

Travail de fin d'études

Auteur : Kifufu Gafidji Fidji, Jude

Promoteur(s) : 8792; 14979

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master de spécialisation en gestion des ressources aquatiques et aquaculture

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/13167>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



FACULTE DES SCIENCES



**Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et
Aquaculture**

Travail de fin d'études

**Induction hormonale du frai chez le rivulus des mangroves
(*Kryptolebias marmoratus*)**



Jude KIFUFU GAFIDJI FIDJI

Promoteur

Frédéric SILVESTRE

Encadrant

Yves BLANCO

Année académique : 2020-2021

Table des matières

Epigraphe.....	ii
Dédicace	iii
Remerciements.....	iv
Résumé.....	v
Liste des abréviations.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
I. INTRODUCTION.....	1
I.1. Endocrinologie de la reproduction des poissons téléostéens.....	1
I.2. Dysfonctionnements de reproduction chez les poissons d'élevage.....	4
I.3. Induction artificielle de l'ovulation et de la ponte	5
I.5. Le rivulus des mangroves	7
<i>I.5.1. Présentation de l'espèce</i>	<i>7</i>
<i>I.5.2. Cycle de vie et répartition géographique</i>	<i>9</i>
<i>I.5.3. Conditions écologiques</i>	<i>9</i>
<i>I.5.4. Régime et besoins alimentaires</i>	<i>10</i>
<i>I.5.5. Biologie de la reproduction</i>	<i>11</i>
I.6. Problématique et objectifs de l'étude.....	12
II. MATERIEL ET METHODES	13
II.1. Matériel biologique	13
II.2. Sélection des poissons et conditions d'élevage	13
II.3. Traitements hormonaux.....	14
II.4. Préparation des doses hormonales.....	15
II.5. Récolte, pesée et incubation des œufs.....	16
II.6. Détermination de la viabilité et fécondation des œufs et des stades de développement embryonnaire.....	17
II.7. Paramètres d'évaluation	17
II.8. Analyses statistiques des données	17
III. RESULTATS.....	19
III.1. Performances de la reproduction	19
III.2. Viabilité des œufs	20
III. 3. Développement embryonnaire.....	21
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	26

Epigraphe

« L'ennui dans ce monde est que les fous sont sûrs d'eux-mêmes et les sages pleins de doute » Bertrand Russel

Dédicace

A mes enfants, neveux et nièces,

Je dédie ce modeste travail.

Remerciements

Le présent travail achève ma formation en Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture. Plusieurs personnes physiques et morales ont contribué pour qu'elle aboutisse après une année d'études particulièrement bouleversante. C'est donc pour moi un agréable devoir et une occasion favorable de leur exprimer ma sincère gratitude.

Ainsi, je rends d'abord grâce au Seigneur Jésus-Christ, Source de ma vie et de ma bénédiction, qui guide chacun de mes pas et veille sur moi comme l'aigle le fait pour ses aiglons. Mon âme Le servira à jamais.

J'adresse ensuite mes profonds remerciements au Professeur Frédérick Silvestre, promoteur de ce travail qui m'a accueilli au sein du Laboratoire de Physiologie Evolutive et Adaptative et à Yves Blanco Alvares alias « Ivan », mon infatigable encadrant. Par votre rigueur et votre savoir-faire scientifiques, j'ai pu améliorer la qualité de ce travail. Je suis donc très reconnaissant pour vos orientations, remarques et observations sans lesquelles je n'aurais pu affiner mes vagues pensées.

Je souligne particulièrement ici le soutien de la coopération belge au développement, qui à travers l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur a mis à ma disposition les moyens nécessaires qui m'ont permis de mener à bien cette formation. Je leur exprime donc ma profonde reconnaissance. Merci également à tous les enseignants du Master GeRAA, en particulier Patrick Kestemont et Carole Rougeot, responsables académiques de la formation et membres du jury de ce mémoire, pour la formation de qualité que j'ai bénéficiée d'eux.

Mes pensées vont aussi aux autorités de l'Université Baptiste au Congo et d'International Ministries pour leur contribution morale, financière et spirituelle qu'elles ne cessent de m'assurer depuis que j'ai repris le chemin de l'apprentissage pour des nouveaux horizons. A mes parents Eyano Ndombu et Marie-Thérèse Mpata, mon épouse Nancy Sala, mes frères et sœurs, cousins et cousines, tantes et oncles, sans oublier mes amis et collègues de l'Unibac et l'Uniband. Trouvez tous ici l'expression de ma reconnaissance pour votre solidarité, confiance et soutien me témoignés.

Enfin, à vous mes compagnons de lutte en Belgique, Pétra-Scolastique Gambagko, Maliki Imorou Idrissou, Roger Djialiek, Clovis Houchteme, Guillaume Dupuy, Serge Mbondo ainsi que le doctorant Hyppolyte Ditona. Merci d'avoir rendu, par votre enthousiasme et votre amitié inoubliables, mon séjour et ma formation très agréables.

Résumé

Chez les poissons, la reproduction est sous le contrôle des hormones qui régulent le processus de développement des gamètes. Ce système neuroendocrinien fonctionne suivant les variations des facteurs environnementaux (température et photopériode) qui, en situation d'élevage peuvent faire défaut, interrompant le processus de maturation sexuelle. Chez la plupart des espèces de poissons, l'administration artificielle des hormones impliquées dans la reproduction rétablit le processus de maturation des gamètes, induisant chez la femelle l'ovulation et la ponte tandis que chez le mâle, la spermiation. Dans cette étude, nous avons évalué les effets de l'administration des hormones exogènes de reproduction sur la fécondité, la fécondation, la viabilité et le développement des embryons de *Kryptolebias marmoratus*. Au total, 60 individus hermaphrodites répartis en 6 groupes ont été soumis à deux types d'hormones à différentes doses. Il s'agit de la Mélatonine aux doses de 0.1 μM et 1 μM administrées par balnéation durant 14 jours et l'Ovaprim administré par injection péritonéale aux doses de 0.35 $\mu\text{L.g}^{-1}$ et 0.50 $\mu\text{L.g}^{-1}$. Les poissons traités avec Ovaprim ont été suivis durant 24h post-injection.

A l'issue des essais, il apparaît que les traitements appliqués n'ont eu aucun effet sur la fécondité et la fécondation. Les poissons traités avec les deux différentes hormones ont pondu de la même manière que ceux des groupes témoins correspondants avec une faible fécondité moyenne de 4.8 œufs pour la Mélatonine à 0.1 μM et 9.3 œufs pour la Mélatonine à 1 μM contre 5.4 œufs du traitement témoin. Les poissons du groupe de l'Ovaprim ont pondu en moyenne 0.4 œuf pour la dose de 0.35 $\mu\text{L.g}^{-1}$ et 0.5 œuf pour la dose de 0.50 $\mu\text{L.g}^{-1}$ alors que pour le groupe témoin Ovaprim, il y a eu 0.9 œuf. Le taux de ponte journalier a été de 20% pour le groupe témoin, 16.4% pour la dose faible et 25% pour la dose forte de Mélatonine. De la même manière, il a été de 13.3% pour le groupe témoins, 10% pour la faible dose et 16.9% pour la dose forte d'Ovaprim. Tous les œufs étaient fécondés avant d'être expulsés (taux de fécondation de 100%). Les taux de survie des œufs/embryons à la ponte, après 24h de ponte et au 14e jour d'incubation ont été élevés pour tous les groupes de Mélatonine et d'Ovaprim. Le développement embryonnaire s'est poursuivi normalement de la ponte jusqu'à entrer en diapause pour tous les traitements de deux groupes.

Ces résultats mettent en évidence l'inefficacité des traitements appliqués chez *K. marmoratus* quant à l'influence des hormones sur la production et la fécondation des œufs. Par ailleurs, ils se sont prouvés non létaux tant sur les géniteurs que sur les embryons.

Liste des abréviations

°C	: degré Celsius
μL	: Microlitre
μM	: Micromolaire
CPE	: Extrait hypophysaire de carpe
DA	: Dopamine
E2	: Œstradiol
FSH	: Hormone folliculostimulante
g	: Gramme
GnRH	: Hormone de libération des gonadotrophines
H	: Heure
J	: Jour
LEAP	: Laboratoire de physiologie évolutive et adaptative
LH	: Hormone lutéinisante
LH-RH	: Hormone libérant l'hormone lutéinisante
LHRHa	: hormone libérant l'hormone lutéinisante analogue
mg	: Milligramme
mL	: Millilitre
Ppt	: Partie par million
T°	: Température
T3	: Triiodothyronine
T4	: Thyroxine

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux problèmes de reproduction des poissons en captivité et leurs causes	4
Tableau 2. Hormones utilisées ou testées chez les poissons en captivité.....	6
Tableau 3. Intervalles de la catégorie de poids et concentrations en Ovaprim effectives	16
Tableau 4. Critères de réponse aux traitements appliqués	17
Tableau 5. Paramètres de performance de la reproduction des poissons expérimentaux.....	19

Liste des figures

Figure 1 : Cascade hormonale reproductive chez les poissons téléostéens (Bobe et al, 2014).	2
Figure 2 : Mode d'action de la mélatonine dans la maturation ovocytaire et l'ovulation chez les poissons (Takahashi et al, 2021).....	3
Figure 3 : Rivulus des mangroves hermaphrodite à gauche et mâle secondaire à droite (Johnson et al., 2015).	8
Figure 4 : Aire de distribution mondiale de <i>K. marmoratus</i> en zone rougeâtre (www.floridamuseum.ufl.ed)	9
Figure 5 : Rivulus des mangroves en hors de l'eau (Photo crédit : www.sciencesetavenir.fr).....	10
Figure 6 : Disposition générale des containers à rivulus des mangroves (A) et container spécifique de culture (B) (Photo : Kifufu, 2021)	14
Figure 7 : Injection des poissons avec l'Ovaprim (Photo : Kifufu, 2021).....	15
Figure 8: Dispositif d'observation microscopique (A), plaque à 24 puits contenant les œufs et illustration de 32 stades de développement embryonnaire de <i>Kryptolebias marmoratus</i> (C) selon Mourabit et al, 2011(Photo : Kifufu, 2021).....	18
Figure 9 : Evolution de la ponte en fonction du temps pour le groupe Mélatonine	Erreur ! Signet non défini.
Figure 10 : Viabilité des œufs du groupe Mélatonine	20
Figure 11 : Viabilité des œufs du groupe Ovaprim.....	21
Figure 12: Stades de développement embryonnaire exprimé en termes d'heures post-fécondation	21

I. INTRODUCTION

I.1. Endocrinologie de la reproduction des poissons téléostéens

La reproduction est le processus biologique par lequel les êtres vivants se perpétuent. Chez la plupart des poissons téléostéens ovipares, elle est particulièrement saisonnière (Conover, 1992). La maturation finale des gamètes, l'ovulation, la ponte et la fertilisation n'ont lieu qu'en des périodes spécifiques de l'année qui coïncident avec les saisons d'abondance de nourritures permettant ainsi l'optimisation de la survie des larves fraîchement écloses (Sumpter, 1990; Bromage et al, 2001). La synchronisation des processus de reproduction avec la saison d'abondance des proies est entièrement régulée par le système neuroendocrinien, en particulier le complexe hypothalamo-hypophysaire, lui-même dépendant des variations cycliques des facteurs externes dont la température, la photopériode, la précipitation et les facteurs sociaux (Scott, 1979 ; Billard et al, 1982 ; Migaud, 2002). Toutefois, ce sont essentiellement les changements saisonniers de la photopériode qui constituent le principal facteur déclenchant le processus endocrinien de maturation sexuelle chez la majorité des poissons, la température agissant comme facteur limitant (Bromage et al., 2001). Cette saisonnalité de la reproduction est particulièrement marquée chez les espèces des zones tempérées où les fluctuations photopériodiques sont beaucoup plus perceptibles (Scott, 1990).

Lorsqu'il y a variations de la photopériode, les organes sensoriels des poissons les perçoivent via les mécanismes de la photoréception. L'intégration neurale de ces informations conduit à la modification du taux de production et de libération d'hormones de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade, aboutissant *in fine* à la maturation et à la libération des ovules chez les femelles, ainsi qu'à la maturation et à la libération des spermatozoïdes chez les mâles (Breton et al., 1983; Bobe et al., 2014).

Les premières hormones sont libérées par les cellules neurosécrétrices de l'hypothalamus (Figure 1) et comprennent l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH), qui régule positivement la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires, et la dopamine (DA) qui a un effet inhibiteur sur la libération de celles-ci (Billard et al, 1982; Trudeau, 1995; Bobe et al, 2014). Les hormones hypothalamiques sécrétées exercent un contrôle direct sur les cellules de l'hypophyse responsables de la production de deux hormones gonadotrophines hypophysaires, notamment l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) (Legendre et Jalembert, 1988; Battaglene et Selosse, 1996).

Les hormones hypophysaires jouent un rôle majeur dans le cycle de maturation sexuelle. La FSH est spécialement impliquée dans les premières phases de la maturation des gamètes, elle initie aussi chez la femelle la vitellogénèse. La LH intervient dans la maturation finale des gamètes et l'ovulation (Swanson, 1991, Jobling, 1995). Les autres hormones produites par l'hypophyse, à savoir la thyrotropine, la somatotropine, la prolactine et l'hormone adrénocorticotrope participent aussi au contrôle de certains processus liés à la reproduction tel que le développement gonadique par l'augmentation de la production d'aromatase qui est une enzyme intervenant dans la production des stéroïdes sexuels femelles (Legendre et Jalembert, 1988).

