

# LE DÉVELOPPEMENT DES ŒUFS DU SPHÉROÏDE ANNELÉ (*Sphaeroides annulatus*, Jenyns 1834) : EFFET DE LA QUALITÉ DE L'EAU ET DE L'INCUBATEUR SUR LE TAUX D'ÉCLOSION

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Cédric KOMAR**

Né, le 15 janvier 1975 à TOULOUSE (Haute-Garonne)

---

Directeur de thèse : M. le Professeur Yves LIGNEREUX

---

**JURY**

PRESIDENT :

**M. Jean-Louis FONVIEILLE**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

**M. Yves LIGNEREUX**

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**M. Jacques DUCOS de LAHITTE**

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur par intérim	: M.	<b>G. BONNES</b>
Directeurs honoraires.....	: M.	<b>R. FLORIO</b>
	M.	<b>R. LAUTIE</b>
	M.	<b>J. FERNEY</b>
	M.	<b>G. VAN HAVERBEKE</b>
Professeurs honoraires.....	: M.	<b>A. BRIZARD</b>
	M.	<b>L. FALIU</b>
	M.	<b>C. LABIE</b>
	M.	<b>C. PAVAU</b>
	M.	<b>F. LESCURE</b>
	M.	<b>A. RICO</b>

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **ECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2<sup>e</sup> CLASSE**

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

**PROFESSEUR ASSOCIE**

- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

## PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*  
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

## MAITRES DE CONFERENCES 1<sup>ère</sup> CLASSE

- M. **ASIMUS Erick**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS- BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **GAYRARD Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

## MAITRES DE CONFERENCES 2<sup>e</sup> CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **HAY Magali**, *Zootéchnie*  
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*  
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
Mlle **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

## **DEDICACES JURY**

À NOTRE PRESIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur FONVIEILLE  
Faculté de Pharmacie - Unité de Parasitologie et Mycologie  
Université Paul Sabatier

*Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury*

*Hommage respectueux*

À NOTRE JURY DE THÈSE

Monsieur le Professeur LIGNEREUX  
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Anatomie

*Qui nous a soutenu et encouragé dans l'élaboration de notre thèse*

Monsieur le Professeur DUCOS-DE-LAHITTE  
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Parasitologie et maladies parasitaires

*Qui nous a fait l'honneur d'être membre de notre jury de thèse*

*En témoignage de reconnaissance et de respect*



*A mes parents, pour leur soutien tout au long de ma scolarité*

*A Lauke, pour le bonheur qu'elle m'apporte chaque jour*

*A Marion, Jean-Louis et Orla, pour tous les moments partagés*

*A Jean et Cathy pour leur gentillesse, leur accueil, et leur gentille maison.*



## TABLE DES MATIERES

<b><u>DEDICACES JURY</u></b> .....	3
<b><u>REMERCIEMENTS</u></b> .....	4
<b><u>TABLE DES MATIERES</u></b> .....	5
<b><u>1. Introduction</u></b> .....	8
<i><u>1.1 L'importance de l'aquaculture</u></i> .....	8
<i><u>1.2 L'avenir de l'aquaculture : commercialisation de nouvelles espèces</u></i>	
<i><u>1.3 Le potentiel du poisson-globe dans l'aquaculture mexicaine</u></i> .....	9
<i><u>1.4 Les critères de selection utilisés pour déterminer si une espèce est bonne pour l'aquaculture</u></i> .....	11
<i><u>1.5 Les facteurs influençant la ponte des poissons-globe dans la nature</u></i>	
<i><u>1.6 Les facteurs influençant la ponte des poissons-globe en captivité</u></i> .....	14
<i><u>1.7 Ponte et fécondation artificielle chez les poissons-globe</u></i> .....	16
<i><u>1.8 La qualité des œufs</u></i>	
<i><u>1.9 Objectifs de l'étude</u></i> .....	21
<i><u>1.10 Hypothèses</u></i> .....	23
<b><u>2. Matériels et Méthodes</u></b> .....	24
<i><u>2.1 Les reproducteurs</u></i> .....	24
<i><u>2.2 Induction hormonale des femelles</u></i> .....	26
<i><u>2.3 Sélection des mâles</u></i> .....	29
<i><u>2.4 Fécondation artificielle</u></i> .....	31
<i><u>2.5 Le système expérimental</u></i> .....	32
<i><u>2.6 Description des différentes expériences</u></i> .....	39
<i><u>2.7 Les expériences réalisées</u></i> .....	40
<i><u>2.8 Evaluation de la qualité des œufs</u></i> .....	42
<i><u>2.9 Techniques utilisées pour la bactériologie</u></i> .....	44
<i><u>2.10 Analyses statistiques</u></i> .....	46
<b><u>3. Résultats</u></b> .....	47

<i>3.1 Le développement embryonnaire des œufs du sphéroïde annelé</i> .....	47
<i>3.2 Résultats des autres expériences</i> .....	53
<b>4. Discussion</b> .....	<b>71</b>
<i>4.1 Le développement embryonnaire de l'œuf du sphéroïde annelé</i> .....	71
<i>4.2 Mise en place et standardisation du système d'incubation</i>	
<i>4.3 Effet du type d'incubateur sur le taux d'éclosion et la charge bactérienne</i> .....	74
<i>4.4 Recommandations à venir</i> .....	78
<i>4.5 Conclusion</i> .....	79
<b>LISTE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>80</b>

## TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1.1 : Classification taxonomique du sphéroïde annelé</i> .....	9
<i>Tableau 1.2 : Principe des différentes expériences réalisées</i> .....	22
<i>Tableau 2.1 : Composition de la ration donnée aux reproducteurs</i> .....	25
<i>Tableau 2.2 : Protocole d' injection de LHRHa utilisé pour Exp1a, Exp2a, Exp3a, Exp3b</i> .....	28
<i>Tableau 2.3 : Identification des femelles reproductrices utilisées dans les différentes expériences</i> .....	29
<i>Tableau 3.1 : Résultats des tests d'identification bactérienne pratiqués sur les incubateurs statique sans UV<sup>UV</sup> (SF), statique avec aération et sans UV (OF) et avec renouvellement de l'eau sans UV (FTF)</i> .....	54
<i>Tableau 3.2 : Résultats des tests statistiques déterminant les différences entre la charge bactérienne des 4 traitements de l'expérience 3a</i> .....	67
<i>Tableau 3.3 : Résultats des tests statistiques déterminant les différences entre la charge bactérienne des 4 traitements de l'expérience 3b</i> .....	68

## TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1.1 : Reproducteur sphéroïde annelé</i> .....	10
<i>Figure 2.1 : Prélèvement des oocytes d'une femelle</i> .....	32
<i>Figure 2.2 : Adhésion des œufs à la lame en verre</i> .....	33
<i>Figure 2.3 : Incubateur avec renouvellement de l'eau</i> .....	35
<i>Figure 2.4 : Le bac contenant les différents incubateurs</i> .....	37

<i>Figure 3 : œuf de sphéroïde annelé</i>	47
<i>Figure 3.1 : Evolution de l'oxygène dissous dans les incubateurs témoins des 3 types de systèmes testés pour l'exp. 1a</i>	53
<i>Figure 3.2 : Evolution de la charge bactérienne dans l'eau des incubateurs pour l'exp. 1a</i>	55
<i>Figure 3.3 : Charge bactérienne dans l'eau des incubateurs des systèmes SF, OF et FTF au dernier jour de l'expérience 1a</i>	55
<i>Figure 3.4 : Evolution de la charge bactérienne dans les œufs des incubateurs témoins de l'exp.1a</i>	56
<i>Figure 3.5 : Taux d'éclosion et taux de survie observés dans les différents traitements SF, OF, FTF à l'issue de l'Exp. 1a</i>	57
<i>Figure 3.6 : Evolution de l'oxygène dissous dans les incubateurs témoins des 3 types de systèmes testés dans l'exp.1b</i>	58
<i>Figure 3.7 : Evolution de la charge bactérienne dans l'eau des incubateurs pour l'exp. 1b</i>	59
<i>Figure 3.8 : Charge bactérienne dans l'eau des incubateurs des systèmes SF, OF et FTF au dernier jour de l'expérience 1b</i>	59
<i>Figure 3.9 : Evolution de la charge bactérienne dans les œufs des incubateurs témoins de l'exp.1b</i>	60
<i>Figure 3.10 : Taux d'éclosion et taux de survie observés dans les différents traitements SF, OF, FTF à l'issue de l'Exp. 1b</i>	61
<i>Figure 3.11 : Evolution de l'oxygène dissous dans les incubateurs témoins des 3 types de systèmes testés dans l'exp.2</i>	62
<i>Figure 3.12 : Evolution de la charge bactérienne dans l'eau des incubateurs pour l'exp. 2</i>	63
<i>Figure 3.13 : Charge bactérienne dans l'eau des incubateurs des systèmes SF, OF et FTF au dernier jour de l'expérience exp. 2</i>	63
<i>Figure 3.14 : Evolution de la charge bactérienne dans les œufs des incubateurs témoins de l'exp.2</i>	64
<i>Figure 3.15 : Taux d'éclosion et taux de survie observés dans les différents traitements Suv, Ouv, FTuv à l'issue de l'Exp. 2</i>	65
<i>Figure 3.16 : Evolution de la charge bactérienne moyenne dans chacun des 4 traitements de l'exp. 3a</i>	66
<i>Figure 3.17 : Evolution de la charge bactérienne moyenne dans chacun des 4 traitements de l'exp. 3b</i>	67
<i>Figure 3.18 : Taux de survie et taux d'éclosion pour les 4 traitements de l'exp. 3a</i>	69
<i>Figure 3.19 : Taux de survie et taux d'éclosion pour les 4 traitements de l'exp. 3b</i>	69



## **1. Introduction**

### **1.1 L'importance de l'aquaculture**

#### **1.1.1 En général**

Avec un taux de croissance de pratiquement 10% par an, l'aquaculture est le secteur agroalimentaire dont la croissance annuelle est la plus rapide (FAO, 1996). En 1995, 23,10% de la production totale d'organismes aquatiques provenaient de l'aquaculture, soit l'équivalent de 27,8 millions de tonnes. De plus, il a été estimé qu'en 2030 l'aquaculture dominerait l'approvisionnement en poissons et que moins d'un poisson consommé sur deux proviendrait de la pêche (Wijkstrom, 2000).

#### **1.1.2 L'aquaculture au Mexique**

Au Mexique, l'aquaculture est encore une jeune industrie. Jusqu'à nos jours, ce secteur a été largement dominé par la production de crevettes et de poissons d'eau douce. La production de crevettes en Sinaloa, province mexicaine de la côte pacifique, est passée de 6,6 tonnes par an en 1984 à 10,470 tonnes par an en 1995 (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, 1996). En 1998, les quatre principales espèces élevées étaient la crevette blanche (*Penaeus vanamei*) avec une production de 23,759 tonnes par an, la carpe (*Cyprinus carpio*) avec 6,701 tonnes par an, la tilapia (*Oreochromis spp.*) avec 5,398 tonnes par an et l'huître (*Crassostrea gigas*) avec 2,055 tonnes par an (FAO, 2001). En 1998, la production d'autres espèces marines était négligeable.

### **1.2 L'avenir de l'aquaculture : commercialisation de nouvelles espèces.**

Selon un rapport publié par la FAO en 1996, seulement 3,4% de la totalité des poissons consommés proviendrait de l'aquaculture marine. Un grand potentiel de développement existe donc dans ce secteur. Aussi, de nombreux pays producteurs de poissons manifestent-ils une certaine volonté de diversifier leur production de poissons marins d'élevage. En Ecosse et en

Norvège par exemple, le grave déclin de poissons sauvages à haute valeur commerciale tels que la morue (*Gadus morrhua*) ou le flétan (*Hippoglossus hippoglossus*) a suscité des études en vue de leur élevage (Rosenlund, 1997). Au Chili, des programmes visant à optimiser et à diversifier l'élevage de poissons marins ont développé l'élevage d'espèces qui n'étaient pas encore produites par ce pays telles que le turbot (*Scophthalmus maximus*) (Alvial et Manriquez, 1999). Dans le golfe du Mexique, l'élevage d'espèces telles que le thon à nageoires jaunes (*Thunnus albacores*) ou le thon à nageoires bleues (*Thunnus thynnus*) sont actuellement à l'étude (Benetti, 1999) sur un plan expérimental, économique et technologique. En Sinaloa, la biologie du sphéroïde annelé, un poisson-globe dénommé bullseye puffer par les anglophones et producteur d'un mets aussi apprécié que délicat à préparer, le « *fugu* » des japonais, est actuellement à l'étude pour déterminer son potentiel pour l'élevage.

### 1.3 Le potentiel du poisson-globe dans l'aquaculture mexicaine.

#### 1.3.1 Présentation du poisson étudié

Le sphéroïde annelé fut décrit pour la première fois par Jenyns en 1834 comme *Sphaeroides annulatus* (Jordan et Evermann, 1963). Il est abondant dans le golfe de Californie et a une répartition géographique qui s'étend de San Diego (USA) au Pérou. Sa position taxinomique est présentée dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 Classification taxinomique du sphéroïde annelé

Classe	Actinopterygii (poissons à nageoires rayonnées)
Ordre	Tetraodontiformes
Famille	Tetraodontidae
Genre	<i>Sphaeroides</i>
Espèce	<i>annulatus</i>

En Sinaloa, il est localement appelé botete diana. Les termes diana et *annulatus* réfèrent aux cercles visibles sur le corps du poisson (figure 1.1).

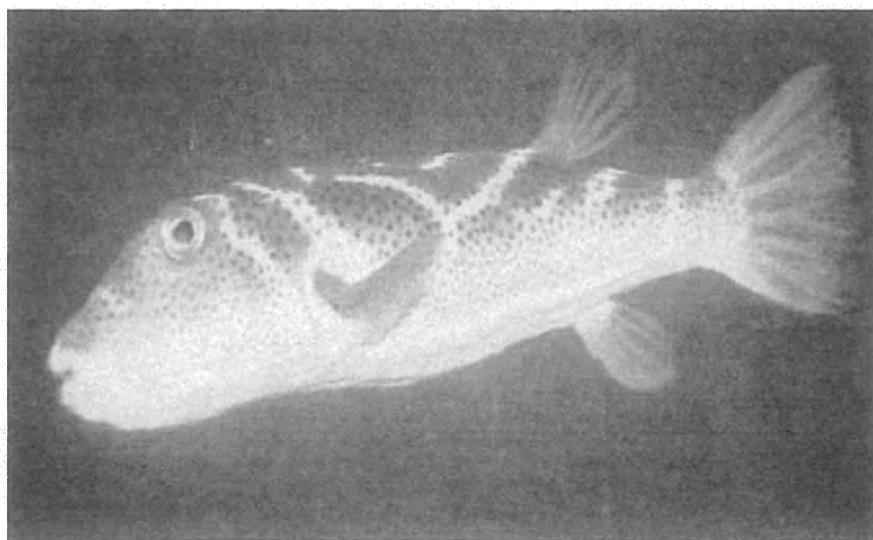


Figure 1.1: sphéroïde annelé, femelle reproductrice

### **1.3.2. Un marché du poisson-globe est déjà bien développé au Japon**

Le poisson-globe tigré (*Takifugu rubripes*) appartient à la même famille taxonomique que *Sphaeroides annulatus* : les tetraodontidae. Il a la valeur commerciale la plus élevée de tous les poissons au Japon en Chine et en Corée (Kanazawa, 1991). La fécondation artificielle a été développée avec succès en 1962 pour le poisson-globe tigré. Depuis, le cycle de reproduction de ce poisson a été bouclé et il est élevé depuis son éclosion jusqu'à sa taille de consommation (Kanazawa, 1991). La production totale de poisson-globe a augmenté de 69 tonnes par an à 1028 tonnes par an entre 1980 et 1987 (Kanazawa, 1991). En 1997, il était dix-neuvième au classement des poissons marins les plus produits dans le monde (FAO, 1997).

### **1.3.4 L'état de la pêche et du marché du poisson-globe au Mexique.**

Le poisson-globe représente une importante ressource en pêche sur la côte pacifique du Mexique. De 1993 à 1996, la quantité moyenne de poissons-globe pêchés était 278 tonnes

avec une valeur approximative de 1,5 millions d'euros (Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática, 1996). Ces poissons sont massivement pêchés durant leur période de reproduction dans certains estuaires et lagons où les adultes mûrs sexuellement se regroupent pour frayer. Avec une pression de pêche qui dépasse les limites du renouvellement naturel, et l'absence d'une quelconque régulation, la ressource sauvage des poissons-globe est menacée à court terme.

### **1.4 Les critères de sélection utilisés pour déterminer si une espèce est bonne pour l'aquaculture.**

Il n'est pas possible d'élever toutes les espèces de poissons. Sur près de 20000 espèces décrites, moins de cent sont commercialement élevées (Shepherd et Bromage, 1988). Le plus souvent, les espèces sont sélectionnées pour leur valeur marchande. Néanmoins, c'est loin d'être le seul critère. En effet, l'élevage n'est possible que si les poissons supportent de cohabiter en haute densité, acceptent une nourriture artificielle en captivité, grossissent suffisamment vite et s'il est possible d'obtenir de la semence des reproducteurs lorsque celle-ci est nécessaire (Chou et Lee, 1997). C'est pourquoi il est d'une importance capitale de pouvoir contrôler totalement la maturation sexuelle et la ponte des espèces élevées artificiellement. Sans ce contrôle, l'industrie resterait dépendante de la capture annuelle et aléatoire de reproducteurs sauvages, d'alevins ou de jeunes afin de boucler le cycle de production (Billard *et al.*, 1995).

### **1.5 Les facteurs influençant la ponte des poissons-globe dans la nature**

Jusqu'à ces dernières années, aucune publication scientifique n'avait décrit la reproduction du sphéroïde annelé. Mais récemment, des chercheurs du CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y desarrollo) équivalent mexicain de l'INRA, ont décrit la fécondation artificielle (Rodriguez et Duncan, 2001), l'induction de l'ovulation (Duncan et Rodriguez, 2001) et la production de sperme (Rodriguez *et al.*, 1999) chez le sphéroïde annelé,

*Sphaeroides annulatus*. Dans cette espèce comme chez *Canthigaster valentini* (Gladstone et Westoby, 1988) et *Takifugu niphobles* (Yamahira, 1997), les sexes sont séparés (gonochorie). L'âge de maturité n'est donné dans aucun des articles cités.

### **1.5.1 Influence de la température de l'eau.**

Les poissons-globe semblent n'avoir qu'une seule période de ponte annuelle. Chez *Takifugu niphobles*, la période de ponte s'étend de début juin à fin juillet (Honma *et al.*, 1979), alors que chez *Canthigaster rivulata*, celle-ci s'étend de fin juin à la mi-septembre (Arai et Fujita, 1987). Chez *Takifugu porphyreus*, la saison de ponte dure de la mi-juin à la mi-septembre, avec une température de l'eau variant de 13,5° à 17,1°C (Fujita *et al.*, 1992). Au Mexique, les pêcheurs attrapent les poissons-globe durant leur période de reproduction, qui s'étend de fin avril à mi-juin alors que la température de l'eau varie de 24° à 28°C (Duncan, com. pers. 2001).

### **1.5.2 Influence des cycles circadiens, lunaires et des marées**

La reproduction de nombreux poissons marins ou d'estuaire est liée aux cycles lunaires et aux cycles des marées. De nombreux poissons en effet, pondent à marée haute ou à proximité de celle-ci et particulièrement lors des marées de printemps (Gibson, 1992). Au Japon, *Takifugu niphobles*, pond en période de pleine lune, à la marée montante lorsque la nuit tombe (Yamahira, 1994). Les pêcheurs locaux de Sinaloa, racontent que la pêche aux poissons-globe est meilleure en période de pleine lune, et à marée haute. Il s'agit sans doute du moment où ces poissons se reproduisent. Néanmoins, la ponte chez *Canthigaster valentini* à l'île de Lizard en Australie a été décrite comme indépendante des cycles lunaires bien que les embryons éclosent le plus souvent à marée montante (Gladstone et Westoby, 1988).

### 1.5.3. Le comportement et les lieux de ponte

Chez *Sphaeroides annulatus*, la relation entre mâle et femelle avant la ponte n'a pas encore été décrite. Néanmoins, une société harémique a été observée chez le *sharpnose puffer* (*Canthigaster punctatissima*) en Basse Californie (Kobayashi, 1986) et chez le *sharpnose puffer*, poisson-globe à museau pointu (*Canthigaster valentini*), autour de l'île de Lizard en Australie (Gladstone *et al.*, 1988). Dans chacune de ces deux espèces, les harems sont composés d'un gros mâle qui fraie avec 4 femelles plus petites. Chez *Takifugu niphobles*, il a été remarqué qu'il y a beaucoup plus de femelles que de mâles dans les sites de fraie. De plus, les mâles peuvent libérer du sperme plusieurs fois tout au long de la période de reproduction alors que les femelles ne pondent qu'une seule fois par saison (Honma *et al.*, 1979). Chez *Fugu niphobles*, la tetrodotoxine (TTX) semble jouer le rôle d'une phéromone qui attirerait les mâles (Matsumura, 1995).

