures	1 complète + 7 partielles	8 heures 30
GnRH +pimozide	6 heures	2 complètes + 6 partielles	8 heures
	12 heures	4 complètes + 3 partielles	10 heures

Le nombre de femelles ovulantes selon le temps de latence (temps écoulé entre la seconde injection et l'ovulation) est repris sur la Figure 55 pour l'hypophysation et sur la Figure 56 pour l'induction au GnRH et pimozide. La variabilité des temps de latence est élevée, puisque les écarts entre la première et la dernière ovulation varient de 1 heure 30 à 4 heures selon les protocoles d'induction.

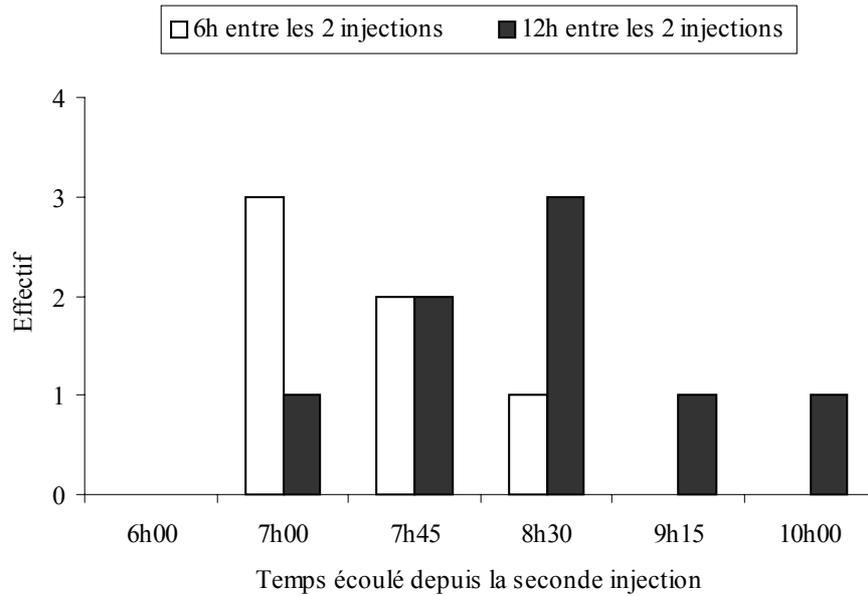


Figure 55. Effectifs de femelles ovulantes selon le temps de latence (temps écoulé depuis la seconde injection) pour une induction à l'extrait hypophysaire.

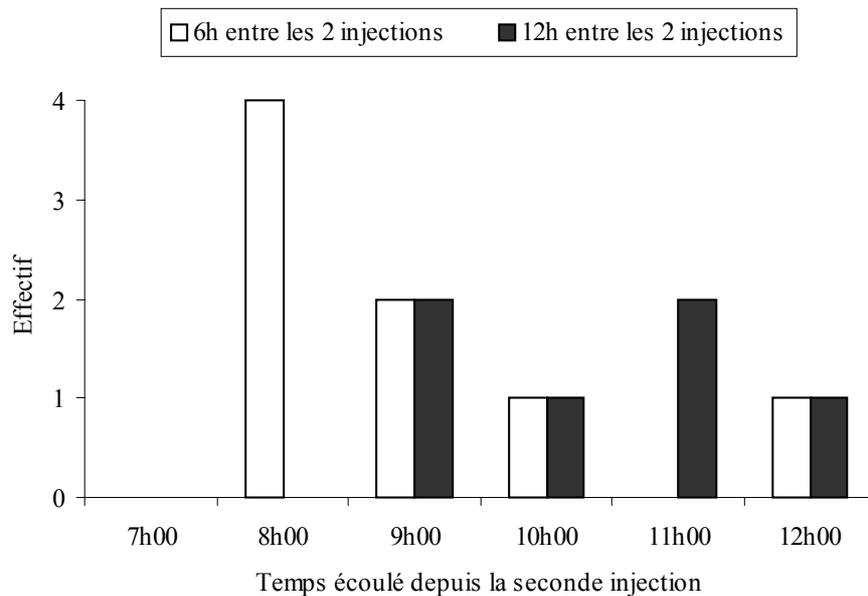


Figure 56. Effectifs de femelles ovulantes selon le temps de latence (temps écoulé depuis la seconde injection) pour une induction au GnRH et pimozide.

Les poissons injectés à 6 heures d'intervalle semblent être plus homogènes de ce point de vue (la moitié des effectifs ovule en même temps). Nous avons donc raisonné sur la médiane des temps de latence (le temps au bout duquel la moitié des individus a ovulé). On constate que les temps de

latence sont plus courts pour l'extrait hypophysaire que pour le GnRH, et également plus courts pour les poissons injectés à 6 heures d'intervalle que pour les poissons injectés à 12 heures d'intervalle, quelle que soit la préparation injectée (Tableau 18).

La fécondité relative de la seule ovulation complète obtenue avec l'extrait hypophysaire est de 65 000 ovules/kg de femelle, et pour le GnRH $59\,000 \pm 23\,000$ ovules pour les femelles injectées à 6 heures d'intervalle ($n=2$) et $95\,000 \pm 29\,000$ ovules pour les femelles injectées à 12 heures d'intervalle ($n=4$).

Pour les groupes induits à l'extrait hypophysaire, les profils de LH (Figure 57) diffèrent notablement selon l'intervalle entre les deux injections : les poissons injectés à 6 heures d'intervalle atteignent des taux de LH plasmatique plus élevés que les poissons injectés à 12 heures d'intervalle.

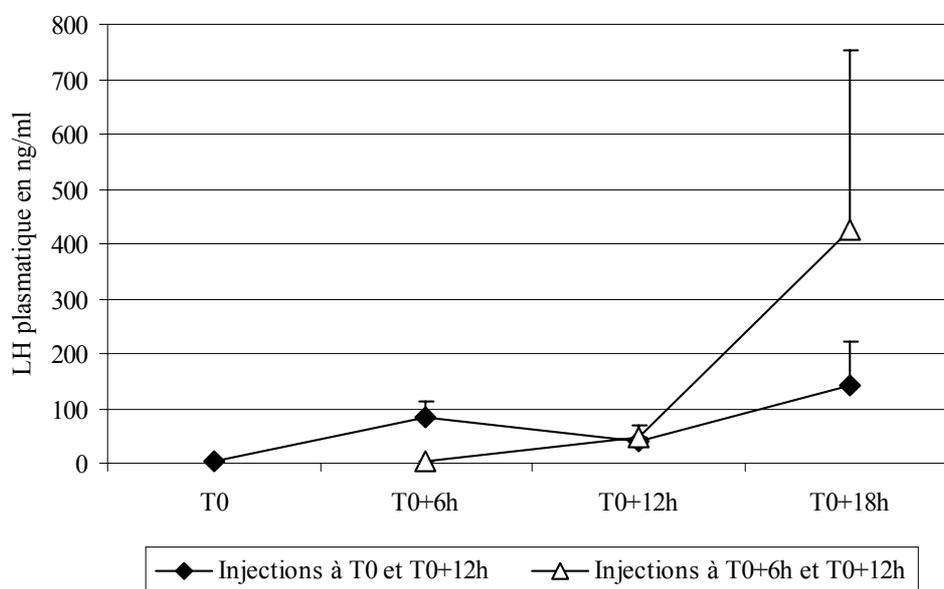


Figure 57. Evolution des taux de LH plasmatique des deux groupes de poissons induits à l'extrait hypophysaire (moyenne \pm écart-type).

Pour les poissons injectés au GnRH et pimozide en revanche (Figure 58), les taux de LH six heures après la seconde injection sont similaires entre les deux protocoles d'injection, et inférieurs aux taux des poissons hypophysés. Au sein de chaque groupe, il n'y a pas de relation entre le taux de LH final et le fait que les femelles ovulent partiellement ou totalement.

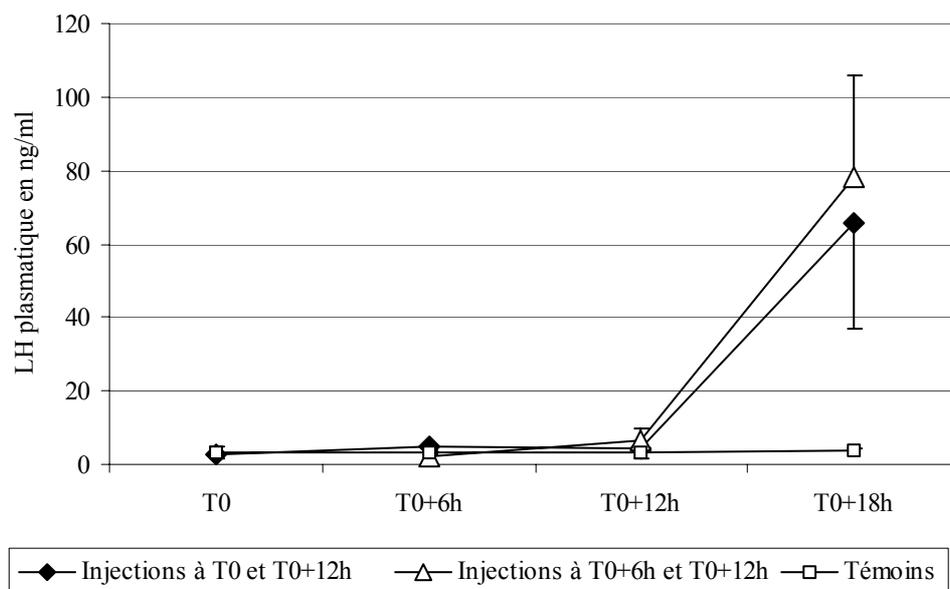


Figure 58. Evolution des taux de LH plasmatique des deux groupes de poissons induits au GnRH et pimozide et du groupe témoin injecté au NaCl 0,9% (moyenne \pm écart-type).

4. Discussion

La proportion totale de femelles ovulantes a été élevée et semblable pour les deux préparations hormonales, confirmant les résultats obtenus en Europe (Brzuska, 1999). Les injections au GnRH+pimozide ont cependant donné de meilleurs résultats d'ovulation complète que les injections à l'extrait hypophysaire, et on observe également une différence selon l'intervalle entre les deux injections : les poissons injectés à 12 heures d'intervalle présentaient des taux d'ovulation complète supérieurs à ceux injectés à 6 heures d'intervalle seulement. Ceci pourrait être dû à un meilleur déroulement de la maturation avec un intervalle entre injections de 12 heures, en particulier pour la mise en place de la compétence ovocytaire (Kime *et al.*, 1987). En revanche, les ovulations étaient plus synchrones chez les poissons injectés à 6 heures d'intervalle : ce protocole doit accélérer le processus de maturation mais au détriment de la qualité si les cascades de régulations ne sont pas complètement mises en place. Le fort taux d'ovulations partielles pourrait être dû aux effets du stress des manipulations et des prélèvements de sang chez ces poissons, car les femelles de l'essai alimentation induites par hypophysation avec le même protocole (mais n'ayant pas subi de manipulations répétées ni de prélèvements) ont produit au total 60% d'ovulations complètes (voir Tableau 17, p. 129).

On observe une différence de sensibilité à l'extrait hypophysaire selon le moment d'injection : les taux de LH sont plus élevés après un *priming* réalisé à 13h00 qu'à 19h00. Un phénomène similaire a été mis en évidence chez la carpe commune par certains auteurs (Bieniarz *et al.*, 1985), qui se traduit par une différence dans les taux d'ovulation (injection à 9h00 : 59% d'ovulation, à 21h00 : 33% d'ovulation), mais pas par d'autres (Drori *et al.*, 1994). Dans nos essais, malgré la différence dans les taux de LH, la réponse ovulatoire est semblable.

Pour les injections au GnRH+pimozide, la réponse en LH au *priming* est identique quelle que soit l'heure d'injection, comme chez la carpe commune injectée au GnRH et métoclopramide (Drori *et al.*, 1994).