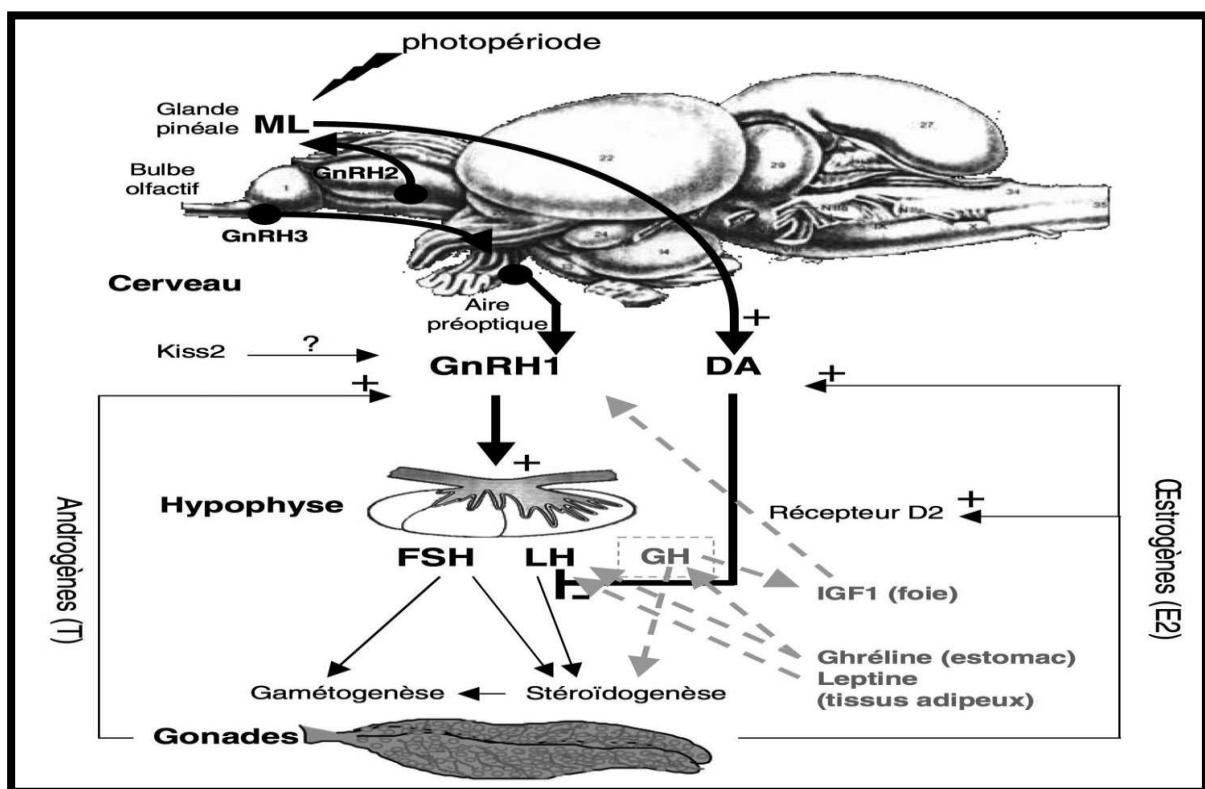


Figure 1 : Cascade hormonale reproductive chez les poissons téléostéens (Bobe et al, 2014).

L'épiphysse cérébrale ou glande pinéale est le principal site de production de mélatonine qui est une hormone jouant un rôle important dans la régulation du sommeil et des rythmes circadiens (Besseau et al, 2006). Elle intervient également dans le processus de reproduction au niveau du système nerveux central (Bromage et al, 2001) en ciblant directement l'hypophyse ou indirectement l'hypothalamus (Falcon et al, 2007). Cette intervention de la mélatonine dans les fonctions endocrines de la reproduction influence la maturation des gamètes par le renforcement de la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires (Figure 2) (Asamanja et al, 2005).

Les hormones gonadotrophines sécrétées par l'hypophyse (FSH et LH) atteignent via le système circulatoire les tissus des gonades (ovaires ou testicules), se lient aux récepteurs spécifiques gonadiques et stimulent la production des stéroïdes sexuels. Dans les testicules, les cellules interstitielles de Leydig synthétisent la testostérone (T) et l'androstènedione ainsi que leur dérivé 11-cétotestostérone (11-KT). Il produit en outre des dérivés de la progestérone di- ou tri-hydroxylés, qui sont impliqués dans l'acquisition de la motilité et l'excrétion des spermatozoïdes (Jalabert et al, 1977; Kime, 1993). Les cellules du follicule ovarien sécrètent l'œstrogène 17 β -œstradiol (E₂), l'androstènedione, la testostérone et les progestogènes 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (Jalabert et Fostier, 1984 ; Kime, 1993 ; Bobe et al, 2014).

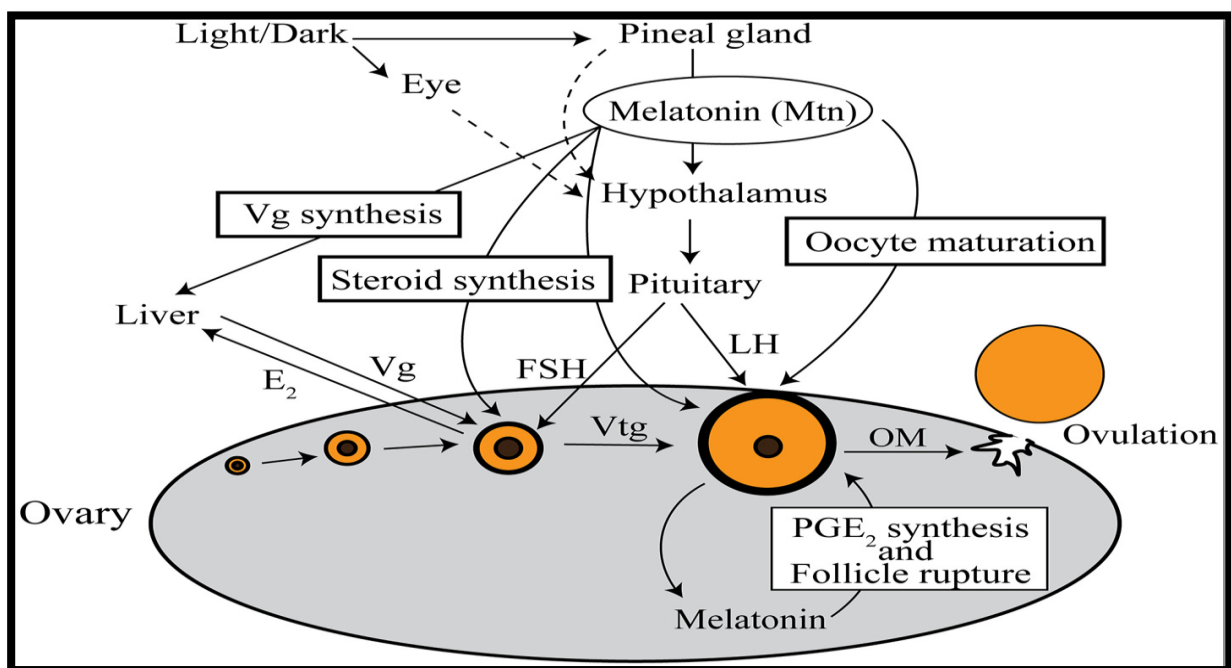


Figure 2 : Mode d'action de la mélatonine dans la maturation ovocytaire et l'ovulation chez les poissons (Takahashi et Ogiwar, 2021)

Les hormones de la glande thyroïde, la thyroxine (T₄) et la triiodothyronine (T₃), seraient aussi impliquées dans la reproduction des poissons quoique l'interrelation entre le système thyroïdien et le système de reproduction ne soit pas clairement établie (Pavlidis et al. 2001, Bobe et al., 2014). Les deux hormones thyroïdiennes interviennent probablement dans les premières étapes de la maturation gonadale. La T₄ stimulerait le développement ovarien précoce et la vitellogenèse par l'accroissement de l'action de la FSH dans la stimulation de la synthèse de T, et augmenterait la conversion de la T en E₂ (Pavlidis et al., 2001). D'autre part, l'action de la T₃ sur les phases de maturation ovocytaire a également été montrée grâce à une stimulation plus importante de la sécrétion de progestagène (Sullivan et al., 1989, Epier et Bieniarz, 1983).

I.2. Dysfonctionnements de reproduction chez les poissons d'élevage

Il a été observé qu'en conditions de captivité, certaines espèces de poissons ne pondaient plus spontanément comme dans le milieu naturel. L'absence de stimuli environnementaux (variation de la photopériode et de la température, présence de substrat, etc.), l'inadéquation des autres facteurs externes du milieu naturel, l'alimentation inadaptée, le stress dû au confinement, aux manipulations et à la captivité diminuent et/ou empêchent la sécrétion par l'hypophyse des hormones gonadotrophines hypophysaires (Billard et al., 1980, Breton et al., 1983; Zohar et al, 2001, Bobe et al., 2014).

Tableau 1. Principaux problèmes de reproduction des poissons en captivité et leurs causes

Problèmes	Causes spécifiques	Exemples d'Espèces	Références
Maturation sexuelle incomplète	Qualité de l'alimentation Inadéquation des facteurs environnementaux Stress	Bar européen <i>Dicentrarchus labrax</i> Barbeau <i>Barbus callensis</i>	Scott et al, 1990 Devauchelle et Coves, 1988 Nasri et Guendouz, 2013
Absence de frai	Défaut des stimuli environnementaux	Poisson-chat africain <i>Clarias gariepinus</i>	Ducharme et Micha, 2003
Reproduction saisonnière	Caractéristiques génétiques	Truite arc-en-ciel <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Breton et al, 1996 Lam, 1985.
Ovulations non synchrones	Variabilité génétique	Dorade royale <i>Sparus aurata</i>	Breton et al, 1996
Décalage de maturité entre mâles et femelles	Stress et inadéquation des facteurs environnementaux	<i>Stizostedion sp</i>	Breton et al, 1996
Maturation sexuelle indésirable ou trop précoce Frai spontané indésirable	Caractéristiques génétiques Facteurs d'élevage	Tilapia du Nil <i>Oreochromis niloticus</i>	Mohamed et al, (2005).

Ce déficit de sécrétion de gonadotrophines entraîne donc des dysfonctionnements sévères de reproduction chez plusieurs espèces des poissons en captivité dont les principaux sont décrits dans le tableau 1 (Jalabert et al., 1973). Généralement, on remarque que les femelles accusent soit une absence de maturation ovocytaire et donc de l'ovulation, soit une insuffisance de ponte tandis que les mâles présentent une production de laitance de mauvaise qualité et une réduction

de la quantité de sperme (Zohar, 1988). Harvey et Haor (1986) et Medour et al (2005) soulignent qu'en situation d'élevage, les gonades des femelles entreprennent et poursuivent un développement normal jusqu'aux stades finaux de maturation des gamètes, et que ce n'est qu'au moment de la libération de ces derniers que la séquence est interrompue. Les ovocytes subissent une dégénérescence très rapide empêchant l'ovulation et la ponte (Zohar et al, 1988).

I.3. Induction artificielle de l'ovulation et de la ponte

Pour remédier aux problèmes de reproduction des poissons en captivité, diverses techniques d'induction de la reproduction ont été mises en œuvre depuis des décennies (Lam, 1985). D'abord les manipulations des paramètres environnementaux dont la température, la photopériode, la salinité, le volume de l'eau, la végétation, la présence du substrat, etc., visant à redonner aux poissons les conditions optimales de frai (Yaron, 1995; Meddur et al, 2005), puis l'utilisation des hormones de maturation tant naturelles que synthétiques (Yaron, 1995; Battaglione et Selosse, 1996), qui sont spécifiquement utilisées pour induire la maturation finale des ovocytes, l'ovulation, la spermiation et la ponte (Zohar et Mylonas, 2001). Pour les espèces qui pondent naturellement en captivité malgré l'absence de stimuli environnementaux et les conditions artificielles d'élevage, les techniques d'induction hormonale de l'ovulation sont utilisées afin d'augmenter d'une part la production d'œufs et, d'autre part de synchroniser les pontes (Bobe et al, 2014).

Parmi les hormones utilisées en aquaculture (Tableau 2), il y a premièrement des préparations à base de gonadotrophines, agissant au niveau de l'hypophyse. Ce sont généralement les extraits hypophysaires prélevés chez la carpe (CPE), le poisson-chat africain ou d'autres vertébrés ainsi que la gonadotrophine chorionique d'origine humaine (Migaud, 2002). Ces dernières méthodes dites d'hypophysation consistent à employer ces hypophyses prélevées uniquement sur des poissons matures contenant des gonadotrophines, les broyer et injecter aux poissons en phase finale de maturation ovocytaire (Gardes et al, 1999). Plusieurs autres hormones synthétiques sont utilisées et/ou testées à côté des extraits hypophysaires pour contrôler artificiellement de façon efficace la reproduction des poissons (Souza et al, 2018). L'hormone synthétique la plus communément utilisée est l'Ovaprim qui est un supplément peptidique liquide utilisé pour synchroniser la saison de frai, et augmenter la production de laitance chez les mâles (Syndel, Inédit).

Tableau 2. Hormones utilisées ou testées chez les poissons en captivité

Substances naturelles ou synthétiques	Voie d'administration	Espèces-types	Références
Ovaprim	Injection	Poisson-chat asiatique <i>Heteropneustes fossilis</i> Poisson-chat africain <i>Clarias gariepinus</i>	Chaube et al, 2013
Ovopel	Injection	Le tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>	Souza et al, 2018
Ovatide	Injection	Carpe indienne <i>Labeo Rohita</i>	Tiwana et Raman, 2012
LH-RH	Injection	Ombrine, <i>Sciaenops ocellatus</i> maigre commun <i>Argyrosomus regius</i>	Gardes et al, 1999 Ali et al, 2012
GTH	Injection	Poisson-chat africain <i>Clarias gariepinus</i>	
LHRHa	Injection musculaire	Sole sénégalaise <i>Solea senegalensis</i>	Agulleiro et al, 2006
Pimozine +LHRHa	Injection	Poisson-chat africain <i>Clarias gariepinus</i>	
Mélatonine	Balnéation	Poisson zèbre <i>Danio rerio</i> Carpe <i>Labeo rohita</i> <i>Fundulus heteroclitus</i>	Carnevali et al, 2011 Asamanja et al, 2005 Lombardo et al, 2012
GnRH	Injection et Implant	Sole sénégalaise <i>Solea senegalensis</i>	Agulleiro et al, 2006
Gonadotrophine chorionique humaine	Injection	Médaka <i>Oryzias dancena</i>	Park, 2020
Extrait de l'hypophyse de la carpe ou du poisson-chat africain	Injection	Médaka <i>Oryzias dancena</i>	Park, 2020
Oxytocine	Injection	Poisson-chat ambulant <i>Clarias batrachus</i>	Priyadarshi et al, (2020)
Gonadotrophine chorionique humaine	implants à libération prolongée	Poisson-chat africain <i>Clarias gariepinus</i>	Muruganankumar et al, 2017

I.4. Administration des hormones de reproduction aux poissons

Les hormones sont généralement administrées par injection mais aussi par implant et balnéation (Muruganankumar et al, 2017). L'efficacité des traitements hormonaux administrés aux poissons dépend de l'âge, du sexe, de l'espèce cible, du type et de la dose d'hormone appliquée. Pour les extraits d'hypophyse naturels, elle dépend aussi du degré de maturité du donneur d'hormones (Jalabert et al., 1977).