Des facteurs environnementaux peuvent jouer sur l'induction de la reproduction, néanmoins ce sont les hormones sécrétées par le système hypothalamo-hypophysaire qui sont directement responsables du processus de la reproduction entraînant l'induction de la ponte chez les poissons (Bromage *et al.*, 1992).

### 1.5.4 Le contrôle hormonal de la reproduction

Chez les poissons comme chez les autres vertébrés, la régulation de la reproduction implique l'axe hypothalamo-hypophysaire. En réponse à des stimuli provenant à la fois du milieu intérieur et du milieu environnant l'animal, l'hypothalamus sécrète la gonadotropin-releasing hormone (GnRH) et la luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH). Ces molécules contrôlent l'activité de cellules hypophysaires à action gonadotrope qui sécrètent à leur tour la follicule stimulating hormone (FSH) et la lutenizing hormone (LH). Celles-ci passent dans le

sang jusqu'aux gonades du poisson où elles contrôlent l'état structurel et les changements fonctionnels du testicule et de l'ovaire (Bromage, 1988).

### **1.6. Les facteurs influençant la ponte des poissons-globe en captivité**

#### **1.6.1 Soins et nutrition apportés aux reproducteurs**

Comme pour tout autre poisson élevé en captivité, des soins appropriés apportés aux reproducteurs sont nécessaires afin d'obtenir une bonne production d'oocytes, de spermatozoïdes, d'alevins et de jeunes (Piper *et al.*, 1992). L'environnement a un impact déterminant sur le bien-être du poisson. Chez *Takifugu rubripes*, on a remarqué que la couleur du bassin, l'intensité lumineuse et la densité des poissons dans l'eau étaient des conditions influençant leur gain moyen quotidien (Hatanaka, 1996). De manière générale, les mâles poisson globe peuvent être élevés dans les mêmes conditions que les femelles. Pour les reproducteurs, il est important d'utiliser des densités moins importantes qu'en grossissement (Billard *et al.*, 1995). Des croquettes subvenant aux besoins nutritifs des reproducteurs poissons-globe sont commercialement disponibles (Kanazawa, 1991). Néanmoins, comme cela se fait pour d'autres poissons marins, la ration des reproducteurs est complétée par de la seiche fraîche ou décongelée (Duncan, com. pers. 2001).

#### **1.6.2 L'induction de la ponte**

Certains poissons élevés en captivité ne semblent pas pondre naturellement. C'est pourquoi, l'induction de la ponte utilisant des traitements hormonaux a été développée chez plusieurs espèces de poissons-globe. Chez *Takifugu porphyreus*, les femelles reproductrices sont induites par l'injection de 6 mg/kg d'un mélange d'acétone et d'extraits d'hypophyse de carpe argentée. La ponte a lieu de 79 à 96 heures après l'injection avec une température de l'eau allant de 14,2° à 15,6°C (Fujita et Abe, 1992). Chez *Takifugu rubripes*, la maturation ovarique et la ponte ont été obtenues en utilisant 500 UI /kg d'hormone chorionique

gonadotrope humaine (HCG) et 7 mg/kg d'un homogénéisat d'hypophyse de saumon atlantique (*Salmo salar*). La ponte a lieu 95 à 109 heures après l'injection à une température de l'eau allant de 14° à 18°C (Miyaki *et al.*, 1992). Une approche plus moderne du problème utilise de la LHRH-a, analogue synthétisé de la LHRH. Cette molécule a déjà prouvé son efficacité à induire la ponte de nombreux poissons téléostéens (Crim *et al.*, 1988 ). Cette hormone de synthèse a également été utilisée de manière efficace chez plusieurs espèces de poissons-globe. Chez *Takifugu rubripes* notamment, l'induction de femelles a été obtenue en utilisant 2 types de traitements à la LHRH-a. Le premier était l'implant ovarien d'éponge contenant 400µg/kg LHRH-a. Le deuxième était l'injection répétée de 50µg/jour/poisson sur deux semaines. Pour les femelles dont la taille initiale des oocytes était comprise entre 800 µm et 900 µm, le temps moyen entre le début du traitement hormonal et l'ovulation était 18,8 jours. Pour celles dont la taille initiale des oocytes était supérieure à 900 µm, cette durée n'était que 10,6 jours (Matsuyama *et al.* 1997). Par rapport à ces résultats, il paraît donc crucial de contrôler le diamètre initial des oocytes par biopsie ovarienne afin de synchroniser la ponte dans une population de poissons (Bromage *et al.*, 1992). Chez *Sphaeroides annulatus*, une méthode d'induction a également été établie (Duncan *et al.*, 2001). Les femelles ont été induites si la taille initiale des oocytes était supérieure à 500 µm. Deux méthodes ont été testées. La première était l'administration de LHRH-a par injection et l'autre par implant ovarien. Une double injection à deux jours d'intervalle de respectivement 20 et 40µl/kg a entraîné la ponte de la majorité des femelles testées. L'implant de LHRH-a à des concentrations allant de 70 à 150 µg d'hormone a également montré des résultats positifs (Duncan *et al.*, 2001). Dans la même espèce, un traitement à la LHRH-a a également été appliqué aux mâles. L'injection de 40 et 80 µl/kg tous les 28 jours pendant deux mois chez des mâles sexuellement mûrs a montré une augmentation significative du volume de sperme produit en comparaison avec les poissons non injectés. Ce traitement ne semble pas affecter la

qualité du sperme (motilité, concentration et taux de fécondation) toujours par rapport aux poissons testés non injectés (Rodriguez *et al.* 1999).

### **1.7. Ponte et fécondation artificielle chez les poissons-globe**

Mâles et femelles reproducteurs doivent être séparés autour de la période de ponte afin d'éviter que les poissons ne pondent dans les bassins avant que l'on ait récupéré leurs gamètes (Billard *et al.*, 1995). Comme dans d'autres espèces, c'est la ponte artificielle qui est utilisée chez les poissons-globe. Les gamètes sont récoltés manuellement et mélangés dans un récipient bien propre avant que les œufs fécondés ne soient placés dans un incubateur. Une méthode sèche est utilisée pour la fécondation. En effet, l'eau n'est introduite dans le récipient qu'une fois que le sperme et les oocytes ont été mélangés, et jusqu'à ce moment, l'équipement est soigneusement gardé le plus au sec possible (Piper *et al.*, 1992). L'ajout d'un diluant est nécessaire pour activer les spermatozoïdes, mais le type de diluant et le taux de dilution des spermatozoïdes est variable d'une espèce à l'autre (Billard *et al.*, 1995). Chez *Sphaeroides annulatus*, la dilution du sperme est obtenue avec de l'eau de mer filtrée par les UV. Des dilutions de 1 pour 20 jusqu'à 1 pour 500 n'affectent pas la qualité du sperme (Rodriguez *et al.*, 1999). La qualité du sperme est évaluée par le pourcentage de motilité après activation, par le temps maximum d'activité post-activation et par le taux de fécondation (Rodriguez *et al.*, 1999). Avant fécondation, le sperme peut être conservé 30 minutes sans être détérioré (Rodriguez *et al.*, 1999).

### **1.8 La qualité des œufs**

Une fois les oocytes fécondés, ils doivent être incubés. Il s'agit là d'une étape très délicate dont dépend l'obtention d'alevins et de jeunes de qualité (Brooks *et al.*, 1997). De nombreux facteurs sont impliqués dans la détermination de la viabilité des œufs et le succès de l'incubation. Dans la filière industrielle aquacole, des œufs de bonne qualité ont été définis

comme ceux ayant un taux de mortalité bas aux stades de fécondation, d'apparition des yeux, d'éclosion, et de première prise de nourriture (Bromage *et al.*, 1992). Néanmoins, bien que le taux de survie et le taux d'éclosion soient des moyens de mesurer la qualité des œufs, ils ne sont pas pour autant informatifs quant aux réels facteurs déterminant la qualité de ces œufs. Ces facteurs sont formés d'une part par les propriétés intrinsèques de l'œuf et d'autre part par l'environnement dans lequel l'œuf a été fécondé et par la suite incubé (Brooks *et al.*, 1997).

### **1.8.1 Paramètres intrinsèques affectant la qualité des œufs**

Les caractéristiques morphologiques et la taille des œufs varient d'une espèce à l'autre. Pour de nombreux œufs de poissons marins, il existe une relation entre le diamètre de l'œuf, la température de l'eau et la durée d'incubation (Pauly et Pullin, 1988). Chez les poissons-globe, les œufs sont sphériques et adhérents à certains substrats comme le verre (Fujita *et al.*, 1992). Toutes les réserves vitellines de l'œuf, lipides, vitamines et oligo-éléments sont importants pour produire un œuf de bonne qualité et une descendance viable. La qualité de ces réserves est intrinsèquement reliée à celle des reproducteurs avant la ponte (Brooks *et al.*, 1997). Dans certaines espèces, le diamètre de l'œuf a une influence sur sa viabilité. La stratégie de reproduction de la morue atlantique montre que la taille de l'œuf est décisive pour sa survie. Il a en effet été montré que dans la nature, les juvéniles provenant d'œufs aux plus gros diamètres avaient plus de chance de survivre dans les premiers jours de leur vie que ceux provenant d'œufs aux diamètres plus petits. Cela est lié à la quantité de réserves plus importante lorsque le diamètre de l'œuf est plus grand (Kjesbu *et al.*, 1996). A l'opposé, chez les poissons-globe, le diamètre de l'œuf ne semble pas influencer son taux de survie. Par contre, l'œuf de ces poissons accumule la tétrodoxine, ce qui les rend toxiques et in mangeables par les autres poissons prédateurs potentiels de leur environnement (Matsumura, 1998).

### 1.8.3 Paramètres extrinsèques affectant la qualité des œufs

La ponte des reproducteurs, le développement embryonnaire, l'éclosion et la croissance de la larve ne sont optimaux que dans une fenêtre très étroite de température. De plus, la température à laquelle les œufs sont incubés a un effet direct sur le développement embryonnaire et détermine partiellement le taux d'éclosion (Watson et Chapman, 1996). Une température optimale existe pour chaque stade du développement et celle-ci peut varier d'une espèce à l'autre. Un faible taux de survie des embryons, un faible taux d'éclosion et une croissance médiocre des alevins s'expliquent souvent par des fluctuations de température trop importantes durant la période embryonnaire (Watson *et al.*, 1996). La température peut en effet affecter le métabolisme de l'embryon ainsi que son développement structural (Piper *et al.*, 1992). Des études sur les salmonidés ont même montré que la température d'incubation des œufs pouvait influencer le nombre de vertèbres et de cartilages branchiaux (Piper *et al.* 1992).

L'intensité lumineuse appliquée aux œufs durant la période embryonnaire a également des effets sur le développement. Mais le type d'effet est spécifique de chaque espèce. Chez le saumon atlantique (*Salmo salar*) par exemple, de l'obscurité durant l'incubation des œufs, entraîne un délai à l'éclosion (Brannas, 1987). Chez le flétan (*Hippoglossus hippoglossus*) au contraire, des œufs maintenus dans le noir éclosent plus rapidement que s'ils sont maintenus éclairés (Helvik et Walther, 1992). Chez *Takifugu niphobles*, Yamahira (1997) a remarqué que les alevins éclosent dans l'obscurité, et spécialement au crépuscule. Cette propriété n'a pas encore été vérifiée chez *Sphaeroides annulatus*, le poisson étudié ici.

L'oxygène dissous dans l'eau est un autre paramètre vital qui peut avoir une grande influence sur le taux d'éclosion. Des niveaux bas d'oxygène dissous dans l'eau peuvent en effet causer des difformités et la mort de l'œuf (Bromage, 1988). Pour l'incubation des œufs, le taux d'oxygène dissous dans l'eau doit être supérieur à 7mg/l pour les œufs de salmonidés et

supérieur à 2 mg/l pour les œufs de poissons-chats et de tilapias (Bromage, 1988). Le niveau minimal satisfaisant est variable selon les espèces. Mais pour une espèce donnée, des valeurs inférieures à ce niveau mettent en danger la survie des œufs. Chez la morue (*Gadus morrhua*), il a été montré que le taux d'éclosion diminue de 30% lorsque l'oxygène dissous dans l'eau est 8 ml/l à 10% lorsque l'oxygène dissous dans l'eau atteint 2 ml/l (Waller *et al.*, 1993).

La salinité peut aussi avoir une influence sur la qualité des œufs et peut également modifier les effets physiologiques de la température sur le développement embryonnaire chez les poissons d'eau de mer et d'eau saumâtre (Kinne et Kinne, 1961). Watanabe *et al.*, (1999) ont trouvé qu'une exposition simultanée à température élevée (24°C) et salinité réduite (22-28 g/l) peut augmenter le taux de mortalité des œufs, et affecter la croissance des juvéniles chez le flounder (*Paralichthys dentatus*). Chez les juvéniles de *Takifugu rubripes*, on a observé que la salinité optimale varie au cours des stades précoces du développement, reflétant les préférences d'habitat du poisson dans son environnement naturel (Han *et al.*, 1995).

L'incubation des œufs de poisson est souvent perturbée par un développement bactérien à la surface de l'œuf. Cela est susceptible d'affecter les relations commensales qui peuvent exister entre la microflore indigène et des pathogènes opportunistes qui prennent le dessus et gênent le développement embryonnaire, entraînant une baisse du taux d'éclosion (Hansen et Olafsen, 1989). En général, il n'est pas possible d'attribuer un incident de mortalité à une bactérie particulière. Le plus souvent, il s'agit d'agents opportunistes (Munro *et al.*, 1994). Les problèmes de contamination bactérienne sont souvent signalés au cours des stades précoces du développement larvaire car les alevins de poissons marins qui sont petites et sensibles nécessitent une période sans changement d'eau (Skjermo et Vadstein, 1999). Une relation entre la charge bactérienne et le taux de mortalité a été établie chez les œufs de salmonidés (Barker *et al.*, 1989), et de non-salmonidés (Subasinghe et Sommerville, 1985). Jusqu'à aujourd'hui, aucune recherche de ce type n'a encore été conduite sur le poisson étudié ici,

*Sphaeroides annulatus*. Les bactéries qui colonisent les œufs sont le plus souvent retrouvés dans l'environnement immédiat des œufs, c'est-à-dire, l'incubateur (Watson et Chapman, 1996).

Un large éventail d'équipements est utilisé pour incuber des œufs de poissons. Des mini-tapis sont utilisés pour incuber des œufs adhérents. Ils sont un point d'attache pour les œufs, à l'instar des substrats naturels de ponte (plantes, rochers,...) (Piper *et al.*, 1992). Pour l'incubation de nombreux poissons ornementaux tels que les poissons anges, *discus*, ou *corydoras*, les petits tapis sont souvent remplacés par des brosses, des ardoises ou des pots en plastique, verre, glaise ou roche (Watson *et al.*, 1996). Pendant l'incubation, changer l'eau est important pour prévenir l'accumulation de déchets, d'agents pathogènes opportunistes, et permettre un échange gazeux entre l'œuf et l'eau qui l'entoure. Néanmoins, s'il y a trop de mouvements d'eau, cela provoque des chocs qui peuvent avoir un effet négatif sur les œufs et même les tuer (Billard *et al.*, 1995). Chez *Sphaeroides annulatus*, le type optimal d'incubateur et le débit optimal d'eau changée pour affecter au minimum le développement embryonnaire, n'ont pas encore été déterminés (Duncan, com. pers. 2001).

Les sections précédentes ont décrit la variété des paramètres pouvant affecter la survie des œufs et le taux d'éclosion chez les poissons. Dans la littérature, aucune publication ne se rapporte à la ponte en captivité et à l'éclosion d'œufs issus de cette ponte chez *Sphaeroides annulatus*. L'élevage expérimental du CIAD à Mazatlan au Mexique, a obtenu une génération F1 de sphéroïde annelé qui a actuellement l'âge de un an, et qui est issu de reproducteurs capturés. Les jeunes n'ont pas encore atteint l'âge de la maturité sexuelle (Duncan com. pers.). Pour le moment les reproducteurs sont donc toujours capturés au moment de la période de reproduction et sont induits à pondre artificiellement. Ainsi, la plupart des paramètres concernant les reproducteurs et donc les propriétés intrinsèques des œufs ne peuvent pas pour

le moment être contrôlés. Néanmoins, des paramètres extrinsèques tels que la qualité de l'eau, la charge bactérienne dans l'eau et le type d'incubateur utilisé peuvent être optimisés afin d'obtenir le taux d'éclosion le plus élevé possible. Il s'agit précisément du sujet du présent travail.

### **1.9 Objectifs de l'étude**

En 1996, les recherches sur le sphéroïde annelé (*Sphaeroides annulatus*), ont commencé au CIAD, à Mazatlan, (Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo en Acuicultura y Manejo ambiental). En 1998, un projet financé par CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), branche du ministère mexicain de l'agriculture, et intitulé recherche sur la maturation sexuelle et l'élevage du sphéroïde annelé, a vu le jour. Ce projet a pour buts de rechercher les aspects importants de la maturation sexuelle, de la nutrition, de la génétique et de l'élevage de ce poisson en captivité afin de déterminer s'il est possible de développer commercialement son élevage.

Le but général du présent travail était de déterminer l'effet du système d'incubation et de la qualité de l'eau sur le taux d'éclosion. Durant l'incubation, des échantillons d'eau furent également prélevés afin de mettre en évidence une éventuelle relation entre la charge bactérienne présente dans l'eau et le taux d'éclosion dans les différents systèmes expérimentaux. Le tableau 1.2 résume le principe de chaque test. Dans chacun d'eux, différents incubateurs ont été testés. Dans l'exp. 1a et 1b, de l'eau non filtrée par les UV a été utilisée pour tester trois types d'incubateurs : incubateur statique, incubateur statique plus aération et incubateur avec renouvellement de l'eau. Pour l'exp. 2, de l'eau filtrée par les UV a été utilisée pour tester les mêmes trois types d'incubateurs que dans les exp. 1a et 1b. Pour les exp. 3a et 3b, les deux types de traitement d'eau ont été testés sur deux types d'incubateurs : incubateur statique et incubateur statique plus aération.

Pour compléter cet objectif général, une étude morphologique a également été réalisée. Son objet était de réaliser des photographies du développement embryonnaire du poisson.

Tableau 1.2 : Principe des différentes expériences réalisées

Expérience	incubateur testé
<b>Exp. 1a et exp1b</b>  (filtre 20 $\mu\text{m}$ ) sans UV	➤ statique
	➤ statique + aération
	➤ dynamique
<b>Exp. 2</b>  (filtre 5 $\mu\text{m}$ ) avec UV	➤ statique
	➤ statique + aération
	➤ dynamique
<b>Exp 3a et Exp3b</b>  (filtre 20 $\mu\text{m}$ ) sans UV et (filtre 5 $\mu\text{m}$ ) avec UV	➤ statique
	➤ statique + aération

### 1.10 Hypothèses

- **Exp. 1a 1b et exp. 2:**

Ho = Il n'y a pas de différence dans le taux d'éclosion obtenu par les trois systèmes différents d'incubation

Ho = Il n'y a pas de corrélation entre le taux d'éclosion et la charge bactérienne de l'incubateur

- **Exp. 3a et 3b**

Ho = Il n'y a pas de différence dans le taux d'éclosion obtenu par les deux systèmes différents recevant de l'eau passée aux rayons UV

Ho = Il n'y a pas de différence dans le taux d'éclosion obtenu par les deux systèmes différents recevant de l'eau non passée aux rayons UV

Ho = Il n'y a pas de différence entre les traitements avec UV et sans UV.

## **2. Matériels et Méthodes**

### **2.1 Les reproducteurs**

#### **2.1.1 Origine**

La saison de pêche du sphéroïde annelé coïncide avec la saison de reproduction, avril et mai, lorsque les poissons se rassemblent et fraient dans des endroits spécifiques. Pour le présent travail, les reproducteurs ont été directement achetés le 29 mars 2001 aux pêcheurs du lagon de Teacapan, petit village de pêche se situant à deux heures de route au sud de Mazatlan (105°47'23''O; 22°49'26''N). Soixante poissons ont été ramenés dont au moins dix-huit femelles confirmées. Sur le bateau de pêche, les poissons ont été maintenus par 15 dans des bassines de 35 litres, avec une alimentation en oxygène et un changement manuel de l'eau toutes les cinq minutes. Pour le transport jusqu'au centre, les poissons ont été placés dans deux bassins cylindriques de 500 litres chacun, remplis avec de l'eau de mer locale, sans traitement et alimenté en oxygène par bouteilles. Les femelles ont été maintenues dans un des tanks et les autres poissons dans l'autre. La durée du transport a été de deux heures et demi.

#### **2.1.2 Gestion des reproducteurs**

##### **2.1.2.1 Traitement parasitaire externe**

A l'arrivée au CIAD, les reproducteurs ont reçu un traitement de deux heures de salinité inversée (eau douce) ayant pour but de tuer les parasites externes. Puis ils ont été placés dans différents bassins en fibre de verre de 1000 litres chacun.

