



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Régulation de la stéroïdogénèse lors de la maturation gonadique chez la perche *Perca fluviatilis*

Hubermont, Pierre

Award date:
2005

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**REGULATION DE LA STEROIDOGENESE LORS DE LA MATURATION GONADIQUE CHEZ LA
PERCHE *PERCA FLUVIATILIS***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Pierre HUBERMONT
Août 2005

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Régulation de la stéroïdogénèse lors de la maturation gonadique chez la perche *Perca fluviatilis*

HUBERMONT Pierre

Résumé

Une filière de production de perche en monoculture intensive offre de larges perspectives de diversification pour l'aquaculture continentale européenne. Toutefois, si un élevage sous des conditions constantes de température et de photopériode permet une croissance normale des poissons, la maturation ovocytaire n'aboutit pas. Dans le but de contribuer à une meilleure compréhension des processus d'inhibition de la gonadogenèse chez les poissons non vernalisés, nous avons procédé à deux approches expérimentales à partir de deux groupes de poissons, l'un en maturation et l'autre maintenu en conditions contrôlées (12L:12O et 20-22°C). Une approche *in vivo*, tout d'abord, a permis l'identification du stade critique de développement ovocytaire. Nos résultats montrent que les poissons en conditions constantes de température et photopériode n'atteignent pas le stade de vitellogenèse exogène à cause d'une faible capacité de stéroïdogénèse. Néanmoins la capacité potentielle de stéroïdogénèse ne semble pas altérée car l'activité aromatasase n'est pas inhibée et de plus une stimulation gonadotrope induit une production de stéroïde comparable à celles des poissons en conditions naturelles au mois de mars. Ces derniers résultats indiquent que l'efficacité de cette action stimulante augmente tout au long de la période de reproduction. Une seconde approche, *in vitro* cette fois, a permis de comparer les capacités de réponse en terme de stéroïdogénèse, en présence de différents traitements hormonaux (hCG et IGF-I). Différentes doses ont été testées, ainsi que la combinaison des deux hormones. Les résultats de cette étude *in vitro* confirment la capacité potentielle des ovaires des poissons en conditions constantes de répondre positivement à une stimulation gonadotrope, les réponses étant comparables aux ovaires des poissons en conditions naturelles. Les résultats les meilleurs semblent être obtenus par le facteur de croissance IGF-I, et cela aux deux doses étudiées.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Août 2005

Promoteur : P. Kestemont

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements au promoteur de ce mémoire, Monsieur P. Kestemont, ainsi qu'à Monsieur R. Mandiki, directeur du mémoire, pour m'avoir accueilli dans leur unité et permis de mener ce travail à terme.

Je remercie également les membres du jury, Mesdames Rougeot et Leclerc-Smekens, ainsi que Messieurs Trausch et Piront, pour la lecture de ce travail. Si ils ont des questions, je suis là pour y répondre...

Je remercie Martine ainsi que Daniel et Raphaël pour leur aide précieuse apportée en laboratoire.

Merci également à tous ceux qui m'ont aidé un coup de main pour ce mémoire. Je pense notamment à Emilie, Sylvain et à quelques torrificateurs passionnés.

J'adresse également mes pensées à mes petits camarades de classe, pour leur bonne humeur, et parfois leur patience. Par ordre d'apparition : Célinette, Jess, les deux Laurences, Amandine, Aurélie, Benja,... Et, si ils ne sont pas dans la liste des favoris de par leur statut (...) : Thibaut et Pez

Comme il commence à se faire tard, je vais penser à mes derniers remerciements, qui sont en fait les premiers. Je les réserve à mes parents qui m'ont permis d'arriver où j'en suis. Pour leur confiance et bien d'autres choses, je les remercie chaleureusement.