L'application des hormones de reproduction est uniquement effectuée sur des sujets ayant atteint la maturité sexuelle, détectable pour la plupart des espèces par l'émission de laitance après une pression sur le flanc chez le mâle ou en se basant sur des critères morphologiques externes chez la femelle. Parmi ceux-ci, on distingue notamment la rougeur de la papille génitale et sa protubérance, le gonflement de l'abdomen qui peut devenir mou et éventuellement l'émission de quelques ovocytes (Harvey et Hoar, 1980 ; Breton et al, 1996 ; Migaud, 2002).

La dose d'hormone requise pour provoquer l'ovulation ou la ponte varie en fonction du degré de maturité des ovocytes (Harvey et Hoar, 1980). L'induction hormonale de l'ovulation et de la ponte se pratique en une seule injection ou en plusieurs injection(s) dont une ou plusieurs préparatoires (dose hormonale réduite) suivies d'une injection définitive (dose hormonale maximale) (Chaube et al, 2013). La dose préparatoire est généralement équivalente à 10% de la dose définitive. Elle est appliquée entre 6 et 24 heures avant la dose définitive pour avancer le développement gonadique au stade de pré-ovulation (Breton et al, 1996, Gardes, 1998 ; Chaube et al, 2013).

L'intervalle de temps entre l'administration de l'hormone et l'ovulation varie en fonction de l'hormone, de la température, de l'espèce et de l'âge du sujet traité. Chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) par exemple, l'ovulation se produit approximativement 8 heures après injection à 28 °C, alors qu'à 15 °C, il faut une période trois fois plus longue (Richard, 1981).

I.5. Le rivulus des mangroves

I.5.1. Présentation de l'espèce

Le rivulus des mangroves *Kryptolebias marmoratus* (Poey, 1880) est une espèce de poisson téléostéen ovipare appartenant à la famille des Rivulidae, ordre de Cyprinodontiformes qui mesure au maximum 50 mm à l'âge adulte (Ferrer et al., 2014). Avec son espèce sœur *Kryptolebias hermaphroditus*, elle constitue l'une de deux uniques espèces parmi tous les

vertébrés à être constituée uniquement d'individus hermaphrodites à autofécondation et de mâles (Turner et al., 2006 ; Farmer & Orlando 2012).

Les mâles rencontrés au sein des populations de rivulus des mangroves peuvent être de types primaires ou secondaires. Les mâles primaires ont des testicules fonctionnels tandis que les tissus ovariens sont absents. Les mâles secondaires sont des hermaphrodites transformés en mâles par la perte de la fonction ovarienne (Harrington, 1961). Cette transition d'hermaphrodite en mâle pourrait être une stratégie de survie à un environnement difficile (Gresham et al., 2019). Ces deviennent alors incapables de reproduction par autofécondation, mais peuvent fertiliser les œufs des hermaphrodites (Harrington, 1961).

Le patron de coloration des écailles permet de différencier les hermaphrodites des mâles (Figure 2). Les individus hermaphrodites présentent une coloration brune voire grise, et développent, un ocelle noir proche du pédoncule caudal entre 10 à 14 jours après l'éclosion. Les mâles primaires ont une intense coloration orangée alors que chez les mâles secondaires cette coloration orange est située dans la région ventrale et caudale, avec un ocelle qui disparaît progressivement (Sakakura & Noakes, 2000).



Figure 3 : Rivulus des mangroves hermaphrodite à gauche et mâle secondaire à droite (Photo crédit: Frederick Silvestre).

Selon Marson et al (2019), il existerait également certains individus mâles dits cryptiques, qui ont un phénotype hermaphrodite, sans pigmentation orange visible sur le corps et conservant une légère décoloration de l'ocelle.

I.5.2. Cycle de vie et répartition géographique

Le cycle de vie de *K. marmoratus* est composé de trois stades : le stade embryonnaire, le stade juvénile et le stade adulte. Le stade embryonnaire débute à la fécondation jusqu'à l'éclosion. Le stade juvénile va du premier jour de l'éclosion jusqu'à la maturité sexuelle. L'entièreté du cycle de vie se déroule dans les mangroves, plus spécifiquement les mangroves rouges *Rhizophora mangle* où le rivulus peut survivre durant 3 à 4 ans (Taylor, 1999). L'aire de répartition naturelle de *K. marmoratus* (Figure 3) suit donc les forêts de mangroves allant du Brésil jusqu'à la Floride aux Etats-Unis en passant par de nombreuses îles des Caraïbes et l'Amérique centrale (Costa et al, 2010, Tatarenkov et al., 2017).

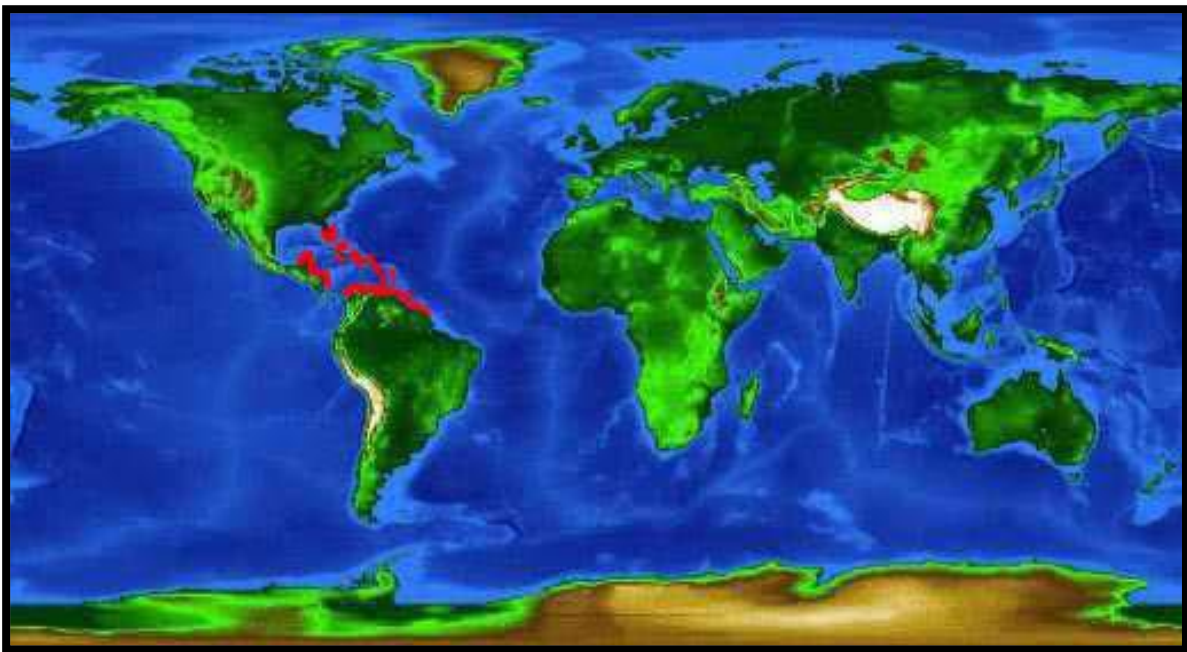


Figure 4 : Aire de distribution mondiale de *K. marmoratus* en zone rougeâtre
(www.floridamuseum.ufl.edu)

I.5.3. Conditions écologiques

Le rivulus des mangroves supporte une large gamme de température variant entre 7 et 38°C. Il peut survivre à 5 °C lorsqu'il est émergé (Taylor, 1999). L'optimum thermique de reproduction se situe entre 20 à 30°C (Taylor et al., 1995 ; Taylor, 2000). Park et al (2017) soulignent que les températures allant au-delà de 27.5°C réduisent les performances de sa reproduction par inhibition de l'autofécondation.

Le rivulus des mangroves vit dans des zones d'eau peu profonde et tolère une salinité pouvant varier de 0 à plus de 70 ppt (Kristensen, 1970 ; Taylor et al, 1995). En laboratoire, les juvéniles

peuvent tolérer jusqu' à 80 ppt (Taylor, 2000). Par sa capacité d'absorber l'oxygène de l' air et d'excréter les déchets azotés par la peau, *K. marmoratus* est capable de sortir de l'eau et de rester longtemps dans les milieux terrestres (Ong et al. 2007, Cooper et al., 2013). Selon Abel et al (1987), il sort de l'eau pour échapper à la prédation soit lorsque les conditions du milieu aquatique deviennent trop défavorables ou encore pour pondre ses œufs. Il peut survivre en dehors de l'eau jusqu'à deux mois, à condition de rester en milieu humide (Taylor, 2000). On le retrouve en milieu terrestre à l'air libre (Figure 4), caché sous des litières de feuilles humides, dans les cavités d'insectes ou les bûches en décomposition, ou dans des terriers créés par des insectes à l'intérieur des arbres (Davis et al. , 1990; Ong et al, 2007).

1.5.4. Régime et besoins alimentaires

Le rivulus des mangroves est un poisson carnivore se nourrissant essentiellement des microinvertébrés aquatiques et terrestres ainsi que de petits poissons même de sa propre espèce (Harrington, 1961; Taylor, 2000). Il est aussi capable de poursuivre sa proie hors de l' eau (Kristisen, 1970 ; Davis et al., 1995). Bien que les besoins nutritifs spécifiques de cette espèce n'ont pas encore été bien étudiés, en captivité, il est nourri de copépodes ou d'artémias (Camacho et al., 2008).



Figure 5 : Rivulus des mangroves en hors de l'eau (Photo crédit : www.sciencesetavenir.fr)

I.5.5. Biologie de la reproduction

K. marmoratus est hermaphrodite à autofécondation et présente un ovotestis composé majoritairement de tissu ovarien ainsi que d'une portion minoritaire de tissu testiculaire (Harrington, 1961). Les ovules produits dans la partie ovarienne de l'ovotestis sont fécondés de manière interne par les spermatozoïdes émis par les tissus testiculaires de la gonade (Costa et al., 2010). Toutefois, les hermaphrodites ont également la capacité d'émettre des œufs viables non fécondés, rendant le croisement avec les mâles possible (Mackiewicz et al., 2006). Dans ces cas, les œufs non fécondés sont pondus par l'individu hermaphrodite et le mâle y dépose sa laitance pour les fertiliser. Dans la majorité des populations, ce sont toutefois des croisements occasionnels et moins fréquents (Mackiewicz et al., 2006, Turner et al., 2006, Park et al., 2017).

La fécondation coïncide essentiellement avec l'ovulation. Les deux processus, ainsi que la ponte, se produisent avec des rythmes de 24 heures (Harrington, 1961). De plus, environ 80% des œufs sont pondus après 24 heures de fécondation, et moins de 1% sont pondus immédiatement. Les œufs ne sont pas expulsés dans l'ordre de leur fécondation. Les ovules fécondés ou matures par l'une ou l'autre voie sont libérés près de la surface de l'eau à différents stades de développement, allant de ceux qui ont été récemment fécondés à d'autres contenant des embryon en développement, s'attachent aux feuilles, aux brindilles ou à d'autres débris végétaux flottants (Harrington, 1961; Earley et al., 2000). Ils sont bien adaptés à la dispersion et peuvent survivre hors de l'eau pendant une période prolongée avant d'éclore rapidement une fois réimmergés (Ritchie et Davis, 1986).

Au cours de l'incubation, l'embryon se développe en 32 phases durant environ 14 jours puis s'en suit une période de diapause avant l'éclosion (Mourabit et al., 2011). La durée de celle-ci varie entre 40 et 60 jours. Les individus naissent hermaphrodite ou mâle, appelés mâles primaires. Jusqu'à ce jour, aucune femelle n'a encore été identifiée dans le milieu naturel ni en conditions de laboratoire (Harrington, 1961; Farmer et Orlando, 2012).

Il est possible que la reproduction de *K. marmoratus* ait lieu toute l'année, à l'exception des périodes de sécheresses prolongées et/ou des marées basses (Taylor, 2000). Et un hermaphrodite est capable de pondre une dizaine d'œufs par jours (Mourabit et al., 2011; Moore et al., 2012). A l'éclosion, la larve est déjà mobile et capable de se nourrir de petites proies vivantes (Lescat, 2016). La maturité sexuelle est atteinte entre 70 à 80 jours après éclosion (Kanamori et al., 2006).

I.6. Problématique et objectifs de l'étude

Le rivulus des mangroves est une espèce de poisson qui suscite beaucoup d'intérêt dans des études génétiques et écotoxicologiques (Lee et al., 2008; Tatarenkov et al., 2017). Par son mode de reproduction très particulier donnant des individus homozygotes, il se révèle comme un excellent organisme modèle pour l'étude des mécanismes épigénétiques (Fellous et al., 2018). Cependant, celles-ci nécessitant souvent un grand nombre d'œufs ainsi que des croisements entre les lignées, il s'avère malheureusement qu'en conditions de captivité, sa reproduction pose quelques difficultés qui se traduisent par une irrégularité des pontes et un faible taux de fécondité. De plus, ces œufs sont souvent fécondés avant d'être expulsés, empêchant toute possibilité de croisement contrôlé entre les hermaphrodites et les mâles.