Les taux de LH observés après injection à l'extrait hypophysaire sont similaires à ceux observés chez la carpe commune (Weil *et al.*, 1980; Bieniarz *et al.*, 1980). Les niveaux de LH plasmatique après les injections d'extrait hypophysaire et de GnRH+pimozide ne sont pas comparables, puisqu'il s'agit sans doute majoritairement de gonadotropines issues de l'extrait hypophysaire de carpe commune dans le premier cas, et de gonadotropines endogènes de carpe herbivore dans le second, qui vraisemblablement n'ont pas la même affinité pour l'anticorps utilisé pour le dosage. Cependant, les résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus chez la carpe commune, où les extraits hypophysaires provoquent une hausse de LH supérieure à celle induite par le GnRH et pimozide (Bieniarz *et al.*, 1986). Ces auteurs observent également davantage d'ovulations partielles chez les femelles induites à l'extrait hypophysaire, qu'ils interprètent comme la conséquence des taux de LH trop élevés qui provoqueraient une résorption des ovocytes. C'est une hypothèse qui pourrait également expliquer le fort taux d'ovulations partielles que nous avons observé après hypophysation. Les doses d'extrait hypophysaire couramment utilisées (3 mg d'extrait sec par kg de femelle) sont probablement trop élevées pour des poissons dont l'état de maturité (taille des ovocytes, migration de la V.G.) est contrôlé avant hypophysation.

Les temps de latence varient selon l'intervalle entre injections et selon la préparation hormonale utilisée : les poissons injectés à 6 heures d'intervalle ovulent au moins 1 heure avant les autres, et les poissons injectés à l'extrait hypophysaire ont également au moins 1 heure d'avance sur les poissons injectés au GnRH+pimozide. Ce dernier phénomène est couramment observé (Drori *et al.*, 1994), et peut être expliqué par le délai nécessaire à la libération des gonadotropines endogènes sous l'effet du GnRH et du pimozide (alors que l'extrait hypophysaire agit directement au niveau des gonades).

Les écarts de temps de latence entre les poissons les plus précoces et les plus tardifs sont de 1 h 30 à 4 h, semblables à ceux observés chez cette espèce par d'autres auteurs (Horvath, 1978; Zonneveld, 1984; Rottman et Shireman, 1985) et chez la carpe commune (Drori *et al.*, 1994). Cependant, certaines données (Brzuska, 1999) et les pratiques des pisciculteurs font référence à des intervalles

beaucoup plus brefs (1 heure). L'origine de ces différences pourrait venir des conditions thermiques ou des caractéristiques génétiques des différentes populations. Chez la carpe commune, la température n'a pas d'impact sur la variabilité des temps de latence entre 20 et 26°C (Drori *et al.*, 1994). La survie des ovules est très brève chez les carpes chinoises : 50% des ovules sont surmatures et non fécondables 30 à 40 min après ovulation (Horvath, 1978). Pour cette raison, il est certain que des temps de latence peu variables sont plus favorables, évitant la contrainte de contrôler régulièrement les femelles pour détecter le moment de l'ovulation. L'injection au GnRH et pimozide ne semble pas avoir accru la variabilité des temps de latence, contrairement à des observations chez la carpe commune (Kulikovsky *et al.*, 1996) et d'autres cyprinidés (Peter *et al.*, 1988).

Un *priming* de 2% de GnRH+pimozide a permis d'éviter les ovulations précoces avant la seconde injection (à la différence des 10% injectés lors des expérimentations en Pologne et qui induisaient des ovulations avant l'injection finale). Ce phénomène est surtout observé pour des inductions à température élevée, et peut-être que les températures des bacs pendant l'induction a aussi évité ce phénomène : la température de l'eau des bacs était fraîche (du fait de la saison et de l'effet de l'aération), et les conditions n'étaient donc pas très représentatives des conditions habituellement rencontrées en Côte d'Ivoire.

En regroupant les résultats de fécondité de cette expérience avec ceux des femelles de l'essai alimentation (voir Tableau 17, p. 129), on n'observe aucune différence en terme de fécondité relative entre les poissons injectés à l'extrait hypophysaire et ceux injectés au GnRH+pimozide : la moyenne globale est de $80\ 000 \pm 25\ 000$ ovules/kg de femelle, ce qui est du même ordre que les données relevées en Europe (Billard, 1995). Ce sont de bons résultats si l'on considère que tous les poissons utilisés étaient dans leur première année de reproduction, et la fécondité relative est indépendante du poids des femelles dans la limite de nos données (poids individuels de 0,9 à 3,4 kg).

En conclusion, les injections au GnRH et pimozide ont donné de meilleurs taux d'ovulation complète, mais les conditions thermiques de cet essai (25-26°C) étaient particulièrement favorables et pas très représentatives des conditions habituelles en Côte d'Ivoire. L'intervalle de 12 heures entre injections a également favorisé les ovulations complètes : l'hypothèse d'amélioration des résultats par le rapprochement des deux injections n'est pas vérifiée dans ces conditions. L'hypophysation à 3 mg/kg a provoqué une élévation très importante des taux de LH plasmatique qui a peut-être eu un effet négatif sur les ovulations chez ces individus. Pour des poissons dont le degré de maturité est évalué avant l'induction, il serait sans doute possible de diminuer les doses avec la possibilité d'améliorer les performances. Les résultats seraient sans doute également améliorés par des

conditions moins stressantes (pas de prélèvements de sang et de manipulations répétées). Les temps de latence sont variables, ce qui oblige à contrôler régulièrement les femelles à plusieurs reprises pendant la maturation. L'intervalle de 6 heures entre injections réduit cette variabilité mais au détriment des taux d'ovulation complète.

Conclusion et perspectives

1. les données apportées par l'étude

La mise au point de techniques de reproduction artificielle de la carpe herbivore est essentielle à son élevage en milieu paysan en Côte d'Ivoire. Le développement d'écloseries, quelle que soit leur taille, nécessite de disposer d'un nombre suffisant de géniteurs réceptifs à l'induction de ponte. Pour le sexe mâle, les données recueillies en Côte d'Ivoire ont montré qu'il n'y a pas de problème pour disposer d'un nombre suffisant de mâles spermiant. Les problèmes identifiés venaient des femelles, caractérisées par un faible nombre d'individus en fin de vitellogénèse quelle que soit la saison, et de faibles taux de réponse à l'hypophysation pendant les périodes les plus chaudes de l'année. Ce constat nous a conduit à réaliser une étude détaillée des caractéristiques des stades sexuels pour mettre en évidence les éventuelles étapes sensibles (points de blocage) du cycle sexuel, et de voir par une approche expérimentale dans quelle mesure elles dépendaient des facteurs externes.

Nos travaux ont permis d'apporter différentes informations sur la description des cycles sexuels. Tout d'abord, un certain nombre de femelles réalisent une vitellogénèse normale, dont les caractéristiques histologiques et endocriniennes sont conformes à ce qui est observé chez d'autres cyprinidés ou chez des carpes herbivores élevées en milieu tempéré (Pologne). Cependant, la dynamique de leurs cycles est tout de même perturbée : la durée du stade de fin de vitellogénèse est très variable selon les femelles, et les cycles sexuels sont désynchronisés, ce qui fait que le taux de femelles en fin de vitellogénèse est le plus souvent faible.

Par ailleurs, les autres femelles présentent des anomalies des cycles :

- certaines sont bloquées en début de vitellogénèse, avec des taux très faibles d'œstradiol et de vitellogénine, et ce blocage est sans doute partiellement lié aux températures d'élevage,
- d'autres présentent des ovocytes en fin de vitellogénèse atypiques en grand nombre.

Après une induction de ponte, les femelles redémarrent rapidement un nouveau cycle de vitellogénèse.

Nous avons ensuite entrepris une étude expérimentale pour décrire l'impact des hautes températures et de l'alimentation, deux facteurs externes potentiellement responsables des dysfonctionnements observés.

A partir de femelles élevées en conditions tempérées, nous avons étudié l'impact de la température sur la maturation des ovocytes lors d'inductions de pontes, par une comparaison des inductions menées à 24°C, une température favorable pour la reproduction de l'espèce, et 28°C, température à partir de laquelle les données semblent montrer une inhibition. Les suivis hormonaux lors de ces

inductions et les études *in vitro* montrent que l'effet au niveau central (hypophysaire) est principalement une augmentation de l'inhibition dopaminergique par les fortes températures, mais l'injection d'un antidopaminergique lors des inductions permet de s'en affranchir. Les taux d'ovulation sont significativement réduits à 28°C malgré des taux de gonadotropines similaires aux deux températures (on note toutefois une certaine accélération de la synthèse et de la disparition de la LH à haute température). Au niveau périphérique (gonades), les effets des fortes températures sont multiples : il y a des manifestations des perturbations lors de l'établissement de la compétence à la maturation, lors de la maturation et lors de l'ovulation :

- au niveau de la réponse aux gonadotropines par la production de MIS (au niveau des récepteurs aux gonadotropines ou de la régulation de la stéroïdogénèse) : on observe des inhibitions de la production de MIS à 28°C malgré des taux de LH plasmatique élevés, et une accélération de la cinétique (synthèse et dégradation),
- au niveau de la réponse ovocytaire au MIS par la maturation : cela pourrait être un problème de cinétique (production de MIS trop précoce ou trop fugace) ou de transduction du signal (voir les essais *in vitro*),
- au niveau de l'ovulation, puisqu'on observe beaucoup d'ovulations partielles à haute température alors que les ovocytes ont mûri.

Les comparaisons de régimes alimentaires ont permis de caractériser la consommation alimentaire des carpes herbivores dans nos conditions : les indices de conversion (poids d'herbe consommée par kg de gain de biomasse) sont de l'ordre de 30 dans les différents étangs, ce qui, vu les rejets des parties dures des végétaux, représenterait donc environ 60 à 100 kg d'herbes brutes à distribuer pour produire 1 kg de carpe. Les rendements obtenus dans nos petits étangs allaient de 0,6 à 2,4 t/ha/an (0,6 à 1,3 t/ha/an dans les étangs alimentés uniquement avec des herbes), et ont permis une production additionnelle de tilapia de 0,7 à 2 t/ha/an (0,6 à 1,3 t/ha/an dans les étangs alimentés uniquement avec des herbes). Le rendement en carpe herbivore représentait entre 60% et 120% des rendements associés en tilapias, avec une alimentation uniquement végétale.

Les expériences comparant différents régimes alimentaires montrent un effet important de l'alimentation sur la date d'apparition des premières femelles matures, qui ont été observée à l'âge de 18 mois et demi chez les poissons alimentés à l'herbe à éléphants et au granulé, en avance de trois mois et demi sur les poissons des autres régimes alimentaires (herbes à éléphant *ad libitum* ou rationnées). Le taux de femelles en fin de vitellogénèse est également fortement amélioré par le régime alimentaire complété à l'aliment. Cet effet est principalement dû à une amélioration des taux d'entrée en vitellogénèse, le déroulement du cycle étant peu affecté par nos régimes. Les

femelles les moins bien alimentées ne redémarrent pas leur vitellogénèse après une induction de ponte. En revanche, la durée des cycles, la fécondité relative des femelles et la qualité des ovocytes n'ont pas été affectées par les différents régimes alimentaires que nous avons comparés. Les perturbations toujours observées dans le déroulement des cycles sexuels sont donc sans doute dues à d'autres facteurs, peut-être thermiques, alimentaires ou de qualité du milieu. Un régime alimentaire "amélioré" (par rapport à une alimentation uniquement à base d'herbes à éléphant) permet donc d'augmenter le nombre de femelles disponibles pour les inductions. Il est vraisemblable toutefois qu'outre les températures élevées, l'absence de variations annuelles de photopériode soit responsable d'une absence de rythme dans le déroulement des cycles, sur laquelle les conditions alimentaires auront peu ou pas d'impact.

Il faut souligner que les meilleures performances obtenues dans nos petits étangs sont largement inférieures à celles obtenues dans des étangs de barrage à très faible densité d'élevage (de l'ordre d'1 individu/are), qui peuvent atteindre jusqu'à 20 g/individu/j. Il est donc probable que dans ces conditions de forts taux de femelles en fin de vitellogénèse pourraient être également obtenus. Toutefois, ces conditions ne permettent pas de contrôles réguliers des poissons pour détecter ceux qui seraient à un stade favorable pour l'induction de ponte.

Enfin, la réussite de l'induction de ponte dépend également du protocole d'injection. Les injections au pimozide et GnRH semblent plus efficaces que l'extrait hypophysaire de carpe commune utilisé dans notre essai, et un intervalle de 12 heures entre les deux injections donne de meilleurs résultats, bien que les ovulations soient plus étalées dans le temps. Toutefois, les performances de l'extrait hypophysaire ont probablement été réduites dans cet essai par le stress lié aux manipulations des poissons, car les taux d'ovulation complète étaient inférieurs à ceux observés lors d'inductions "en routine" (sans prélèvements répétés des poissons).

2. les conséquences pour la conception d'écloseries

Les données de notre étude ont des applications sur l'élevage des géniteurs et la conduite des inductions de ponte.