Table des matières

Introduction	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 1: Synthèse bibliographique	Erreur ! Signet non défini.
1. Contrôle de la gamétogenèse chez les poissons	Erreur ! Signet non défini.
1.1 Stratégies de reproduction chez les poissons	Erreur ! Signet non défini.
1.2 Déterminisme de la reproduction	Erreur ! Signet non défini.
1.3 Particularités de la gamétogenèse chez les poissons	Erreur ! Signet non défini.
2. Induction de la stéroïdogenèse chez les poissons	Erreur ! Signet non défini.
2.1 Intervention des facteurs environnementaux	Erreur ! Signet non défini.
2.2 Différentes stratégies d'induction hormonale	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 2: Matériels et méthodes	Erreur ! Signet non défini.
1. Problématique et objectifs	Erreur ! Signet non défini.
2. Matériel biologique	Erreur ! Signet non défini.
2.1 Conditionnement des poissons	Erreur ! Signet non défini.
2.2 Prélèvements	Erreur ! Signet non défini.
2.3 Culture in vitro de tissus ovariens	Erreur ! Signet non défini.
3. Paramètres étudiés	Erreur ! Signet non défini.
3.1 Indice morpho-anatomique	Erreur ! Signet non défini.
3.2 Dosage de l'activité aromatasase	Erreur ! Signet non défini.
3.3 Dosages radio-immunologiques	Erreur ! Signet non défini.
3.4 Histologie	Erreur ! Signet non défini.
4. Analyse statistique	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 3: Présentation des résultats	Erreur ! Signet non défini.
1. Comparaison des processus de gonadogenèse in vivo	Erreur ! Signet non défini.
1.1 L'indice gonadosomatique (IGS)	Erreur ! Signet non défini.
1.2 La maturation gonadique	Erreur ! Signet non défini.
2. Comparaison de la stéroïdogenèse in vivo	Erreur ! Signet non défini.
2.1 La testostérone	Erreur ! Signet non défini.
2.2 L'oestradiol	Erreur ! Signet non défini.
2.3 La 11-kétotestostérone	Erreur ! Signet non défini.
2.4 L'activité aromatasase	Erreur ! Signet non défini.
3. Comparaison des capacités de stéroïdogenèse in vitro	Erreur ! Signet non défini.
3.1 Production de testostérone	Erreur ! Signet non défini.
3.2 Production d'oestradiol	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 4: Discussion des résultats	Erreur ! Signet non défini.
1. Comparaison in vivo des processus de gonadogenèse	Erreur ! Signet non défini.
2. Comparaison des capacités de stéroïdogenèse	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 5: Conclusions et perspectives	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 6: Références bibliographiques	Erreur ! Signet non défini.

Table des figures

Figure 1 : Induction en deux étapes de la maturation ovocytaire par une gonadotropine maturationnelle (selon Patino et al., 2000).....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 2 : Synthèse des effets d'IGF-I sur l'induction de la maturation.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 3 : Evolution de l'indice gonadosomatique.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 4 : Proportions des différents stades ovocytaires en janvier	Erreur ! Signet non défini.
Figure 5 : Proportions des différents stades ovocytaires en mars ...	Erreur ! Signet non défini.
Figure 6 : Evolution des diamètres ovocytaires entre janvier et mars	Erreur ! Signet non défini.
Figure 7 : Evolution des niveaux de testostérone dans le plasma. ...	Erreur ! Signet non défini.
Figure 8 : Evolution des niveaux de 17 β -oestradiol dans le plasma.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 9 : Evolution des niveaux de 11-kétotestostérone dans le plasma. ...	Erreur ! Signet non défini.
Figure 10 : Evolution de l'activité aromatasé	Erreur ! Signet non défini.
Figure 11 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture sans hormones exogènes.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 12 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture additionné de hCG 25UI/ml.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 13 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture additionné de hCG 50UI/ml.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 14 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture additionné de IGF-I 50nM.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 15 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture additionné de IGF-I 100nM.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 16 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture additionné de IGF-I 50nM et hCG 25UI/ml.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 17 : Relargage de 17 β -oestradiol dans un milieu de culture sans hormones exogènes.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 18 : Relargage de 17 β -oestradiol dans un milieu de culture additionné de hCG 25UI/ml.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 19 : Relargage de 17 β -oestradiol dans un milieu de culture additionné de hCG 50UI/ml.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 20 : Relargage de 17 β -oestradiol dans un milieu de culture additionné de IGF-I 50nM.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 21 : Relargage de 17 β -oestradiol dans un milieu de culture additionné de IGF-I 100nM.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 22 : Relargage de 17 β -oestradiol dans un milieu de culture additionné de IGF-I 50nM et hCG 25UI/ml.	Erreur ! Signet non défini.