##### **2.1.2.2 Nutrition**

Les reproducteurs ont été nourris deux fois par jour. Le matin, ils recevaient un mélange de croquettes composées à 50% de croquettes élaborées sur place en fonction des besoins

nutritifs des poissons-globe et à 50% d'un aliment commercial pour truites. Les poissons ont été rationnés à 2% de leur masse corporelle. Le détail de la composition de l'aliment est présenté dans le tableau 2.1

Tableau 2.1: Composition de la ration donnée aux reproducteurs

	Aliment préparé au CIAD	Aliment du commerce
Origine	A partir de Kanazawa (1991)	El pedregal Silver Cup (Mexico).
proportion	50%	50%
Protéine	42%	45%
Lipides	14%	10%
Energie	460Kcal	-
Vitamines	3%*	-
Minéraux	3%**	-

\* Carosen, Bayer™, Mexico

\*\* Superbifos, Bayer™, Mexico

Durant toute la période des expériences, les aliments ont été conservés au congélateur (-20°C) jusqu'au moment de leur utilisation. L'après-midi, les reproducteurs recevaient 10 grammes par poisson de seiche fraîchement décongelée.

### **2.1.3. Alimentation en eau et nettoyage des bassins**

Les reproducteurs ont été maintenus dans des bassins recevant de l'eau de mer filtrée à 20 µm. Dix minutes après chaque repas d'aliment sec, les parois du bassins étaient nettoyées à la brosse. Afin d'éviter des contaminations éventuelles d'un bassin à l'autre, une brosse différente était utilisée pour chaque bassin.

## **2.2 Induction hormonale des femelles**

Le 2 avril, la maturation des femelles capturées a été contrôlée et les plus avancées ont été placées dans un bassin différent. Le 6 avril, les 3 femelles les plus avancées ont été sélectionnées afin d'être « induites ».

### **2.2.1 Anesthésie**

Avant toute manipulation, qu'il s'agisse de biopsie ovarienne, d'injection hormonale ou de récupération des gamètes, les poissons ont été anesthésiés en utilisant du 2-phénoxyéthanol (Sigma, USA) à raison de 0,5ml/l. Les poissons étaient placés dans la solution d'anesthésique pendant une à deux minutes, la durée dépendant de leur réaction. Une fois la manipulation terminée, les poissons étaient remis dans un bassin sans autres poissons, avec de l'eau de mer sans anesthésique, ou ils retrouvaient en quelques secondes, leur état de veille initial.

### **2.2.2 Contrôle de la maturité ovarienne**

#### **2.2.2.1 Biopsie ovarienne**

Pour contrôler la maturité ovarienne, une biopsie des ovaires est réalisée. Une fois le poisson anesthésié, et rincé, il est placé sur le dos sur une table de travail, et séché avec une serviette en papier. Puis une canule en plastique d'un millimètre de diamètre est introduite de 3 centimètres dans l'oviducte pour atteindre l'ovaire. Enfin, une portion d'ovaire est aspirée à

l'aide d'une seringue vide. Pendant l'analyse de la biopsie, la femelle est tenue à l'écart dans une bassine de 50 litres d'eau, dotée d'un système de renouvellement de l'eau.

### **2.2.2.2 Analyse de l'état de maturité des ovaires**

Les oocytes biopsiés ont été étalés sur une lame propre d'histologie en utilisant deux seringues à insuline comme outils. Puis ils ont été recouverts par une solution éclaircissante de YBAG/85 (Gutiérrez, 1992) permettant de voir le cytoplasme et le noyau cellulaire. Après une ou deux minutes d'attente, les lames ont été observées sous microscope au grossissement 50. A l'aide d'une échelle micrométrique, le diamètre de 20 oocytes choisis au hasard a été mesuré. L'échelle était divisée en 39 unités équivalent à 1 millimètre. Ainsi, le diamètre des oocytes a facilement été converti en millimètres. Les femelles possédant un diamètre moyen d'oocytes supérieur à 0,5 mm ont été considérées comme bonnes pour l'induction, les autres n'ont pas été induites (Duncan *et al.*, 2001).

### **2.2.3 Induction hormonale**

#### **2.2.3.1 Hormone utilisée**

Une ampoule de 5 mg de LHRH-a, des-Gly<sup>10</sup>[D-ala<sup>6</sup>]-Luteinizing Hormone Releasing Hormone Ethylamine (Sigma, USA) a été utilisée. Les 5 mg d'hormone ont été dissous dans 25 ml de chlorure de sodium à 0,9% (Merck<sup>TM</sup>, USA) pour obtenir une concentration finale de 200µl/ml. Puis, la solution a été homogénéisée pendant 5 minutes à l'aide d'un mixer. La solution initiale a été préparée le 6 avril. La même solution a été utilisée pour toutes les expériences. Entre chaque utilisation, celle-ci a été conservée au congélateur à -18°C. La bouteille contenant la solution était recouverte d'une feuille d'aluminium afin d'éviter une dégradation de l'hormone par la lumière.

### 2.2.3.2 Protocole d'induction

Avant toute injection, la masse des femelles a été mesurée à l'aide d'une balance mécanique d'échelle 0-6 kg et de sensibilité 20 g. Les femelles ont été injectées en intramusculaire dans les muscles dorsaux en utilisant une seringue à insuline de 1 ml de référence 27 Gx13mm-sans espace mort (TERUMO<sup>TM</sup>, Mexico). Le protocole d'injection est résumé dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Protocole d'injection de LHRHa utilisé pour Exp1a, Exp2a, Exp3a, Exp3b

	Temps	Action
première injection	Zéro heure	20 µL/kg de poisson
deuxième injection	48 heures	40 µL/kg de poisson
Date d'ovulation	72 heures	collecte des gamètes

Dans l'exp. 1b, comme aucun des deux poissons induits n'a pondu 72 heures après la première injection, une troisième injection leur a été donnée à 80 heures après la première injection en vue d'obtenir une ponte induite à 96 heures (Duncan *et al.*, 2001).

### 2.2.3.2 Identification des femelles utilisées

Pour chaque expérience, entre 2 et 3 femelles ont été sélectionnées. Après leur première injection, elles étaient placées dans un bassin à part. À ce stade, leur identification était réalisée par une description simple de leur taille, couleur, forme, et motifs cutanés. Après la ponte, les femelles dont les oocytes ont été effectivement utilisés pour les expériences, ont reçu une puce électronique. L'identification des femelles utilisées dans chaque expérience est présentée dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Identification des femelles reproductrices utilisées dans les différentes expériences

Expérience	femelle		
	Référence de la puce	Longueur du sujet	Masse avant induction
Exp. 1a	92564B2COF	34,3cm	610g
Exp. b	4254485103	34,7cm	1085g
Exp. 2	42544F7722	33,2cm	900g
Exp. 3a	4256253370	31,8 cm	750g
Exp. 3b	Euthanasiée après la ponte	-	-

### 2.3 Sélection des mâles

Lorsqu'ils sont sexuellement mûrs, les mâles sphéroïdes annelés ont une production continue de semence durant la période de reproduction. Un mâle a été utilisé pour chaque expérience. Le jour de la ponte, 2 ou 3 mâles étaient transférés à l'intérieur de l'écloserie et maintenus dans des bassines de 50 l jusqu'à la fin du processus.

#### 2.3.1 Evaluation de la qualité du sperme

##### 2.3.1.1 Anesthésie des mâles

Les mâles ont été anesthésiés avant chaque prélèvement par la méthode présentée dans la section 2.2.1.

##### 2.3.1.2 Prélèvement du sperme

Une fois les mâles anesthésiés, ils ont été rincés et séchés. Pour chaque expérience, le sperme a été prélevé par légère pression abdominale en direction de l'orifice sexuel. Le sperme a été récupéré immédiatement à sa sortie du spermiducte à l'aide de seringues jetables de 5ml (Terumo<sup>nd</sup>, Mexique), afin d'éviter les contaminations par l'eau ou l'urine (Lahnsteiner et Patzner, 1998).

### **2.3.1.3 Evaluation du pourcentage de motilité**

Une goutte de sperme a été placée sur une lame porte-objet, mélangée avec une goutte d'eau de mer puis immédiatement observée sous le microscope au grossissement x 400. Le pourcentage de motilité a été évalué à l'œil (Gutiérrez, 1992).

### **2.3.1.4 L'évaluation du temps de motilité du sperme**

Le temps de motilité a été évalué sur le même principe que l'évaluation du pourcentage de motilité. Un chronomètre était enclenché dès que le sperme était activé, c'est-à-dire dès qu'il était mélangé avec l'eau de mer. Le chronomètre était arrêté dès que les spermatozoïdes commençaient à s'immobiliser.

### **2.3.1.5 Sélection du mâle**

Pour chaque expérience, un seul mâle a été utilisé. Pour être sélectionné, il devait avoir un pourcentage de motilité de 100%, et un temps de motilité d'au moins une minute.

## **2.4 Fécondation artificielle**

Pour chaque expérience, les oocytes d'une seule femelle ont été fécondés par les spermatozoïdes d'un seul mâle.

### **2.4.1 Obtention des gamètes**

#### **2.4.1.1 Obtention du sperme**

Comme la semence peut survivre dans une seringue au moins trente minutes avant la fécondation sans aucun effet sur son pouvoir fécondant (Rodriguez *et al.*, 1999), les mâles ont été prélevés en premier comme décrit dans la section 2.3.1.2. Une fois le mâle avec le sperme de meilleure qualité sélectionné, la femelle était prélevée.

#### **2.4.1.2 Prélèvement de la femelle**

Une fois anesthésiée, la femelle a été séchée avec une serviette en papier afin d'éviter un contact éventuel entre l'eau et les oocytes. Puis, son abdomen a été massé cranio-

caudalement, et les oocytes récupérés dans un bêcher en plastique de 1 litre parfaitement propre et sec (figure 2.1).

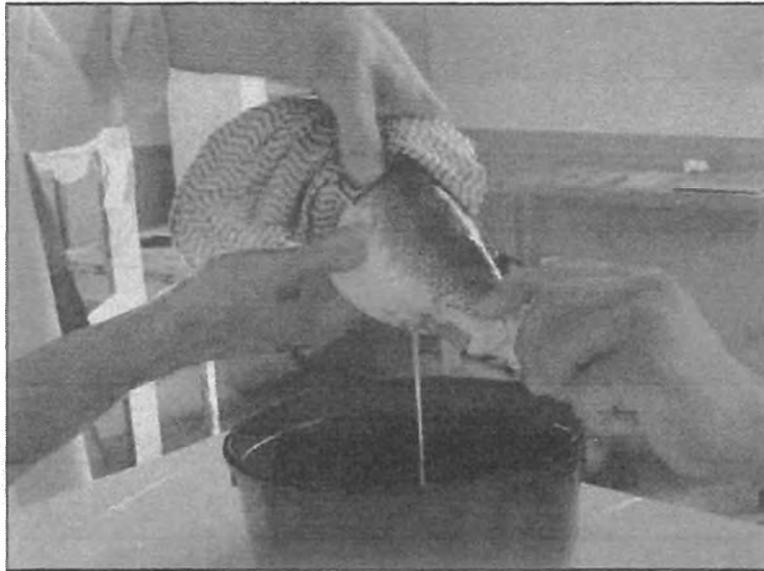


Figure 2.1 : Prélèvement des ovules d'une femelle

#### **2.4.1.3 Evaluation de la taille et de la quantité d' oocytes**

Les femelles ont été pesées avant et après le prélèvement, et la masse totale des œufs prélevée a été estimée à l'aide d'une balance digitale de capacité 2 kg et de sensibilité 1g. La quantité d'oocytes contenue dans 0,1g était en suite évaluée afin d'obtenir une approximation du nombre total d'œufs produits par la femelle. L'échelle était comprise entre 300000 à 500000 œufs par gramme.

#### **2.4.2 Fécondation artificielle**

Pour chaque expérience, 10 g d'oocytes ont été fécondé par 1 ml de sperme. En premier, la semence a été versée dans le bêcher contenant les oocytes et immédiatement après cette opération, de l'eau de mer filtrée par les UV a été lentement ajoutée dans le récipient. La solution était ensuite lentement et soigneusement mélangée manuellement pendant 45 secondes. Puis les œufs ont été laissés à reposer pour deux minutes sans les toucher. Après

cette phase durant laquelle la fécondation a lieu, l'excès d'eau est enlevé avec précaution et remplacé par 300 ml d'eau propre toujours filtrée par les UV.

## **2.5 Le système expérimental**

### **2.5.1 Adhérence des œufs aux lames d'histologie**

Les œufs de sphéroïde annelé sont adhérents au verre. Cette propriété a été utilisée pour coller 50 œufs par lame histologique. D'abord, quelques-uns des œufs venant d'être fécondés ont été prélevés à l'aide d'une petite cuillère en plastique à laquelle les œufs ne sont pas adhérents. Puis, ils ont été lentement versés sur toute la longueur de la lame en verre préalablement humidifiée à l'aide d'eau filtrée par les UV. A ce stade, les œufs ont été comptés un par un et les œufs excédentaires ont été enlevés en utilisant la cuillère en plastique (figure 2.2).

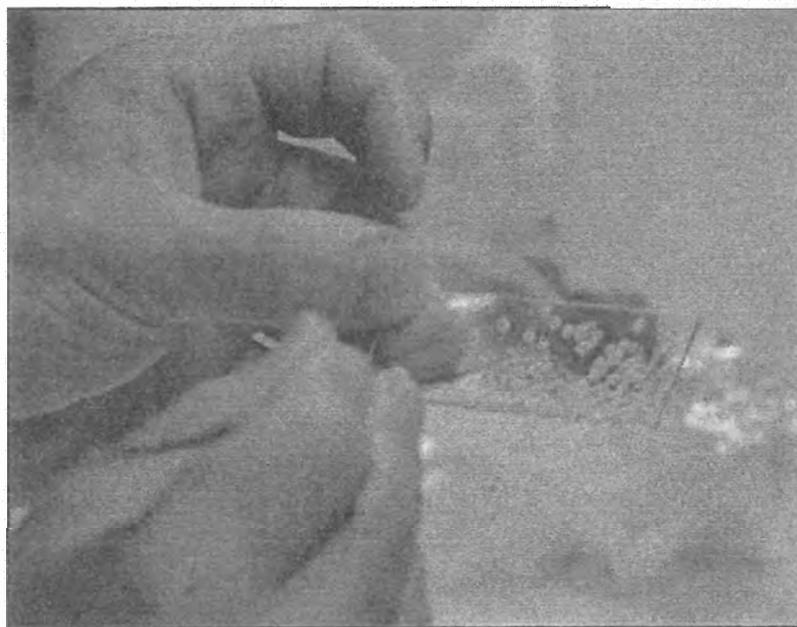


Figure 2.2 : Adhérence des œufs à la lame en verre

### **2.5.2 Disposition des lames à histologie sur un support**

Une fois les lames remplies, celles-ci ont été placées sur un support en plexiglas. Chaque support a reçu quatre lames. Durant la période du remplissage du collecteur, celui-ci est tenu

immergé dans un bac contenant de l'eau de mer filtrée par les UV. Une fois qu'un collecteur contenait quatre lames, celui-ci était attribué au hasard de manière « randomisée » vers un incubateur.

### **2.5.3 Les incubateurs**

Les incubateurs étaient des bouteilles en plastique d'eau minérale de 2 litres (SierrAzul<sup>TM</sup>) placées à l'envers. Elles ont été coupées 5 cm dessus du fond et ce fond a été utilisé comme couvercle pour éviter toute contamination par l'air. Les incubateurs étaient remplis avec 1,5 litre d'eau. Différents systèmes d'incubation ont été testés. Ils sont référencés ci-dessous comme : incubateur statique, incubateur statique + aération et incubateur avec renouvellement de l'eau.

#### **2.5.3.1 Les incubateurs statiques**

Les incubateurs ont été dans ce cas simplement remplis d'eau et n'ont reçu aucun échange d'eau. Du ruban adhésif a été utilisé pour éviter les fuites d'eau par le bouchon.

#### **2.5.3.2 Incubateurs statiques + aération**

L'alimentation en air a été fournie grâce à un compresseur de type Ring Compressor of 2,5 HP, (Fuji Electric Co, Ltd, USA) fonctionnant 24 heures sur 24. L'aération a été délivrée aux incubateurs grâce à une pierre à air cylindrique de 5 mm de diamètre et de 1,5 cm de long (Aqua Fizzzz<sup>TM</sup>). Cette dernière a été reliée à un tuyau en plastique de 5 mm de diamètre intérieur et de 7 mm de diamètre extérieur. Du teflon a été utilisé pour éviter les fuites au niveau des jonctions de tuyaux. La pierre à air était placée 10 cm au-dessus du bouchon de la bouteille et un trou de 6 mm de diamètre a été percé au centre du bouchon afin de laisser passer le tuyau approvisionnant en air. Du silicone a été utilisé pour fixer le tuyau sur le bouchon. Comme dans les incubateurs statiques, du ruban adhésif a également été utilisé pour fixer le bouchon sur la bouteille. Chaque incubateur a été équipé d'un filtre à air de 2 $\mu$ m. Le

débit d'air a été fixé à 100 ml par minute. Ce débit a pu être réglé en utilisant des valves en T avec régulateur (LEES<sup>TM</sup>). Afin de mesurer le débit d'air avant le début de chaque expérience, la méthode suivante a été utilisée. Un bûcher gradué complètement rempli d'eau a été immergé à l'envers. La pierre à eau recevant l'air a été disposée au-dessous du bûcher pendant une minute, puis le volume d'eau déplacé par l'air a été lu sur le bûcher gradué.

### 2.5.3.3 Incubateurs avec renouvellement de l'eau :

Dans ce cas, l'eau a été introduite dans l'incubateur grâce à un tuyau en plastique du même type que celui utilisé pour l'alimentation en air. Comme précédemment, ce tuyau passait à travers le bouchon de la bouteille et était long de 2 cm à l'intérieur de la bouteille. L'évacuation de l'eau de l'incubateur se faisait à travers un trou rectangulaire de 6 cm<sup>2</sup> situé en haut de l'incubateur et recouvert d'un fin grillage en plastique de 0,5 mm de diamètre pour les exp. 1a, exp.1b et de 0.1 mm de diamètre pour l'exp. 2a . Une représentation schématique de cet incubateur est présentée dans la figure 2.3. Comme pour l'incubateur statique avec aération, le tuyau en plastique a été fixé à l'aide de silicone et le bouchon avec du ruban adhésif.

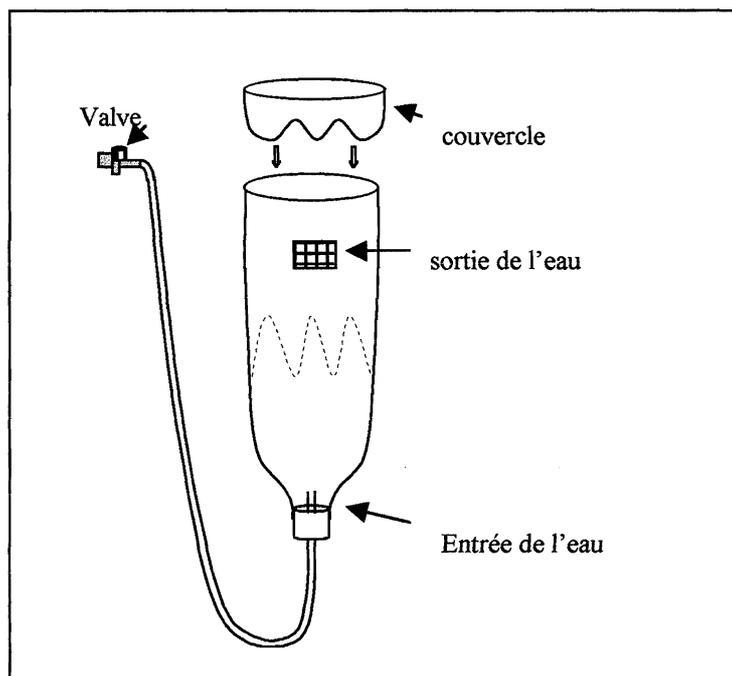


Figure 2.3 : Incubateur avec renouvellement de l'eau

Le débit de l'eau a été contrôlé par une valve à air avec régulateur (LEES<sup>TM</sup>). Les valves ont été fixées en utilisant du téflon afin d'éviter un mélange d'air et d'eau dans le tuyau. Dans l'exp. 1a, expérience préliminaire, le débit utilisé a été 300 ml par minute mais il y eut des variations d'un incubateur à l'autre de 100 à 450 ml par minute. Pour les expériences suivantes, le débit a été fixé à 25 ml par minute. Le débit a été mesuré en recueillant la quantité d'eau reçue en une minute par un incubateur vide. Ce volume d'eau a ensuite été mesuré dans un bêcher de 100 ml.