Sur l'élevage des géniteurs, il faut s'efforcer d'avoir de bonnes conditions alimentaires, dont une bonne croissance peut être un indice. Toutefois, certains végétaux comme *Hydrilla* permettent une bonne croissance mais provoquent une accumulation de graisses périviscérales qui semble être néfaste pour la reproduction (Chen *et al.*, 1969). L'alimentation à base d'herbes à éléphant *Pennisetum purpureum* semble éviter ces problèmes, de même qu'une alimentation diversifiée reposant sur des apports extérieurs et la végétation spontanée des étangs de barrage. En étang, la supplémentation avec un aliment concentré est très bénéfique.

Les écloseries devraient donc disposer de structures d'élevage des géniteurs, plutôt à faible densité (barrages ou étangs) et également de petits étangs où stocker les géniteurs aux fins de contrôle et de suivi des stades sexuels des femelles. Ce suivi peut être réalisé simplement par des biopsies intraovariennes à la pipelle de Cormier.

Les effets inhibiteurs des hautes températures sont assez difficiles à éviter pendant les mois chauds. La période où les températures sont inférieures à 28°C s'étend en général de juillet à octobre, et semble favorable pour la pratique des inductions de pontes. Il y a également une période fraîche (harmattan) de très courte durée en janvier-février qui pourrait être mise à profit pour produire des alevins en vue des empoissonnements de la saison des pluies suivante. Manifestement la température a des impacts à court terme sur la régulation des étapes finales de la maturation, et le maintien des géniteurs en eau rafraîchie pendant la maturation devrait améliorer nettement les résultats d'ovulation.

Concernant les inductions de ponte, il semble que les extraits hypophysaires, malgré des résultats inférieurs au GnRH et pimozide, permettent tout de même d'assurer de bons taux d'ovulation. Ils sont plus facilement accessibles, dans la situation actuelle de la filière piscicole en Côte d'Ivoire, que le GnRH et le pimozide, et permettent une autonomie des producteurs pour toutes les étapes de la reproduction. Des reproductions induites avec des hypophyses fraîches de silure *Heterobranchus isopterus* ont été obtenues en Côte d'Ivoire (Glasser, données non publiées). Pour augmenter la probabilité d'avoir des extraits riches en gonadotropines, il faudrait les prélever sur des femelles en fin de vitellogénèse. Les techniques d'induction de ponte avec des extraits hypophysaires sont déjà maîtrisées sur le silure par plusieurs pisciculteurs de la zone, avec du matériel disponible sur place à bas prix. Le rôle de la température est prépondérant pendant l'induction, et il faudra donc s'efforcer de maintenir les poissons dans une eau la plus fraîche possible pendant la durée de la maturation finale. Tous les dispositifs utiles pour réduire la température de maintien des géniteurs induits peuvent améliorer les performances : ombrage, inductions pendant la nuit, eau courante, bulleurs ou chute d'eau en amont...

Le protocole d'induction le plus efficace est de deux injections à 12 heures d'intervalle, mais se traduit par une grande variabilité des temps de latence. Vu la très rapide dégradation des ovules après ovulation chez cette espèce, il est donc nécessaire de contrôler très régulièrement les femelles pendant plusieurs heures pour pratiquer la fécondation dès que l'ovulation intervient.

Vu les problèmes liés au transport des alevins, au caractère très disséminé de la demande, et le fait qu'il semble possible de pratiquer des inductions de ponte à bas coût, il nous semblerait plus approprié de développer des écloseries "décentralisées", à l'échelle d'une petite région géographique, mises en œuvre par des pisciculteurs privés qui peuvent en faire une spécialisation

partielle pendant quelques mois de l'année, ou par des associations (coopératives ?) de producteurs. Cependant, ce sont les techniques disponibles, les coûts associés et le contexte socio-économique qui vont déterminer le type d'infrastructure qui sera développé.

3. *les perspectives en termes de recherches*

Les deux facteurs externes que nous avons étudiés ont des impacts sur le déroulement des cycles sexuels chez la carpe herbivore. Cependant, une connaissance plus détaillée de certains aspects de l'action de ces deux facteurs pourrait permettre d'améliorer la maîtrise de la reproduction de l'espèce dans les conditions tropicales.

Des effets thermiques clairs sur les taux d'ovulation ont été mis en évidence lors des inductions en température contrôlée. Ils interviennent manifestement à différents niveaux de l'axe reproducteur, mais semblent majeurs au niveau des gonades. Il serait utile de mieux cerner les étapes précises d'action des fortes températures au cours de la maturation finale et de l'ovulation : les étapes successives (acquisition de la compétence, maturation, ovulation) pourraient avoir des optimums thermiques différents (Epler *et al.*, 1985) et donc être plus ou moins affectées. Une meilleure connaissance des aspects cinétiques pourrait permettre d'améliorer les protocoles d'induction de ponte dans des conditions thermiques limitantes pour l'espèce. L'amplitude du blocage dopaminergique en fonction de la température pourrait également être étudiée.

Au niveau de l'alimentation, la distribution d'aliment composé industriel est très efficace pour améliorer les taux de femelles en fin de vitellogénèse qui étaient un facteur limitant important diagnostiqué au début de l'étude. Cependant, les aliments composés sont coûteux, se conservent mal en conditions tropicales et sont assez difficiles à se procurer. Il serait donc intéressant de tester l'effet de différentes matières premières facilement disponibles localement, riches en énergie digestible pour la carpe herbivore ou riches en protéines. Egalement pour limiter les coûts alimentaires, l'impact de pratiques de suralimentation pré-reproduction (*flushing*) pourrait être évalué, qui de surcroît pourrait avoir un effet de déclenchement ou de meilleure synchronisation des cycles sexuels.

La cause extérieure et le mécanisme responsable de l'apparition d'ovocytes en fin de vitellogénèse atypiques chez certaines femelles n'ont pas pu être déterminés, alors qu'ils affectent une bonne partie du cheptel.

Des aspects que nous n'avons pas abordés dans notre étude pourraient également être profitables pour la maîtrise et la qualité des résultats de reproduction. La régulation de l'ovulation, en particulier par la température, n'a pas été abordée, alors que des ovulations partielles sont souvent

observées. L'impact des conditions d'élevage (en particulier l'alimentation) sur la qualité du développement embryonnaire et larvaire est également susceptible d'avoir de forts impacts sur les résultats techniques des écloséries. Ces études ne sont pas simples à mener du fait de la dégradation rapide de la qualité des ovules après ovulation chez cette espèce (qui pourrait masquer les effets des facteurs expérimentaux), mais pourraient être engagées au moins à titre exploratoire. De ce point de vue, un problème non encore abordé est l'existence de mortalités totale des embryons avant l'éclosion dans certains cas, alors que la ponte paraissait normale et que les conditions d'incubation étaient favorables. L'étude de ce problème selon les conditions d'incubation (température, qualité d'eau...) ou l'alimentation des géniteurs pourrait apporter des solutions.

Enfin, les effets d'un éventuel contrôle artificiel d'autres facteurs externes, comme la photopériode par exemple, bien que présentant des difficultés d'application pratique en conditions paysannes, pourraient se révéler intéressants en termes scientifiques et utiles pour l'obtention de géniteurs de bonne qualité. L'imposition de variations des facteurs externes pourrait augmenter le taux d'entrée en vitellogénèse et la synchronicité des cycles. Des jeûnes temporaires suivis de réalimentation, ou des variations artificielles de la photopériode pourraient avoir un effet inducteur potentiel.

Finalement, nous espérons que ces travaux pourront contribuer au développement de la pisciculture artisanale en Côte d'Ivoire, et qu'ils seront un exemple de collaboration entre des instituts de recherche et des opérateurs de développement en Afrique.

Liste des figures

- Figure 1 : Carte de la Côte d'Ivoire
- Figure 2 : Températures et précipitations moyennes mensuelles à Gagnoa
- Figure 3 : Un aménagement piscicole en zone rurale
- Figure 4 : La filière piscicole dans le Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire
- Figure 5 : Les différentes espèces élevées en polyculture en Côte d'Ivoire
- Figure 6 : Pêche à la senne de carpes herbivores
- Figure 7 : Schéma du déroulement des différentes étapes de la gamétogenèse femelle
- Figure 8 : Vue des enveloppes folliculaires d'un ovocyte de carpe herbivore
- Figure 9 : Les stéroïdes sexuels et le modèle à deux cellules
- Figure 10 : Profils de gonadotropine (GtH) et de stéroïdes lors de l'ovulation chez la carpe commune
- Figure 11 : Mécanismes moléculaires de l'activation du MPF par le MIS chez le carassin
- Figure 12 : Plan de la démarche de recherche
- Figure 13 : Plants d'herbe à éléphant *Pennisetum purpureum*
- Figure 14 : Carte de la Pologne
- Figure 15 : Température moyenne mensuelle des étangs et durée de la photopériode à Gagnoa et Żabieniec
- Figure 16 : Protocole de purification de la vitellogénine de carpe herbivore
- Figure 17 : Densité optique des différentes fractions collectées à la sortie de la gel-filtration
- Figure 18 : Gel d'électrophorèse des différentes fractions à la sortie de la gel-filtration
- Figure 19 : Densité optique des différentes fractions à la sortie de la colonne échangeuse d'ions
- Figure 20 : Gel d'électrophorèse des différentes fractions à la sortie de la colonne échangeuse d'ions
- Figure 21 : Comparaison de la liaison maximale (B₀) pour différentes combinaisons de greffages et de dilutions des anticorps pour le dosage ELISA de la vitellogénine
- Figure 22 : Pourcentage de liaison de l'anticorps à la vitellogénine greffée (B/B₀), en présence de sérum de carpe herbivore mâle ou de vitellogénine de truite
- Figure 23 : Liaison d'une gamme de vitellogénine pure ou surchargée avec du sérum de carpe mâle
- Figure 24 : Pourcentage de liaison de l'anticorps à la vitellogénine greffée, en présence de plasma de mâle œstrogénisé, de plasma de femelle ou de vitellogénine purifiée
- Figure 25 : Profils de fréquence des diamètres d'ovocytes dans un cycle normal et chez une femelle bloquée en début de vitellogénèse
- Figure 26 : Stades de l'ovogénèse chez la carpe herbivore
- Figure 27 : Ovocytes normal et atypique après histo-immunologie avec un anticorps anti-vitellogénine

- Figure 28 : Niveaux de vitellogénine plasmatique selon le stade ovarien
- Figure 29 : Niveaux de stéroïdes plasmatiques selon le stade ovarien
- Figure 30 : Cinétique de concentration d'œstradiol *in vitro* par des ovaires en début de vitellogénèse, incubés à 24°C, 28°C ou 32°C
- Figure 31 : Sécrétion d'œstradiol *in vitro* par des ovaires en début de vitellogénèse, incubés à 24°C, 28°C ou 32°C en présence de différentes doses d'extrait hypophysaire de carpe commune
- Figure 32 : Moyennes hebdomadaires des températures relevées dans les étangs de la station piscicole de Gagnoa pendant les trois années d'expérimentations
- Figure 33 : Pourcentage de liaison de l'anticorps dirigé contre la sous-unité β de la LH de carpe commune, en présence de dilutions de plasma de carpe herbivore femelle ou de LH de carpe commune purifiée
- Figure 34 : Evolution des taux de LH plasmatique individuels lors de l'induction de ponte réalisée en 2001 à Żabieniec
- Figure 35 : Evolution des taux de MIS plasmatique individuels lors de l'induction de ponte réalisée en 2001 à Żabieniec
- Figure 36 : Evolution des taux individuels plasmatiques de LH et de MIS lors de l'induction de ponte réalisée en 2001 à Gagnoa
- Figure 37 : Evolution des taux individuels de LH plasmatique lors de l'induction de ponte réalisée en 2002 à Gosławice
- Figure 38 : Evolution des taux individuels de MIS plasmatique lors de l'induction de ponte réalisée en 2002 à Gosławice
- Figure 39 : Culture de cellules hypophysaires : concentration de LH dans le milieu et contenu cellulaire en LH selon la température d'incubation (24°C et 28°C) et la durée d'incubation (3 heures et 12 heures)
- Figure 40 : Sécrétion de MIS *in vitro* par les ovaires en fin de vitellogénèse, en fonction de la dose d'extrait hypophysaire de carpe commune
- Figure 41 : Cinétique de concentration d'œstradiol *in vitro* par des ovaires en début de vitellogénèse, incubés à 24°C, 28°C ou 32°C
- Figure 42 : Evolution au cours du temps du contenu en AMPc des fragments d'ovaires incubés *in vitro* avec des extraits hypophysaires à 24°C, 28°C et 32°C
- Figure 43 : Contenu en AMPc des fragments d'ovaires incubés *in vitro* en présence de différentes doses de MIS à 24°C et 32°C
- Figure 44 : Taux de maturation des ovocytes *in vitro*, en fonction de la dose d'extraits hypophysaires de carpe commune
- Figure 45 : Pourcentage de maturation des ovocytes *in vitro* en fonction du taux de MIS sécrété dans le milieu d'incubation par les ovocytes stimulés par des extraits hypophysaires
- Figure 46 : Déroulement de l'essai alimentation et des prélèvements réalisés
- Figure 47 : Courbes de croissance dans les 6 étangs de l'essai sur les régimes alimentaires
- Figure 48 : Contenu en GnRH des cerveaux selon le régime alimentaire (âge 13,5 mois)
- Figure 49 : Contenu en GnRH des hypophyses selon le régime alimentaire (âge 13,5 mois)
- Figure 50 : Proportion des différents stades sexuels femelles dans les étangs au cours du temps
- Figure 51 : Proportion de mâles spermiantes dans les différents étangs en fonction du temps