A la lumière des données scientifiques existant dans la littérature, il n'existe pas d'informations relatives aux tentatives d'induction hormonale de la reproduction chez cette espèce. Pour combler cette lacune et donner les possibilités de contrôler sa reproduction en captivité, la présente étude tente de mettre au point un protocole susceptible d'augmenter la fécondité et d'induire la ponte des œufs non-fécondés chez *K. marmoratus*. Pour ce faire, nous allons tenter de réaliser la comparaison des effets de deux traitements hormonaux (Ovaprim et Mélatonine) suivant deux modes d'administration, injection et balnéation sur la fécondation et la ponte.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel biologique

Cette étude avait pour but d'évaluer l'influence des hormones exogènes (Mélatonine et Ovaprim) sur la reproduction chez *Kryptolebias marmoratus*.

Les essais ont été réalisés sur 60 hermaphrodites répartis en six groupes (n=10 par groupe). Trois groupes ont servi à évaluer les effets de la Mélatonine (groupe contrôle M0, groupe exposé à la dose faible de mélatonine M1, groupe exposé à la dose forte de mélatonine M2) tandis que les trois autres groupes ont reçu un traitement à l'Ovaprim (groupe contrôle P0, groupe recevant la dose faible d'Ovaprim P1, groupe recevant la dose forte d'Ovaprim P2).

Les poids des poissons expérimentaux étaient compris entre 0.35 g et 0.90 g tandis que leur âge variait de 180 à 700 jours. Tous les poissons hermaphrodites appartenaient à la même lignée EPP des différentes générations (F1, F2 et F3), initialement prélevés dans la réserve d'Emerson Point en Floride.

II.2. Sélection des poissons et conditions d'élevage

Les individus hermaphrodites de l'espèce *K. marmoratus* ont la capacité de transitionner en mâles quand ils atteignent l'âge adulte. Bien que cette transformation s'accompagne de l'apparition d'une coloration orangée (Taylor, 2000; Gresham et al., 2019), il n'est pas connu si ce changement de coloration précède la perte de fonction ovarienne ou lui succède. Pour éviter le choix d'un individu mâle aux caractéristiques des hermaphrodites, 80 individus provenant du stock reproducteur ont donc fait l'objet d'un suivi préalable de ponte durant trois semaines pour s'assurer de leur capacité de ponte. Parmi les poissons ayant pondu au moins une fois, 60 ont été sélectionnés au hasard pour les expérimentations.

Suivant la méthode standard d'élevage en laboratoire de *K. marmoratus* (Koenig et Chassar, 1984), chaque poisson est placé individuellement dans une boîte en plastique d'une capacité de 1 litre marquée du numéro d'identification unique du poisson, de sa filiation, sa date de naissance et sa génération. Ce bocal est perforé de deux petits trous permettant le nourrissage du poisson et l'aération du récipient (Figure 4 B).

Les conditions environnementales d'élevage de ces poissons expérimentaux sont semblables à celles de tous les autres rivulus des mangroves au sein du LEAP. Sur deux étagères dans une chambre aménagée et contrôlée, les bocaux contenant les poissons sont rangés les uns sur les autres en raison de 3 à 4 bocaux par rangées (Figure 4 A).

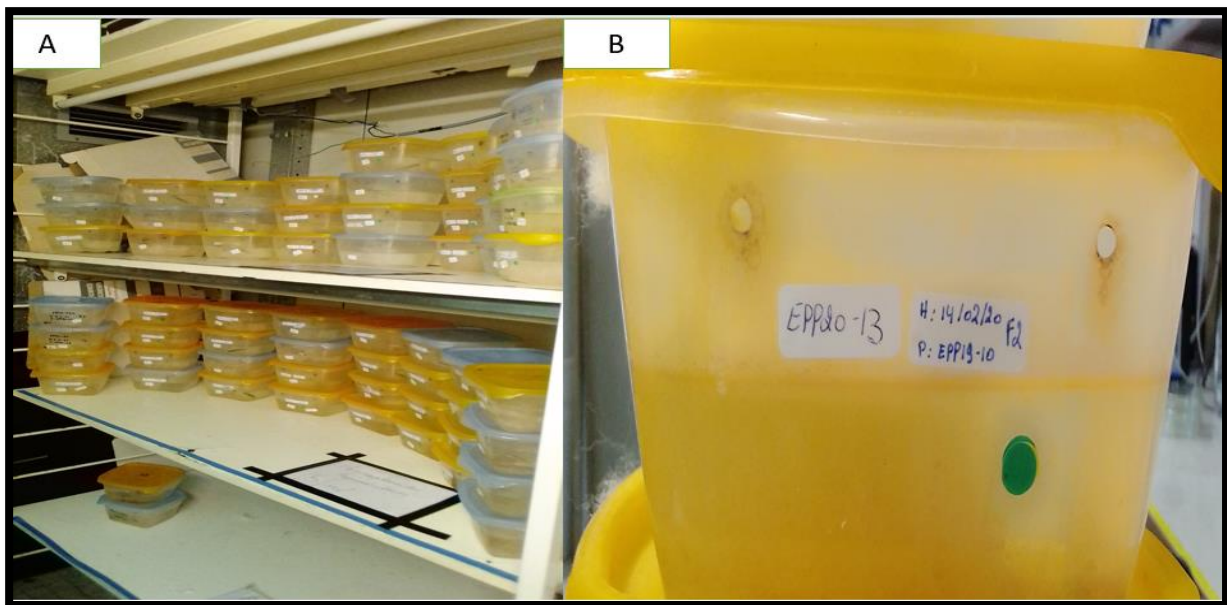


Figure 6 : Disposition générale des containers à rivulus des mangroves (A) et container spécifique de culture (B) (Photo : Kifufu, 2021)

Les paramètres physico-chimiques contrôlés sont la salinité de l'eau des boîtes individuelles d'élevage, la photopériode et la température de la chambre à rivulus. La salinité de l'eau est toujours maintenue à 12 ppt. Le contrôle de celle-ci est réalisé une fois la semaine sur une fraction des poissons qui est choisie aléatoirement. La photopériode est de 12/12 et la température de la chambre est maintenue entre 25-26°C. Les poissons sont nourris *ad libitum* avec des *Artemia salina* au stade *nauplii*.

II.3. Traitements hormonaux

Les traitements hormonaux retenus pour cette étude sont l'Ovaprim (GnRH synthétique et domperidone) et la Mélatonine, administrés respectivement par injection péritonéale et par baignade. Les concentrations en mélatonine testées sont de 0.1 μM et 1 μM (Carnevali et al, 2011) tandis que les doses d'Ovaprim injectées sont de 0.35 $\mu\text{L.g}^{-1}$ et 0.5 $\mu\text{L.g}^{-1}$ de poids corporel suivant les recommandations de Syndel (inédit). Le groupe contrôle de l'Ovaprim a été injecté avec la solution saline à la dose de 0.5 $\mu\text{L.g}^{-1}$.

Afin d'éviter la constitution de groupes de poissons dont le poids moyen varierait de manière importante, les poissons ont d'abord été classés par poids, puis subdivisés en 10 groupes de 6 poissons (chaque groupe étant donc constitué de poissons de poids adjacent dans le classement). Parmi ces sous-groupes, l'attribution d'un des six traitements a été réalisée de manière aléatoire, permettant ainsi une répartition régulière des animaux du point de vue de leur poids.

II.4. Préparation des doses hormonales

Les expériences se sont déroulées en deux phases sur des groupes des poissons différents. D'abord l'exposition à la mélatonine pendant 14 jours, ensuite les injections uniques avec l'ovaprim. L'eau du groupe des poissons ayant subi le traitement avec la mélatonine était entièrement renouvelée chaque jour pour assurer le maintien de sa concentration durant toute la période expérimentale. Une solution de 0.1 μM ou 1 μM était donc ajoutée quotidiennement dans des containers de 5L et transvasés dans les boîtes d'élevage des poissons en raison de 500 ml par boîte.

Les poissons du groupe ovaprim ont par ailleurs été gardés à jeûne durant 24h avant l'administration de l'hormone afin de limiter le risque d'endommager un organe interne lors de l'injection. Les injections ont été réalisées en une seule dose. Avant les injections, ils ont été préalablement anesthésiés dans une solution d'eau salée (12g/L) additionnée de 400 mg/L de MS-222 et tamponnée avec du bicarbonate de sodium à saturation.

Lors des injections, les poissons étaient placés sur une éponge humide et injectés dans la cavité péritonéale avec une solution d'Ovaprim diluée (Figure 7). Etant donné les trop faibles volumes qui devraient être utilisés si l'Ovaprim était injecté pur, il a été résolu d'injecter un volume fixe d'Ovaprim dilué dans la solution saline et d'utiliser une solution de concentration différente pour chaque catégorie de poids (Tableau 3).

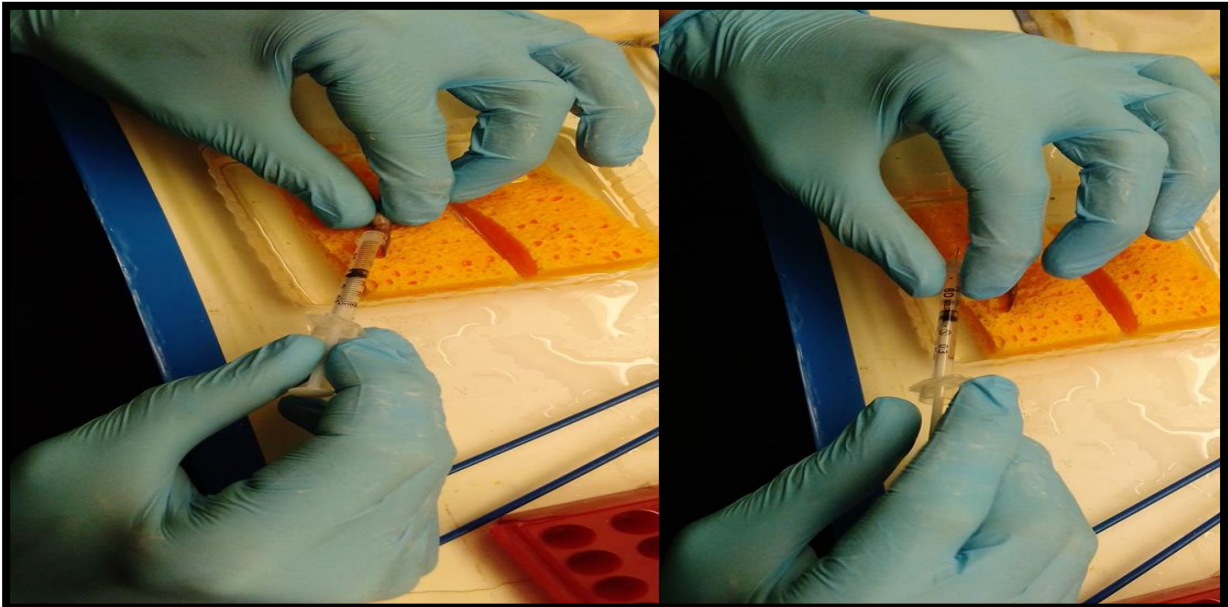


Figure 7 : Injection des poissons avec l'Ovaprim (Photo : Kifufu, 2021)

Une catégorie de poids consiste en un intervalle de poids centré autour d'un poids cible pour lequel une concentration exacte de 0,35 $\mu\text{L/g}$ ou 0,5 $\mu\text{L/g}$ d'ovaprim pur serait injecté. Une solution d'Ovaprim diluée a été préparée par catégorie de poids (6 catégories de 0,4 à 0,9g et par dose d'Ovaprim visée (0,35 $\mu\text{L/g}$ ou 0,5 $\mu\text{L/g}$).

II.5. Récolte, pesée et incubation des œufs

Dans la boîte d'élevage de rivulus des mangroves est placée une certaine quantité de ouate servant de zone de refuge et de ponte. Les œufs étant adhésifs se collent au substrat une fois pondus. La fouille systématique de cette ouate avec les doigts après essorage permet de récolter aisément les œufs. Dans l'éventualité où des œufs seraient pondus dans le fond du bocal, c'est avec une pincette qu'ils sont récoltés.

Le suivi de la ponte s'est fait tous les jours à 9h00 durant 14 jours pour le groupe Mélatonine. Quant au traitement avec l'Ovaprim, la récolte des œufs a été réalisée à 6h, 12h et 24 h après les injections. Les œufs récoltés étaient déposés individuellement dans des plaques à 24 puits et pesés à l'aide d'une balance électronique de précision METTLER AE 200 sur laquelle est posée un petit récipient propre destiné à contenir l'œuf à peser. Ils étaient ensuite conservés dans la chambre à rivulus où la température est contrôlée en vue des incubations qui ont duré 14 jours. Au terme de cette échéance, les embryons ont été euthanasiés par congélation et conservés à -80°C .

Tableau 3 : Intervalles de la catégorie de poids et concentrations en Ovaprim effectives

Poids cible (g) pour une dose exacte de 0,35 $\mu\text{L/g}$ et 0,5 $\mu\text{L/g}$ en Ovaprim pure	Intervalle de la catégorie de poids (g)	Concentration en Ovaprim effective ($\mu\text{L/g}$) groupe à concentration cible de 0,35 $\mu\text{L/g}$	Concentration en Ovaprim effective ($\mu\text{L/g}$) groupe à concentration cible de 0,5 $\mu\text{L/g}$
0,4	0,35 à 0,44	0,32 à 0,39	0,45 à 0,57
0,5	0,45 à 0,54	0,33 à 0,38	0,46 à 0,56
0,6	0,55 à 0,64	0,33 à 0,38	0,47 à 0,55
0,7	0,65 à 0,74	0,33 à 0,38	0,47 à 0,54
0,8	0,75 à 0,84	0,33 à 0,37	0,48 à 0,53
0,9	0,85 à 0,94	0,34 à 0,37	0,48 à 0,53

II.6. Détermination de la viabilité et fécondation des œufs et des stades de développement embryonnaire

Après la récolte, les œufs étaient immédiatement observés sous microscope inversé (Figure 8A et B) afin de déterminer la viabilité, les stades de développement embryonnaire ou s'ils étaient fécondés ou non. Par rapport à la viabilité et la fécondation des œufs, trois statuts étaient attribués aux œufs observés : viable (+ stade de développement), non-viable et non-fécondé.