#### **2.5.4 Le bac recevant les incubateurs**

Les incubateurs ont été fixés sur une table en bois recouverte de résine et peinte en blanc. Le système disposait d'une capacité totale de 20 incubateurs. Ce bac contenant les incubateurs était en fait rempli d'eau de manière à conserver la température de l'eau dans les incubateurs la plus constante possible. L'eau dans le bac s'est renouvelée à raison de 4 litres par minutes. Mais il s'agissait d'un circuit d'eau complètement indépendant de celui utilisé pour alimenter les incubateurs. Un tuyau vertical en PVC a été utilisé pour réguler le niveau d'eau dans le bac. Il a été réglé afin d'être au-dessus des supports à lames histologiques dans les incubateurs et quelques centimètres en dessous du niveau de l'eau dans les incubateurs. Même si des variations de température ont été possibles, ce système de bain-marie a permis de maintenir l'eau de tous les incubateurs à la même température (figure 2.4).

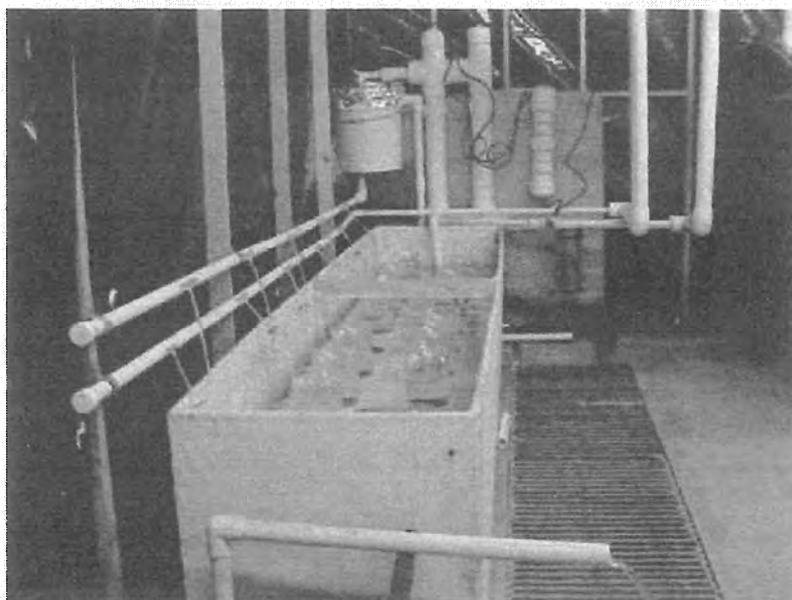


Figure 2.4 : Le bac contenant les différents incubateurs

#### **2.5.4.1 L'alimentation en eau**

L'eau approvisionnant toute l'écloserie a été pompée de la mer à 500 mètres de la côte une seule fois par jour. Puis elle a été stockée dans un grand bac de 10000 litres à partir duquel elle a été filtrée à 20  $\mu\text{m}$ . Le bac contenant les incubateurs ainsi que les incubateurs ont été directement alimentés depuis ce réservoir. L'eau utilisée pour remplir les incubateurs à renouvellement d'eau a reçu une deuxième filtration. Pour les expériences 1a et 1b, c'est-à-dire celles testant une filtration sans UV, un autre filtre de 20  $\mu\text{m}$  a été utilisé afin d'éliminer toute particule de sable. Pour l'expérience 2, c'est-à-dire celle testant une filtration avec UV, un filtre de 5  $\mu\text{m}$  a été utilisé avant la filtration UV (Sommer *et al.*, 1997). Pour éviter des différences de pression au sein des incubateurs à renouvellement d'eau, un seau recevant l'eau filtrée et alimentant les incubateurs a été disposé au dessus du système afin que tous les incubateurs soient alimentés par gravité (voir figure 2.4)..

## **2.5.5 Mesures des différents paramètres de l'eau et environnementaux**

### **2.5.5.1 Température de l'eau**

La température de l'eau a été conservée la plus constante possible et mesurée avec un thermomètre à mercure d'échelle -30°C to +50°C (BRANNAN<sup>TM</sup>, Angleterre). Elle a été mesurée tous les matins à 10 heures. De plus, un thermomètre minimum-maximum d'échelle -40°C à +50°C (BRANNAN<sup>TM</sup>, Angleterre) était constamment présent dans le bac contenant les incubateurs. La température a été mesurée à la fois dans les incubateurs témoins et dans le bac pour s'assurer qu'il n'y avait pas de trop grandes fluctuations entre celles-ci.

### **2.5.5.2 La salinité**

Pour les 2 premières séries d'expérience, la salinité a été mesurée tous les matins à 10 heures avec un réfractomètre optique d'échelle 0-100‰ (ATAGO, Japon<sup>TM</sup>), dans chacun des incubateurs témoins. Pour la dernière série d'expériences, sans incubateurs témoins, celle-ci ne fut mesurée que le premier et le dernier jour des expériences.

### **2.5.5.3 L'oxygène dissous dans l'eau**

Pour les deux premières séries d'expériences, l'oxygène dissous a été mesuré tous les matins à 10 heures dans les incubateurs témoins à l'aide d'un oxygénomètre (YSI 95<sup>TM</sup>, Etats-Unis).

### **2.5.5.4 La température de l'air**

La pièce a été équipée d'un système d'air conditionné conservant la température de la pièce entre 20 et 24°C (YORK<sup>TM</sup>).

### **2.5.5.5 La photopériode**

Pour chacune des expériences, la photopériode a été réglée pour avoir 12 heures de jour et 12 heures de nuit centrées sur 6 heures. L'intensité lumineuse n'a pas été mesurée, faute de moyens. La pièce a été équipée de 2 séries de lampes au néon : 6 lampes de 39 watts et de 1,1 mètres de long (PHILIPS, USA) et 4 lampes de 75 watts et de 2,5 mètres de long (OSRAM,

Mexique). Les lampes ont été disposées de manière régulière dans la pièce dont la surface était de 30 m<sup>2</sup>.

### **2.5.6 Nettoyage et désinfection**

Avant chaque expérience, le protocole suivant de nettoyage et désinfection a été suivi (Corpet, 1998) :

1. nettoyage de tout l'équipement avec du savon et une brosse afin d'éliminer toute la matière organique, et rinçage avec de l'eau douce ;
2. désinfection de l'équipement avec du chlore à 0,1 ppt (CHLORALEX<sup>TM</sup>, Mexique) ;
3. rinçage de l'équipement avec de l'eau douce ;
4. séchage de tout l'équipement au soleil afin d'éliminer toute particule de chlore.

## **2.6 Description des différentes expériences**

### **2.6.1 Les différents traitements de l'eau testés**

Deux types de traitement de l'eau ont été testés. Le premier a utilisé un filtre à particules de 20-µm. Le deuxième a utilisé un filtre à particules de 5 µm et une filtration par les UV utilisant 2 lampes de modèle G37T6VH (LIGHT SOURCES<sup>TM</sup>) à un débit de 5 litres par minutes (Sommer *et al.*, 1997).

### **2.6.2 Les différents incubateurs testés**

Trois types d'incubateurs ont été testés:

- Incubateur statique.
- Incubateur statique avec aération.
- Incubateur avec renouvellement de l'eau.

## **2.7 Les expériences réalisées**

Toutes les expériences ont été conduites du 9 avril au 18 mai 2001.

### **2.7.1 Le développement embryonnaire**

Le développement embryonnaire a été suivi par photographie du 11 au 15 mai 2001. La température de l'eau a fluctué de 1 degré Celsius autour de 25 °C. Les œufs ont été placés sur des lames histologiques à l'intérieur d'un bassin cylindrique de 500 litres avec une incubation statique avec aération. Les œufs ont été photographiés en utilisant un appareil photo numérique de modèle N°SSC-DC54A (SONY™, Japon) et un microscope Axiolab de modèle arbKT (ZEISS™, Allemagne) à x50 de grossissement. Pour les cinq premières heures, les photos ont été prises toutes les trente minutes. De la sixième à la onzième heure, elles ont été prises toutes les heures. A partir de la treizième heure et ce jusqu'à la fin de la première journée d'incubation, les œufs ont été photographiés toutes les deux heures. Pour le reste du développement embryonnaire, c'est-à-dire jusqu'à 96 heures, ils ont été photographiés toutes les 8 heures. Après avoir été sorti du bassin pour réaliser les photos, chaque lame n'a été utilisée qu'une seule fois.

### **2.7.2 Expérience préliminaire, exp. 1a : incubateurs statique ; statique + aération et à renouvellement d'eau testés avec de l'eau non filtrée par les UV**

Cette expérience a été conduite du 10 au 18 avril. Les trois types d'incubateur testés ont chacun reçu de l'eau de mer simplement filtrée à 20 µm. Pour chaque système testé, cinq incubateurs ont été utilisés, c'est-à-dire cinq répliqués du même système. L'un de ces 5 répliqués a été utilisé comme incubateur témoin. Dans les incubateurs témoins, chaque jour une lame histologique a été retirée au hasard pour contrôler la mortalité des œufs et la bactériologie des œufs. Des incubateurs témoins également, ont été prélevés des échantillons d'eau afin de contrôler la qualité bactériologique de l'eau. Les lames prélevées n'ont pas été remises dans les incubateurs après analyse afin de ne pas contaminer celles restantes. Sept

jours après la fécondation, le taux d'éclosion a été calculé pour tous les répliqués à l'exception des incubateurs témoins et des échantillons d'eau ont été prélevés dans tous les incubateurs pour la bactériologie. Dans cette expérience, le débit d'eau n'a pas été correctement calibré, la même expérience a donc été répétée, il s'agit de l'expérience 1b.

### **2.7.3 Même expérience réalisée avec des améliorations techniques : exp 1b**

Cette expérience a été conduite du 18 au 25 avril 2001. Cette fois-ci, le débit d'air pour les incubateurs statiques avec aération a été correctement fixé à 100 ml par minute comme décrit dans la section 2.5.3.3. De plus le débit d'eau pour les incubateurs à renouvellement d'eau a été calibré à 25 ml par minute comme décrit dans la section 2.5.3.3. Dans cette expérience ainsi que dans la suivante, les lames prélevées dans les incubateurs témoins ont été remplacées après le prélèvement ceci pour que les incubateurs témoins soient plus représentatifs de ce qui se passait dans les autres incubateurs. Sept jours après fécondation artificielle, le taux d'éclosion a été calculé à partir des 4 répliqués par traitement et des échantillons d'eau ont été prélevés pour la bactériologie.

### **2.7.4 Expérience 2 : incubateurs statique ; statique + aération et à renouvellement d'eau testés avec de l'eau filtrée par les UV**

Cette expérience a été conduite du 26 avril au 3 mai. Avant d'être filtrée avec les lampes UV, l'eau a reçu une filtration préalable à 5  $\mu\text{m}$ . Le même nombre de répliqués a été utilisé que pour les expériences précédentes, c'est-à-dire 5 incubateurs par traitement dont un incubateur témoin. Le mode de prélèvement et d'échantillons a été exactement le même que pour l'expérience précédente.

### **2.7.5 Expériences finales 3a et 3b : incubateurs statique et statique + aération testés simultanément avec de l'eau filtrée par les UV et de l'eau non filtrée par les UV**

Ces expériences ont été réalisées respectivement du 4 au 11 mai et du 11 au 18 mai. Dans ces deux répétitions de la même expérience, les incubateurs statiques et statiques + aération ont été simultanément testés avec de l'eau filtrée à 20 µm sans UV et de l'eau filtrée à 5 µm avec UV. Il y a donc eu 4 traitements différents dans ces expériences, statique sans UV, statique avec UV, statique + aération sans UV et statique plus aération avec UV. Cinq répliqués ont été utilisés par traitement. Afin d'augmenter la valeur statistique des résultats, les prélèvements journaliers de routine n'ont pas été faits comme précédemment sur des incubateurs témoins. Sept jours après la fécondation artificielle, le taux d'éclosion a été calculé à partir des cinq répliqués par traitement. Des échantillons d'eau pour la bactériologie ont été prélevés à partir de ces mêmes répliqués.

## **2.8 Evaluation de la qualité des œufs**

### **2.8.1 Evaluation du taux de fécondation**

Trois heures après le début de chaque expérience, le taux de fécondation a été calculé. Tous les œufs présents sur une lame histologique ont été observés sous le microscope au grossissement x 50. Les œufs au stade 16 ou 32 cellules ont été comptés comme fécondés, ceux au stade 1 cellule ou ceux avec une coloration blanche opaque ont été comptés comme non fécondés. Le taux de fécondation a été calculé avec la formule suivante :

$$\text{Taux de fécondation} = \frac{\text{Nombre d'œufs au stade 16 ou 32 cellules sur la lame}}{\text{Nombre total d'œufs sur la lame}} \times 100$$

Pour réaliser ce calcul, trois lames différentes ont été à chaque fois observées et le résultat obtenu est une moyenne des trois observations.

### 2.8.2 Calcul du taux d'éclosion

Sept jours après la fécondation artificielle, c'est-à-dire après que tous les œufs susceptibles d'éclore l'aient fait, le taux d'éclosion a été calculé. La méthode suivante a été utilisée : un par un, le contenu de chaque incubateur a été intégralement vidé dans une bassine rectangulaire en plastique blanc. Comme il arrive très souvent que les alevins collent aux parois de la bouteille, la bouteille vide, ainsi que son bouchon ont été rincés à l'intérieur de la bassine. Depuis cette bassine, l'eau a été progressivement transférée dans un bol blanc plus petit, où les alevins ont pu être comptés en petit nombre. Les alevins qui n'avaient aucun mouvement ont été considérés comme morts. Les œufs qui étaient encore collés aux lames ont également été considérés comme morts. Les comptages ont été réalisés en double aveugle, à savoir que le manipulateur ne savait de quel type d'incubateur il était en train de compter les œufs. Le taux d'éclosion a été calculé grâce à la formule suivante.

$$\text{Taux d'éclosion} = \frac{\text{Alevins morts} + \text{alevins vivants}}{\text{Alevins morts} + \text{alevins vivants} + \text{œufs morts}}$$

### 2.8.3 Calcul du taux de survie

La même technique que celle utilisée dans la section 2.8.2 a été utilisée et le taux de survie a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Taux de survie} = \frac{\text{Alevins vivants}}{\text{Alevins vivants} + \text{alevins morts} + \text{œufs morts}}$$

## **2.9 Techniques utilisées pour la bactériologie**

### **2.9.1 Echantillonnage**

#### **- À partir de l'eau des incubateurs**

1 ml d'eau a été prélevé 2 cm au-dessous de la surface de l'eau dans l'incubateur, et ceci en utilisant une pipette (200-1000µl, Labsystems<sup>TM</sup>). Un embout stérile a été utilisé pour chaque nouvel échantillon. Le prélèvement a ensuite été immédiatement mis dans un tube en verre contenant 2,5% de chlorure de sodium stérile. Un seul échantillon a été prélevé par incubateur. Pour les deux premières séries d'expériences, les prélèvements ont été réalisés de façon journalière sur les incubateurs témoins de chaque traitement. Pour la série d'expériences finales les prélèvements ont été réalisés un jour sur deux sur tous les incubateurs. Des prélèvements témoins sur l'eau des incubateurs avant que ceux-ci aient reçu les œufs, et sur la source d'eau ont également été réalisés avant le début de chaque expérience.

#### **- À partir des œufs**

Ces prélèvements ont été réalisés pour les deux premières séries d'expériences. 10 œufs vivants ont été prélevés journalièrement de chaque incubateur témoin. La sélection des dix œufs était réalisée à l'aide d'une spatule miniature en métal préalablement trempée dans l'alcool à 90° et flambée. Les œufs récupérés étaient transférés dans un ependorf stérile de 2,5 ml. Des prélèvements témoins ont également été réalisés dans ce cas à partir d'œufs venant d'être fécondés, ce de manière à mettre en évidence l'existence potentielle d'une contamination verticale.

### **2.9.2 Les dilutions**

#### **- Dilutions des échantillons d'eau**

Des dilutions au dixième ont été réalisées en utilisant le même type de pipettes et d'embouts que pour le prélèvement. Avant chaque dilution, chaque échantillon a été re-suspendu à l'aide d'un vortex. Pour l'expérience préliminaire 1a, trois dilutions ont été réalisées,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  pour inoculer les gels d'agarose. Pour les expériences suivantes, seulement une ou deux dilutions a été réalisée, en utilisant comme référence l'expérience préliminaire pour choisir celle convenant le mieux.

#### - Dilution des prélèvements d'œufs

Les œufs collectés ont été mis dans un homogénéisateur en verre avec 1 ml de chlorure de sodium stérile à 2,5%. Après homogénéisation, les solutions ont subies le même nombre de dilutions sériales au dixième qu'énoncées dans la section précédente.

#### **2.9.3 Inoculation des échantillons**

Les échantillons ont été inoculé sur du TSA (Trypton Soya Agar) + 2,5% NaCl. Les boîtes de Pétri ont été préparées dans la semaine de leur utilisation et ont été conservées au réfrigérateur jusqu'au moment de leur utilisation. Juste avant leur inoculation, chaque boîte de Pétri a été divisée en 6 avec un marqueur indélébile, puis chaque portion a reçu 20µl de la solution à inoculer à l'aide d'une pipette LabSystems<sup>TM</sup> 5-40 µl.

#### **2.9.4 Incubation**

Pour l'expérience préliminaire 1a, les gels ont été incubés pendant une nuit à 30°C. Mais comme certaines bactéries avaient une croissance trop rapide, il était impossible le lendemain de compter le nombre de colonies ayant poussé. Par conséquent, on a décidé pour les expériences suivantes, que les gels seraient incubés à température ambiante,  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 24 heures.

#### **2.9.4 Les comptages bactériens**

Les bactéries ont été comptées en utilisant un compteur de colonies (DARKFIELD™ Québec). Le nombre d'unités formant des colonies (CFU) dans chacune des 6 sections de la boîte de pétri était noté. Puis, une moyenne de ces 6 valeurs était calculée. Le nombre de CFU par ml est donné par la formule suivante.

$$\text{Nombre de CFU/ml} = \frac{\text{Nombre moyen de CFU/20 } \mu\text{l} \times 5}{\text{Dilution de l'échantillon}}$$

#### **2.9.5 Identification des bactéries**

Des tests d'identification ont été réalisés à partir des échantillons prélevés dans l'expérience préliminaire 1a. Les bactéries les plus présentes sur les gels avaient été choisies en fonction de leur taille, morphologie, texture, et couleur. Les tests suivants ont été réalisés : coloration de Gram, motilité, test à l'oxydase, et test OF.

#### **2.10 Analyses statistiques**

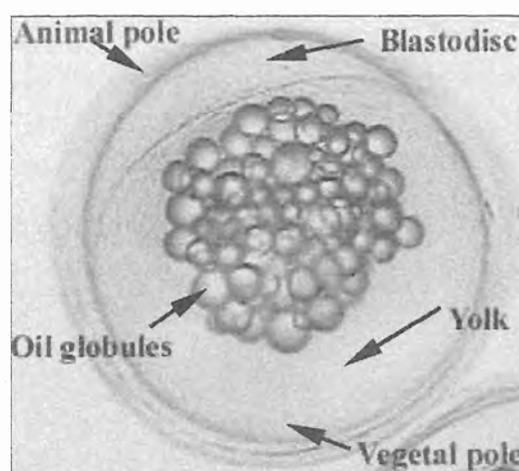
Un test d'analyse non-paramétrique de la variance (Kruskal-Wallis) et un post-test non paramétrique de comparaison multiple (Dunn's multiple comparison) ont été réalisés en utilisant le logiciel InStat version 3.00 pour Windows 95 (GraphPad Software 1998).

### 3. Résultats

#### 3.1 Le développement embryonnaire des œufs du sphéroïde annelé

##### 3.1.1 Caractéristiques des œufs

Le diamètre des œufs de ce poisson-globe est de  $0,75 \text{ mm} \pm 0,05$ . Il n'y a pas de variations de taille durant l'incubation. Les œufs ont deux types de réserve, qui sont le vitellus et les globules huileux. Au début, la plus grande partie de l'œuf est remplie avec le vitellus. Les globules de gras sont présents dans la partie centrale de l'œuf. Le développement embryonnaire est limité au blastodisque, mince région de cytoplasme dépourvu de vitellus au pôle animal de l'œuf, comme indiqué sur la figure 3.1.



##### **Légende**

- Animal pole = pôle animal
- Oil globules = gouttelettes lipidiques
- Blastodisc = blastodisque
- Yolk = vitellus
- Vegetal pole = pôle végétal

Figure 3: œuf de sphéroïde annelé

##### 3.1.2 Premières divisions de l'œuf

Le type de division cellulaire ou clivage que l'on rencontre chez ce poisson ne divise pas complètement le cytoplasme, on parle de clivage méroblastique (du grec *meros*, partie). Seul le cytoplasme du blastodisque devient l'embryon. Aussi, ce type de clivage méroblastique est-il appelé discoïdal (Gilbert, 1997).