Figure 52 : Proportion de femelles pubères en fonction du poids moyen des poissons dans les différents étangs

Figure 53 : Proportion de mâles spermants en fonction du poids moyen des poissons dans les différents étangs

Figure 54 : Caractéristiques des femelles en fin de vitellogénèse selon le régime alimentaire : Rapport Gonado-Somatique, fécondité relative et poids moyen des ovocytes

Figure 55 : Effectifs de femelles ovulantes selon le temps de latence pour une induction à l'extrait hypophysaire

Figure 56 : Effectifs de femelles ovulantes selon le temps de latence pour une induction au GnRH et pimozide

Figure 57 : Evolution des taux de LH plasmatique des deux groupes de poissons induits à l'extrait hypophysaire

Figure 58 : Evolution des taux de LH plasmatique des deux groupes de poissons induits au GnRH et pimozide et du groupe témoin injecté au NaCl 0,9%

Glossaire

ad libitum : à volonté, sans rationnement.

ADN : Acide Désoxyribonucléique, c'est le support de l'information génétique.

ARNm : Acide Ribonucléique messager, c'est le produit de la transcription de l'ADN qui sera ensuite traduit en une protéine.

fécondabilité : aptitude de l'ovule à être fécondé.

fécondité : nombre de gamètes produits par une femelle. Ce nombre peut être déterminé à différents stades : au stade des ovocytes en fin de vitellogénèse (on peut parler dans ce cas de fécondité potentielle) ou au stade de l'ovulation, de la ponte, voire des alevins pour les espèces vivipares. On oppose généralement la **fécondité absolue** (nombre de gamètes par individu) et la **fécondité relative** (nombre de gamètes par unité de poids de géniteur : kg de femelle...).

fingerling : jeune poisson de quelques dizaines de grammes de poids moyen (20 à 50 g environ).

front pionnier : progression des cultures aux dépens de la forêt lors de la colonisation agricole. La zone de colonisation possède une forte attraction pour les migrants (possibilités d'installation, besoins en main d'œuvre...)

hypophysation : injection d'extraits hypophysaires pour provoquer artificiellement la maturation finale des ovocytes et la ponte.

indice de conversion : c'est la quantité d'aliment ingérée ramenée au gain de biomasse de poisson (c'est l'inverse de l'**efficacité alimentaire**).

itéropane : espèce dont les individus se reproduisent plusieurs fois au cours de leur vie (contraire : sémelpane).

macrophyte : végétal de «grande» taille, terrestre ou aquatique, par opposition aux végétaux unicellulaires ou planctoniques.

périphyton : ensemble des organismes qui se développent à la surface de supports immergés. C'est une communauté d'espèces animales et végétales très complexe, allant des bactéries aux arthropodes.

plaquettes vitellines : forme cristallisée du vitellus, elles sont principalement formées par un cristal protéique contenant dans ses mailles la fraction lipidique issue de la vitellogénine. C'est la forme de stockage du vitellus lipoprotéique dans les ovocytes des cyprinidés.

semelpare : espèce dont les individus se reproduisent une seule fois avant de mourir (contraire : itéropare).

sexage manuel : le sexe des poissons est déterminé visuellement par l'aspect de la papille génitale sur des individus de 15 à 30 g environ, afin d'éliminer les femelles des populations de tilapias destinées au grossissement.

surmaturation : phénomène d'atrésie (ou régression) des ovocytes en fin de vitellogénèse, qui intervient si la ponte n'a pas lieu ou suite à un stress environnemental. Les ovocytes s'hydratent, les enveloppes folliculaires sont dégradées et le contenu des ovocytes est finalement réabsorbé par l'organisme. La qualité des ovocytes (fécondabilité, aptitude au développement...) sont bien sûr fortement dégradées dès l'amorce de ce phénomène.

temps de latence : durée séparant l'instant de l'induction de ponte (injection d'une préparation hormonale) du moment de l'ovulation.

Références bibliographiques

- A.F.V.P., 1998. Projet "Appui à la Profession Piscicole du Centre-Ouest", Rapport d'activité 1997. 71 p.
- Acharia, K., Lal, B., et Singh, S.B., 2000. Modulatory effect of temperature on the influence of dietary linolenic (18:3 n-3) and linoleic (18:2 n-6) acids on the gonadal recrudescence in *Clarias batrachus* (L.). *Journal of Fish Biology* 57 (4), 968-980.
- Adams, B.A., Vickers, E.D., Warby, C., Park, M., Fischer, W.H., Craig, A.G., Rivier, J.E., et Sherwood, N.M., 2002. Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biology of Reproduction* 67 (1), 232-239.
- Aida, K., 1988. A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. *Aquaculture* 74, 11-21.
- Al Hafedh, Y.S., Siddiqui, A.Q., et Al Saiady, M.Y., 1999. Effects of dietary protein levels on gonad maturation, size and age at first maturity, fecundity and growth of Nile tilapia. *Aquaculture International* 7 (5), 319-332.
- Ali, M. et Wootton, R.J., 1999. Effect of variable food levels on reproductive performance of breeding female three-spined sticklebacks. *Journal of Fish Biology* 55, 1040-1053.
- Aliyev, D.S., 1976. The role of phytophagous fishes in the reconstruction of commercial fish fauna and the biological improvement of water. *Journal of Ichthyology* 16 (2), 216-229.
- APDRA-CI, 2001. Rapport d'activités 2000. 52 p.
- Bagenal, T.B., 1969. The relationship between food supply and fecundity in Brown trout *Salmo trutta* L. *Journal of Fish Biology* 1, 167-182.
- Bardach, J. E., Ryther, J. H., et McLaren, W. O., 1972. *Aquaculture : the farming and husbandry of freshwater and marine organisms*. John Wiley and Sons : New York. 868 p.
- Baroiller, J.F., Guiguen, Y., et Fostier, A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular & Molecular Life Sciences* 55 (6/7), 910-931.
- Basu, D. et Bhattacharya, S., 2002. Purification of two types of gonadotropin receptors from carp ovarian follicles: overlapping recognition by two different ligands. *General and Comparative Endocrinology* 129 (3), 152-162.
- Bieniarz, K., Epler, P., Luong-ngoc-Thuy, et Breton, B., 1980. Changes in blood gonadotropin level in mature female carp following hypophysial homogenate injections. *Aquaculture* 20, 65-69.
- Bieniarz, K., Epler, P., Popek, W., Billard, R., et Sokolowska, M., 1986. Effect of pimozide and LHRH-A on carp (*Cyprinus carpio* L.) oocyte maturation and ovulation *in vivo*. *Fish Physiology and Biochemistry* 2 (1-4), 109-114.
- Bieniarz, K., Popek, W., Breton, B., et Epler, P., 1985. Daily changes in the gonadotropin levels and response of carp oocytes to hypophysial homogenate. *Chronobiology International* 2 (2), 93-101.
- Billard, R., 1995. *Les carpes, Biologie et élevage*. INRA : Paris. 387 p.
- Billard, R., Breton, B., Fostier, A., Jalabert, B., et Weil, C., 1978. Endocrine control of the teleost reproductive cycle and its relation to external factors : salmonid and cyprinid models. In Gaillard, P. J. et Boer, H. H. (Eds.) : *Comparative Endocrinology*. Elsevier : Amsterdam, pp. 37-48.

- Billard, R. et Fremont, M., 1980. Level of nutrition during gametogenesis and reproductive performance in the brown trout. *Bulletin Français de Pisciculture* 53, 49-56.
- Billard, R. et Gillet, C., 1984. Influence de quelques facteurs de l'environnement sur la fonction de reproduction chez les poissons. *Cahiers du laboratoire de Montereau* 15, 45-54.
- Billard, R. et Marcel, J., 1986. Aquaculture of cyprinids. INRA : Paris. 500 p.
- Blaise, O., Weil, C., et Le Bail, P.Y., 1995. Role of IGF-I in the control of GH secretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Growth Regulation* 5 (3), 142-150.
- Breton, B., Govoroun, M., et Mikolajczyk, T., 1998. GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout : relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. *General and Comparative Endocrinology* 111, 38-50.
- Breton, B., Mikolajczyk, T., Popek, W., Bieniarz, K., et Epler, P., 1991. Neuropeptide Y stimulates in vivo gonadotropin secretion in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 84 (2), 277-283.
- Breton, B. et Sambroni, E., 1989. Evolution du nombre des recepteurs gonadotropes ovariens au cours du cycle annuel de reproduction chez la truite fario (*Salmo trutta*). *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 408, 495-500.
- Breton, B., Sambroni, E., Govoroun, M., et Weil, C., 1997. Effects of steroids on GTH I and GTH II secretion and pituitary concentration in the immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences* 320 (10), 783-789.
- Breton, B., Sambroni, E., et Zohar, Y., 1983. Dosages radioimmunologiques hétérologues de gonadotropines de type glycoprotéiques maturantes de poissons téléostéens. *Aquaculture* 40, 307-323.
- Breton, B. et Weil, C., 1973. [Effect of synthetic LH-FSH releasing hormone and hypothalamic extracts of the carp on in vivo gonadotropic hormone secretion in the carp (*Cyprinus carpio* L.)]. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Serie D* 277 (19), 2061-2064.
- Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J., et Barker, G., 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 141-166.
- Bromage, N., Porter, M., et Randall, C., 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197 (1/4), 63-98.
- Bromley, P.J., Ravier, C., et Witthames, P.R., 2000. The influence of feeding regime on sexual maturation, fecundity and atresia in first-time spawning turbot. *Journal of Fish Biology* 56 (2), 264-278.
- Brzuska, E., 1999. Artificial spawning of herbivorous fish: use of an LHRH-a to induce ovulation in grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes). *Aquaculture Research* 30 (11/12), 849-856.
- Cai, Z. et Curtis, L.R., 1989. Effects of diet on consumption, growth and fatty acid composition in young grass carp. *Aquaculture* 81 (1), 47-60.
- Cai, Z. et Curtis, L.R., 1990. Effects of diet and temperature on food consumption, growth rate and tissue fatty-acid composition of triploid grass carp. *Aquaculture* 88 (3-4), 313-327.
- Carter, C.G., Houlihan, D.F., Brechin, J., McCarthy, I.D., et Davidson, I., 1993. Protein synthesis in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.), and its relation to diet quality. In Kaushik, S. et Luquet, P. (Eds.) : Fish nutrition in practice. INRA : Paris, pp. 673-680.