La viabilité des œufs était également contrôlée après 24h d'incubation afin d'évaluer le taux de mortalité lors du développement embryonnaire précoce ainsi qu'après 14 jours d'incubation pour évaluer le taux d'embryons complétant entièrement leur développement et qui entraient dès lors en diapause. Après que les stades de développement des embryons des œufs récoltés étaient déterminés, ils étaient ensuite transformés en heures post-fécondation suivant les critères de Mourabit et al., 2011 (Figure 8).

II.7. Paramètres d'évaluation

Les critères de réponse repris dans le tableau 3 ont permis d'évaluer les effets des traitements hormonaux appliqués sur la reproduction chez *K. marmoratus*.

Tableau 4. Critères de réponse aux traitements appliqués

Paramètres	Formules de calcul
Taux de réussite de frai	Proportion des poissons ayant pondu durant toute la période
Taux de ponte *	Proportion des poissons qui ont pondu par jour ou dans l'intervalle de 6-12 heures
Fécondité moyenne	Moyenne d'œufs pondus par géniteur
Taux de fécondation	Nombre d'œufs fécondés/nombre d'œufs x 100
Stades embryonnaires	Déterminé à partir des observations microscopiques
Viabilité des œufs à la ponte, J1 et J14	Nombre d'œufs viables/nombre d'œufs x 100

*Ce critère a été utilisé par jour pour la mélatonine et pour l'intervalle de 6-12h pour l'Ovaprim.

II.8. Analyses statistiques des données

Deux types d'analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R version 4.1.0. D'abord, l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA I) pour les variables continues normales avec le package Rcmdr. Le seuil de signification de différence entre les traitements a été de 5%. Avant d'effectuer l'ANOVA, le test de Barlett était réalisé pour vérifier l'homoscédasticité des

variances. La deuxième analyse statistique réalisée était le Ch2 d'homogénéité pour les données exprimées en pourcentages. Chacun de deux groupes de traitements (Mélatonine et Ovaprim) a été analysé distinctement. Les graphiques ont été générés avec le logiciel Excel 365.

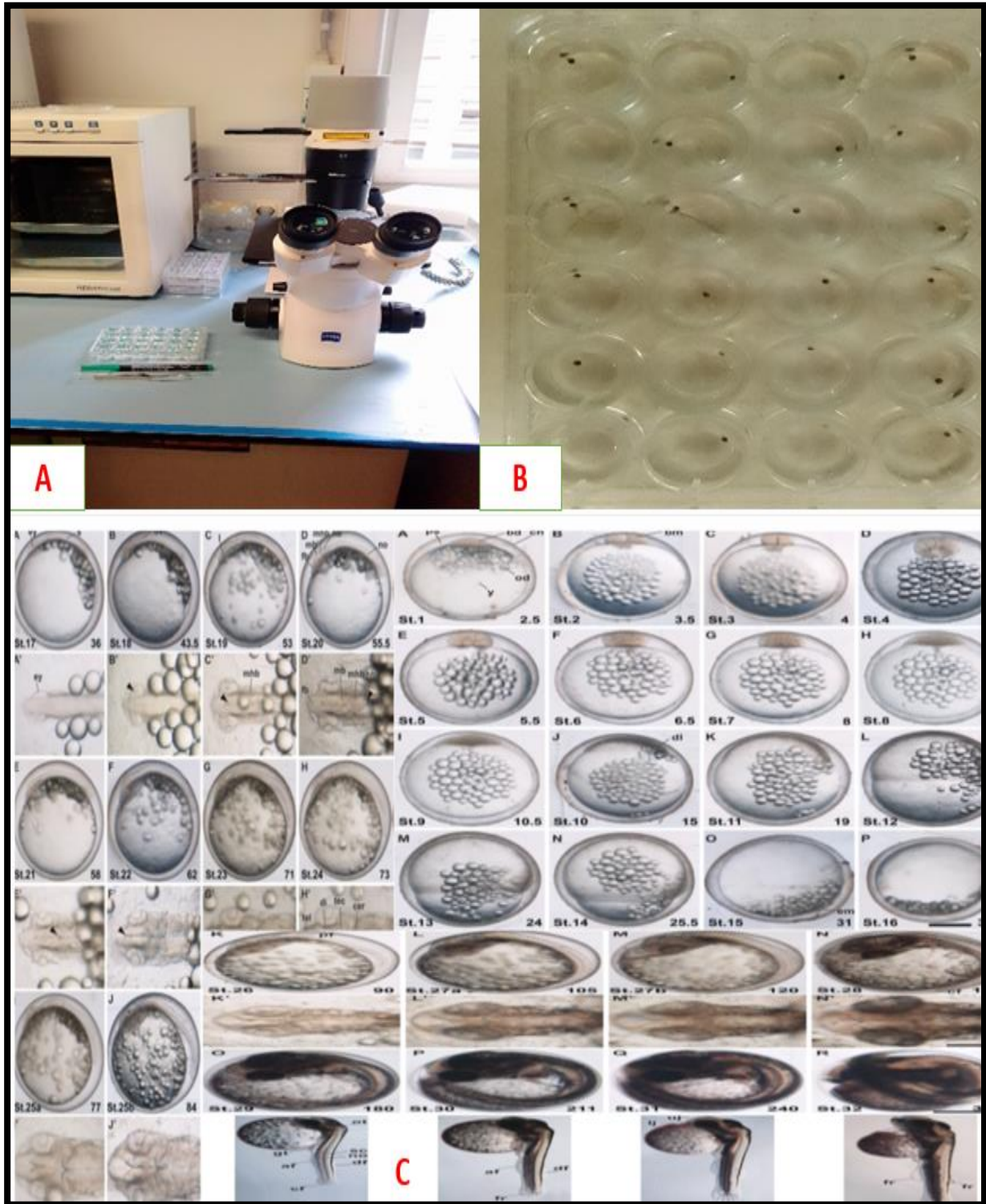


Figure 8: Dispositif d'observation microscopique (A), plaque à 24 puits contenant les œufs et illustration de 32 stades de développement embryonnaire de *Kryptolebias marmoratus* (C) selon Mourabit et al, 2011(Photo : Kifufu, 2021).

III. RESULTATS

Les paramètres de performance de la reproduction, les taux de viabilité des œufs et des stades de développement embryonnaire des poissons traités avec les deux hormones expérimentales à deux doses différentes sont présentés dans le tableau 5 et les figures 9 à 11.

III.1. Performances de la reproduction

Les résultats du suivi de ponte des 60 hermaphrodites de l'espèce *K. marmoratus* traités avec deux doses (faible et forte) des hormones de reproduction (Mélatonine et Ovaprim) indiquent aucune mortalité des géniteurs après qu'ils aient subi les différents traitements. Leurs poids moyens ont été statistiquement similaires (p-value=0.737 Mélatonine et p-value=0.747 Ovaprim).

Tableau 5 : Paramètres de performance de la reproduction des poissons expérimentaux

Critères de performance	MELATONINE			OVAPRIM		
	M0 (n=10)	M1 (n=10)	M2 (n=10)	P0 (n=10)	P1 (n=10)	P2 (n=10)
PMP(g)	0.63 ^a ±0.2	0.59 ^a ±0.1	0.56 ^a ±0.2	0.63 ^a ±0.2	0.64 ^a ±0.1	0.58 ^a ±0.2
MP (%)	0	0	0	0	0	0
TRF (%)	90 ^a	80 ^a	100 ^a	40 ^a	20 ^b	40 ^a
TPJ(%)	20 ^a .0±3	16.4 ^a ±1.6	25 ^a ±12.2	13.3 ^a ±1	10 ^a ±4.1	16.9 ^a ±2
FM	5.4 ±5.03 ^a	4.8 ± 4.8 ^a	9.3± 12.2 ^a	0.9± 1.3 ^a	0.4± 0.8 ^a	0.5± 0.7 ^a
PMO (mg)	2.9 ±0.2 ^a	3.1 ±0.2 ^a	2.8 ±0.3 ^a	2.5 ±1.0 ^a	3.2 ±0.4 ^a	3.0±0.2 ^a
TF(%)	100	100	100	100	100	100

Les valeurs (mean± Sd) sur la même ligne ayant le même exposant ne sont pas significativement différentes. PMP : poids moyens des parents, TRF : taux de réussite de frai, TPJ : Taux de ponte journalier, MP : mortalités des parents, FM : fécondité moyenne, PMO : poids moyens des œufs, TF : taux de fertilisation des œufs viables

Au terme de 14 jours d'exposition à la Mélatonine, le taux de réussite de frai pour ce groupe a été de 90% pour M0, 80% pour M1 et 100% pour M2 tandis que pour le groupe Ovaprim (24h après les injections), il a été de 40% pour P0, 20% pour P1 et 40% pour P2. Le test de χ^2 d'homogénéité a montré une différence significative pour le groupe d'Ovaprim (p-value = 0.01832), alors que pour ceux de mélatonine, aucune différence significative entre les différents groupes n'a été détecté (p-value = 0.3292).

Le taux de ponte journalier du groupe Mélatonine a été très faible pour tous les traitements appliqués avec des valeurs de $20 \pm 3\%$ pour M0, $16.4 \pm 1.6\%$ pour M1 et $25 \pm 12.2\%$ pour M2 (Ch2 d'homogénéité= p-value = 0.402). Il en est de même pour le groupe Ovaprim (13.3% pour P0, 10% pour P1 et 16.9% pour P2). Le test Ch2 d'homogénéité n'a révélé aucune différence significative entre les traitements au seuil de $p < 0.05$ (p-value = 0.4111).

Les valeurs relatives à la fécondité moyenne pour les groupes des poissons ayant été exposés à la Mélatonine ont été de 5.4 ± 5.03 pour M0, 4.8 ± 4.8 pour M1, 9.3 ± 12.2 œufs pour M2. Pour ceux d'Ovaprim, 0.9 ± 1.3 pour P0, 0.4 ± 0.8 pour P1 et 0.5 ± 0.7 pour P2. L'analyse de la variance au seuil de $p < 0.05$ n'a pas révélé de différence significative pour ce paramètre d'évaluation (p-value = 0.42 Mélatonine et p-value = 0.515 Ovaprim).

Les poids moyens des œufs des poissons exposés à la Mélatonine ont été de 2.9 ± 0.2 mg pour M0, 3.1 ± 0.2 mg pour M1 et 2.8 ± 0.3 mg pour M2. Pour ceux injecté avec l'Ovaprim, ils ont été de 2.5 ± 1.0 mg pour P0, 3.2 ± 0.4 mg pour P1 et 3.0 ± 0.2 mg pour M2. Aucune différence significative n'a été détectée entre les groupes de Mélatonine (p-value=0.426) et Ovaprim (p-value=0.363) en ce qui concerne les poids. Le taux de fécondation des œufs pondus a atteint les 100% pour tous les groupes de poissons confondus.

III.2. Viabilité des œufs

En ce qui concerne les taux de viabilité des œufs pour le groupe Mélatonine (Figure 10), ils ont été de 98.15% pour M0, 81.25% pour M1, 95.70% pour M2 au jour de la ponte, 100% pour les trois traitements (M0, M1 et M2) au premier jour et 96.23% pour M1, 95% pour M1 et 97.75% pour M2 au 14^e jour. Le test Ch2 d'homogénéité n'a montré aucune différence statistiquement significative entre les trois groupes Mélatonine au jour de la ponte (p-value = 0.4027) et au 14^e jour (p-value = 0.9805).

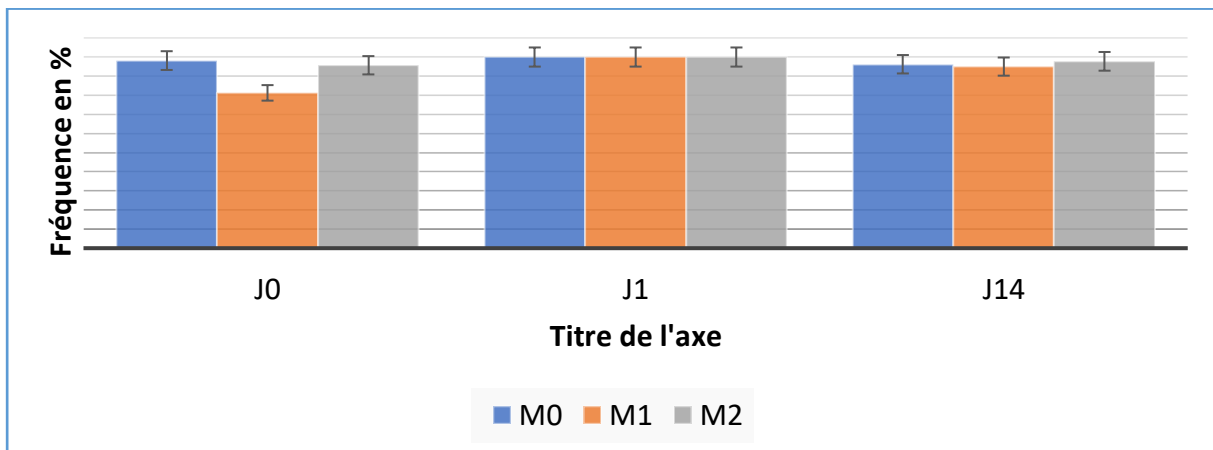


Figure 9 : Viabilité des œufs du groupe Mélatonine

De la même manière, pour les poissons traités avec Ovaprim, les œufs viables dont les proportions au J0 ont été de 92.86% pour P0, 98.0% pour P1 et 98.25 % pour P2. Au J1, il a été de 100% pour P0, 93.75% pour P1 et 96.43% pour P2. Au J14, le taux de viabilité des œufs a été de 97.44% pour P0, 100% pour P1 et 96.3% pour P2. Le test χ^2 d'homogénéité a montré que le taux de viabilité a été le même (p-value = 0.9084 au J0), au premier jour après la ponte (p-value = 0.9034) et au 14^e jour (p-value = 0.964).