Introduction

La perche commune, *Perca fluviatilis*, est un des poissons d'eau douce les plus appréciés par les consommateurs Européens. L'approvisionnement provient dans une large mesure d'une activité halieutique dans les milieux dulcicoles. Toutefois cette production du milieu naturelle montre une diminution de l'effort de pêche. Une filière de production de perche en monoculture intensive offre donc de larges perspectives de diversification pour l'aquaculture continentale européenne. Toutefois, l'obtention d'une perculture rentable n'est pas encore acquise à l'heure actuelle. Un élevage sous des conditions constantes de température et de photopériode permet une croissance normale des poissons mais, le processus de maturation ovocytaire est sujet à inhibition. L'entrée dans un cycle de reproduction nécessite une diminution de la température et de la photopériode, et la connaissance précise de l'importance relative de ces deux facteurs environnementaux semble nécessaire afin d'obtenir un cycle de reproduction hors-saison. L'application chez la perche de programmes photo-thermopériodiques condensés ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants, la qualité de la maturation étant affectée. Une meilleure compréhension de ces mécanismes d'inhibition, notamment l'identification du stade ovocytaire critique, permettrait l'amélioration des techniques d'élevage.

Des protocoles d'induction hormonale ont été établis pour permettre la synchronisation des dates de ponte en période de reproduction naturelle ou hors saison chez d'autres espèces de poissons, mais une telle induction de reproduction n'a pas encore été proposée chez la perche commune. Ce mémoire envisage la possibilité de recourir à une stimulation hormonale exogène (hCG) afin de déterminer la capacité de stéroïdogénèse chez les poissons non matures en conditions constantes de température. Une approche *in vitro* est également proposée afin de comparer les capacités de réponse des différents tissus à différentes stimulations hormonales (hCG et IGF-I).

Ce mémoire présente d'abord une synthèse bibliographique destinée à faire le point des connaissances autour de la problématique choisie. Une partie « matériels et méthodes » présente les moyens développés pour tenter de répondre à cette problématique. Les résultats sont ensuite présentés puis discutés. Une conclusion permet enfin de tirer les enseignements de ce mémoire et de définir différents cadres de recherches ultérieures.

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

1. Contrôle de la gamétogenèse chez les poissons

1.1 Stratégies de reproduction chez les poissons

La reproduction chez les téléostéens est un phénomène cyclique, tout comme les conditions environnementales qui la contrôlent. Les poissons développent des stratégies de reproduction qui leur sont favorables. On peut classer les poissons en trois catégories, selon la période où se produit une activité gamétogénique intense (Malservisi et Magnin, 1968). Ainsi, la gamétogenèse s'active soit lorsque la durée de la photophase et la température augmentent, soit lorsqu'elles diminuent, soit en été et en automne. Le mode de développement de l'ovaire se décline selon trois types: synchrone, groupe-synchrone, asynchrone (Wallace et Selman, 1981). Un développement de type synchrone signifie que tous les ovocytes, une fois formés, se développent et sont libérés en même temps. En présence d'un type groupe-synchrone, au moins deux populations ovocytaires sont présentes. Tandis que tous les stades du développement ovocytaire sont présents chez le type asynchrone. Les poissons isochrones (« total spawners ») et les poissons hétérochrones (« multiple spawners ») représentent deux modes distincts d'ovogenèse et de ponte (Hunter et al., 1985). Les fréquences de pontes sont également très diverses (Rincharde et al., 1998). On distingue notamment les pondeurs uniques et multiples. Des pontes continues sont possibles ; à l'inverse certains poissons pondent que tous les 2 à 3 ans.

1.2 Déterminisme de la reproduction

1.2.1 Généralités

L'axe cerveau-glande pituitaire-gonade contrôle la reproduction chez les femelles et chez les mâles. Les stimuli environnementaux sont traduits en signaux nerveux et les neurones situés dans le centre de l'hypothalamus contrôlent les sécrétions hormonales de l'axe hypophyse-gonade.