- Cerda, J., Carrillo, M., Zanuy, S., et Ramos, J., 1994. Effect of food ration on estrogen and vitellogenin plasma levels, fecundity and larval survival in captive sea bass, *Dicentrarchus labrax*: preliminary observations. *Aquatic Living Resources* 7, 255-266.
- Cerda, J., Zanuy, S., Carrillo, M., Ramos, J., et Serrano, R., 1995. Short- and long-term dietary effects on female sea bass (*Dicentrarchus labrax*): seasonal changes in plasma profiles of lipids and sex steroids in relation to reproduction. *Comparative Biochemistry and Physiology* 111 (1), 83-91.
- Chang, Y.S., Huang, C.J., Huang, F.L., Liu, C.S., et Lo, T.B., 1990. Purification, characterization, and molecular cloning of gonadotropin subunits of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *General and Comparative Endocrinology* 78 (1), 23-33.
- Chang, Y.S., Huang, C.J., Huang, F.L., et Lo, T.B., 1988. Primary structures of carp gonadotropin subunits deduced from cDNA nucleotide sequences. *International Journal of Peptide & Protein Research* 32 (6), 556-564.
- Chen, F.Y., Chow, M., et Sim, B.K., 1969. Induced spawning of the three major chinese carps in Malacca, Malaysia. *Malaysian Agricultural Journal* 47 (2), 211-238.
- Collins, A.L. et Anderson, T.A., 1999. The role of food availability in regulating reproductive development in female golden perch. *Journal of Fish Biology* 55 (1), 94-104.
- Cook, A.F. et Peter, R.E., 1980a. Plasma clearance of gonadotropin in goldfish, *Carassius auratus*, during the annual reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 42 (1), 76-90.
- Cook, A.F. et Peter, R.E., 1980b. The metabolism of gonadotropin in goldfish, *Carassius auratus*: tissue uptake and distribution during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 42 (1), 91-100.
- Corraze, G., Larroquet, L., Maisse, G., Blanc, D., et Kaushik, S., 1993. Effect of temperature and of dietary lipid source on female broodstock performance and fatty acid composition of the eggs of rainbow trout. In Kaushik, S. et Luquet, P. (Eds.) : Fish nutrition in practice. INRA : Paris, pp. 61-66.
- Coward, K. et Bromage, N.R., 1999. Spawning frequency, fecundity, egg size and ovarian histology in groups of *Tilapia zillii* maintained upon two distinct food ration sizes from first-feeding to sexual maturity. *Aquatic Living Resources* 12 (1), 11-22.
- Dabbadie, L., 1994. La carpe Amour, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844) : quelques données bibliographiques sur sa biologie, sa culture et son introduction en dehors de sa zone d'origine. 14 p.
- Dabbadie, L. 1996. Etude de la viabilité d'une pisciculture rurale à faible niveau d'intrant dans le Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire : approche du réseau trophique. Thèse, Université de Paris 6, Paris.
- Daget, J. et Iltis, A., 1965. Poissons de Côte d'Ivoire. Eaux douces et saumâtres. IFAN : Dakar. 385 p.
- Das, K.M. et Tripathi, S.D., 1991. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Aquaculture* 92 (1), 21-32.
- Davies, P.R. et Hanyu, I., 1986. Effect of temperature and photoperiod on sexual maturation and spawning of the common carp. I. Under conditions of high temperature. *Aquaculture* 51, 277-288.
- Davies, P.R., Hanyu, I., Furukawa, K., et Nomura, M., 1986. Effect of temperature and photoperiod on sexual maturation and spawning of the common carp. III. Induction of spawning by manipulating photoperiod and temperature. *Aquaculture* 52, 137-144.

- de Vlaming, V.L., 1972. Environmental control of teleost reproductive cycles : a brief review. *Journal of Fish Biology* 4, 131-140.
- de Vlaming, V.L., 1975. Effects of photoperiod and temperature on gonadal activity in the cyprinid teleost, *Notemigonus crysoleucas*. *Biology Bulletin* 148 (3), 402-415.
- de Vlaming, V.L., 1983. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts. In Rankin, J. C., Pitcher, T. J., et Duggan, R. T. (Eds.) : Control processes in fish physiology. Kluwer Academic Publishers : Dordrecht, pp. 176-199.
- Degani, G., Boker, R., et Jackson, K., 1996. Growth hormone, gonad development, and steroid levels in female carp. *Comparative Biochemistry and Physiology* 115C (2), 133-140.
- Domaizon, I., Desvillettes, C., Debroas, D., et Bourdier, G., 2000. Influence of zooplankton and phytoplankton on the fatty acid composition of digesta and tissue lipids of silver carp: mesocosm experiment. *Journal of Fish Biology* 57 (2), 417-432.
- Drori, S., Ofir, M., Levavi-Sivan, B., et Yaron, Z., 1994. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide : analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependance on temperature. *Aquaculture* 119, 393-407.
- Dubois, E.A., Zandbergen, M.A., Peute, J., et Goos, H.J., 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Research Bulletin* 57 (3-4), 413-418.
- Dufour, S., Huang, Y. S., Rousseau, K., Sbaihi, M., Le Belle, N., Vidal, B., Marchelidon, J., Quérat, B., Burzawa-Gerard, E., Chang, C. F., and Schmitz, M., 2000. Puberty in teleosts: new insights into the role of peripheral signals in the stimulation of pituitary gonadotropins. In Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L., Andersson, E., and Stefansson, S. O. (Eds.) : Proceedings of the 6th international symposium on the reproductive physiology of Fish, Institute of Marine Research : Bergen, pp. 455-461.
- Epler, P., Bieniarz, K., et Marosz, E., 1985. Effect of temperature, 17 alpha-hydroxy-20 beta-dihydroprogesterone and prostaglandin F2 alpha on carp oocyte maturation and ovulation in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 58 (2), 192-201.
- Epler, P., Galas, J., et Stoklosowa, S., 1987a. Steroidogenic activity of carp ovarian follicular and interstitial cells at the pre-spawning and resting time: a tissue culture approach. *Comparative Biochemistry and Physiology* 116 (2), 167-170.
- Epler, P., Kime, D.E., Son, N.K., et Bieniarz, K., 1987b. Effects of carp hypophyseal homogenate doses, incubation times, and temperatures on carp oocyte maturation and steroidogenesis in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 66 (3), 343-352.
- FAO, 2003a. FAOSTAT Agriculture Data. URL : <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>, consulté le 21-2-2003a
- FAO, 2003b. FAOSTAT Nutrition Data. URL : <http://apps.fao.org/page/collections?subset=nutrition>, consulté le 19-2-2003b
- FAO, 2003c. World aquaculture production of fish, crustacean, molluscs, etc. by principal species in 2000. URL : ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summ_00/a-6_table.pdf, consulté le 20-2-2003c
- Farkas, T., Csengeri, I., Majoros, F., et Olah, J., 1980. Metabolism of fatty acids in fish. 3. Combined effect of environmental temperature and diet on formation and deposition of fatty acids in the carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758. *Aquaculture* 20 (1), 29-40.
- Fine, M., Zilberg, D., Cohen, Z., Degani, G., Moav, B., et Gertler, A., 1996. The effect of dietary protein level, water temperature and growth hormone administration on growth and

- metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 114A (1), 35-42.
- Fostier, A., Breton, B., Jalabert, B., et Marcuzzi, O., 1981. Evolution des niveaux plasmatiques de la gonadotropine glycoprotéique et de la 17 alpha hydroxy-20 beta dihydroprogesterone au cours de la maturation et de l'ovulation chez la Truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri*. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, série III* 293 (15), 817-820.
- Fostier, A. et Jalabert, B., 1986. Steroidogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at various preovulatory stages : changes in plasma hormone levels and in vivo and in vitro responses of the ovary to salmon gonadotropin. *Fish Physiology and Biochemistry* 2 (1-4), 87-99.
- Fostier, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, B., et Zohar, Y., 1983. The gonadal steroids. In Hoar, W. S., Randall, C., et Donaldson, E. M. (Eds.) : *Fish Physiology*, vol. IX. Academic Press : New York, pp. 277-372.
- Fostier, A., Le Gac, F., et Loir, M., 1994. Facteurs de croissance de type insulinique et régulation gonadique chez les poissons. *Contraception Fertilité Sexualité* 22 (9), 548-550.
- Fostier, A., Weil, C., Terqui, M., Breton, B., et Jalabert, B., 1978. Plasma estradiol-17b and gonadotropin during ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 18, 929-936.
- Fukada, H., Fujiwara, Y., Takahashi, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., et Hara, A., 2003. Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: purification and development of a simultaneous chemiluminescent immunoassay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 134 (3), 615-623.
- Gabe, M., 1968. Techniques histologiques. Masson : Paris. 1113 p.
- George, T.T., 1982. The Chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, its biology, introduction, control of aquatic macrophytes and breeding in the Sudan. *Aquaculture* 27 (3), 317-327.
- Gerking, S.D., 1980. Fish reproduction and stress. In Ali, M. A. (Eds.) : *Environmental Physiology of Fishes*. Plenum Press : New-York, pp. 369-387.
- Gillet, C., Billard, R., et Breton, B., 1977a. Effets de la température sur le taux de gonadotropine plasmatique et la spermatogénèse du poisson rouge *Carassius auratus*. *Canadian Journal of Zoology* 55 (1), 242-245.
- Gillet, C., Billard, R., et Breton, B., 1977b. Influence de la température sur la reproduction du poisson rouge *Carassius auratus* L. *Cahiers du laboratoire de Montereau* 5, 25-42.
- Gillet, C., Breton, B., et 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 Resources* 9, 257-263.
- Glasser, F. 1999. Approche de la reproduction de la carpe chinoise herbivore *Ctenopharyngodon idella* en zone équatoriale. Mémoire de fin de DEA. Université de Rennes 1.
- Glasser, F., Oswald, M., Ble, C., and Coulibaly, M., 1998. Mise en valeur des bas-fonds ivoiriens par l'aménagement de petits barrages à vocation piscicole. In Actes du 6ème atelier régional du Consortium Bas-Fonds, C.B.F. Bouaké, Côte d'Ivoire,
- Goetz, F.W. et Theofan, G., 1979. *In vitro* stimulation of germinal vesicle breakdown and ovulation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes. Effects of 17 alpha-hydroxy-20 beta-dihydroprogesterone and prostaglandins. *General and Comparative Endocrinology* 37 (3), 273-285.

- Gomez, J.M., Mourot, B., Fostier, A., et Le Gac, F., 1999a. Growth hormone receptors in ovary and liver during gametogenesis in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Reproduction and Fertility* 115 (2), 275-285.
- Gomez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P.Y., Breton, B., et Le Gac, F., 1999b. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 113 (3), 413-428.
- Gorbach, E.I., 1972. Fecundity of the grass carp [*Ctenopharyngodon idella* (Val.)] in the Amur Basin. *Journal of Ichthyology* 12 (4), 616-625.
- Gunasekera, R.M., Shim, K.F., et Lam, T.J., 1995. Effect of dietary protein level on puberty, oocyte growth and egg chemical composition in the tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 134 (1/2), 169-183.
- Gunasekera, R.M., Shim, K.F., et Lam, T.J., 1996. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 146 (1/2), 121-134.
- Gupta, S., 1975. The development of carp gonads in warm water aquaria. *Journal of Fish Biology* 7, 775-782.
- Gur, G., Melamed, P., Gissis, A., et Yaron, Z., 2000. Changes along the pituitary-gonadal axis during maturation of the Black carp, *Mylopharyngodon piceus*. *Journal of Experimental Zoology* 286, 405-413.
- Habibi, H.R., 1991. Desensitization to native molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in the goldfish pituitary: dependence on pulse frequency and concentration. *General and Comparative Endocrinology* 84 (2), 199-214.
- Habibi, H.R., De Leeuw, R., Nahorniak, C.S., Goos, H.J.T., et Peter, R.E., 1989. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish : seasonal and gonadal effects. *Fish Physiology and Biochemistry* 7 (1-4), 109-118.
- Habibi, H.R., Van der Kraak, G., Bulanski, E., et Peter, R.E., 1988. Effect of teleost GnRH on reinitiation of oocyte meiosis in goldfish, *in vitro*. *American Journal of Physiology* 255 (2), 268-273.
- Henderson, B.A., Wong, J.L., et Nepszy, S.J., 1996. Reproduction of walleye in Lake Erie: allocation of energy. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 53, 127-133.
- Hickling, C.F., 1960. Observation on the growth rate of the chinese grass carp. *Malaysian Agricultural Journal* 43 (1),
- Hislop, J., Robb, A., et Gauld, J., 1978. Observations on effects of feeding level on growth and reproduction in haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (L.) in captivity. *Journal of Fish Biology* 13 (1), 85-98.
- Holloway, A.C., Sheridan, M.A., Van der Kraak, G., et Leatherland, J.F., 1999. Correlations of plasma growth hormone with somatostatin, gonadal steroid hormones and thyroid hormones in rainbow trout during sexual recrudescence. *Comparative Biochemistry and Physiology* 123B (3), 251-260.
- Horvath, L., 1978. Relation between ovulation and water temperature by farmed cyprinids. *Aquacultura Hungarica (Szarvas)* 1, 58-65.
- Horvath, L., 1986. Carp oogenesis and the environment. In Billard, R. et Marcel, J. (Eds.) : *Aquaculture of cyprinids*. INRA : Paris, pp. 109-117.