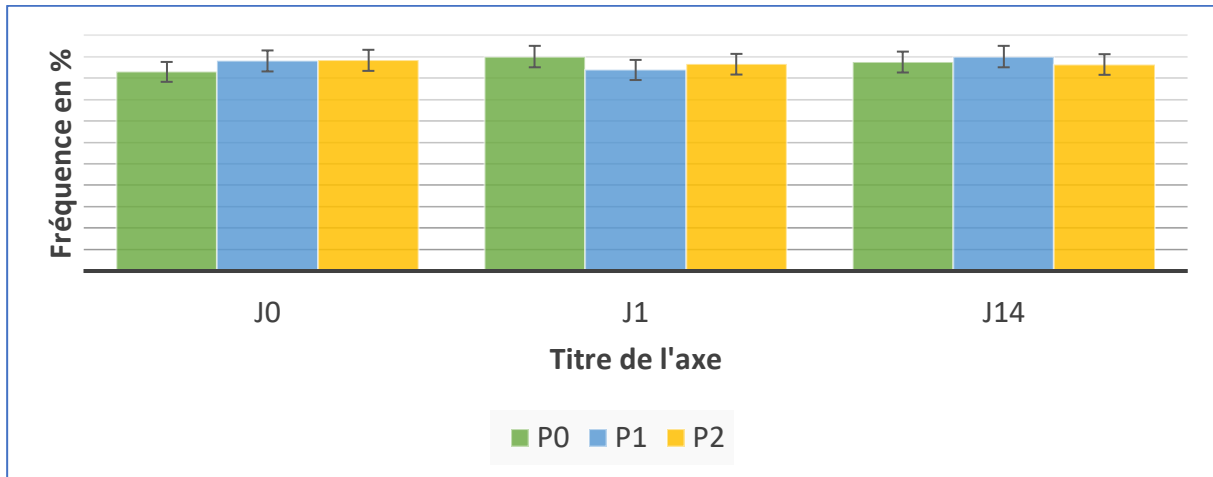


Figure 10 : Viabilité des œufs du groupe Ovaprim

III. 3. Développement embryonnaire

Les stades de développement des embryons convertis en heures post-fécondations moyennes pour les groupes Mélatonine ont été de $18.9 \pm 14.8h$ pour M0, $22.9 \pm 22.1h$ pour M1 et $22.17 \pm 14.4h$ pour M2. Quant aux poissons traités avec Ovaprim, ils ont varié de $10.5 \pm 13.4h$ pour P0, $15.6 \pm 13.6h$ pour P1 et $21.00 \pm 13.6h$ pour P2 respectivement pour P0, P1 et P2 (Figure 12). L'Analyse de la variance n'a révélé aucune différence significative (p-value=0.424 pour Mélatonine et p-value= 0.399 pour l'Ovaprim).

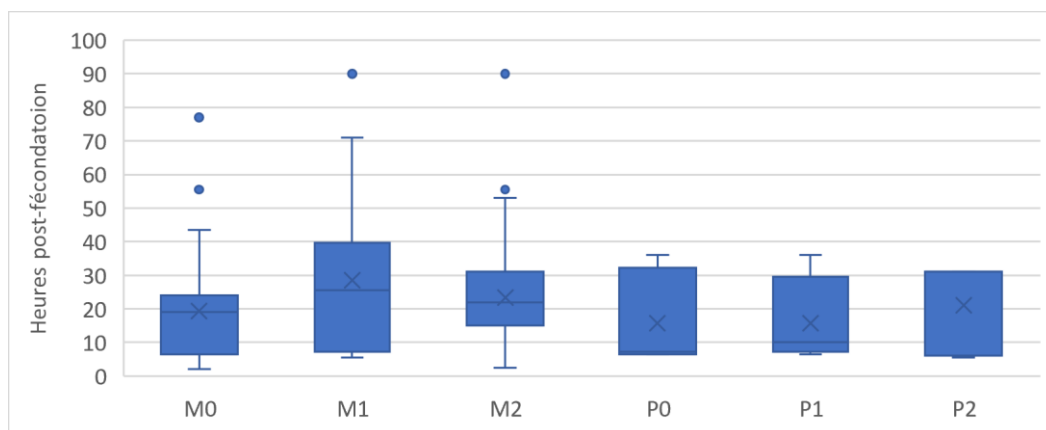


Figure 11: Stades de développement embryonnaire exprimés en termes d'heures post-fécondation

IV. DISCUSSION

En situation de captivité, plusieurs espèces de poissons n'ovulent pas spontanément ou connaissent une réduction de la fertilité (Harvey et Haor, 1980; Rottmann et al. 1991, Agulleiro et al., 2006). Chez ces poissons, la maturation finale et la libération des gamètes n'ont pas lieu en raison de l'inadéquation de certains facteurs environnementaux nécessaires à la stimulation du système endocrinien responsable de la sécrétion des hormones de maturation sexuelle et de la ponte (Crim et Glebe, 1990; Tiwana et Sudhanshu, 2012). L'utilisation des hormones exogènes agissant directement sur l'hypophyse ou indirectement sur l'hypothalamus, organes centraux de contrôle et de régulation des processus endocriniens de la reproduction des poissons est devenue indispensable pour assurer la reproduction de ces poissons (Harvey et Hoar, 1980, Bobe et al, 2014; Chaube et al, 2014).

Le rivulus des mangroves *Kryptolebias marmoratus*, une espèce de petit poisson d'eau saumâtre, qui selon plusieurs auteurs, est un organisme modèle important pour des recherches biologiques (Lee et al, 2008; Earley et al., 2012) particulièrement en écotoxicologie et en génétique (Lee et al, 2008; Tatarenkov et al., 2009; Fellous et al., 2018), présente aussi une irrégularité des pontes et une faible fécondité en captivité. Et beaucoup de zones d'ombres subsistent encore sur les processus de sa reproduction (Lomax et al, 2017). Cette étude a tenté d'apporter quelques possibilités de contrôle de sa reproduction en élevage. A l'issue des essais d'induction de la ponte avec deux types hormones administrés par balnéation pour la Mélatonine et par injection unique pour Ovaprim chez les individus hermaphrodites, aucune mortalité des géniteurs n'a été enregistrée. Weil et al (1986) renseignent que certaines hormones administrées artificiellement peuvent avoir des effets délétères sur certaines espèces de poissons. Nos résultats confirment que ni la mélatonine ni l'Ovaprim ne sont délétères aux concentrations utilisées chez le rivulus des mangroves.

Toutefois, au cours de cette étude nous avons émis l'hypothèse selon laquelle tous les poissons traités aux hormones pondraient régulièrement avec une augmentation de production des œufs. Celle-ci était étayée par les observations quotidiennes préliminaires qui ont confirmé que les individus hermaphrodites sélectionnés étaient capables de pondre quoiqu'avec irrégularité et une faible production d'œufs. Les hormones exogènes administrées auraient donc pour effet l'induction d'une grande production d'œufs (Yanong et al, 2012). Les résultats obtenus ont montré que le taux de réussite de frai a été maximal pour la mélatonine alors que pour les traitements à l'Ovaprim, il a été très faible. Cette situation contradictoire pour les deux types d'hormones s'expliquerait par l'intervalle de temps de traitement qui a été très bref (24h) pour

l'Ovaprim et plus long pour la mélatonine. Durant la courte période d'observation après les injections, moins d'individus soumis au traitement à l'Ovaprim ont pondu confirmant l'inefficacité des traitements à l'Ovaprim pour cette espèce.

Pour la mélatonine par contre, ce seul paramètre ne suffit pas pour confirmer l'efficacité de l'hormone étant donné que *K. marmoratus* est une espèce de poisson à ponte continue (Taylor, 2000), et sa capacité à produire des œufs en élevage n'est pas totalement impactée. Le suivi de son exposition durant un long temps à la mélatonine (14 jours) pourrait toujours occasionner des pontes de beaucoup d'hermaphrodites même si le traitement était inefficace.

Quant à la fécondité, nos résultats révèlent qu'elle a également été très faible pour tous les traitements de deux groupes. Il en est de même pour le taux de ponte journalier. Plusieurs raisons pourraient expliquer ces résultats.

Le succès des traitements hormonaux visant à induire artificiellement la reproduction chez les poissons dépend de plusieurs facteurs dont les principaux sont l'état de maturité ovocytaire, le type et la dose d'hormones appliquées (Harvey et Haor, 1980; Meddur et al, 2005; Bobe et al, 2014). Chez les femelles, l'état de maturité des ovocytes est déterminé par des critères morphologiques externes tels qu'une papille génitale rougeâtre et proéminente, un abdomen mou et gonflé et éventuellement l'émission de quelques ovocytes (Fontana, 1969; Ibtissem et al, 2013). Cependant, il est parfois difficile d'appliquer cette méthode basée sur les aspects externes à certaines espèces même de grande taille à l'instar de la carpe de roseau *Ctenopharyngodon idella* (Harvey et Haor, 1980). Le rivulus des mangroves étant de petite taille, celle-ci n'a pas permis la détermination visuelle de la maturation des ovocytes. Ainsi, comme Harvey et Haor (1980) ont soutenu que l'échec de bien des essais des techniques d'induction à la reproduction des poissons est imputable à une détermination imprécise du développement des ovules, l'absence d'effets de l'hormone Ovaprim injectée chez le rivulus des mangroves pourrait en partie être due à l'état de maturation des ovocytes qui n'a pas pu être déterminé avant les injections. De plus, l'Ovaprim est une hormone synthétique contenant un analogue de la GnRH de saumon et un inhibiteur de la dopamine (Syndel, inédit). Selon Dhawan et Kaur (2004), c'est un inducteur particulièrement efficace mais qui peut se révéler aussi inefficace chez d'autres espèces comme chez *Labeo rohita*.

Par ailleurs, selon Duncan et al. (2007), les doses à administrer aux poissons pour induire le frai doivent être suffisantes sinon elles ne pourraient qu'induire la maturation ovocytaire sans ovulation. Les doses appliquées varient beaucoup selon l'espèce traitée (Das, 2004). Pour

beaucoup d'espèces, une dose supérieure ou égale à 0.5 mL/kg de poids corporel de l'Ovaprim, induisent l'ovulation et la ponte (Bri et al, 2008; Hill et al, 2008; Chaube et al, 2014; Adawiyah et al, 2019). Dans le cas de notre étude, les doses d'Ovaprim appliquées sont proche et similaire à celles indiquées dans la littérature. Elles n'ont malheureusement pas eu d'impact sur la reproduction chez le rivulus des mangroves. Yanong et al (2012) soutiennent que l'Ovaprim injectées aux doses de 0.5 mL/kg sont susceptibles d'induire des effets. Pour le rivulus des mangroves, nous estimons que les doses appliquées ne seraient pas faibles mais plutôt elles n'ont pas été appliquées au bon moment du processus de maturation des gamètes. Naturellement, le processus de développement des gamètes femelles (ovogénèse) débute avec la différenciation des ovogonies qui évoluent aux stades d'ovocytes primaires et secondaires. Suivant les espèces et en fonction des caractéristiques du milieu au sein duquel elles évoluent, elle peut durer plusieurs heures à plusieurs jours (Bobe et al, 2014).

Au terme de son développement, l'ovocyte secondaire entouré du chorion se sépare du follicule et est expulsé dans la lumière ovarienne : c'est l'ovulation, et la ponte se produit après l'ovulation avec un délai variable suivant les espèces (Legendre et Jalambert, 1988). L'administration des hormones exogènes pour l'induction de l'ovulation et de la ponte chez les espèces dont l'ovogénèse s'interrompt en captivité avant d'avoir atteint les phases finales de maturation sexuelle est effectuée en fin de vitellogenèse et avant l'achèvement de la migration de la vésicule germinale (Megaud, 2002). Ainsi, toute intervention hormonale avant ou après cette étape de l'ovogénèse ne pourrait donc avoir d'effets probants.

En outre, l'application de deux injections (préparatoire et définitive) d'Ovaprim est le protocole le plus efficace par rapport à l'utilisation d'une dose unique chez plusieurs espèces de poissons (Barnabe et Quet, 1985; Mylomas et al, 2010). Dans le cas de notre étude par contre, comme Carneiro et Mikos (2008) ont tenté de provoquer une induction chez *Rhamdia quelen* en utilisant une seule dose d'un inducteur de reproduction sans succès, l'unique injection réalisée chez *K. marmoratus* expliquerait aussi l'échec de la tentative d'induction hormonale avec l'Ovaprim.

Pour la mélatonine, elle a pu entraîner une augmentation de l'indice gonado-somatique associée à l'augmentation de la production d'œufs chez *Danio rerio* à la dose de 1 µM selon Carnevali et al (2011). Chez *Catla catla*, Moniruzzaman et al (2016) confirment avoir induit la maturation ovocytaire avec le même traitement hormonal. La mélatonine agit sur l'hypothalamus en réduisant les niveaux de dopamine, ce qui entraîne une augmentation de la sécrétion de LH et

FSH (Pope et al., 2005), et donc des stéroïdes impliqués dans la maturation des ovules. Malgré que notre étude ne se soit pas penchée sur l'évaluation du développement ovocytaire comme c'est le cas avec les derniers travaux cités, l'absence d'effets de cette hormone sur la ponte de cette hormone observée chez les hermaphrodites *K. marmoratus* pourrait être due soit aux doses appliquées qui seraient faibles pour stimuler l'augmentation de la LH et FSH qui induisent la maturation finale des ovocytes (Popek et al. 1991). La période d'exposition à la mélatonine ayant été longue au cours de ce travail, il est possible que la mélatonine ait pu initier la maturation ovocytaire de nombreux ovules, mais comme Duncan et al (2007) le soutiennent, les doses seraient insuffisantes pour stimuler leur ovulation et ponte. Lomax et al (2017) ont constaté que *K. marmoratus* avait une ponte plus élevée en automne jusqu'au début printemps quoiqu'il ne présente pas une saisonnalité spécifique de ponte (Taylor, 2000), ce qui sous-entendrait que le taux de sécrétion de mélatonine varie durant cette période où la photopériode est courte. Pour impacter la reproduction comme c'est le cas chez les autres espèces, un dosage plus élevé pourrait convenir.

L'évaluation des autres effets biologiques des hormones administrées notamment sur la viabilité des œufs et le développement embryonnaire, montre que les hormones appliquées n'ont pas de conséquences préjudiciables sur les œufs ou le développement embryonnaire même si plusieurs auteurs renseignent que certaines hormones sont susceptibles de déclencher des réactions inattendues qui peuvent éventuellement avoir des effets néfastes chez certains sujets traités (Barnabe et Paris, 1984; Weil et al, 1989, Szabo et al, 2007).