### **3.1.3 Du blastodisque à la blastula**

Les œufs au stade 2 cellules, ont été observées une heure après fécondation. La première division coupe le blastodisque en deux blastomères de même taille (figure 3.2). La deuxième division a été observée une heure et demie après la fécondation et donne quatre blastomères de taille comparable (figure 3.3). La troisième division a été observée 2 heures après fécondation et donne huit blastomères assez identiques (figure 3.4). Le stade 16 cellules n'a pas été photographié. Deux heures et demie après fécondation, on a pu observer le stade 32 cellules (figure 3.5 et 3.6, vue du pôle animal). A partir de ce stade, les plans de clivages sont devenus irréguliers, et le nombre de cellules impossible à compter, puis une masse de cellules a commencé à apparaître au pôle animal (figure 3.7). Cette masse de cellule forme le blastodisque, c'est le stade *blastula*.

### **3.1.4 Gastrulation des œufs de sphéroïde annelé**

La gastrulation est le processus morphogénétique qui débute immédiatement après que la blastula soit formée. Durant la gastrulation, l'œuf subit une série de mouvements internes et de transformations qui aboutit à la formation des trois feuillets embryonnaires qui seront à l'origine de l'organisme adulte tout entier. Il s'agit de l'ectoderme, de l'endoderme et du mésoderme.

#### **3.1.4.1 Un des mouvements cellulaires importants de la gastrulation : l'épibolie**

Cinq heures et demie après la fécondation, les bords du blastodisque s'épaississent et commencent à s'étendre sur la surface du vitellus (figure 3.8). Sept heures et demie après fécondation, 40% du vitellus est recouvert. Huit heures et demie après la fécondation, le feuillet syncitial vitellin (yolk syncitial layer ou YSL) a pu être distingué (figure 3.8). Le YSL est la fusion entre l'extrémité végétative du blastodisque et les cellules vitellines sous-jacentes (Gilbert, 1997). Neuf heures et demie après la fécondation, la lame enveloppant le sac vitellin, l'ectophylle (the enveloping layer ou EVL) a pu être distingué. L'EVL est en fait composé

des cellules les plus superficielles du blastodisque, formant un épithélium simple. Entre l'EVL et l'YSL se trouve la couche des cellules dites profondes ou embophylle qui sera à l'origine de l'embryon proprement dit (figure 3.9).

#### **3.1.4.2 Les autres mouvements cellulaires se produisant durant la gastrulation**

Des mouvements d'« embolie », de convergence et d'extension viennent compléter la gastrulation. Mais ce type de mouvements cellulaires internes n'a pas pu être mis en évidence par la simple observation microscopique. Dix heures et demie après fécondation, le stade gastrula semble être atteint (figure 3.9). A ce stade, les régions crânielles et ventrales peuvent aisément être distinguées.

#### **3.1.5 La neurulation**

Onze heures et demie après la fécondation, une incurvation de l'ectophylle (EVL) est apparue en région dorsale de la gastrula formant la plaque neurale (figure 3.10). Une heure plus tard, la plaque neurale s'était épaissie. La formation du tube neural et du neurocèle n'a pas clairement pu être observée.

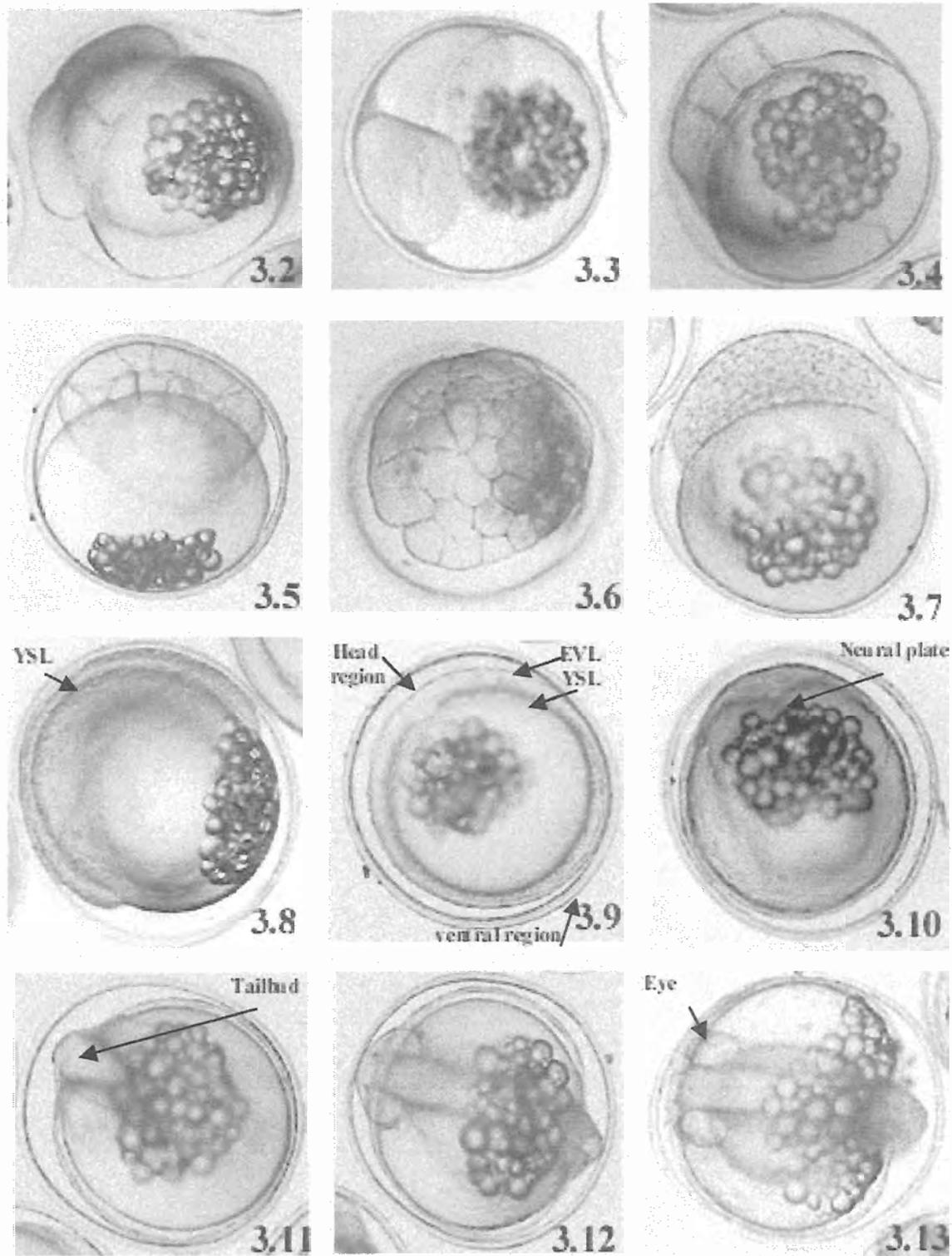
#### **3.1.6 Apparition de la symétrie**

De la quinzième à la dix-septième heure de développement, le bourgeon caudal se forme et s'allonge. Les somites se devinent par transparence et l'embryon acquiert progressivement sa symétrie bilatérale (figure 3.11 et 3.12).

#### **3.1.7 Suite du développement embryonnaire jusqu'à l'éclosion**

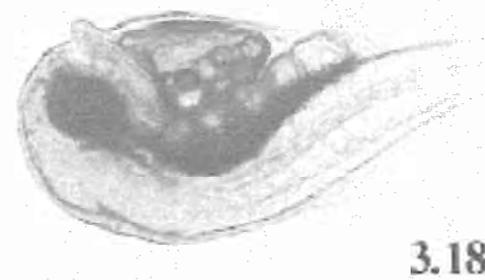
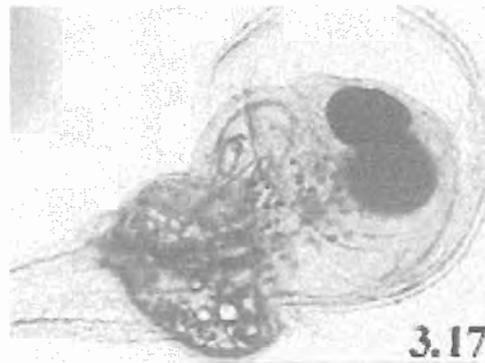
Dix-neuf heures après fécondation, l'ébauche des yeux est visible (figure 3.13). Après vingt-et-une heures, les yeux sont clairement visibles et la métamérie est maintenant clairement visible. Après vingt-sept heures, la tête et la colonne vertébrale sont visibles (figure 3.13). Les premiers mouvements de l'embryon apparaissent après trente cinq heures. A ce stade, l'embryon occupe les trois quarts de la circonférence de l'œuf. Après quarante-quatre heures,

les cristallins sont visibles et quelques mélanophores commencent à apparaître dans la partie de l'embryon encore en contact avec le vitellus (figure 3.14). Cinquante et une heure après la fécondation, le cœur bat et la pigmentation a gagné la partie caudale de l'organisme. Après cinquante neuf heures, des vaisseaux sanguins sont visibles aux alentours du vitellus. Après soixante-sept heures, la tête apparaît bien séparée du reste du corps et la pigmentation des yeux commence, à leur base. De plus, la pigmentation ventrale de l'embryon est complète. Soixante-dix sept heures après fécondation, les yeux sont totalement pigmentés (figure 3.15). Après quatre-vingt quatre heures, la plupart des alevins éclosent lorsqu'ils sont exposés à la lumière du microscope (figure 3.16). Après quatre-vingt seize heures, la plupart des alevins ont éclos. Les alevins mesurent approximativement 2 mm de long, et ont la bouche totalement fermée, leurs réserves en vitellus et en gouttelettes lipidiques ne sont pas encore épuisées (figure 3.17 et 3.18).



x50

Figure 3.2 à 3.13: Le développement embryonnaire des oeufs de sphéroïde annelé



x50

Plates 3.14 à 3.18: Le développement embryonnaire des oeufs de sphéroïde annelé (fin).

### 3.2 Résultats des autres expériences

#### 3.2.1 Expérience préliminaire, exp. 1a : incubateurs statique ; statique + aération et à renouvellement d'eau testés avec de l'eau non filtrée par les UV

##### Paramètres d'eau :

Pour toutes les expériences, la salinité a toujours été entre 34 et 35 ‰. Durant l'exp. 1a, la température de l'eau a fluctué entre 22° et 23,2°C avec une moyenne de 22,8°C. L'oxygène dissous dans l'eau des incubateurs témoins de OF (système d'incubateurs avec aération et sans UV) et de FTF (système d'incubateurs avec renouvellement de l'eau sans UV) a varié de 6,5 à 7,2 mg/l. Ces valeurs sont un peu supérieures à celles obtenues pour SF (système d'incubateurs statiques) dans lequel l'oxygène dissous dans l'eau est passé de 6,9 mg/l le premier jour à 5 mg/l à la fin de l'expérience.

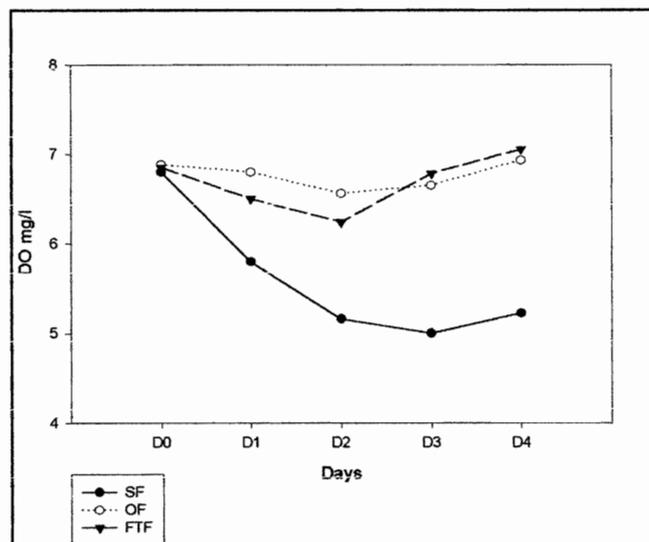


Figure 3.1: Evolution de l'oxygène dissous dans les incubateurs témoins des 3 types de systèmes testés ; SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV ; FTF= système avec renouvellement d'eau et filtration sans UV

- Taux de fécondation :

Le taux moyen de fécondation pour les trois types de système a été  $97,5 \pm 1,25 \%$ .

- Tests d'identification des bactéries :

Ces tests ont été réalisés sur 12 cultures pures provenant de l'eau des trois types d'incubateurs. Les caractéristiques de base de ces 12 types de colonies sont présentées dans le tableau 3.1. Toutes étaient des bactéries gram négatives

**Tableau 3.1 : Résultats des tests d'identification bactérienne pratiqués sur les incubateurs statique sans UV (SF), statique avec aération et sans UV (OF) et avec renouvellement de l'eau sans UV (FTF)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Origine</b>	SF	SF	SF	SF	OF	OF	OF	OF	OF	FTF	FTF	FTF
<b>Gram</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>forme</b>	C	B	B	C	B	C	B	B	C	B	B	B
<b>Oxydase</b>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<b>O-F</b>	-	F	F	-	-	F	-	-	-	-	F	-
<b>Motilité</b>	+	+	+	+	+	+	-?	+	+	-?	+	+

C - coque; B-bâtonnet; F- fermentative; O - oxydative

Les isolats 7 et 10 ont été trouvés non-motiles à la première observation mais pour des raisons techniques, n'ont pas été cultivés en milieu de culture pour une confirmation. Tous les isolats ont été trouvés gram négatifs. Cette brève étude n'a pas permis d'obtenir une identification précise d'espèces.

▪ Charge bactérienne:

La charge bactérienne dans l'eau des incubateurs statiques (SF) a commencé à  $1.23 \times 10^5$  CFU/ml (Colony Forming Unit) pour diminuer en fin d'expérience jusqu'à  $8 \times 10^4$  CFU/ml (figure 3.2). Dans les incubateurs statiques avec aération, les comptages bactériens dans l'eau ont commencé à  $6,6 \times 10^4$  CFU/ml et ont diminué jusqu'à  $3 \times 10^3$  CFU/ml. Pour les incubateurs avec renouvellement d'eau la charge bactérienne est passée de  $5 \times 10^3$  CFU/ml à  $2 \times 10^4$  CFU/ml en fin d'expérience.

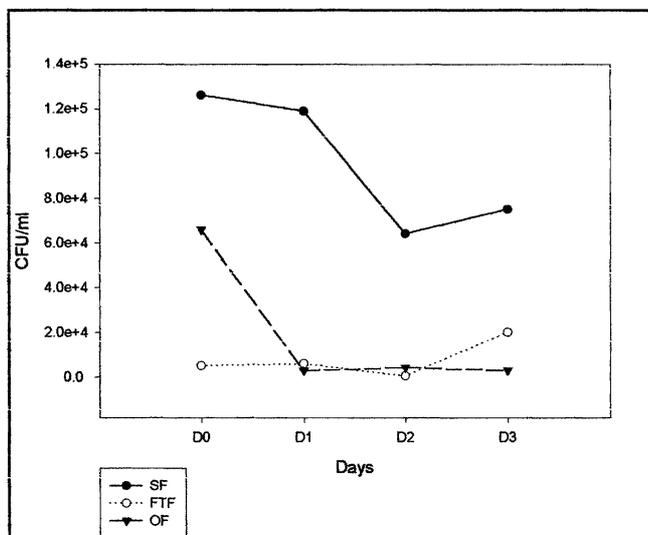


Figure 3.2 : Evolution de la charge bactérienne dans l'eau des incubateurs pour l'exp. 1a ; SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV ; FTF= système avec renouvellement d'eau et filtration sans UV

La figure 3.3 représente la charge bactérienne dans l'eau des incubateurs au dernier jour de l'expérience pour les quatre répliqués de chaque type de système. Le niveau moyen de la charge bactérienne a été de  $7,1 \times 10^4$  CFU/ml  $\pm 5,1 \times 10^4$  pour SF. Pour OF et FTF la charge bactérienne était respectivement de  $2,1 \times 10^3$  CFU/ml  $\pm 1,7 \times 10^3$  et  $1,4 \times 10^3$  CFU/ml  $\pm 1,2 \times 10^3$ .

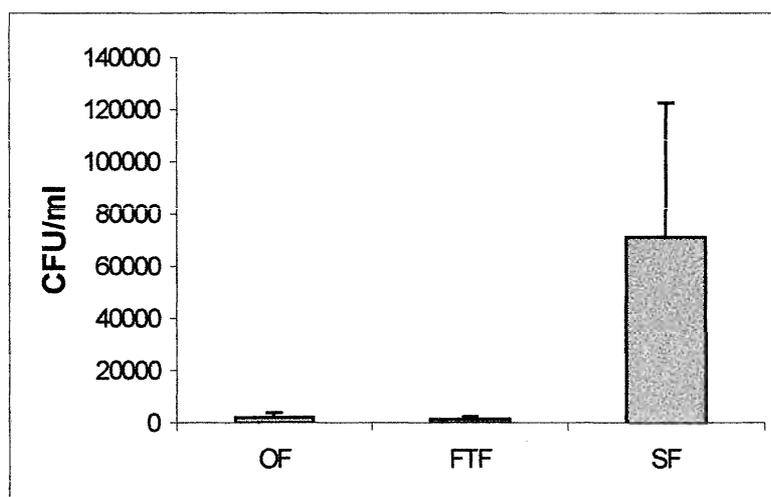


Figure 3.3 : Charge bactérienne dans l'eau des incubateurs des systèmes SF, OF et FTF au dernier jour de l'expérience 1a ; SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV ; FTF= système avec renouvellement d'eau et filtration sans UV

Concernant la charge bactérienne dans les œufs, il y a eu une relative baisse de celle-ci dans les trois types de traitement. (figure 3.4). Initialement, la charge bactérienne des œufs était plus importante dans le système statique avec aération (OF) en comparaison avec le système avec renouvellement d'eau, mais après trois jours la charge bactérienne était semblable dans les trois groupes.

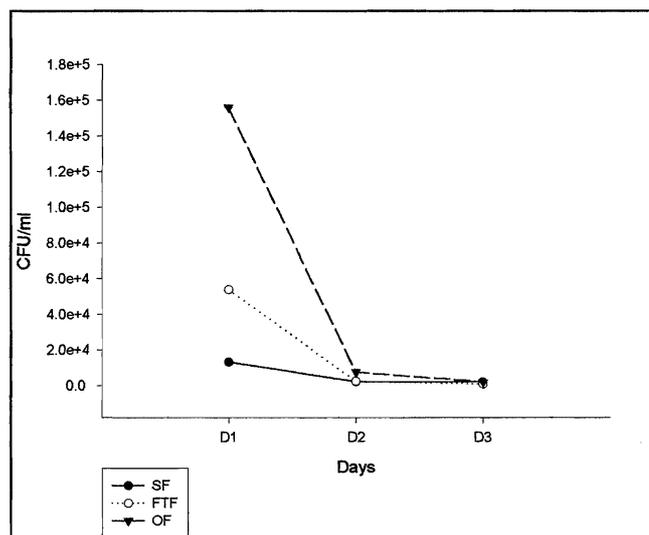


Figure 3.4 : Evolution de la charge bactérienne dans les œufs des incubateurs témoins de l'exp. 1a ; SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV ; FTF= système avec renouvellement d'eau et filtration sansUV

▪ Taux d'éclosion et taux de survie

Les taux d'éclosion et de survie observés dans les incubateurs statiques (SF) ont été légèrement supérieurs à ceux observés dans les incubateurs statiques avec aération. Dans les incubateurs avec renouvellement d'eau (FTF), seulement 10% des œufs ont éclos et aucune larve n'a survécu.

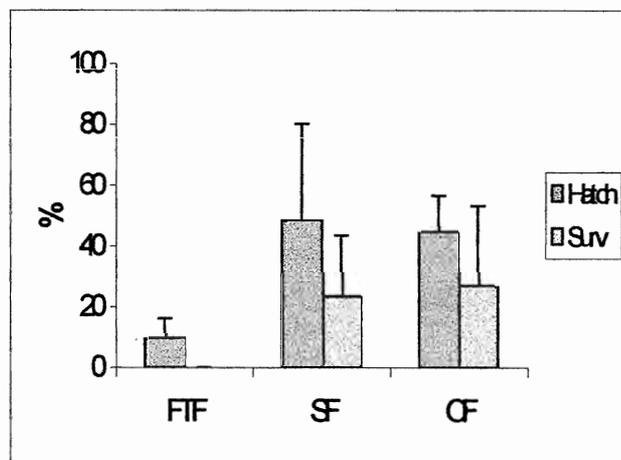


Figure 3.5 : Taux d'éclosion et taux de survie observés dans les différents traitements SF, OF, FTF à l'issue de l'Exp. 1a ; SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV ; FTF= système avec renouvellement d'eau et filtration sans UV

### 3.2.2 Même expérience réalisée avec des améliorations techniques : exp 1b

- Paramètres d'eau:

Durant le déroulement de cette expérience, la température de l'eau a varié de 22,5°C à 24,5°C avec une température moyenne de 23,3°C. Dans les trois types de traitement, on constate une évolution en parallèle de l'oxygène dissous en fonction du temps (figure 3.6). Le niveau d'oxygène dissous en OF (incubateurs statiques et aérés sans filtration par les UV) est passé de 6,58 à 6 mg/l et celle de SF (incubateur statique sans UV) et FTF (incubateur à renouvellement de l'eau sans UV) est descendu de 6,2 à 5,1mg/l.