1.2.2 Facteurs hormonaux

Chez les téléostéens, deux gonadotropines hypophysaires (GtHs) exercent un contrôle général sur les fonctions ovariennes. La GtH I - ou FSH - stimule la stéroïdogénèse et l'incorporation de la vitellogénine dans les ovocytes. La GtH II - ou LH - altère la stéroïdogénèse afin de provoquer la maturation finale des ovocytes (Bieniarz et Epler, 1992).

La synthèse et la libération des gonadotropines sont placées sous le contrôle de différents facteurs: GnRHs (Gonadotropin releasing hormones), GRIF (gonadotropin releasing-inhibiting factor, dopamine), hormone de croissance, neuropeptide (NPY), acide gamma-aminobutyrique (GABA) et mélatonine. Les ions calcium jouent le rôle d'un médiateur intracellulaire dans la libération de GtH.

Les stéroïdes agissent sur les tissus cibles dans le cadre de diverses actions nécessaires au bon déroulement de la reproduction (Cyr et Eales, 1996). Les stéroïdes en C19 et C18,

respectivement les androgènes et les oestrogènes, sont produits par l'ovaire au cours de la vitellogenèse (Scott et Canario, 1987). Cette production fait place à une synthèse préférentielle des stéroïdes en C21, les progestagènes, pendant la phase de maturation finale. Le 17 β -oestradiol, produit par aromatisation de la testostérone, stimule la production de vitellogénine, une lipoglycophosphoprotéine, par le foie (Scott et al., 1998). Chez le mâle, c'est un autre androgène, la 11-kétotestostérone (11KT), qui est actif durant la spermatogénèse. Le MIH (maturation-inducing hormone) interagit avec les récepteurs membranaires des ovocytes, induisant une cascade d'événements cytosoliques, incluant la formation du MPF (maturation promoting factor), lequel initie la rupture de la vésicule germinale (GVBD, germinal vesicle breakdown). La 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α ,20 β -P) et la 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β -S) sont deux progestagènes.

1.2.3 Influence de la photopériode et de la température

Les variations saisonnières de la photopériode sont les principales responsables du déclenchement et de la synchronisation de la reproduction chez la majorité des poissons. C'est le cas des Salmonidés, des Esocidés, et de plusieurs familles de Perciformes marins. Chez les Salmoniformes, une photophase longue ou croissante est nécessaire pour les premiers stades, tandis que la maturation ovocytaire et de l'ovulation nécessitent une photophase décroissante ou courte (Henderson, 1963; Whitehead et Bromage, 1980; Bromage et al., 1984). La température n'exerce pour sa part qu'une influence mineure. Indépendamment du régime photopériodique, chez la truite arc-en-ciel, le pic de sécrétion hypophysaire de GTH intervient plus rapidement chez des poissons stockés à 13°C que chez des poissons maintenus à 8°C (Billard et Breton, 1977).

Si les processus reproducteurs chez les Cyprinidés ou les Percidés sont influencés par la température ou les précipitations, la photopériode a vraisemblablement son importance (Scott, 1979). La température est le seul facteur ayant un effet direct sur les cellules gonadiques, par son action sur le système enzymatique. Chez les cyprinidés, le développement ovarien et l'ovulation sont modulés par les variations de la température de l'eau et de la photopériode, même si la température de l'eau joue un rôle prédominant sur l'ensemble du cycle de reproduction (Peter et Yu, 1997). L'importance des variations de la photopériode chez la perche commune est démontrée (Migaud et al., 2004).

1.2.4 Autres facteurs environnementaux

Outre la photopériode et la température, d'autres facteurs se montrent également importants dans le contrôle de la reproduction. Les précipitations, l'approvisionnement en nourriture, les phéromones et la présence du partenaire sexuel, la densité, la disponibilité en substrat et la hauteur d'eau en sont des exemples (Bromage et al., 2001).

1.3 Particularités de la gamétogénèse chez les poissons

1.3.1 Chez les femelles

D'une façon générale, l'ovogénèse chez les téléostéens se compose de six étapes principales menant à la formation d'oeufs, puis suit une période de régénération de l'ovaire. Lors de la croissance primaire de l'ovocyte, les ovogonies deviennent des ovocytes protoplasmiques suite aux divisions mitotiques. La vitellogenèse, ou phase de croissance des

ovocytes, est le processus d'accumulation d'un élément nutritionnel, le vitellus. Les alvéoles corticaux et globules lipidiques se forment au cours de la vitellogenèse endogène.