Quant à la fécondation interne des œufs avant leur expulsion dans le milieu extérieur, les résultats obtenus dans cette étude montrent que le traitement aux hormones exogènes ne constituent pas un facteur pouvant déclencher la production des œufs non fécondés. Des facteurs génétiques et environnementaux pourraient être à la base de la stimulation de la ponte des œufs non fécondés (Lomax et al., 2017).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a posé les premières bases dans les recherches sur l'induction hormonale de la ponte chez le poisson hermaphrodite à autofécondation *Kryptolebias marmoratus* en utilisant deux types d'hormones administrées suivant deux modes différents. Elle a mis en évidence que les traitements hormonaux appliqués n'ont pas eu d'effets sur la fécondité ni sur la fécondation interne des œufs. Par ailleurs, la viabilité et le développement des embryons n'ont pas été affectés. Les résultats sur la ponte pourront être améliorés par d'autres prospections qui doivent s'orienter dans la perspective de déterminer par des biopsies ovariennes la maturation ovocytaire (ovogenèse) et des dosages de la concentration plasmiques en stéroïdes durant la période expérimentales chez cette espèce. De plus, des études qui portent sur le développement ou l'adaptation aux conditions environnementales de cette espèce pourront permettre l'amélioration du contrôle de la ponte chez cette espèce.

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, DC, SS Koenig, et WP Davis. 1987. « Immersion in the mangrove forest fish, *Rivulus marmoratus*: a unique response to hydrogen sulfide. » *Environ Biol Fishes* 18:67-72.
- Adawiyah L, Laksmi S, Türker B, Darmawan S. 2019. Induction of spermiation using Ovaprim™ with topical gill method in the silver rasbora (*Rasbora argyrotaenia*)
- Agulleiro M., Victoria D, Cañavate J, Gonzalo M.R , Constantinos C. et Cerd J, 2006. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist.
- Ali AIT ALI, Azeddine ABREHOUCHE et Kamal CHEBBAKI, 2012. Induction des premières pontes et élevage larvaire chez le maigre commun *Argyrosomus regius*, Asso 1801 à M'diq (Maroc). *Bulletin de l'Institut Scientifique*, Rabat, section Sciences de la Vie, 2012, n°34 (1), p. 23-28.
- Asamanja C., Bhattacharyya S., Dipanjan B., et Kumar M. 2005. Melatonin accelerates maturation inducing hormone (MIH): induced oocyte maturation in carps. *General and Comparative Endocrinology* 140 (2005) 145–155.
- Barnabe, G. and Barnabe-Quet, R., 1985. Advancement and improvement of induced spawning in the sea-bass *Dicentrarchus Labrax* (L.) using an LHRH analogue injection. *Aquaculture*, 49: 125-132.
- Barnabe, G. et Paris, J., 1984. Ponte avancée et ponte normale du Loup *Dicentrarchus labrax* (L.) à la Station de Biologie Marine et Lagunaire de SBte. Dans: G. Barnabe et R. Billard (Editeurs). Actes du Colloque l'Aquaculture du Bar et des Sparides. INRA,
- Battaglione SC. et Selosse PM., 1996. Hormone-induced ovulation and spawning of captive and wild broodfish of the catadromous Australian bass, *Macquaria novemaculeata* (Steindachner). (*percichthyidae*). *Aqua. Res.* 27, 191-204.
- Besseau, L., Benyassi, A., Møller, M., Coon, SL, Weller, JL, Boeuf, G., Klein, DC , Falcón, J., 2006. voie Mélatonine: briser la règle « haute à nuit » à Trou trétine. *Exp. Rés.* 82, 620-627.
- Billard R., Bry C. et Gillet C., 1980. Stress, environnement and reproduction in teleost fish. In : *Stress and fish*. Ed.Ad. Pickering, Acad.Press.London, N.Y. 185-208.
- Billard R., Fostier A., Weil C. et Breton B., 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39, 65-79.
- Bobé J., Fostier A., Guiguen Y., Lareyre JC. Et Le Gac F. 2014. La reproduction des poissons. Coordination éditoriale de Marie Saint-Dizier et Sylvie Chastant-Maillard. isbn : 9782759222087.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleosts fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C, 219–245.
- Breton, B., Maise, G. et Lemenn, E., 1983. Contrôle photopériodique de la saison de reproduction en salmoniculture : une expérience pilote en Bretagne. *Bull. Fr. Piscic.* 35–45. <https://doi.org/10.1051/kmae:1983013>

- Bromage, N.R., Porter, M.J.R. et Randall, C.F., 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin, *Aquaculture*, 197, 63.
- Camacho, M., Kotani, T., Sakakura, Y. et Hagiwara, A., 2008. Effects of feeding copepod and *Artemia* on early growth and behaviour of the self-fertilizing fish, *Rivulus marmoratus*, under laboratory conditions. *Aquaculture* 281, 100–105.
- Carneiro, P.C.F Mikos, J.D., 2008. Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. *Acta Sci. Anim. Sci.* 30, 345–350.
- Carnevali O, Gioacchini G, Maradonna F, Olivotto I et Migliarini B 2011. Melatonin induces follicle maturation in *Danio rerio*. *PLoS ONE* 6 e19978. (doi:10.1371/journal.pone.0019978) Center, Publication 421, Stoneville, Mississippi
- Chaube R, Singh R.K. et Joy K.P., 2014. Effects of ovaprim, a commercial spawning inducer, on vasotocin and steroid hormone profiles in the catfish *Heteropneustes fossilis*: In vivo and in vitro studies. *General and Comparative Endocrinology* 195, 190–200.
- Conover D.O., 1992. Seasonality and the scheduling of life history at different latitudes. *J. Fish Biol.*, 41, Suppl. B, 161-178.
- Cooper, C.A., Wilson, J.M. et Wright, P.A., 2013. Marine, freshwater and aerially acclimated mangrove rivulus (*Kryptolebias marmoratus*) use different strategies for cutaneous ammonia excretion. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 304, R599–R612.
- Costa, W.J.E.M., Lima, S.M.Q. et Bartolette, R., 2010. Androdioecy in *Kryptolebias* killifish and the evolution of self-fertilizing hermaphroditism: ANDRODIOECY IN KRYPTOLEBIAS KILLIFISH. *Biological Journal of the Linnean Society* 99, 344–349.
- Crim, L. W., and B. D. Glebe. 1990. Reproduction. Pages 529–553 in C. B. Schreck and P. B. Moyle, editors. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Cyr D.G. et Esles J.G., 1988. The influence of thyroidal status on ovarian function in rainbow
- Davis, W. P., Taylor, D. S., et Turner, B. J., 1995. Does the autecology of the mangrove rivulus fish (*Rivulus marmoratus*) reflect a paradigm for mangrove ecosystem sensitivity? *Bulletin of Marine Science* 57(1):208-214.
- Dcvauchelle N. et D. Coves, 1988. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reproduction in captivity : gametogenesis and spawning. *Aquat. Liring Resour.*, 1, 215-222.
- Dhawan, A. and K. Kaur, 2004. Comparative efficacy of ovaprim and ovatide in carp breeding. *Indian J. Fish.*, 51: 227-228.
- Ducarme C. & Micha J.-C., 2003, Techniques de production intensive du poisson-chat africain, *Clarias gariepinus*. *Tropicultura*, 21, 4, 189-198

- Earley, R.L., Hanninen, A.F., Fuller, A., Garcia, M.J., Lee, E.A. (2012). Phenotypic plasticity and integration in the mangrove rivulus (*Kryptolebias marmoratus*): a prospectus. *Integrative and Comparative Biology*. 52(6), 814–827.
- Epier P. et Biemias K., 1983. Role of triiodothyronine and some gonadotopic and steroid hormones on the maturation of carp (*Cyprinus carpio* L.) oocyte in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 23, 1011-1017.
- Falcón J., Besseau L., Sauzet S., Fuentès M. et Bœuf G., 2007. Mélatonine et régulations neuroendocrines chez le poisson. Société de biologie de Paris. *Journal de la Société de Biologie*, 201 (1), 21-29.
- Farmer, J.L. et Orlando, E.F, 2012. Creating females? Developmental effects of 17 α ethynylestradiol on the mangrove rivulus' ovotestis. *Integrative and Comparative Biology*. 52, 769–780.
- Fellous, A., Labeid-Veydert, T., Locrel, M., Voisin, A.S., Earley, R.L., Silvestre, F. (2018). DNA methylation in adults and during development of the self-fertilizing mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. *Ecology and Evolution*. 8(12), 6016–6033.
- Ferrer, J., Wingert, J.M. et Malabarba, L.R., 2014. Description of a new species and phylogenetic analysis of the subtribe Cynopoecilina, including continuous characters without discretization (Cyprinodontiformes: Rivulidae): Phylogenetic Analysis of Cynopoecilina. *Zool J Linn Soc* 172, 846–866.
- Fontana A., 1969. Etude de la maturité sexuelle des *sardfelles sardinella* eba (val) et *Sardinella aurita* c. et v. de la région de pointe-noire. Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Océanogr., vol. VII, no 2,
- Francesco LombardoA, Elisabetta GiorginiA, Giorgia GioacchiniA, Francesca MaradonnaA, Paolo FerrarisA and Oliana Carnevali, 2012. Melatonin effects on *Fundulus heteroclitus* reproduction. *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 794–803
- Frick N.T. et P.A. Wright. 2002. Nitrogen excretion in the mangrove killifish *Rivulus marmoratus*. I. The influence of environmental salinity and external ammonia. *J Exp Biol* 205: 79–89.
- Gardes L., Villanove P., Buchet V. et Fauvel C., 1999. L'induction hormonale de la ponte à l'aide de la LH-RH chez l'ombrine, *Sciaenops ocellatus* : mise en évidence des conditions optimales pour la production d'œufs et de larves de qualité. Direction des Ressources Vivantes Laboratoire Ressources Aquacoles - Station de la Martinique, 52p.
- Harrington Jr, R. W. 1961. Oviparous hermaphroditic fish with internal self-fertilization. *Science* 134, 1749–1750.
- Harvey BJ et Haor WS, 1980. Reproduction provoquée chez les poissons : théorie et pratique. Ottawa, Ont., IDRC, 1980. 48 p.
- Jalabert B, Bry C, Szöllösi D et A. Fostier A, 1977. Etude comparée de l'action des hormones hypophysaires et stéroïdes sur la maturation in vitro des ovocytes de la truite et du Carassin (poissons téléostéens). Laboratoire de Physiologie des Poissons, I. N. R. A., 16p.

Jalabert B. et Fostier A., 1984. The modulatory effect in vitro of oestradiol-17 β , testosterone or cortisol on the output of 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone by rainbow trout ovarian follicles stimulated by the maturational gonadotropins-GtH. *Reprod Nut. Dev.* 24, 127-136.

Jeffrey e. Hilton d. Baldwin james f. f. Powell craig a. watson. 2008. Preliminary Observations of Topical Gill Application of Reproductive Hormones for Induced Spawning of a Tropical Ornamental Fish. *North American Journal of Aquaculture* 67:7-9,

Jobling M., 1995. *Environmental biology of Fishes*. Fish and Fisheries Series, 16, Chapman and Hall, 455 p.

Johnson, E., Weinersmith, K. et Earley, R., 2015. Changes in reproductive physiology of mangrove rivulus *Kryptolebias marmoratus* following exposure to environmentally relevant doses of ethinyl oestradiol. *Journal of fish biology* 88.

Kanamori, A., Yamamura, A., Koshiba, S., Lee, J.-S., Orlando, E.F. et Hori, H., 2006. Methyltestosterone efficiently induces male development in the self-fertilizing hermaphrodite fish, *Kryptolebias marmoratus*. *genesis* 44, 495-503.

Kime D.O, 1993. Classical and non classical reproductive steroids in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 3,160-180.

Koenig, CC et MP Chasar. 1984. Utilité du poisson marin hermaphrodite, *Rivulus marmoratus*, dans les tests de cancérogénicité. *Natl. Cancer Inst. Monogr* . 65: 15-33.

Kristensen, I. 1970. « Competition in three cyprinodont fish species in the Netherlands Antilles. » *Stud Fauna Curacao Carib Isl* 119:82-101.

Lam, T. J., 1985. Induced spawning in fish. Reprint from *Reproduction and Culture of Milk fish*. Lee, C.S. ; Liao, I.C. Editors, Oceanic Institute, Hawaii and Tungkang Marine Laboratory, Taiwan, 14-56

Lee, J. S., S. Raisuddin, et D. Schlenk. 2008. « *Kryptolebias Marmoratus* (Poey, 1880): A 35 Potential Model Species for Molecular Carcinogenesis and Ecotoxicogenomics ». *Journal of Fish Biology* 72(8):1871-89.

Legendre M et Jalabert B., 1988. *Physiologie de la reproduction. Biologie et écologie des poissons d'eau douce africains*, 216, Editions de l'Orstom , Travaux et Documents de l'ORSTOM, 2-7099- 0929-4. hal-02858454.

Lescat L, 2016. Caractérisation moléculaire des ADN méthyltransférases chez le rivulus des mangroves *Kryptolebias marmoratus* et étude du rôle fonctionnel de la méthylation de l'ADN. Mémoire de fin d'études.

Lin HC et Dunson Washington. 1995. Une explication de la grande diversité de souches d'un poisson hermaphrodite autofertile, *Écologie*, vol. 76 593-605.