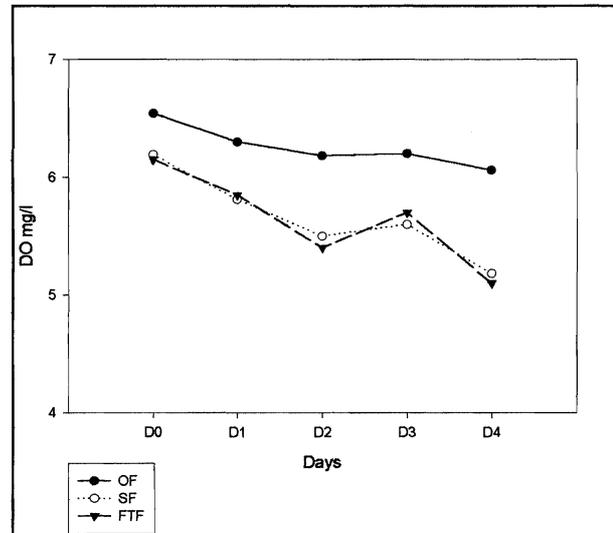


Figure 3.6 : Evolution de l'oxygène dissous dans les incubateurs témoins des 3 types de systèmes testés dans l'exp.1b : SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV ; FTF= système avec renouvellement d'eau et filtration sans UV

- Taux de fécondation

Le taux moyen de fécondation pour les trois types de système a été  $95,5\% \pm 4,6$ .

- Charge bactérienne dans l'eau et dans les oeufs

Un pic a pu être observé 24 heures après fécondation à  $5 \times 10^5$  CFU/ml pour le traitement statique (SF) et à  $5,5 \times 10^5$  CFU/ml pour le traitement statique avec aération (OF). Pas de pic de CFU n'a été observé pour le traitement avec renouvellement de l'eau.

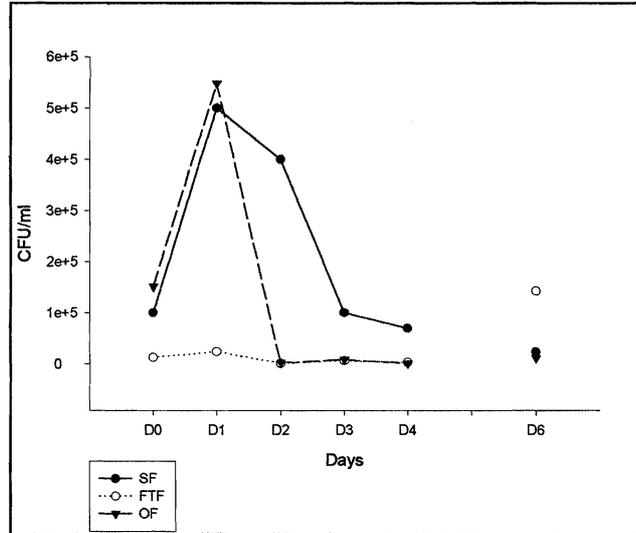


Figure 3.7 : Evolution de la charge bactérienne dans l'eau des incubateurs pour l'exp. 1b : SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV ; FTF= système avec renouvellement d'eau et filtration sans UV

La charge bactérienne présente dans l'eau des incubateurs testés le dernier jour de l'expérience a montré  $1,4 \times 10^5$  CFU/ml  $\pm 8,5 \times 10^4$  pour les incubateurs avec renouvellement de l'eau (FTF),  $2,4 \times 10^4$  CFU/ml  $\pm 1,3 \times 10^4$  pour les incubateurs statiques (SF) et  $1,19 \times 10^4$  CFU/ml  $\pm 6,3 \times 10^3$  pour les incubateurs statiques avec aération.

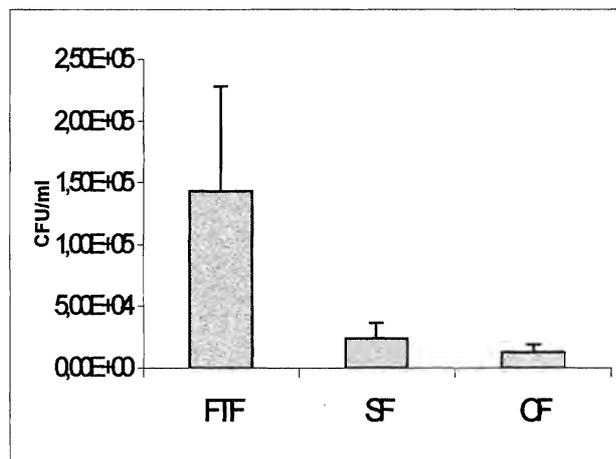


Figure 3.8 : Charge bactérienne dans l'eau des incubateurs des systèmes SF, OF et FTF au dernier jour de l'expérience 1b : SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV ; FTF= système avec renouvellement d'eau et filtration sans UV

Un test de Kruskal-Wallis a montré que la charge bactérienne était significativement différente dans les traitements (  $H = 7,731$ ;  $DF = 2$ ;  $P = 0,0066$ ). Un test de comparaison multiple de Dunn a précisé que la charge bactérienne dans les systèmes avec renouvellement d'eau (FTF) était significativement plus élevée que dans les systèmes statiques avec aération (OF) avec  $p < 0,05$ . De plus, une augmentation de la charge bactérienne sur les œufs a été observée dans tous les traitements entre le premier et le troisième jour de l'expérience. En effet, dans les systèmes statiques (SF), statique avec aération (OF) et avec renouvellement d'eau (FTF), le niveau de bactéries a augmenté respectivement de  $2,7 \times 10^3$  CFU/ml à  $2,7 \times 10^5$  CFU/ml pour SF;  $5,8 \times 10^3$  CFU/ml à  $1,4 \times 10^4$  CFU/ml pour OF et de  $2,7 \times 10^3$  CFU/ml à  $1,4 \times 10^5$  CFU/ml pour FTF (figure 3.9).

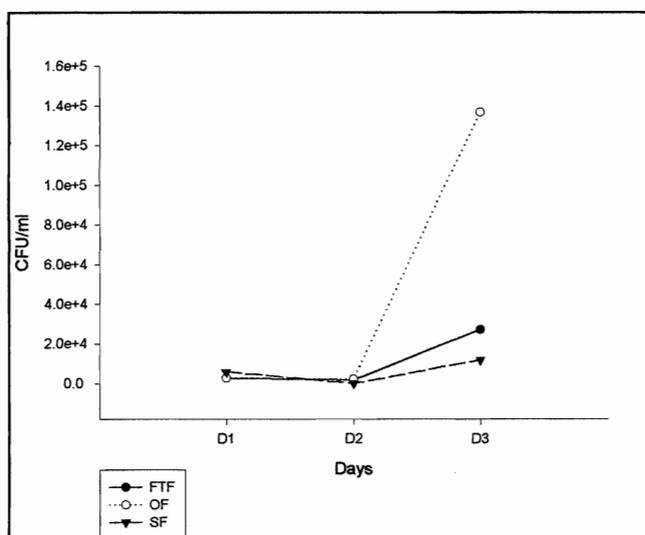


Figure 3.9 : Evolution de la charge bactérienne dans les œufs des incubateurs témoins de l'exp.1b : SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV ; FTF= système avec renouvellement d'eau et filtration sans UV

▪ Taux d'éclosion et taux de survie

Un test de Kruskal-Wallis ( $H = 6,64$ ;  $DL = 2$ ;  $p = 0,036$  ou  $DL$  est le nombre de degrés de liberté), complété par un test de comparaison multiple de Dunn a montré que le taux

d'éclosion pour les incubateurs statiques avec aération (OF) était significativement plus élevé que pour les incubateurs avec renouvellement d'eau ( $p < 0,05$ )

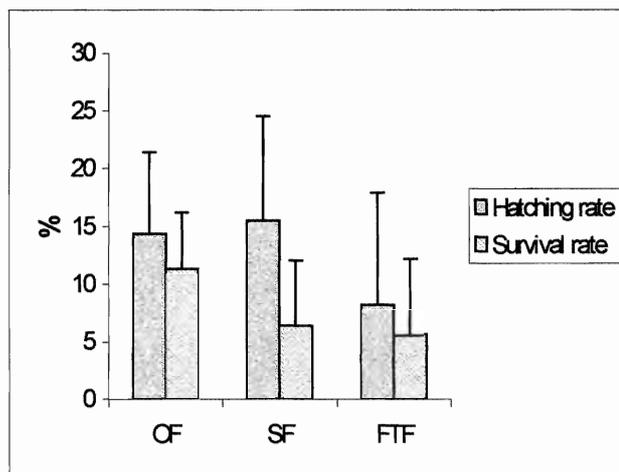


Figure 3.10 : Taux d'éclosion et taux de survie observés dans les différents traitements SF, OF, FTF à l'issue de l' Exp. 1b : SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV ; FTF= système avec renouvellement d'eau et filtration sans UV

### 3.2.3 Exp. 2

Durant cette expérience, la température de l'eau a varié de 22,5° à 25°C avec une température moyenne de 24,2°C. Le niveau d'oxygène dissous dans les incubateurs statiques avec aération et filtration aux UV (Ouv) a été toujours plus élevé que dans les incubateurs statiques avec filtration aux UV (Suv), lui-même ayant été toujours plus élevé que dans les incubateurs avec renouvellement d'eau filtrée aux UV (FTuv), voir figure 3.11.

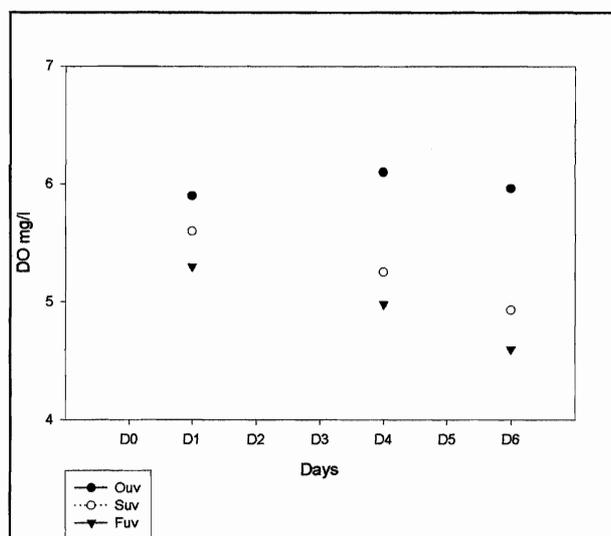


Figure 3.11 : Evolution de l'oxygène dissous dans les incubateurs témoins des 3 types de systèmes testés dans l'exp.2 ; Suv= système statique avec filtration avec UV ; Ouv = système statique avec aération et filtration avec UV; Ftuv= système avec renouvellement d'eau et filtration avec UV

- Taux de fécondation

Le taux moyen de fécondation pour les trois types de système a été  $95,5 \pm 0,9$  °C.

- Charge bactérienne dans l'eau des incubateurs et dans les œufs

Un pic de la charge bactérienne a été observée quarante-huit heures après le début de l'expérience dans l'incubateur témoin du système statique avec aération et UV (Ouv) avec  $1,15 \times 10^6$  CFU/ml et dans l'incubateur témoin du système statique et UV (Suv) avec  $2 \times 10^5$  CFU/ml. Dans l'incubateur témoin du système de renouvellement de l'eau avec UV (Ftuv), la charge bactérienne a diminué sans cesse de  $7,5 \times 10^4$  CFU/ml au premier jour de l'expérience à  $4,2 \times 10^3$  CFU/ml à la fin (figure 3.12)

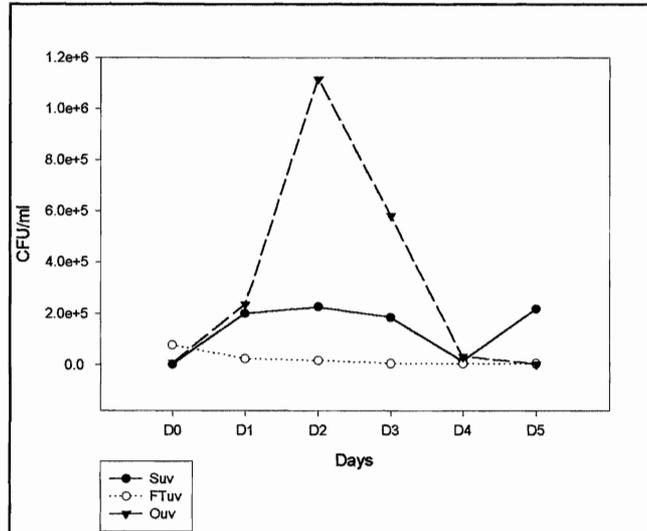


Figure 3.12 : Evolution de la charge bactérienne dans l'eau des incubateurs pour l'exp. 2 : Suv= système statique avec filtration avec UV ; Ouv = système statique avec aération et filtration avec UV ; FTuv= système avec renouvellement d'eau et filtration avec UV

Le dernier jour de l'expérience, la charge bactérienne était plus importante dans les répliqués du système statique avec UV avec  $6 \times 10^6 \pm 2,3 \times 10^5$  CFU/ml que dans les répliqués du système avec renouvellement d'eau et UV avec  $2,3 \times 10^4 \pm 3 \times 10^3$  CFU/ml identique aux répliqués du système statique avec aération et UV avec  $7,6 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$  CFU/ml (figure 3.13).

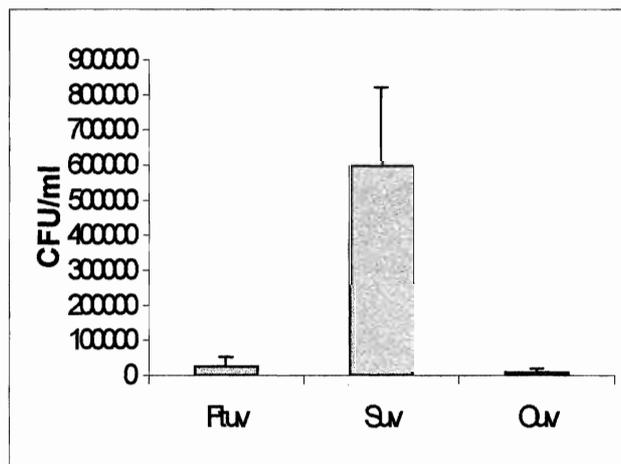


Figure 3.13 : Charge bactérienne dans l'eau des incubateurs des systèmes SF, OF et FTF au dernier jour de l'expérience exp. 2 : Suv= système statique avec filtration avec UV; Ouv = système statique avec aération et filtration avec UV ; FTuv= système avec renouvellement d'eau et filtration avec UV

Un test de Kruskal-Wallis a montré que la charge bactérienne était significativement différente dans les trois traitements (  $H = 8$ ;  $DL = 2$ ;  $p = 0,0048$ ). Ce test a été complété par un test de comparaison multiple de Dunn qui a montré que la charge bactérienne dans les incubateurs statiques avec UV était significativement plus élevée que dans les incubateurs statiques avec aération et UV ( $p < 0.05$ ). Pas d'autres différences significative n'a été mise en évidence entre les trois traitements. L'évolution de la charge bactérienne en fonction du temps dans les œufs du système Suv a suivi une courbe de type parabolique avec un pic à  $3,5 \times 10^5$  CFU/ml entre les jours deux et trois de l'expérience. Dans le système Ftuv, le nombre de bactéries a un peu augmenté au fil du temps en passant de  $4,5 \times 10^3$  CFU/ml au premier jour de l'expérience à  $7 \times 10^3$  CFU/ml au quatrième jour. Dans les incubateurs du système Ouv, le nombre de bactéries sur les œufs a diminué de  $6 \times 10^4$  CFU/ml au premier jour à  $1,1 \times 10^4$  CFU/ml au quatrième jour.

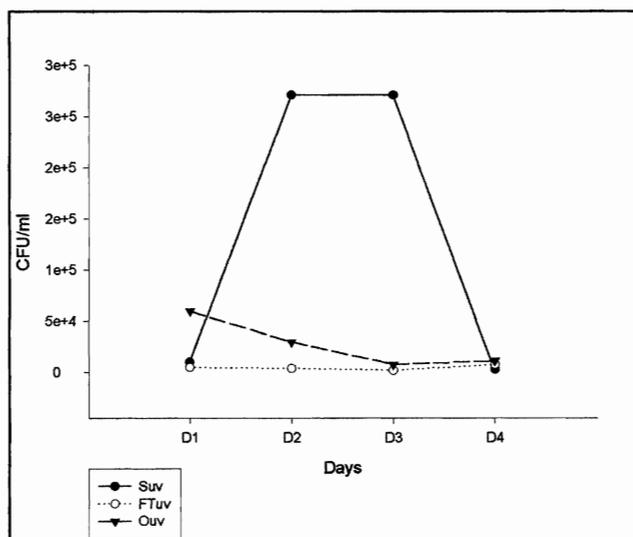


Figure 3.14 : Evolution de la charge bactérienne dans les œufs des incubateurs témoins de l'exp.2 : Suv= système statique avec filtration avec UV; Ouv = système statique avec aération et filtration avec UV ; Ftuv= système avec renouvellement d'eau et filtration avec UV

▪ Taux d'éclosion et taux de survie

Le taux d'éclosion dans les incubateurs du système Ouv a été plus élevé que les incubateurs du système Suv lui-même plus élevé que dans les incubateurs du système Ftuv. Le taux de survie dans ces trois systèmes sont ordonnés de la même façon (figure 3. 15).

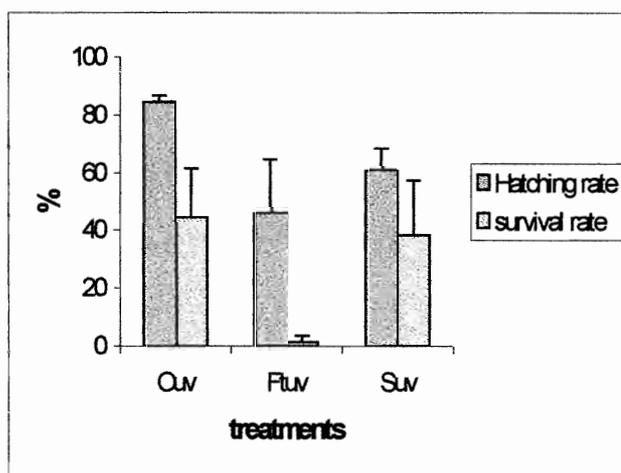


Figure 3.15 : Taux d'éclosion et taux de survie observés dans les différents traitements Suv, Ouv, Ftuv à l'issue de l' Exp. 2 : Suv= système statique avec filtration avec UV ; Ouv = système statique avec aération et filtration avec UV ; Ftuv= système avec renouvellement d'eau et filtration avec UV

Un test de Kruskal-Wallis ( $H = 6,957$ ;  $DL = 2$ ;  $p = 0,0309$ ) complété par un test de comparaison multiple de Dunn ( $p < 0,05$ ) ont montré que le taux d'éclosion du système statique avec aération et UV (Ouv) était significativement plus élevé que dans le système avec renouvellement de l'eau et UV (Ftuv)

**3.2.4. Expériences finales 3a et 3b : incubateurs statique et statique + aération testés simultanément avec de l'eau filtrée par les UV et de l'eau non filtrée par les UV Exp. 3a et Exp. 3b**

▪ La température de l'eau

Pour l'exp. 3a, la température a varié de 22°C à 24,8°C avec une température moyenne de 23,6°C. Pour l'exp. 3b, la température a varié de 22,8°C à 26°C avec une température moyenne de 24,8°C.

▪ Taux de fécondation

Le taux de fécondation a été de  $93,8 \pm 3,1\%$  pour l'exp.3a et de  $91,3 \pm 1,5\%$  pour l'exp. 3b.

▪ Charge bactérienne dans l'eau des incubateurs

La charge bactérienne pour chacune de ces deux mêmes expériences a présenté un pic entre le début des expériences et le quatrième jour. Après le jour 4 des expériences, la charge bactérienne a commencé à augmenter de nouveau pour tous les traitements, voir figures 3.16 et 3.17.