L'incorporation par micropinocytose de vitellogénine, qui sera scindée en phosvitine et lipovitelline, dans les globules vitellins constitue la vitellogenèse exogène. La maturation ovocytaire finale comprend la migration de la vésicule germinative en périphérie de l'ovocyte, la dissociation de l'enveloppe nucléaire et une hydratation chez de nombreuses espèces (Selman et Wallace, 1989). Les ovocytes qui se trouvaient arrêtés en prophase I reprennent la méiose jusqu'en métaphase II, après élimination du premier globule polaire. Le micropyle est l'orifice au niveau du chorion qui est ouvert chez l'ovocyte mature ovulé. Il facilite la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovule après la ponte. Des phénomènes d'atrésie donnent des follicules atrétiques préovulatoire et postovulatoire.

1.3.2 Chez les mâles

Les cellules de Sertoli forment des cystes spermatogéniques et spermiogéniques, qui contiennent des spermatogonies de type A, des cellules uniques. Les spermatogonies de type B, plus petites, sont obtenues après division mitotique. Dès la première division méiotique, il y a formation des spermatocytes primaires, puis secondaires. La division méiotique secondaire produit les spermatides qui se transforment en spermatozoïdes.

1.3.3 Particularités chez les percidés

La baisse de la température de l'eau (26,4 à 14,1°C) et de la photopériode voit la mise en place du processus d'ovogenèse, en septembre (Sulistyo et al., 1998). Les ovocytes présentent un développement de type groupe-synchrone (Marza, 1938) jusqu'à la ponte, unique, vers la mi-avril (14-15°C). Une période de vernalisation d'environ 160 jours à moins de 10°C est nécessaire. La ponte s'étend sur une période allant de quinze jours à un mois et demi. Les oeufs sont agglutinés en rubans spiralés, transparents et gélatineux. La fécondité absolue et/ou la fécondité relative sont très variables (Craig, 1987). Les spermatozoïdes sont viables probablement moins de deux minutes après leur libération. Des études récentes ont décrit le cycle de reproduction de la perche et l'évolution des taux plasmatiques des principaux stéroïdes (Sulistyo et al., 1998, 2000; Migaud et al., 2003; Fontaine et al., 2003).

2. Induction de la stéroïdogénèse chez les poissons

2.1 Intervention des facteurs environnementaux

Les travaux de Hoover et Hubard (1937) chez l'omble de fontaine, *Salvelinus fontinalis*, sont les premiers à montrer que le contrôle photopériodique de la date de ponte est possible chez les Salmonidés. Il l'est également chez certains poissons marins comme le bar, *Dicentrarchus labrax* (Girin et Devauchelle, 1978). D'autres poissons, en particulier les Cyprinidés, sont peu sensibles aux variations de la durée du jour (Billard et Breton, 1985).

Une combinaison de photophases constantes longues et courtes, ou des photophases de substitution peuvent remplacer efficacement les variations saisonnières de la photophase. Cela a été réalisé chez les perciformes comme le tambour rouge, *Sciaenops ocellatus*, et d'autres espèces de Sciaenidés (Arnol, 1988; Mc Carty et al., 1990; Thomas et Holt, 1995), le bar (Mananos et al., 1997); les Cypriniformes comme le barbeau, *Barbus barbus*, le chevaine, *Leuciscus cephalus*, et la tanche, *Tinca tinca* (Poncin, 1984; Poncin et al., 1987; Poncin, 1989); et les Salmoniformes comme la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* (Whitehead et Bromage, 1980; Bromage et al., 1984), le saumon masu, *Oncorhynchus masou* (Takashima et Yamada, 1984), le saumon Atlantique, *Salmo salar* (Taranger et al., 1991, 1998, 1999; Duncan et al., 1999), le saumon de fontaine, *Salvelinus fontinalis* (Henderson, 1963), et la truite commune, *Salmo trutta* (Bromage et al., 1990). Bromage et al. (2001) montre que le nombre de photopériodes constantes à appliquer dépend du temps nécessaire pour l'initiation de la gonadogenèse, pour la maturation et la ponte.