Lomax, J.L., et al., Factors affecting egg production in the selfing mangrove rivulus (*Kryptolebias marmoratus*). *Zoology* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.zool.2017.02.004>

- Mackiewicz, M., Tatarenkov, A. et Turner, B.J., Avise, J.C., 2006. A mixed-mating strategy in a hermaphroditic vertebrate. *Proc. R. Soc. B.* 273, 2449–2452.
- Mahammed Moniruzzaman, Kazi Nurul Hasan and Saumen Kumar Maitra, 2016. Melatonin actions on ovaprim (synthetic GnRH and domperidone)-induced oocyte maturation in carp
- Maitra K, Asamanja C. et Sharmistha B., 2006. Implication of melatonin in oocyte maturation in Indian major carp *Catla catla*. *Fish Physiol Biochem* (2005) 31:201–207
- Mann R. H., Mills C. A. & Crisp D. T. 1984. — Geographical variation in the life-history tactics of some species of freshwater fish. In : Potts G. W. & Wootton R. J. (eds), *Fish Reproduction : Strategies and Tactics*. Academic Press, London : 171-186.
- Marson K, Taylor S et Earley R., 2019. Cryptic Male Phenotypes in the Mangrove Rivulus Fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Biol Bull.* 236(1):13-28. doi: 10.1086/700697.
- Meddur A, Bouderda K. Loucif N. Remili A. et Khatal Y., 2005 Experimentations sur la reproduction artificielle de Sander lucioperca, Hypophthalmichthys molitrix et Aristichthys nobilis en Algérie. *Sciences & Technologie C – N° 23, Juin (2005)*, pp 63 – 71.
- Migaud H., 2002. Influence des variations de la température et de la photopériode sur le cycle de reproduction et la qualité des pontes de la perche commune *Perca fluviatilis*. Thèse de doctorat, Ecole doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement.
- Mohamed N D.*, M.S. AZAZA et M.M. KRAÏEM, 2010. Etude de la reproduction du Tilapia du nil *Oreochromis niloticus* (L.) en captivité dans les eaux géothermales du sud tunisien. *Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô*, Vol. 37,
- Moore, G.L., Sucar, S., Newsome, J.M., Ard, M.E., Bernhardt, L., Bland, M.J., Ring, B.C. (2012). Establishing Developmental Genetics in a Self-fertilizing Fish (*Kryptolebias marmoratus*). *Integrative and Comparative Biology.* 52(6), 781–791.
- Mourabit, Sulayman, Mathew Edenbrow, Darren P. Croft, et Tetsuhiro Kudoh. 2011. « Embryonic development of the self-fertilizing mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus* ». *Developmental Dynamics* 240(7):1694-1704
- Muruganankumar R., Prathibha Y., Balasubramanian S., Rajakumar A. et Kagawa H., 2017. In vivo induction of human chorionic gonadotropin by osmotic pump advances sexual maturation during pre-spawning phase in adult catfish. *General and Comparative Endocrinology* 255 74–84.
- Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock, 2010. management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocrinol*;165:516e34
- Ong K., D. Stevens et P.A. Wright. 2007. Gill morphology of the mangrove killifish (*Kryptolebias marmoratus*) is plastic and changes in response to terrestrial air exposure. *J Exp Biol* 210:1109–1115.

- Park, C.-B., Kim, Y. et Soyano, K., 2017. Effects of increasing temperature due to aquatic climate change on the self-fertility and the sexual development of the hermaphrodite fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Environmental Science and Pollution Research* 24.
- Park, C.-B., Soyano, K., Fantaye, S., Kitamura, T., Minamiyama, M. et Suzuki Y., 2013. Transient effects of methyltestosterone injection on different reproductive parameters of the hermaphrodite fish *Kryptolebias marmoratus*. *Ecotoxicology (London, England)* 22.
- Pavlidis, M., Keravec, L., Greenwood, L., Mourot, B., et Scott, A.P., 2001. Reproductive performance of common dentex, *Dentex dentex*, broodstock held under different photoperiod and constant temperature conditions, *Fish Physiol Biochem*, 25, 171.
- Popek, W., Luszczyk-Trojnar, E., Drag-Kozak, E., Rzasca, J., Epler, P., 2006. Effet de mélatonine sur la sécrétion de dopamine dans l'hypothalamus des femelles matures communes carpe, *Cyprinus carpio* L. *Acta Ichthyol. Piscat.* 36, 135-141. <https://doi.org/10.3750/aip2006.36.2.07>
- Porter, MJR, Duncan, NJ, Michell, D., Bromage, NR, 1999. L'utilisation de la cage lighting pour réduire la mélatonine plasmatique chez le saumon atlantique (*Salmo salar*) et ses effets sur the inhibition du grillage. *Aquaculture* 176, 237-244
- Priyadarshi H, Rekha D, Atom AS, Bhai P. et Kumar P. , 2020. Hormone manipulation to overcome a major barrier in male catfish spawning: The role of oxytocin augmentation in inducing voluntary captive spawning. DOI: 10.1111/are.14869
- Ricard, J.M. 1981. Développement des techniques de contrôle de la reproduction de la carpe commune en éclosion. Synthèse et analyse bibliographique, Mise en place d'une production d'alevins dans une éclosion en Camargue. Mémoire d'études, juin 1981, CEMAGREF, Montpellier, 149p.
- Ritchie, S.A., and W.P. Davis. 1986. Evidence for Embryonic Diapause in *Rivulus marmoratus*: Laboratory and Field Observations. *J. Am. Kill. Assoc.* 19(1): 103-08.
- Rottmann, R. W., J. V. Shireman, and F. A. Chapman. 1991. Introduction to hormone-induced spawning of fish. U.S. Department of Agriculture, Southern Regional Aquaculture
- Sakakura, Yoshitaka, Kiyoshi Soyano, David L. G. Noakes, et Atsushi Hagiwara. 2006. « Gonadal morphology in the self-fertilizing mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus* ». *Ichthyological Research* 53(4):427-30.
- Scott A.P., Canario A.V.M. et Prat F., 1990. Radioimmunoassay of ovarian steroids in plasma of ovulating females sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 85,91-100.
- Scott D.B.C., 1979. Environmental timing and the control of reproduction in teleost fish. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 44, 105-132..
- Scott, A., 1990. Environmental control of spawning time in salmonids. In: *Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences* (A. D. Munro, A. P. Scott and T. Lam, ed.s). pp. 33-51. CRC Press, Inc. pp. 33–51.

- Souza F, Ferreira M, Filho RA, Janessa SA, Barbosa P., Danilo PSD, Mauricio LB, et Aparecido P. 2018. Ovopel and carp pituitary extract for induction of reproduction in *Collossoma macropomum* females (CUVIER, 1818). S0378-4320(18)30247-1.
- Sullivan C.V., Bernard M.G., Hara A. et Dickhoff W.W., 1989. Thyroid hormone in trout reproduction: enhancement of GnRH α and partially purified salmon GtH-induced ovarian maturation in vivo and in vitro. *J. Exp. Zool.* 250, 188-195.
- Sumpter J.P., 1990. General concepts of seasonal reproduction. In: Munro A.D., Scott A.P. and Lany T.J. (Eds). *Reproductive Seasonality in Teleosts : Environmental influences*. Boea Raton, FL: CRO. Press, pp. 13-21.
- Swanson P., 1991. Salmon gonadotropins: reconciling old and new idea. In: Scott A.P., Sumpter J., Kime D., Roffe M. (Eds). *Proceedings of IV International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Fish Symp. 91, Sheffield, pp. 2-7.
- Szabo, T., F. Radics, T. Barth and L. Horvath, 2007. *In vivo* activity of native GnRHs and their analogues on ovulation in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquacult. Res.*, 38: 140-146.
- Takahash T et i, Ogiwar K, 2021. Rôles de la mélatonine dans l'ovaire téléostéen : un examen de la situation actuelle
- Tatarenkov, A., Lima, S.M.Q., Earley, R.L., Berbel-Filho, W.M., Vermeulen, F.B.M., Taylor, D.S., Marson, K., Turner, B.J. et Avise, J.C., 2017. Deep and concordant subdivisions in the self-fertilizing mangrove killifishes (Kryptolebias) revealed by nuclear and mtDNA markers. *Biological Journal of the Linnean Society* 122, 558–578.
- Taylor D.S., 2000. Biologie et écologie de *Rivulus marmoratus* : nouvelles perspectives et revue, *Fla Sci*, vol. 63, 242-55.
- Taylor DS, Davis WP et Tourneur BJ, 1995. *Rivulus marmoratus* : écologie des modèles de distribution en Floride et dans la lagune centrale de l'Indian River, *Bull Mar Sci*, vol. 57 (p. 202-7).
- Taylor DS, 1999. Examen du statut de *Rivulus marmoratus* : examen d'inscription en vertu de la loi sur les espèces en voie de disparition, Rapport final pour le NMFS. Service national des pêches maritimes, Saint-Pétersbourg, Floride
- Tiwana G.S. et Raman S, 2012. An Economically Viable Approach for Induced Breeding of *Labeo Rohita* by Ovatide, Ovaprim And Carp Pituitary Extract. ISSN : 2319-2380 Volume 1, Issue 1 (Sep.-Oct. 2012), PP 30-32
- Trudeau, V., 1995. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*, *Rev Reprod*, 2, 55.
- Turner BJ, Fisher MT, Taylor DS, Davis WP et Jarrett BL, (2006). Evolution of 'maleness' and outcrossing in a population of the self-fertilizing killifish, *Kryptolebias marmoratus*. *Evolutionary Ecology Research*, 8, 1475–1486

- Vermeirssen E.L.M. et Scott A.P., 2001. Male priming pheromone in present in bile, as well as urine, of female rainbow trout. 1. Fish Biol. 58, 1039-1045.
- Weil, C.; Fostier, A. and Billard, R. 1986. Induced spawning (ovulation and spermatation) in carp and related species. in Aquaculture of cyprinids. Billard, R. et Marcel, J. Editeurs, INRA, Paris, 119-137.
- Weil, C.; Fostier, A. and Billard, R. 1986 – Induced spawning (ovulation and spermatation) in carp and related species. in Aquaculture of cyprinids. Billard, R. et Marcel, J. Editeurs, INRA, Paris, (1986), 119-137
- Yanong P.E, Martinez C and Craig A., 2012. Use of Ovaprim in Ornamental Fish Aquaculture.
- Yaron Z., 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. Aquacult. 129,49-73.
- Zohar, Y., 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: basic and applied considerations, in Reproduction in Fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics, Zohar, Y., and Breton, B., Eds., INRA Press, Paris, 47.
- Zohar, Y., Mylona et C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197, 99–136.

ANNEXES

Fécondité absolue

MELATONINE

Traitement	Parents	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	
M0	EPP20-26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	
	EPP20-36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	0	
	EPP21-72	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	EPP20-5	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	EPP20-14	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	EPP21-72	5	6	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3
	EPP21-61	1	0	0	1	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	EPP21-39	0	2	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	EPP20-23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	EPP21-64	2	0	0	0	1	0		0	2	0	1	0	0	0	0
	Total	8	8	3	3	1	6	3	2	4	0	2	2	5	7	
M1	EPP21-40	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	
	EPP21-36	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	5	0	0	
	EPP20-17	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	2	0	0	
	EPP21-26	0	0	0	0	0	1	3	0	2	0	0	0	0	0	
	EPP21-86	3	1	1	0	3	0	2	0	0	0	0	5	1	0	
	EPP21-53	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	
	EPP20-20	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
	EPP20-37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	EPP20-18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	EPP19-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Total	5	1	2	0	3	4	10	3	2	2	1	12	3	0	
M2	EPP19-12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	
	EPP21-77	8	1	3	4	0	9	2	0	6	0	5	0	0	3	
	EPP20-39	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	EPP20-42	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
	EPP21-5	0	5	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2	5	
	EPP20-52	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
	EPP20-24	4	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	
	EPP20-22	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
	EPP20-41	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
	EPP21-71	2	1	1	0	0	0	1	1	6	2	0	0	1	0	
	Total	14	7	7	6	1	10	8	4	12	6	5	1	3	9	

OVAPRIM					
Traitement	Parents	Poids parents	J0+6	J0+12	J0+24
P0	EPP20-54	0,92	0	0	0
	EPP20-51	0,73	0	0	0
	EPP21-77b	0,3	0	0	4
	EPP20-34	0,69	0	0	0
	EPP21-78	0,31	0	0	0
	EPP21-28	0,49	0	2	0
	EPP21-13	0,48	0	1	0
	EPP20-31	0,73	0	0	0
	EPP21-50	0,46	0	0	0
	EPP19-14	0,73	0	0	2
	Total		0	3	6
P1	EPP20-49	1,01	0	0	0
	EPP19-10	0,78	0	0	0
	EPP21-63	0,52	0	0	0
	EPP19-11	0,68	0	0	0
	EPP21-27	0,51	0	0	0
	EPP20-9	0,59	0	1	1
	EPP21-79	0,27	0	0	0
	EPP20-13	0,67		0	0
	EPP20-10	0,62	2	0	0
	EPP19-4	0,69		0	0
	Total		2	1	1
P2	EPP20-33	0,87	1	0	0
	EPP20-6	0,79	0	0	0
	EPP20-48	0,58	0	0	0
	EPP19-2	0,73	0	0	0
	EPP21-68	0,46	0	0	0
	EPP20-44	0,66	0	1	0
	EPP21-33	0,41	0	0	0
	EPP21-42	0,45	0	0	2
	EPP20-43	0,79	0	0	0
	EPP19-3	0,7	0	0	1
	Total		1	1	3

Poids, viabilité et stades de développement

OVAPRI
M

Traitement	N°Œuf	Parent	Stade à la ponte	Heures post-féc	Poids (mg)	Viabilité à la ponte	Viabilité à J1	Viabilité à J14
P0	234	EPP21-77b	6	6,5	2,6	V	V	V
	235	EPP21-77b	17	36	2,9	V	V	V
	236	EPP21-77b	7	8	2,5	V	V	V
	237	EPP21-77b	15	31	2,5	V	V	V
	238	EPP19-14	6	6,5	3,8	V	V	V
	239	EPP19-14	6	6,5	2,5	V	V	V
	227	EPP21-28	D	D	0	D	0	0
	228	EPP21-28	D	D	2,9	D	0	0
	229	EPP21-13	D	D	3,3	D	0	0
P1	224	EPP20-9	9	10,5	3,3	V	V	V
	225	EPP20-9	17	36	3,2	V	V	V
	222	EPP20-10	8	9,5	3,7	V	V	V
	223	EPP20-10	6	6,5	2,6	V	V	V
P2	226	EPP20-44	15	31	3,3	V	V	V
	221	EPP19-3	15	31	3,2	V	V	V
	231	EPP21-42	5	5,5	2,9	V	V	V
	232	EPP21-42	15	31	2,7	V	V	V
	233	EPP19-3	6	6,5	3	V	V	V