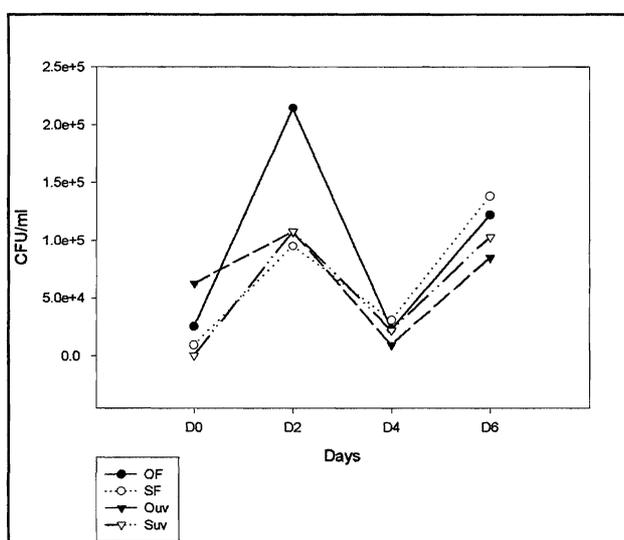
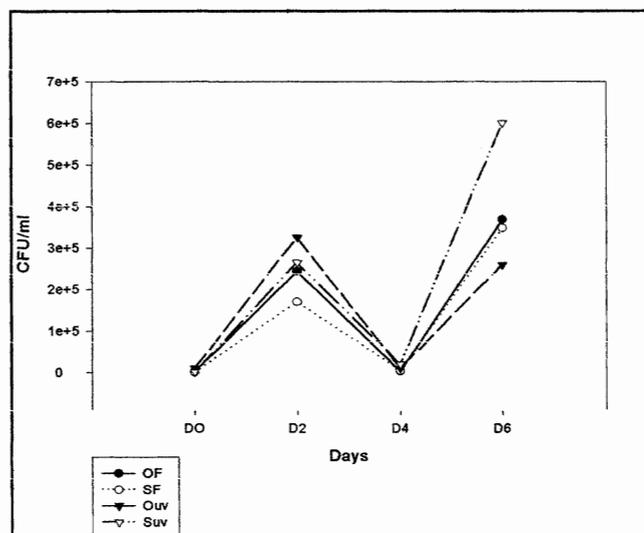


Figure 3.16 : Evolution de la charge bactérienne moyenne dans chacun des 4 traitements de l'exp. 3a : Suv= système statique avec filtration avec UV ; Ouv = système statique avec aération et filtration avec UV ; et SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV



**Figure 3.17 : Evolution de la charge bactérienne moyenne dans chacun des 4 traitements de l'exp. 3b : Suv= système statique avec filtration avec UV ; Ouv = système statique avec aération et filtration avec UV ; et SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV**

Des tests de Kruskal-Wallis ont été réalisés afin de déterminer d'éventuelles différences significatives entre les traitements chaque jour de prélèvement. Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau 3.2 pour l'expérience 3a et le tableau 3.3 pour l'expérience 3b.

**Tableau 3.2 : Résultats des tests statistiques déterminant les différences entre la charge bactérienne des 4 traitements : Suv= système statique avec filtration avec UV ; Ouv = système statique avec aération et filtration avec UV ; et SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV de l'expérience 3a**

	Test de Kruskal-Wallis	Post- Test de Dunn's
Jour 0	H = 10,499 DL = 3 p = 0,0148	SF plus élevé que Suv (p<0,05)
Jour 2	H = 8,143 DL = 3 p = 0,0531	Pas de différence significative
Jour 4	H = 7,977 DL = 3 p = 0,0465	SF plus élevé que Ouv (p<0,05)
Jour 6	H = 2.521 DL = 3 p = 0.4751	Pas de différence significative

Tableau 3.3 : Résultats des tests statistiques déterminant les différences entre la charge bactérienne des 4 traitements : Suv= système statique avec filtration avec UV ; Ouv = système statique avec aération et filtration avec UV ; et SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV de l'expérience 3b

	Test de Kruskal-Wallis	Post-test de Dunn's
Jour 0	H = 15,694 DL = 3 p = 0,0013	Ouv plus élevé que Suv
Jour 2	H = 2,977 DL = 3 p = 0,3952	Pas de différence significative
Jour 4	H = 12,902 DL = 3 p = 0,0049	Suv plus élevé que OF
Jour 6	H = 4,280 DL = 3 p = 0,2328	Pas de différence significative

▪ Taux d'éclosion et taux de survie

Les résultats de l'expérience 3a sont présentés dans la figure 3.18.

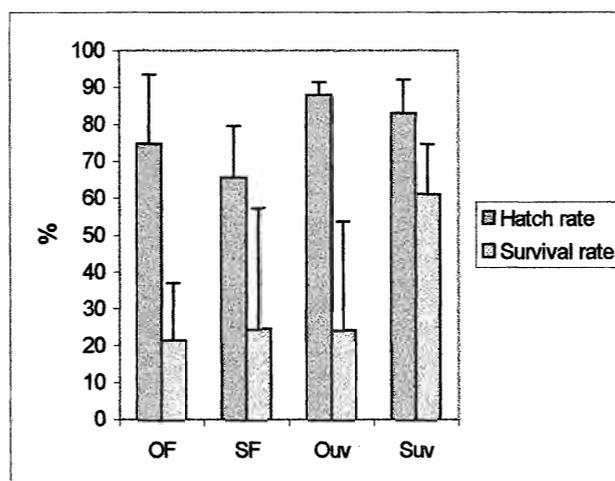


Figure 3.18 : Taux de survie et taux d'éclosion pour les 4 traitements de l'exp. 3a : Suv= système statique avec filtration avec UV ; Ouv = système statique avec aération et filtration avec UV ; et SF= système statique avec filtration sans UV ; OF= système statique avec aération et filtration sans UV

Un test de Kruskal-Wallis ( $H = 8,794$  ;  $DL = 3$  ;  $p = 0,0322$ ), complété par un test de comparaison multiple de Dunn's a montré que le taux d'éclosion des incubateurs statiques avec aération et UV (Ouv) était significativement plus élevé que celui des incubateurs statiques sans aération et sans UV (SF) ( $p < 0,05$ ).

Les résultats de l'expérience 3b sont présentés dans la figure 3.19.

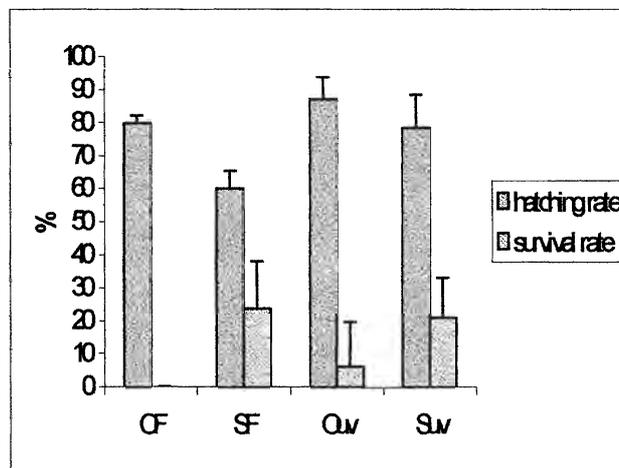


Figure 3.19 : Taux de survie et taux d'éclosion pour les 4 traitements de l'exp. 3b ; Suv= système statique avec filtration avec UV; Ouv = système statique avec aération et filtration avec UV; et SF= système statique avec filtration sans UV; OF= système statique avec aération et filtration sans UV

Un test de Kruskal-Wallis ( $H = 13,193$  ;  $DL = 3$  ;  $p = 0,0042$ ), complété par un test de comparaison multiple de Dunn's a montré que le taux d'éclosion des incubateurs statiques avec aération et UV (Ouv) était significativement plus élevé que celui des incubateurs statiques sans aération et sans UV (SF) ( $p < 0,01$ ).

#### **4. Discussion**

##### **4.1 Le développement embryonnaire de l'œuf du sphéroïde annelé.**

Le développement embryonnaire de *Sphaeroides annulatus*, n'avait encore jamais été décrit. Il montre les mêmes stades embryonnaires chez les autres poissons, et en particulier chez le *Danio rerio* (zebra fish), poisson qui a beaucoup été utilisé pour étudier le développement embryonnaire des vertébrés (Gilbert, 1997). Chez le mérrou (*Epinephelus striatus*), une relation inversement proportionnelle entre la température et la durée d'incubation a été décrite par Watanabe *et al.* (1995). Pauly et Pullin (1988), ont aussi mis en évidence une relation inversement proportionnelle entre le diamètre de l'œuf, la température et la durée d'incubation pour 84 espèces de poissons téléostéens, pondant dans une fourchette de température comprise entre 2,8° et 28,5°C. Chez le poisson-globe (*Canthigaster rivulata*), ce type de relation a également été mis en évidence avec une durée d'incubation passant de 73,5 heures à 145 heures lorsque la température évolue de 28 à 22 °C (Arai et Fujita, 1987). Cela a également été observé chez le poisson étudié, puisque la durée d'incubation est passée de 120 heures à 96 heures lorsque la température de l'eau est passée de 22°C à 25°C.

Le travail de description réalisé ici, permettra lors de la phase de commercialisation, de pouvoir mettre en relation un incident de mortalité embryonnaire avec une période précise du développement.

##### **4.2 Mise en place et standardisation du système d'incubation**

Dans l'expérience préliminaire 1a, les résultats furent difficilement interprétables par la présence de variations considérables au sein même d'un même traitement. Ce qui laisse suggérer l'existence d'autres facteurs n'ayant pas été standardisés correctement pour cette expérience. Il s'agit vraisemblablement de :

- L'effet des prélèvements et de l'échantillonnage

Durant l'expérience préliminaire 1a, les lames contenant chacune 50 œufs n'ont pas été remises à leur place après la lecture dans leur incubateur d'origine. Comme il n'y avait que 4 lames par incubateur, au bout de quatre jours, les incubateurs témoins de chaque traitement se sont donc retrouvés vides. Par conséquent, ils n'étaient plus représentatifs de ce qui pouvait se passer dans les autres incubateurs où 200 œufs poursuivaient leur développement. À la suite de cela, les lames prélevées pour être échantillonnées ont été remises à leur place dans les expériences ultérieures. Néanmoins, ces lames appartenant aux incubateurs témoins, ayant été touchés au moins une fois par jour, des contaminations dues au manipulateur n'ont pu être exclues et les comptages bactériens des premières expériences sont difficilement interprétables. Il n'y a que pour la série finale d'expériences 3a et 3b (confrontant simultanément des incubateurs statiques et statiques avec aération un approvisionnement en eau soit traité par les UV soit non), où les comptages bactériens n'ont été faits qu'à partir de l'eau de tous les incubateurs, que les comptages bactériens peuvent être interprétés. Austin et Austin (1987), ont établi que les populations bactériennes présentes à la surface des œufs égalaient en quantité et en qualité celles présentes dans l'eau environnante. L'échantillonnage des œufs n'a donc plus été fait dans les dernières expériences, en se basant simplement sur les prélèvements d'eau.

- Le calibrage du débit d'air

Dans l'expérience préliminaire 1a, le débit d'air alimentant les incubateurs statiques avec aération, n'était pas le même dans chaque incubateur. Ce paramètre n'avait pas été suffisamment bien contrôlé comme prévu en section 3.3.3.2. Par conséquent, des variations de 100 à 400ml/min se sont produites d'un incubateur à l'autre. Cette erreur n'a pas été commise

pour les expériences suivantes, où le débit d'air a été réglé avant le début de chaque expérience.

- Amélioration technique des incubateurs avec renouvellement de l'eau

Dans l'expérience préliminaire 1a, le débit d'eau des incubateurs à renouvellement d'eau n'était pas non plus le même dans chaque incubateur du traitement. Cela a été dû à des variations de pression dans l'alimentation en eau des différents incubateurs. Afin de résoudre ce problème, un seau, faisant office de mini-réservoir a été placé en hauteur au-dessus du système. Ainsi, le flux alimentant les incubateurs était beaucoup plus homogène et beaucoup moins de variations ont été notées pour les expériences suivantes. De plus, les valves utilisées lors de cette expérience préliminaire n'étaient pas suffisamment étanches et laissaient passer une certaine quantité d'air en même temps que l'eau, dans des incubateurs qui n'étaient supposés recevoir strictement que de l'eau. Par la suite, ces valves ont donc été vissées en utilisant du téflon pour éviter les entrées d'air. Dans les expériences suivantes, le débit d'eau a pu être calibré et maintenu à 25ml/min par incubateur.

D'autre part, toujours en ce qui concerne ce même type d'incubateur, le grillage en matière plastique utilisé pour empêcher les alevins de sortir de l'incubateur avait une maille de 500  $\mu\text{m}$  pour l'expérience préliminaire 1a. Il a été remarqué que ce diamètre était encore trop élevé et qu'il permettait le passage d'un certain nombre d'alevins. Ceci a donc entraîné la sous-estimation du nombre d'alevins éclos dans ce type d'incubateur. Par conséquent, ce grillage a été remplacé par un grillage plus fin, 100 $\mu\text{m}$  pour les expériences suivantes. Malheureusement, ceci n'a pas vraiment amélioré les performances de ce type d'incubateur avec un taux d'éclosion de (45% $\pm$ 18%) et un taux de survie de (1,25%  $\pm$ 1%) en comparaison avec des taux d'éclosion de l'ordre de 80% pour les incubateurs statiques avec aération. Par

conséquent, ce type d'incubateur n'a pas été testé pour la série d'expériences finales 3a et 3b. Et l'étude s'est concentrée sur la détermination du système donnant le meilleur taux d'éclosion possible parmi l'incubateur statique et l'incubateur statique avec aération en utilisant ou non des UV pour filtrer l'eau.

### **4.3. Effet du type d'incubateur sur le taux d'éclosion et la charge bactérienne**

#### **4.3.1 Effets sur le taux d'éclosion.**

Dans la présente étude, les incubateurs Ouv (statiques avec aération alimentés avec de l'eau filtrée avec des UV) a donné des taux d'éclosion significativement plus élevés que les incubateurs SF (statiques sans aération alimentés par de l'eau filtrée sans UV). Ce résultat a été obtenu lors des deux répétitions de la même expérience exp. 3a et 3b. Si l'on compare le taux moyen d'éclosion de chaque type d'incubateur dans les expériences 3a et 3b, on obtient pour un type d'incubateur donné des taux d'éclosion du même ordre de grandeur. Par exemple, le taux d'éclosion des incubateurs statiques avec aération et UV appelés Ouv a été de  $87\% \pm 3,5\%$  pour l'exp.3a et de  $87\% \pm 6\%$  pour l'exp. 3b. De plus, dans chacune de ces deux expériences, il a été possible de ranger les taux d'éclosion obtenus pour les différents types d'incubateur dans le même ordre : Pour l'exp.3a et 3b, le taux moyen d'éclosion obtenu pour les incubateurs a pu être rangé dans l'ordre suivant SF<OF<Suv<Ouv.

Ainsi, chez le sphéroïde annelé, comme chez la plupart des poissons d'élevage, les meilleures conditions d'incubation des œufs sont d'avoir une saturation aux alentours de 100% en oxygène dissous (Piper *et al.*, 1992). Les besoins en oxygène semblent devenir de plus en plus importants au fur et à mesure que l'embryon se développe (Piper *et al.*, 1992). La qualité de l'eau n'a pas été surveillée pour les exp. 3a et 3b, il est possible que les concentrations en oxygène dissous dans l'eau aient atteint des niveaux bas. Cependant, au cours des expériences

précédentes, les niveaux d'oxygène dissous dans l'eau ont été d'au moins, 5 mg/l, ce qui n'est pas mortel. Dans l'exp. 2, les niveaux d'oxygène dissous étaient généralement de 5,9 mg/l  $\pm$  0,1 pour les incubateurs avec aération et de 4,9mg/l  $\pm$  0,1 pour ceux sans aération. Ceci peut permettre d'expliquer de meilleurs résultats dans les incubateurs avec aération, avec un taux d'éclosion de 84%  $\pm$  2,4 seulement 64,6%  $\pm$  14 pour les incubateurs sans aération. Le type d'incubateur adéquat pour une espèce de poisson donnée dépend vraiment de la qualité physico-chimique de l'œuf. En effet, des œufs non collants comme ceux des *Madtom* (*Noturus insignis*) ont les meilleurs résultats de survie lorsqu'ils sont maintenus en mouvement perpétuellement (Stoeckel et Neves, 2000). Au contraire, il a été mis en évidence par Yamahira (1996) qu'un stress physique pouvait réduire de manière significative les chances de survie des œufs de poisson-globe *Takifugu niphobles* en comparaison avec ceux qui n'avaient pas été stressés.

### **4.3.2 Effet du type d'incubateur sur le niveau de la charge bactérienne**

Les tests d'identification bactérienne ont été faits de manière à avoir une idée sur les caractéristiques principales des bactéries présentes dans l'eau. Cette petite étude n'a pas permis l'isolation précise de l'espèce bactérienne. En effet, l'objectif était avant tout de quantifier la population bactérienne présente dans l'eau des incubateurs et non d'identifier des germes qui sont pour la plupart des germes opportunistes non pathogènes. La charge bactérienne a été significativement plus élevée dans les incubateurs à renouvellement d'eau que dans ceux avec aération pour l'exp. 1b. La charge bactérienne a été significativement plus élevée dans les incubateurs statiques que dans les incubateurs avec aération pour l'exp.2. Au quatrième jour de l'expérience 3a, la charge bactérienne a été plus importante dans les incubateurs statiques sans UV que dans ceux avec aération et avec UV. Il n'y a que dans l'exp.3b que les résultats ne sont apparemment pas logiques et ou la charge bactérienne était

plus importante dans les incubateurs avec aération et UV. Mais cela peut s'expliquer par le fait que des pierres à air non désinfectées avaient cette fois, faute de temps, étaient utilisées. Cela montre combien il est important de commencer une incubation dans des conditions les plus propres possibles. Ainsi, pour toutes les expériences réalisées à l'exception de l'exp.3b, la charge bactérienne de l'eau des incubateurs a toujours été plus basse dans les incubateurs avec aération par rapport aux incubateurs statiques et également plus basse dans les incubateurs recevant de l'eau UV par rapport à ceux n'en recevant pas.

Pour l'expérience 3a, les systèmes d'incubateurs ayant eu la charge bactérienne la plus élevée ont aussi été ceux ayant eu les taux d'éclosion les plus faibles. Ceci va dans le sens de certains auteurs comme Sauter (1987), qui a mis en évidence que la charge bactérienne de l'eau était un facteur de mortalité des œufs. Cette mortalité peut se manifester par la destruction enzymatique de la membrane externe de l'œuf (Barker *et al.*, 1989). De plus, une charge bactérienne importante aura pour effet de faire diminuer l'oxygène disponible dans l'eau, réduisant ainsi le taux d'éclosion (Trust, 1972). A l'opposé, Barker *et al.*, (1991) ont affirmé qu'une contamination bactérienne d'œufs de salmonidés n'influençait pas significativement la survie de l'œuf. Le même auteur a montré que l'utilisation d'antibiotiques pour réduire la charge bactérienne de l'eau incubant des œufs de truite arc-en-ciel, ne montrait pas d'amélioration significative du taux de survie (Barker *et al.*, 1990). Néanmoins, la plupart des auteurs s'accordent sur le fait que la charge bactérienne dans un incubateur est beaucoup plus importante que dans l'eau environnant les œufs incubant dans la nature. Dans les fermes de turbots (*Scophthalmus maximus*) par exemple, la charge bactérienne à la fin de la période d'incubation est dix mille fois plus importante que celle retrouvée dans l'eau de mer (Keskin *et al.*, 1994).

- Evolution de la charge bactérienne de l'eau durant l'incubation.

L'évolution de la charge bactérienne de l'eau a montré le même type de schéma pour les expériences 3a et 3b. Avant le début de chaque expérience, la charge bactérienne était très basse dans chacun des incubateurs ( $<10^3$  CFU/ml). Un pic a été observé au deuxième jour d'incubation, qui est à peu près le milieu de la période d'incubation. Au quatrième jour d'incubation la charge bactérienne est redescendue à des niveaux très bas, comparables à ceux présents avant l'expérience. Puis lorsque les premiers alevins commencent à éclore, la population bactérienne augmente de nouveau. Il est possible d'expliquer ce type d'évolution en prenant en compte la quantité d'éléments nutritifs présents dans l'eau en fonction du temps : La mortalité initiale de quelques œufs et la possible contamination de l'eau lors de la mise en place des lames dans les incubateurs, sont sans doute à l'origine du premier pic de bactéries au jour 2. Puis, la chute du nombre de CFU peut sans doute s'expliquer par une baisse d'éléments nutritifs indispensables à la croissance bactérienne. Lorsque les membranes externes des œufs se déchirent, au quatrième jour d'incubation, la naissance des alevins dispersent suffisamment d'éléments dans l'eau pour permettre une nouvelle croissance bactérienne (Barnes *et al.*, 2000).

- Effet de la température sur le taux d'éclosion

Dans la présente étude, les fluctuations maximales de température durant chacune des expériences était inférieure à 2°C. Par conséquent, pas d'influence directe de la température sur les résultats n'a été observée. Néanmoins, Yamahira (1997) a remarqué chez le poisson-globe (*Takifugu niphobles*), que la température pouvait avoir une influence considérable sur le taux de survie : Avec des températures comprises entre 16°C et 24°C, la majorité des œufs de *Takifugu niphobles* éclosent. Si la température est inférieure à 16°C ou supérieure à 24°C, la majorité des œufs ne se développent pas.