- Horvath, L., Tamas, G., Tolg, I., et Halver, J. E., 1984. Special methods in pond fish husbandry. Académie de Kiado : Budapest. 147 p.
- Huang, Y.S., Rousseau, K., Le Belle, N., Vidal, B., Burzawa-Gerard, E., Marchelidon, J., et Dufour, S., 1998. Insulin-like growth factor-I stimulates gonadotrophin production from eel pituitary cells: a possible metabolic signal for induction of puberty. *Journal of Endocrinology* 159 (1), 43-52.
- Illing, N., Troskie, B.E., Nahorniak, C.S., Hapgood, J.P., Peter, R.E., et Millar, R.P., 1999. Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2526-2531.
- Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H., et Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197 (1/4), 25-42.
- Jalabert, B., 1976. *In vitro* oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox lucius*), and goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33, 974-988.
- Jalabert, B., 1978. Production of fertilizable oocytes from follicles of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) following *in vitro* maturation and ovulation. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique* 18, 461-470.
- Jalabert, B., Breton, B., et Bry, C., 1972. Maturation et ovulation *in vitro* des ovocytes de la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri*. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences - Serie D* 275, 1139-1142.
- Jalabert, B., Breton, B., Brzuska, E., Fostier, A., et Wieniawski, J., 1977. A new tool for induced spawning: the use of 17 alpha -hydroxy-20 beta -dihydroprogesterone to spawn carp [*Cyprinus carpio*] at low temperature. *Aquaculture* 10 (4), 353-364.
- Jalabert, B., Breton, B., et Fostier, A., 1978. Precocious induction of oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): problems when using 17-alpha-hydroxy-20-beta-dihydroprogesterone. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique* 18, 977-984.
- Jalabert, B. et Finet, B., 1986. Regulation of oocyte maturation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: role of cyclic AMP in the mechanism of action to the maturation inducing steroid (MIS), 17alpha-hydroxy, 20beta-dihydroprogesterone. *Fish Physiology and Biochemistry* 2 (1-4), 65-74.
- Kagawa, H., Young, G., Adachi, S., et Nagahama, Y., 1982. Estradiol-17beta production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: role of the thecal and granulosa cells. *General and Comparative Endocrinology* 47 (4), 440-448.
- Kagawa, H., Young, G., et Nagahama, Y., 1983. Changes in plasma steroid hormone levels during gonadal maturation in female goldfish *Carassius auratus*. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries* 49 (12), 1783-1787.
- Kah, O., Pontet, A., Danger, J.M., Dubourg, P., Pelletier, G., Vaudry, H., et Calas, A., 1989a. Characterization, cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry* 7 (1-6), 69-76.
- Kah, O., Pontet, A., Nunez, R.J., Calas, A., et Breton, B., 1989b. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for goldfish gonadotropin. *Biology of Reproduction* 41 (1), 68-73.
- Kah, O., Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Chang, J.P., Dubourg, P., Yu, K.L., et Peter, R.E., 1992. Influence of GABA on gonadotrophin release in the goldfish. *Neuroendocrinology* 55 (4), 396-404.

- Kah, O., Zanuy, S., Pradelles, P., Cerda, J.L., et Carrillo, M., 1994. An enzyme immunoassay for salmon gonadotropin-releasing hormone and its application to the study of the effects of diet on brain and pituitary GnRH in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *General and Comparative Endocrinology* 95 (3), 464-474.
- Kanamori, A., Adachi, S., et Nagahama, Y., 1988. Developmental changes in steroidogenic responses of ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. *General and Comparative Endocrinology* 72 (1), 13-24.
- Kandel-Kfir, M., Gur, G., Melamed, P., Zilberstein, Y., Cohen, Y., Zmora, N., Kobayashi, M., Elizur, A., et Yaron, Z., 2002. Gonadotropin response to GnRH during sexual ontogeny in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 132 (1), 17-26.
- Karlsen, O., Holm, J.C., et Kjesbu, O.S., 1995. Effects of periodic starvation on reproductive investment in first-time spawning Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 133 (2), 159-170.
- Kestemont, P., 1990. Dynamic aspects of ovogenesis in an asynchronous fish, the gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae), under controlled temperature and photoperiod conditions. *Aquatic Living Resources* 3, 61-74.
- Kilgen, R.H. et Smitherman, R.O., 1971. Food habits of the white amur stocked in ponds alone and in combination with other species. *Progressive Fish-Culturist* 33, 123-127.
- Kime, D.E., 1980. Androgen biosynthesis by testes of the goldfish *Carassius auratus in vitro*: the effect of temperature on the formation of steroid glucuronides. *General and Comparative Endocrinology* 41 (2), 164-172.
- Kime, D.E., Epler, P., Bieniarz, K., Sokolowska, M., Motyka, K., et Mikolajczyk, T., 1987. The temporal sequence of changes in oocyte maturation and ovarian steroid hormone production during induced ovulation in the common carp, *Cyprinus carpio*. *General and Comparative Endocrinology* 68 (2), 313-321.
- Kobayashi, M., Aida, K., et Hanyu, I., 1986. Annual changes in plasma levels of gonadotropin and steroid hormones in goldfish. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries* 52 (7), 1153-1158.
- Kobayashi, M., Aida, K., et Hanyu, I., 1987. Hormone changes during ovulation and effects of steroid hormones on plasma gonadotropin levels and ovulation in goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 67 (1), 24-32.
- Kobayashi, M., Amano, M., Yoshiura, Y., Sohn, Y.C., Suetake, H., et Aida, K., 1997. Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. *Fish Physiology and Biochemistry* 17, 1-8.
- Kobayashi, M., Sohn, Y., Yoshiura, Y., et Aida, K., 2000. Effects of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin subunits in juvenile and ovariectomized goldfish *Carassius auratus*. *Fisheries Science* 66 (2), 223-231.
- Krykhtin, M.L. et Gorbach, E.I., 1982. Reproductive ecology of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, and the silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*, in the Amur basin. *Journal of Ichthyology* 21 (2), 109-123.
- Kulikovsky, Z., Martin, F., et Yaron, Z., 1996. A comparison of two spawning-inducing agents for common carp. *Israeli Journal of Aquaculture* 48 (2), 108-111.
- Lam, T.J., 1983. Environmental influences on gonadal activity in fish. In Hoar, W. S., Randall, C., et Donaldson, E. M. (Eds.) : Fish physiology, Vol. IX. Academic Press : New York, pp. 65-116.

- Larsen, D.A., Beckman, B.R., et Dickhoff, W.W., 2001. The effect of low temperature and fasting during the winter on metabolic stores and endocrine physiology (insulin, insulin-like growth factor-I, and thyroxine) of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology* 123 (3), 308-323.
- Lazard, J., Lecomte, Y., Stomal, B., et Weigel, J.-Y., 1991. Pisciculture en Afrique subsaharienne: situations et projets dans des pays francophones, propositions d'action. Ministère de la Coopération et du Développement : Paris. 155 p.
- Le Bail, P.Y., 1988. Growth-reproduction interactions in salmonids. In Zohar, Y. et Breton, B. (Eds.) : Reproduction in fish. INRA : Paris, pp. 91-108.
- Le Gac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P.Y., Loir, M., Mourot, B., et Weil, C., 1993. Growth hormone (GH) and reproduction : a review. *Fish Physiology and Biochemistry* 11 (1-6), 219-232.
- Le Gac, F., Gomez, J. M., Fostier, A., Weil, C., and Le Bail, P.-Y., 2000. Changes in plasma levels of IGF-I and IGF-II, and in testicular IGF-I and II mRNA during the first gonadal maturation in rainbow trout. In Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L., Andersson, E., and Stefansson, S. O. (Eds.) : Proceedings of the 6th international symposium on the reproductive physiology of Fish, Institute of Marine Research : Bergen, pp. 263
- Legendre, M. et Jalabert, B., 1988. Physiologie de la reproduction. In Lévêque, C., Bruton, N. M., et Ssentongo, G. W. (Eds.) : Biologie et écologie des poissons d'eau douce africains. ORSTOM : Paris, pp. 153-187.
- Lesel, R., 1993. Does a digestive active bacterial flora exist in fish ? In Kaushik, S. et Luquet, P. (Eds.) : Fish nutrition in practice. INRA : Paris, pp. 655-664.
- Lesel, R., Fromageot, C., et Lesel, M., 1986. Cellulose digestibility in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* and in goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture* 54 (1-2), 11-17.
- Levavi-Zermonsky, B. et Yaron, Z., 1986. Changes in gonadotropin and ovarian steroids associated with oocytes maturation during spawning induction in the carp. *General and Comparative Endocrinology* 62 (1), 89-98.
- Lévêque, C. et Paugy, D., 1984. Guide des poissons d'eau douce de la zone du programme de lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'ouest. ORSTOM : Paris. 367 p.
- Lin, H.R., Van der Kraak, G., Zhou, X.J., Liang, J.Y., Peter, R.E., Rivier, J.E., et Vale, W.W., 1988. Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A) and [D-Ala6, Pro9NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. *General and Comparative Endocrinology* 69 (1), 31-40.
- Lin, X.-W., Lin, H.R., et Peter, R.E., 1996. Direct influences of temperature on gonadotropin-II release from perfused pituitary fragments of common carp (*Cyprinus carpio* L.) *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 114A (4), 341-347.
- Lowe-McConnell, R.H., 1979. Ecological Aspects of Seasonality in Fishes of Tropical Waters. In Miller, P. J. (Eds.) : Fish Phenology. Academic Press : London, pp. 219-241.
- Ma, Y., Kjesbu, O.S., et Jorgensen, T., 1998. Effects of ration on the maturation and fecundity in captive Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 55 (4), 900-908.
- Maestro, M.A., Mendez, E., Parrizas, M., et Gutierrez, J., 1997. Characterization of insulin and insulin-like growth factor-I ovarian receptors during the reproductive cycle of carp (*Cyprinus carpio*). *Biology of Reproduction* 56 (5), 1126-1132.

- Makeyeva, A.P. et Yemel'yanova, N.G., 1989. Periodization of oogenesis in cyprinids. *Journal of Ichthyology* 29 (8), 55-67.
- Mananos, E.L., Zanuy, S., Le Menn, F., Carrillo, M., et Nunez, J., 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I- Induction, purification and partial characterisation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 107B (2), 205-216.
- Manning, N.J. et Kime, D.E., 1984. Temperature regulation of ovarian steroid production in the common carp, *Cyprinus carpio* L., *in vivo* and *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* 56 (3), 376-388.
- Marchant, T.A. et Peter, R.E., 1986. Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Experimental Zoology* 237 (2), 231-239.
- Mazoyer, M. et Roudart, L., 1997. Histoire des agricultures du monde du néolithique à la crise contemporaine. Seuil : Paris. 533 p.
- Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., et Yaron, Z., 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 119C (3), 325-338.
- Mellinger, J., 2002. Sexualité et reproduction des poissons. CNRS Editions : Paris. 349 p.
- Mironova, N.V., 1977. Energy expenditure on egg production in young *Tilapia mossambica* and the influence of maintenance condition on their reproductive intensity. *Journal of Ichthyology* 17 (4), 627-633.
- Miwa, S., Yan, L., et Swanson, P., 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by *in vitro* ligand autoradiography. *Biology of Reproduction* 50 (3), 629-642.
- Montero, M. et Dufour, S., 1996. Gonadotropin-releasing hormones (GnRH) in fishes: evolutionary data on their structure, localization, regulation, and function. *Zoological Studies* 35 (3), 149-160.
- Moreau, J., Arrignon, J., et Jubb, R.A., 1988. Les introductions d'espèces étrangères dans les eaux continentales africaines. Intérêt et limites. In Lévêque, C., Bruton, N. M., et Ssentongo, G. W. (Eds.) : Biologie et écologie des poissons d'eau douce africains. ORSTOM : Paris, pp. 395-425.
- Moreau, J. et Costa Pierce, B., 1997. Introduction and present status of exotic carps in Africa. *Aquaculture Research* 28 (9), 717-712.
- Morissens, P., Oswald, M., Sanchez, F., et Hem, S., 1993. Approche de nouveaux modèles d'exploitation piscicole adaptés au contexte rural ivoirien. *Iclarm Conference Proceedings* 41, 118-128.
- Morita, K. et Morita, S.H., 2002. Rule of age and size at maturity: individual variation in the maturation history of resident white-spotted charr. *Journal of Fish Biology* 61, 1230-1238.
- Mourot, B. et Le Bail, P.Y., 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin. *Journal of Immunoassay* 16 (4), 365-377.
- Munro, A.D., 1990. General introduction. In Munro, A. D., Scott, A. P., et Lam, T. J. (Eds.) : Reproductive Seasonality in Teleosts : environmental influences. CRC Press : Boca raton, USA, pp. 1-11.
- Munro, A. D., Scott, A. P., et Lam, T. J., 1990. Reproductive Seasonality in Teleosts : environmental influences. CRC Press : Boca Raton, USA. 241 p.

- Nagahama, Y., 1987. 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one : a teleost maturation-inducing substance. *Development Growth and Differentiation* 29, 1-12.
- Nagahama, Y., 1997. 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62 (1), 190-196.
- Nagahama, Y., Kagawa, H., et Young, G., 1985. Stimulation of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one production in the granulosa cells of amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, by cyclic nucleotids. *Journal of Experimental Zoology* 236, 371-375.
- Nagahama, Y. et Yamashita, M., 1989. Mechanisms of synthesis and action of 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a teleost maturation-inducing substance. *Fish Physiology and Biochemistry* 7 (1-4), 193-200.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., et Tanaka, M., 1994. Regulation of oocyte maturation in fish. In Sherwood, N. M. et Hew, C. L. (Eds.) : Fish Physiology, vol. XIII. Academic Press : New York, pp. 393-439.
- Nandi, S., Chattopadhyay, D.N., Verma, J.P., Sarkar, S.K., et Mukhopadhyay, P.K., 2001. Effect of dietary supplementation of fatty acids and vitamins on the breeding performance of the carp *Catla catla*. *Reproduction, Nutrition, Development* 41 (4), 365-375.
- Nozaki, M., Naito, N., Swanson, P., Miyata, K., Nakai, Y., Oota, Y., Suzuki, K., et Kawauchi, H., 1990. Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. *General and Comparative Endocrinology* 77 (3), 348-357.
- Nunez-Rodriguez, J., Dugué, R., Otémé, Z.J., Hem, S., et Le Menn, F., 1997. Vitellogenin plasma levels in two cultured African catfish species, *Chrysichthys nigrodigitatus* (Claroteidae) and *Heterobranchus longifilis* (Claridae). *Aquatic Living Resources* 10, 231-238.
- Nunez-Rodriguez, J., Suzuki, K., Peter, R. E., and Kawauchi, H., 1992. Effects of common carp GTH-I and GTH-II on vitellogenesis and vitellogenin uptake in goldfish (*Carassius auratus*). In Abstracts, Second International Symposium on Fish Endocrinology, June 1-4, 1992, St Malo,-L51.
- Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Yoshikuni, M., Kawauchi, H., et Nagahama, Y., 1999a. Cloning, functional characterization, and expression of a gonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263 (2), 584-590.
- Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Yoshikuni, M., Kawauchi, H., et Nagahama, Y., 1999b. The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and functional characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265 (2), 366-371.
- Ohta, K., Yamaguchi, S., Yamaguchi, A., Gen, K., Okuzawa, K., Kagawa, H., et Matsuyama, M., 2002. Biosynthesis of steroids in ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major* (Sparidae, Teleostei) during final oocyte maturation and the relative effectiveness of steroid metabolites for germinal vesicle breakdown *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 133 (1), 45-54.
- Omeljaniuk, R.J., Habibi, H.R., et Peter, R.E., 1989. Alterations in pituitary GnRH and dopamine receptors associated with the seasonal variation and regulation of gonadotropin release in the goldfish (*Carassius auratus*). *General and Comparative Endocrinology* 74 (3), 392-399.
- Onitake, K. et Iwamatsu, T., 1986. Immunocytochemical demonstration of steroid hormones in the granulosa cells of the medaka, *Oryzias latipes*. *Journal of Experimental Zoology* 239 (1), 97-103.

- Oswald, M. 1997. Crises et recomposition de la société rurale Bété. Thèse, Institut National Agronomique de Paris-Grignon, Paris.
- Pang, Y. et Ge, W., 2002. Gonadotropin and activin enhance maturational competence of oocytes in the zebrafish (*Danio rerio*). *Biology of Reproduction* 66 (2), 259-265.
- Pankhurst, N.W., Purser, G.J., Van der Kraak, G., Thomas, P.M., et Forteach, G.N.R., 1996. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and *in vitro* ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 146, 277-290.
- Parhar, I.S., Tosaki, H., Sakuma, Y., et Kobayashi, M., 2001. Sex differences in the brain of goldfish: gonadotropin-releasing hormone and vasotocinergic neurons. *Neuroscience* 104 (4), 1099-1110.
- Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, G.A., et Sullivan, C.V., 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 123 (2), 113-:25.
- Patino, R., Yoshizaki, G., Thomas, P., et Kagawa, H., 2001. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 129 (2-3), 427-439.
- Perazzolo, L.M., Coward, K., Davail, B., Normand, E., Tyler, C.R., Pakdel, F., Schneider, W.J., et Le Menn, F., 1999. Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin receptor in ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biology of Reproduction* 60 (5), 1057-1068.
- Perez-Sanchez, J. et Bail, P., 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177 (1/4), 117-128.
- Perez-Sanchez, J., Marti-Palanca, H., et Kaushik, S., 1995. Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Nutrition* 125 (3), 546-552.
- Peter, R.E., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., Omeljaniuk, R.J., Sokolowska, M., Shih, S.H., et Billard, R., 1986. Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Recent Progress in Hormone Research* 42, 513-548.
- Peter, R.E., Lin, H.R., et Van der Kraak, G., 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture* 74 (1-2), 1-10.
- Peter, R.E., Sokolowska, M., Nahorniak, C.S., Rivier, J.E., et Vale, W.W., 1987. Comparison of [D-Arg⁶, Trp⁷, Leu⁸, Pro⁹ NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A) and [D-Ala⁶, Pro⁹ NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A) in combination with pimozide, in stimulating gonadotropin release and ovulation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Canadian Journal of Zoology* 65, 987-991.
- Petrino, T.R., Greeley, M.S., Jr., Selman, K., Lin, Y.W., et Wallace, R.A., 1989. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. II. Production of 17 alpha-hydroxy-20 beta-dihydroprogesterone, testosterone, and 17 beta-estradiol by various components of the ovarian follicle. *General and Comparative Endocrinology* 76 (2), 230-240.
- Peyon, P., Zanuy, S., et Carrillo, M., 2001. Action of leptin on *in vitro* luteinizing hormone release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction* 65 (5), 1573-1578.

- Pierce, A., Beckman, B., Shearer, K., Larsen, D., et Dickhoff, W., 2001. Effects of ration on somatotrophic hormones and growth in coho salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128 (2), 255-264.
- Pinter, J. et Thomas, P., 1999. Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17,20 beta ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout. *General and Comparative Endocrinology* 115 (2), 200-209.
- Planas, J.V., Athos, J., Goetz, F.W., et Swanson, P., 2000. Regulation of ovarian steroidogenesis *in vitro* by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. *Biology of Reproduction* 62 (5), 1262-1269.
- Post, J.R. et McQueen, D.J., 1994. Variability in first-year growth of yellow perch (*Perca flavescens*): Predictions from a simple model, observations, and an experiment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* vol. 51 (no. 11), 2501-2512.
- Quérat, B., 1994. Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. In Davey, K. G., Peter, R. E., et Tobe, S. S. (Eds.) : Perspectives in Comparative Endocrinology. National Research Council of Canada : Ottawa, pp. 27-35.
- Razani, H., Hanyu, I., et Aida, K., 1988. Environmental influences on ovarian activity and related hormones in yearling goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54 (9), 1505-1511.
- Reynolds, W.W. et Casterlin, M.E., 1977. Temperature preference of four species in an electronic thermoregulatory shuttlebox. *The Progressive Fish-Culturist* 39 (3), 123-125.
- Richter, C. J. J., Eding, E. H., Leuven, S. E. W., and van der Wijst, J. G. M., 1982. Effects of feeding levels and temperature on the development of the gonad in the african catfish *Clarias lazera* (C & V). In Reproductive Physiology of fishes, 1982, Wageningen, pp. 147-150.
- Rinchard, J., Kestemont, P., Kuhn, E.R., et Fostier, A., 1993. Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish the gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae). *General and Comparative Endocrinology* 92 (2), 168-178.
- Rinchard, J., Poncin, P., et Kestemont, P., 1998. Croissance ovocytaire et régulation stéroïdienne chez les poissons à pontes uniques et multiples : une revue. *Annales de Limnologie* 34 (2), 211-225.
- Rottman, R.W. et Shireman, J.V., 1985. The use of synthetic LH-RH analogue to spawn Chinese carps. *Aquaculture and Fisheries Management* 16 (1), 1-6.
- Saligaut, C., Linard, B., Breton, B., Anglade, I., Bailhache, T., Kah, O., et Jégo, P., 1999. Brain aminergic systems in salmonids and other teleosts in relation to steroid feedback and gonadotropin release. *Aquaculture* 177 (1/4), 13-20.
- Saligaut, C., Linard, B., Mananos, E.L., Kah, O., Breton, B., et Govoroun, M., 1998. Release of pituitary gonadotrophins GtH I and GtH II in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): modulation by estradiol and catecholamines. *General and Comparative Endocrinology* 109 (3), 302-309.
- Santos, A.J.G., Furukawa, K., Kobayashi, M., Bando, K., Aida, K., et Hanyu, I., 1986. Plasma gonadotropin and steroid hormone profiles during ovulation in the carp *Cyprinus carpio*. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries* 52 (7), 1159-1166.
- Schulz, R.W., Vischer, H.F., Cavaco, J.E.B., Santos, E.M., Tyler, C.R., Goos, H.J.T., et Bogerd, J., 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 129 (2/3), 407-417.

- Schwarz, F. et Kirchgessner, M., 1993. Influence of different carbohydrates on digestibility, growth and carcass composition of carp (*Cyprinus carpio* L.). In Kaushik, S. et Luquet, P. (Eds.) : Fish nutrition in practice. INRA : Paris, pp. 475-478.
- Scott, D.B.C., 1979. Environmental timing and the control of reproduction in teleost fish. In Miller, P. J. (Eds.) : Fish Phenology. Academic Press : London, pp. 105-132.
- Sen, P.R., Rao, N.G.S., Chakrabarty, R.D., Kar, S.L., et Jena, S., 1978. Effect of additions of fertilizer and vegetation on growth of major Indian carps in ponds containing grass carp. *Progressive Fish Culturist* 40 (2), 69-70.
- Sen, U., Mukherjee, D., Bhattacharyya, S.P., et Mukherjee, D., 2002. Seasonal changes in plasma steroid levels in Indian major carp *Labeo rohita*: influence of homologous pituitary extract on steroid production and development of oocyte maturational competence. *General and Comparative Endocrinology* 128 (2), 123-134.
- Shelton, W.L., Smitherman, R.O., et Jensen, G.L., 1981. Density related growth of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.) in managed small impoundments in Alabama. *Journal of Fish Biology* 18, 45-51.
- Shireman, J.V., Colle, D.E., et Rottman, R.W., 1977. Intensive culture of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, in circular tanks. *Journal of Fish Biology* 11, 267-272.
- Shireman, J.V., Colle, D.E., et Rottman, R.W., 1978. Growth of grass carp fed natural and prepared diets under intensive culture. *Journal of Fish Biology* 12, 457-463.
- Shireman, J. V. et Smith, C. R., 1983. Synopsis of biological data on the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Cuvier and Valenciennes, 1844). FAO : Rome. 86 p.
- Siddiqui, A.Q., Al-Hafedh, Y.S., et Ali, S.A., 1998. Effects of dietary protein level on the reproductive performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research* 29, 349-358.
- Siddiqui, A.Q., Al-Harbi, A.H., et Al-Hafedh, Y.S., 1997. Effects of food supply on size at first maturity, fecundity and growth of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) x *Oreochromis aureus* (Steindachner) in outdoor concrete tanks in Saudi Arabia. *Aquaculture Research* 28, 341-349.
- Silverstein, J.T., Shimma, H., et Ogata, H., 1997. Early maturity in amago salmon (*Onchorhynchus masu ishikawai*) : an association with energy storage. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 444-451.
- Sohn, Y.C., Suetake, H., Yoshiura, Y., Kobayashi, M., et Aida, K., 1998a. Structural and expression analyses of gonadotropin Ibeta subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*). *Gene* 222 (2), 257-267.
- Sohn, Y.C., Yoshiura, Y., Kobayashi, M., et Aida, K., 1998b. Effects of water temperature and food limitation on pituitary gonadotropin and thyrotropin subunit mRNA levels in the female goldfish *Carassius auratus*. *Fisheries Science* 64 (5), 700-706.
- Sohn, Y.C., Yoshiura, Y., Kobayashi, M., et Aida, K., 1999. Seasonal changes in mRNA levels of gonadotropin and thyrotropin subunits in the goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology* 113 (3), 436-444.
- Stacey, N.E., 1984. Control of the timing of ovulation by exogenous and endogenous factors. In Fish reproduction: strategies and tactics. Academic Press : London, pp. 207-222.
- Stacey, N.E., Cook, A.F., et Peter, R.E., 1979a. Ovulatory surge of gonadotropin in the goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology* 37 (2), 246-249.