- Les méthodes utilisées pour le contrôle microbiologique de l'incubation

Dans la présente étude, les méthodes de contrôle microbiologique utilisées ont été des méthodes d'hygiène préventive, de nettoyage et désinfection, comme suggérées par Corpet (1998). Le traitement de l'eau avec un filtre à UV a également été utilisé pour certains des systèmes testés. Cependant, d'autres méthodes existent. Skjermo (1999) a montré qu'il était possible de réguler la flore bactérienne de l'eau par l'utilisation de probiotiques ayant pour but de sélectionner une flore bactérienne protectrice. La désinfection de la surface des œufs, est également une méthode employée dans de nombreuses espèces de poissons (Barnes *et al.*, 2000). Les désinfectants les plus courants utilisés sont le formol et le peroxyde d'hydrogène. Un traitement journalier de formol sur des œufs de truites arc-en-ciel (*Onchorhynchus mykiss*), a montré une amélioration significative du taux de survie des alevins (Barnes *et al.*, 2000). De plus, chez les salmonidés, il se pratique la collecte journalière des œufs morts dans les incubateurs (Piper *et al.*, 1992). Ceci est facile à réaliser chez les salmonidés ou les œufs atteignent parfois 0,8 cm mais n'est en pratique pas réalisable pour les œufs de poisson-globe qui mesurent moins de 1 mm de diamètre et qui collent à un substrat.

#### **4.4 Recommandations à venir**

Plusieurs types d'incubateurs ont été testés. Le meilleur d'entre eux a été l'incubateur statique avec aération recevant de l'eau filtrée par les UV. A l'avenir, des études plus précises devront être réalisées afin d'optimiser ce type d'incubateur. Par exemple, différents débits d'oxygène devront être testés afin de trouver celui donnant les meilleurs résultats. Puis le taux de survie devra à son tour être optimisé. Dans la présente étude, les incubateurs étaient de petite taille. Ainsi, le mouvement entraîné par les bulles d'air a pu être à l'origine de chocs entre les alevins fraîchement éclos et le support de lames histologiques, conduisant à la mort d'un très

grand nombre d'alevins. Ainsi, afin d'estimer précisément combien d'alevins peuvent survivre avec ce type d'incubateur, il faudra utiliser des incubateurs plus gros afin d'éviter les chocs entre les différentes parois de l'incubateur et les alevins venant de naître. De plus, d'autres paramètres doivent être contrôlés afin de donner les meilleurs résultats. La température optimale d'incubation n'a pas encore été déterminée chez ce poisson. Il serait également crucial de connaître précisément la fenêtre de température idéale. L'intensité lumineuse et la salinité sont deux autres paramètres qui peuvent avoir un effet sur l'éclosion et la survie des alevins (Watanabe, 1998). Finalement et sans doute avant toute autre recherche, il serait capital d'explorer comment ces poissons se reproduisent exactement dans la nature. Des paramètres tels que la densité des œufs et le type de support d'incubation dans la nature sont encore inconnus. Localiser les sites où les œufs incubent dans la nature permettrait également d'avoir une meilleure idée du type de courant d'eau et de lumière adéquate au bon développement embryonnaire de ces poissons.

### **4.5 Conclusion**

Durant la présente étude, les meilleures conditions pour incuber les œufs du sphéroïde annelé ont été un incubateur statique avec aération alimenté avec de l'eau ayant été filtrée par les UV. Ce résultat a été obtenu de manière répétée au fil des expériences. C'est probablement ce système qui sera amélioré, développé et utilisé à l'avenir pour le développement contrôlé des œufs de sphéroïde annelé.

**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, M. BONNES , Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que  
**M. KOMAR Cédric**  
a été admis(e) sur concours en : 1996  
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 12 septembre 2001  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussigné, Y. LIGNEREUX , Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
déclare que j'ai lu la thèse de :

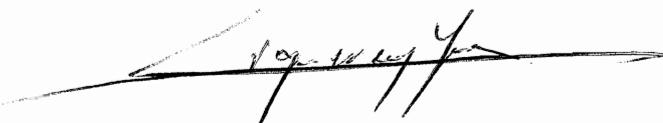
**M. KOMAR Cédric**

intitulée :

"Le développement des œufs du sphéroïde annelé (*Sphaeroides annulatus*, Jenyns 1834) : Effet de la qualité de  
l'eau et de l'incubateur sur le taux d'éclosion"

et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



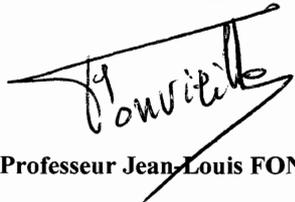
**Professeur Yves LIGNEREUX**

**Vu :  
Le Directeur par intérim  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



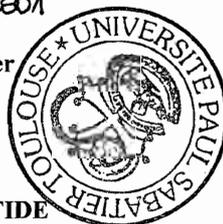
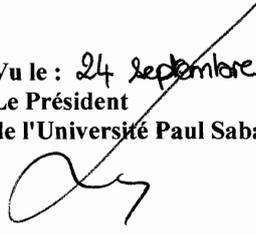
**Professeur Gilbert BONNES**

**Vu :  
Le Président de la thèse :**



**Professeur Jean-Louis FONVIELLE**

**Vu le : 24 septembre 2001  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier**



**Professeur Raymond BASTIDE**



## LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

- Alvial A. et Manriquez J. (1999) Diversification of flatfish culture in Chile. *Aquaculture* **176**, 65-73.
- Arai H. et Fujita S. (1987) Spawning behaviour and early life history of the sharpnose puffer, *Canthigaster rivulata*, in the aquarium. *Japanese Journal of Ichthyology* **35**, 194-201.
- Austin, B. et Austin, D.A. (1987) *Bacterial fish pathogens : disease in farmed and wild fish*, Wiley. New-York.
- Barker G.A., Smith S.N. et Bromage N.R. (1989) The bacterial flora of rainbow trout, *salmo gairdneri* Richardson, and brown trout, *Salmo trutta* L. eggs and its relationship to developmental success. *Journal of Fish Disease* **12**, 281-293.
- Barker G.A., Smith S.N. et Bromage N.R. (1991) Commensal bacteria and their possible relationship to mortality of incubating salmonid eggs. *Journal of Fish Diseases* **14**, 199-201.
- Barker G.A., Smith S.N. et Bromage N.R. (1990) Effect of oxolinic acid on bacterial flora and hatching success rate in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, eggs. *Aquaculture* **91**, 205-222.
- Barnes M., Gabel A. et Cordes R.J. (2000) Bacterial populations during rainbow trout egg culture in vertical-flow tray incubator. *North American Journal of Aquaculture* **62**, 48-53.
- Barnes M.E. (1999) Bacterial populations during inland fall chinook salmon egg culture in vertical-flow tray incubators. *North American Journal of Aquaculture* **61**, 252-257.
- Benetti D. (1999) The aquaculture of Marine Fish in Latin America: Recent Advances and Prospects. In: *Congreso sur American de Acuicultura, Aquaculture '99*.
- Billard R., Cosson J. et Crim L.W.S.M. (1995) *Broodstock management and egg larval quality* (ed. by N.R. Bromage et R.J. Roberts), Blackwell Science. Cambridge
- Brannas E. (1987) Influence of photoperiod and temperature on hatching and emergence of Baltic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Zoology* **65**, 1503-1508.
- Bromage N.R. (1988) Propagation and stock improvement. In: *Intensive fish farming* (ed. by J. Shepherd et N. Bromage), Bsp professional books.
- Bromage N.R., Jones J., Randall C., Trush 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* **100**, 141-166.
- Brooks S., Tyler C.R. et Sumpter J.P. (1997) Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**, 387-416.

- Carlson A.R., Siefert R.E. et Herman L.J. (1974) Effect of low dissolved concentrations on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) embryos and larvae. *Transactions of the American Fisheries Society* **90**, 469-474.
- Chou R. et Lee H.B. (1997) Commercial marine fish farming in Singapore. *Aquaculture Research* **28**, 767-776.
- Corpet, D. (1998) Hygiène en industrie alimentaire, Cours polycopié, 61 p. Toulouse : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- Crim L.W., Sherwood N.M. et Wilson C.E. (1988) Sustained hormone release II. Effectiveness of LHRH analog (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture* **74**, 87-95.
- Duncan N. et Rodriguez M. de O. G. (2001) Induced spawning of the bullseye puffer *Sphaeroides annulatus* using LHRHa. In: *Aquaculture 2001*.
- FAO "Fisheries Production, Statistics"
- Fishstat Plus. FAO (2001) 2.30. Rome: FAO.
- FAO (1996) Review of the state of world aquaculture, circular #886. Roma: FAO fisheries.
- Fujita S. et Abe T. (1992) Induction of ovarian maturation and development of eggs, larvae, and juveniles of the purple puffer *Takifugu porphyreus* reared in the laboratory. *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**, 1627-1632.
- Fujita S., Abe T. et Dotsu Y. (1992) Spawning season and spawners of the purple puffer *Takifugu porphyreus* off the coast of Shozanbetsu in Northwestern Hokkaido. *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**, 1621-1625.
- Gibson R.N. (1992) Tidally-synchronised behaviour in marine fishes. In: *Rhythms in fishes* pp. 63-81. Ali Plemum Press. New York
- Gilbert, S.F. (1997) *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Inc. USA.
- Gladstone W. et Westoby M. (1988) Growth and reproduction in *Canthigaster valentini* (Pisces, Tetraodontidae): a comparison of a toxic reef fish with other reef fishes. *Environmental Biology of Fishes* **21**, 207-221.
- GraphPad. GraphPad Software (1998) version 3.00. San Diego California USA:
- Gutiérrez, M.R. (1992) Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. Mexico: AGT Editor, S.A.
- Han K., Chuang H., Matsui S., Furuichi M. et Kitajima C. (1995) Effect of salinity on growth, survival rate and feed efficiency in the early stages of puffer fish *Takifugu rubripes*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **61**, 21-26.
- Hansen G.H. et Olafsen J.A. (1989) Bacterial colonization of cod (*Gadus morrhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Applied Environmental Microbiology* **55**,

1435-1446.

- Hatanaka H. (1996) Influence of the tank color, light intensity and rearing density on the growth and the shape of caudal fin in juvenile tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **63**, 734-738.
- Helvik J.V. et Walther B.T. (1992) Photo-regulation of the hatching process of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs. *Journal of Experimental Zoology* **263**,
- Honma Y., Ozawa T. et Chiba A. (1979) Maturation and spawning behavior of the puffer, *Fugu niphobles*, Occuring on the coast of Sado Island in the Sea of Japan (a preliminary report). *Japanese Journal of Ichthyology* **27**, 129-138.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática (1996) Panorama Agropecuario . Estados Unidos Mexicanos:
- Jordan, D.S. et Evermann, B.W. (1963) *The fishes of North and Middle America*, T.F.H. Publications. New Jersey, USA.
- Kanazawa A. (1991) Puffer fish, *Fugu rubripes*. In: *Handbook of nutrient requirements of finfish* pp. 123-129. Wilson, R.P.
- Keskin M., Keskin M. et Rosenthal H. (1994) Pathways of bacterial contamination during egg incubation and larval rearing of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Applied Ichthyology/Zeitschrift für angewandte Ichthyologie* **10**, 1-9.
- Kinne O. et Kinne E.M. (1961) Rates of development in embryos of a cyprinodont fish exposed to different temperature-salinity-oxygen combinations. *Canadian Journal of Zoology* **40**, 231-253.
- Kjesbu O.S., Solemdal P., Bratland P. et Fonn M. (1996) Variation in annual egg production in individual captive Atlantic cod (*Gadus morrhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic sciences* **53**, 610-620.
- Kobayashi (1986) Social organization of the spotted sharpnose puffer, *Canthigaster punctatissima* (Tetraodontidae). *Environmental Biology of Fishes*. **15**, 141-145.
- Lahnsteiner F. et Patzner R.A. (1998) Sperm motility of the marine teleost *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. *Journal of Fish Biology* **52**, 726-742.
- Matsumura K. (1998) Production of tetrodotoxin in puffer fish embryos. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **6**, 217-219.
- Matsumura K. (1995) Tetrodotoxin as a pheromone. *Nature* **378**, 563-564.
- Matsuyama M., Chuda H., Ikeda Y., Tanaka H. et Matsuura S. (1997) Induction of ovarian maturation and ovulation in cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* by different hormonal treatments. *Suisanzoshoku* **45**, 67-73.
- Miyaki K., Tachihara K., Ebisu R. et Tsukashima Y. (1992) Induction of ovarian maturation

- of the tiger puffer, *Takifugu rubripes* by gonadotropic hormones injections. *Suisanzoshoku* **40**, 439-442.
- Munro P., Barbour A. et Birkbeck T.H. (1994) Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot under different conditions. *Journal of Applied Bacteriology* **77**,
- Pauly D. et Pullin R.S.V. (1988) Hatching time in spherical, pelagic, marine fish eggs in response to temperature and egg size. *Environmental Biology of Fishes* **22**, 261-271.
- Piper, R.G., McElwain, I.B., Orme, L.E., McCraren, J.P., Fowler, L.G. et Leonard, J.R. (1992) *Fish hatchery management*, Department of the Interior U.S Fish and Wildlife Service. Washington, D.C.
- Rodriguez M.D.O.G. et Duncan N. (2001) Effect of the hormone LHRHa on sperm quality of the bullseye puffer *Sphaeroides annulatus*. In: *Aquaculture, 2001*.
- Rodriguez M.De.O.G., Garcia A. et N. y Duncan N.J. (1999) . Evaluación de la calidad del Esperma del Botete Diana (*Sphaeroides annulatus*) en condiciones de cautiverio. In: *XV Congreso Nacional de Zoología*.
- Rosenlund G. (1997) Recent developments in the production of marine fish. In: *Proceedings of the Huntsman marine science centre symposium coldwater aquaculture to the year 2000*.
- Satterfield J.R. et Flickinger S.A. (1995) Factors influencing storage potential of walleye semen. *The Progressive Fish Culturist* **57**, 175-181.
- Sauter R.W. (1987) A study of bacteria present within unfertilized salmon eggs at the time of spawning and their possible relation to early lifestage death. *Journal of Fish Diseases* **10**, 193-203.
- Shepherd, J. et Bromage, N.R. (1988) *Intensive fish farming*, BSP professional books. Oxford.
- Skjermo J. et Vadstein O. (1999) Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* **177**, 333-343.
- Sommer R., Cabaj A., Pribil W. et Haider T. (1997) Influence of lamp intensity and water transmittance on the UV disinfection of water. *Water Science and Technology* **35**, 113-118.
- Stoeckel J. et Neves R. (2000) Methods for hatching margined madtom eggs. *North American Journal of Aquaculture* **62**, 42-47.
- Subasinghe R.P. et Sommerville C. (1985) Disinfection of *Oreochromis mossambicus* (Peters) eggs against commonly occurring potentially pathogenic bacteria and fungi under artificial hatchery conditions. *Aquaculture and Fisheries Management* **16**, 121-127.
- Trust T.J. (1972) The bacterial population in vertical flow tray hatcheries during incubation of salmonid eggs. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **29**, 567-571.

- Waller U., Wieland K. et Schnack D. (1993) The survival of eggs and the hatching of larvae of cod (*Gadus morrhua*) at different oxygen levels. In: *Ices Council Meeting Papers*, ICES. Copenhagen, (Denmark)
- Watanabe W.O. (1998) Light intensity and salinity effects on eggs and yolk sac larvae of the summer flounder. *The progressive Fish-Culturist* **60**, 9-19.
- Watanabe W.O., Ellis S.C. et Ellis E.P. (1999) Temperature effects on eggs and yolk sac larvae of the summer flounder at different salinities. *North American Journal of Aquaculture* **61**, 267-277.
- Watanabe W.O., Lee C.S., Ellis S.C. et Ellis E.P. (1995) Hatchery study of the effects of temperature on eggs and yolksac larvae of the nassau grouper *Epinephelus striatus*. *Aquaculture* **136**, 141-147.
- Watson C.A. et Chapman F.A. (1996) Artificial incubation of fish eggs. *University of Florida Extension* **FA-32**, 1-4.
- Wijkstrom, U. Wijkstrom, U., Gumy, A. et Grainger, R., (Eds.) (2000) Recent trends and possible consequences for world fisheries and aquaculture. Italy: FAO, Information Division.
- Yamahira K. (1994) Combined effects of tidal and diurnal cycles on spawning of the puffer, *Takifugu niphobles* (Tetraodontidae). *Environmental Biology of Fishes* **40**, 255-261.
- Yamahira K. (1996) The role of intertidal egg deposition on survival of the puffer, *Takifugu niphobles* embryos. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **198**, 291-306.
- Yamahira K. (1997) Hatching success affects the timing of spawning by the intertidally spawning puffer *Takifugu niphobles*. *Marine Ecology Progress Series* **155**, 239-248.







Toulouse, 2001

NOM : KOMAR

PRENOM : CEDRIC

TITRE : LE DEVELOPPEMENT DES ŒUFS DU SPHEROIDE ANNELE (*Sphaeroides annulatus*, JENYNS 1834) : EFFET DE LA QUALITE DE L'EAU ET DE L'INCUBATEUR SUR LE TAUX D'ECLOSION

RESUME : Le poisson-globe (*Sphaeroides annulatus*) est un poisson de la côte ouest du Mexique dont le développement commercial de l'élevage est en ce moment à l'étude. La contrainte majeure de ce type d'élevage est la maîtrise de la reproduction et de l'élevage des alevins. En premier lieu, il est nécessaire d'optimiser les conditions de l'incubation des œufs. En effet, une mortalité importante peut se manifester durant cette période due à une eau de mauvaise qualité ou une charge bactérienne trop importante.

L'objectif général de ce travail, a été de comparer le taux d'éclosion des œufs lorsqu'ils sont incubés dans différents types d'incubateurs, statiques, statiques avec aération et avec renouvellement de l'eau, avec une alimentation en eau étant soit filtrée par les UV, soit filtrée mécaniquement. Au cours de l'incubation, des échantillons d'eau ont également été prélevés afin d'établir une éventuelle relation entre la mortalité des œufs et la charge bactérienne de l'eau. Le meilleur des systèmes testés a été l'incubateur statique avec aération alimenté avec de l'eau filtrée aux UV. Ce système a donné de manière répétée (exp.3a et 3b) un taux d'éclosion significativement ( $p < 0,05$ ) plus important ( $87\% \pm 3,5\%$ ) que le système statique sans aération et filtré sans UV ( $65,6\% \pm 13,9\%$ ). Aussi lors d'une expérience (exp. 3a), le traitement ayant subi la charge bactérienne la plus élevée (incubateur statique sans filtration par les UV) a aussi eu le taux d'éclosion le plus faible. L'objectif général a été complété par une étude descriptive du développement embryonnaire lors de la période d'incubation.

Le succès de l'incubation des œufs du sphéroïde annelé est une étape importante dans le développement de cette espèce vers l'aquaculture.

MOTS-CLES : AQUACULTURE ; POISSON ; FUGU ; POISSON-GLOBE ; DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ; INCUBATION ; ŒUF ; REPRODUCTION ; BACTERIES DE L'EAU

---

ENGLISH TITLE : EFFECT OF THE WATER TREATMENT ON THE INCUBATION OF ADHESIVE EGGS OF THE BULLSEYE PUFFER (*Sphaeroides annulatus*)

ABSTRACT : The bullseye puffer (*Sphaeroides annulatus*) is a potential marine species for commercial aquaculture in the Pacific coast of Mexico. However, the successful rearing of larvae is one of the major constraints affecting the development of marine fish aquaculture. The first step of larval rearing is to determine the optimal conditions of egg incubation. High mortality can occur during this period due to bacterial loading or bad water quality.

The general objective of this work was to investigate hatching rate of bullseye puffer fish eggs when incubated within static, flow-through or aeration conditions receiving either UV or non-UV filtered water. During egg incubation, water samples were taken to evaluate a potential relationship between bacterial loading and egg mortality. In the preliminary work, flow-through incubators gave significantly lower hatching rates than both static incubators and static incubators with aeration ( $p < 0.05$ ). Thus, the final experiment, repeated twice (exp. 3a and 3b) focused on the determination of the best system between static and static with aeration receiving either UV or non-UV filtered water. Incubation with aeration and UV filtered water gave both times significantly ( $p < 0.05$ ) higher hatching rate ( $87\% \pm 3.5\%$ ) than static incubation without UV filtration ( $65.6\% \pm 13.9\%$ ). At one occasion (exp. 3a), the treatment with the highest bacterial loading (static incubation without UV filtration) corresponded with the lowest hatching rate.

The successful egg incubation for bullseye puffer is an important step in the development of this species for aquaculture.

KEY WORDS : AQUACULTURE ; FISH ; PUFFER FISH ; FUGU ; EMBRYONIC DEVELOPMENT ; INCUBATION ; EGG ; REPRODUCTION ; BACTERIA OF THE WATER