- Stacey, N.E., Cook, A.F., et Peter, R.E., 1979b. Spontaneous and gonadotropin-induced ovulation in the goldfish, *Carassius auratus* L. : effects of external factors. *Journal of Fish Biology* 15, 349-361.
- Stanley, J.G., Miley, W.W., Jr., et Sutton, D.L., 1978. Reproductive requirements and likelihood for naturalization of escaped grass carp in the United States. *Transactions of the American Fisheries Society* 107 (1), 119-128.
- Stifani, S., Le Menn, F., Rodriguez, J.N., et Schneider, W.J., 1990. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1045 (3), 271-279.
- Suzuki, K., Kawauchi, H., et Nagahama, Y., 1988. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *General and Comparative Endocrinology* 71 (2), 292-301.
- Tan, Y.T., 1970. Composition and nutritive value of some grasses, plants and aquatic weeds tested as diet. *Journal of Fish Biology* 2, 253-257.
- Thomas, P. et Das, S., 1997. Correlation between binding affinities of C21 steroids for the maturation-inducing steroid membrane receptor in spotted seatrout ovaries and their agonist and antagonist activities in an oocyte maturation bioassay. *Biology of Reproduction* 57 (5), 999-1007.
- Thomas, P., Pinter, J., et Das, S., 2001. Upregulation of the maturation-inducing steroid membrane receptor in spotted seatrout ovaries by gonadotropin during oocyte maturation and its physiological significance. *Biology of Reproduction* 64 (1), 21-29.
- Thomas, P., Zhu, Y., et Pace, M., 2002. Progestin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids* 67 (6), 511-517.
- Thorpe, J.E., Talbot, C., Miles, M.S., et Keay, D.S., 1990. Control of maturation in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar*, in pumped seawater tanks, by restricting food intake. *Aquaculture* 86 (2/3), 315-326.
- Toguyeni, A., Baroiller, J., Fostier, A., Bail, P., Kuhn, E., Mol, K., et Fauconneau, B., 1996. Consequences of food restriction on short-term growth variation and on plasma circulating hormones in *Oreochromis niloticus* in relation to sex. *General and Comparative Endocrinology* 103 (2), 167-175.
- Trudeau, V.L., 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Reviews of Reproduction* 2 (1), 55-68.
- Tyler, C.R. et Sumpter, J.P., 1990. The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry* 8 (2), 111-120.
- Valente, L.M.P., Le Bail, P.-Y., Gomes, E.F.S., et Fauconneau, B., 2003. Hormone profile in fast- and slow-growing strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to nutritional state. *Aquaculture* 219 (1-4), 829-839.
- Van der Kraak, G., Rosenblum, P.M., et Peter, R.E., 1990. Growth hormone-dependent potentiation of gonadotropin-stimulated steroid production by ovarian follicles of the goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 79 (2), 233-239.
- Van der Kraak, G., Suzuki, K., Peter, R.E., Itoh, H., et Kawauchi, H., 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *General and Comparative Endocrinology* 85 (2), 217-229.
- van Dyke, J.M. et Sutton, D.L., 1977. Digestion of duckweed (*Lemna* spp.) by the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Journal of Fish Biology* 11, 273-278.

- Weber, G.M., King, V., Clark, R.W., Hodson, R.G., et Sullivan, C.V., 2000. Morpho-physiological predictors of ovulatory success in captive striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture* 188 (1/2), 133-146.
- Weeks, S.C. et Meffe, G.K., 1996. Quantitative genetic and optimality analyses of life-history plasticity in the eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Evolution* 50 (3), 1358-1365.
- Weil, C., Breton, B., Sambroni, S., Zmora, N., et Zohar, Y., 1992. *In vitro* bioactivities of various forms of GnRH in relation to their susceptibility to degradation at the pituitary level in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 87 (1), 33-43.
- Weil, C., Carre, F., Blaise, O., Breton, B., et Bail, P., 1999. Differential effect of insulin-like growth factor I on *in vitro* gonadotropin (I and II) and growth hormone secretions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the reproductive cycle. *Endocrinology* 140 (5), 2054-2062.
- Weil, C., Fostier, A., Horvath, L., Marlot, S., et Berscenyi, M., 1980. Profiles of plasma gonadotropin and 17 beta-estradiol in the common carp, *Cyprinus carpio* L., as related to spawning induced by hypophysation or LH-RH treatment. *Reproduction Nutrition Développement* 20 (4A), 1041-1050.
- Weil, C., Hansen, P., Hyam, D., Gac, F.I., Breton, B., et Crim, L.W., 1986. Use of pituitary cells in primary culture to study the regulation of gonadotropin hormone (GtH) secretion in rainbow trout: setting up and validating the system as assessed by its responsiveness to mammalian and salmon gonadotropin releasing hormone. *General & Comparative Endocrinology* 62 (2), 202-209.
- Weil, C., Le Bail, P.Y., Sabin, N., et Le Gac, F., 2003. *In vitro* action of leptin on FSH and LH production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the sexual cycle. *General and Comparative Endocrinology* 130 (1), 2-12.
- Wootton, R.J., 1979. Energy Cost of Egg Production and Environmental Determinants of Fecundity in Teleost Fishes. In Miller, P. J. (Eds.) : *Fish Phenology*. Academic Press : London, pp. 133-159.
- Wootton, R. J., 1982. Environmental factors in fish reproduction. In *Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, Wageningen, pp. 210-219.
- Yakupitiyage, A., 1993. Constraints to the use of plant fodder as fish feed in tropical small-scale tilapia culture systems: an overview. In Kaushik, S. et Luquet, P. (Eds.) : *Fish nutrition in practice*. INRA : Paris, pp. 681-689.
- Yan, L., Swanson, P., et Dickhoff, W.W., 1992. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). *Biology of Reproduction* 47 (3), 418-427.
- Yaron, Z., 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture* 129, 49-73.
- Yoshikuni, M. et Nagahama, Y., 1994. Involvement of an Inhibitory G-Protein in the Signal Transduction Pathway of Maturation-Inducing Hormone (17[alpha],20[beta]-dihydroxy-4-pregnen-3-one) Action in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Oocytes. *Developmental Biology* 166 (2), 615-622.
- Yoshikuni, M., Shibata, N., et Nagahama, Y., 1993. Specific binding of [³H]17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one to oocyte cortices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* 11, 15-24.
- Yoshiura, Y., Kobayashi, M., Kato, Y., et Aida, K., 1997. Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin beta subunits (GTH-I beta and -II beta) from the goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology* 105 (3), 379-389.

- Young, G., Adachi, S., et Nagahama, Y., 1986. Role of ovarian thecal and granulosa layers in gonadotropin-induced synthesis of a salmonid maturation-inducing substance (17 alpha, 20 beta -dihydroxy-4-pregnen-3-one). *Developmental Biology* 118 (1), 1-8.
- Young, G., Crim, L.W., Kagawa, H., Kambegawa, A., et Nagahama, Y., 1983a. Plasma 17alpha,20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): correlation with plasma gonadotropin and *in vitro* production by ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology* 51 (1), 96-105.
- Young, G., Kagawa, H., et Nagahama, Y., 1983b. Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cells of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) associated with final oocyte maturation. *Biology of Reproduction* 29 (2), 310-315.
- Zohar, Y., Goren, A., Fridkin, M., Elhanati, E., et Koch, Y., 1990. Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. II. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH, and their analogs in the pituitary, kidney, and liver. *General and Comparative Endocrinology* 79 (2), 306-319.
- Zohar, Y. et Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197 (1-4), 99-136.
- Zonneveld, N., 1984. The spawning season and the relation between temperature and stripping time of grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.) in Egypt. *Bamidgeh* 36 (1), 21-28.
- Zonneveld, N. et Van Zon, H., 1985. The biology and culture of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), with special reference to their utilisation for weed control. In Muir, J. F. et Roberts, R. J. (Eds.) : Recent Advances in Aquaculture. Blackwell science : London, pp. 119-187.

VU :

Le directeur de thèse

VU :

Le responsable de l'École Doctorale

VU pour autorisation de soutenance
Rennes, le
Le président de l'Université de Rennes 1

Patrick Navatte

Vu après soutenance pour autorisation de publication :
Le président de Jury,

L'influence des facteurs externes sur la reproduction de la carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella*) en zone tropicale : une approche descriptive et expérimentale.

Frédéric Glasser

La carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella*) est utilisée en pisciculture extensive en Côte d'Ivoire car elle a de bonnes performances de croissance à partir d'une alimentation uniquement végétale. La production d'alevins par induction de ponte est cependant limitée par le faible nombre de femelles en fin de vitellogénèse et les mauvais taux de réponse aux inductions. Dans l'hypothèse où les conditions d'élevage seraient responsables de ces dysfonctionnements, nous avons décrit les cycles sexuels pour identifier les étapes sensibles. Nous avons montré que les cycles sont désynchronisés, que leur durée est très variable, que l'on observe des blocages en début de vitellogénèse et des ovocytes en fin de vitellogénèse atypiques. Par une approche expérimentale, nous avons cherché à évaluer l'impact des hautes températures sur l'axe reproducteur et l'influence du régime alimentaire sur l'apparition de la puberté et le déroulement des cycles sexuels. Des expérimentations *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence un impact thermique à différents niveaux de l'axe reproducteur : sur la libération de la gonadotropine (LH) par l'hypophyse et sur les dernières étapes de la maturation ovarienne (acquisition de la compétence des follicules à maturer, maturation ovocytaire et probablement ovulation). Des inductions de ponte en température contrôlée ont montré une réduction des taux d'ovulation à 28°C (10%) par rapport à 24°C (36%). Une complémentation du régime herbacé par un aliment composé a avancé la puberté à l'âge de 18 mois et demi (soit 3,5 mois avant les poissons alimentés uniquement à l'herbe) et a augmenté le nombre de femelles débutant la vitellogénèse, mais n'a pas modifié le déroulement des cycles. Enfin, nous avons comparé les résultats de différents protocoles d'induction de ponte. Finalement, nous montrons qu'une meilleure alimentation augmente significativement le nombre de femelles disponibles pour les inductions de ponte, et qu'une température fraîche favorise la maturation finale et l'ovulation chez la carpe herbivore. Ces résultats pourront être utilisés pour l'amélioration de la production d'alevins en Côte d'Ivoire.

The influence of external factors on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reproduction in tropical conditions : a descriptive and experimental approach

Frédéric Glasser

Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is used in small-scale fish farming in the Ivory Coast for its good growth potential when fed grass. Induced spawning for fry production is limited by the low rate of post-vitellogenic females and the low ovulation rate after induction. Assuming that environmental factors were responsible for these disruptions, we first described sexual cycles in order to determine sensitive steps. We showed that cycles are unsynchronised and that their duration is highly variable. We observed females blocked at the beginning of vitellogenesis and atypical mature oocytes. Through an experimental approach, we tried to assess the effects of high temperature on the reproductive axis and dietary influences on puberty and sexual cycles. *In vivo* and *in vitro* experiments showed effects of temperature at various levels of the reproductive axis : on gonadotropin (LH) release from the pituitary and on the last steps of ovarian maturation (follicle maturational competence acquisition, oocyte maturation and probably ovulation). Artificial spawning experiments conducted at 24 and 28°C showed reduced ovulation rates at 28°C (10%) compared to 24°C (36%). Supplementary feeding with formulated diet advanced puberty to the age of 18.5 months (i.e. 3.5 months in advance), and increased the number of females beginning vitellogenesis, but did not improve sexual cycle progress. At last, we compared the results of different spawning induction protocols. As a conclusion, we showed that a better diet increased the number of females available for spawning induction, and that a lower temperature facilitates final maturation and ovulation in grass carp. These results could be useful for fry production improvement in the Ivory Coast.