Un petit cyprinidé, *Gasterosteus maculeatus*, répond positivement à une seule photophase constante (16L:8O) (Borg et al., 1986). Chez la tanche et le chevaine, la reproduction se maintient sous photopériode constante longue (15,5L:7,5O); chez le barbeau, sous photopériode constante courte (10L:14O). Ces régimes retardent la ponte mais il n'y a pas d'inhibition (Bromage et al., 2001). Un régime de photophases constantes courtes (9L/15D) sur un an, entrecoupé d'un régime de photophases constantes longues (15L/9D) pendant un ou deux mois, permet une maturation accélérée chez le bar (Mananos et al., 1997). Selon que le programme est appliqué en début ou fin d'année, la ponte est avancée de 3 ou 1 mois, respectivement.

Les processus mis en oeuvre lors de la gamétogenèse sont compressés par rapport aux poissons contrôlés. Enfin, l'évolution des niveaux de vitellogénine est corrélée aux niveaux de 17 β -oestradiol, à la croissance ovocytaire et au moment de la ponte. Une photophase constante longue (18L:6O) de janvier à mai suivie brutalement d'une photophase constante courte (6L:18O) permet une ponte avec trois à quatre mois d'avance sur les poissons témoins chez la truite arc en ciel (Whitehead et Bromage, 1980; Bromage et al., 1984), l'eau étant à température constante ou non (Davies et Bromage, 1991), mais ne dépassant pas 13°C. Duston et Bromage (1987) montrent chez la truite arc-en-ciel que le moment auquel est appliquée la photophase longue est déterminant pour l'avancement de la ponte. Des jours courts constants pendant l'année ou les sept ou huit premiers mois, ou des jours longs constants après le solstice d'été retardent la ponte chez plusieurs Salmoniformes (Henderson, 1963; Whitehead et Bromage, 1980; Bromage et al., 1990, 1993; Gillet et al., 1998; Taranger et al., 1998; Kissil et al., 2000). Chez la truite arc-en-ciel, Breton et al. (1983) applique un régime photopériodique ne conservant que la photopériode annuelle décroissante, ce qui permet d'obtenir une ponte printanière succédant à une ponte estivale. La durée d'un jour long ne vaut que par comparaison avec celle d'un jour court. C'est la succession d'une période de

jours longs (12 à 22h) et d'une période de jours courts (3,5 à 13,5h) qui est essentielle (Bromage et al., 1993).

Billard (1985) propose d'autres stratégies qui permettent de précipiter le commencement de la vitellogenèse chez les Salmonidés. Une photopériode naturelle contractée en 6 ou 9 mois avance la sécrétion de GTH et la présence de vitellogénine dans le plasma chez la truite arc-en-ciel. La fécondité ainsi que le diamètre ovocytaire diminuent, tandis que la fertilité reste inchangée. Chez le saumon argenté, *Oncorhynchus kisutch*, la vitellogenèse et la ponte sont avancés de 3 mois, mais la qualité des oeufs est réduite. De même, un avancement du régime photopériodique réduit de 16L:8O à 8L:16O en 6 mois produit des effets similaires, avec une fécondité et une fertilité normale, chez la truite arc-en-ciel et la truite commune.

Un cycle thermo-photopériodique condensé est appliqué chez plusieurs espèces de poissons. Chez la perchaude, il comprend une période de refroidissement de deux mois (20 à 7°C, de 14 à 10L), une période de maintien au froid d'un mois (7°C à 10L), et une période de réchauffement de 3 mois (7 à 13°C, de 10 à 15L). Un tel cycle autorise un déclenchement précoce de la gonadogenèse et de la gamétogenèse, par rapport à des poissons contrôles, chez la perchaude, *Perca flavescens* (Dabrowski et al., 1996; Ciereszko et al., 1997), le bar blanc, *Morone chrysops* (Kohler et al., 1994), le bar d'Amérique, *Morone saxatilis* (Blythe et al., 1994; Craig et al., 1997), le doré jaune, *Stizostedion vitreum* (Malison et al., 1998), la daurade royale, *Sparus aurata* (Devauchelle, 1984; Kissil et al., 2000). Toutefois, chez la perchaude, l'efficacité d'un cycle condensé n'est pas réelle pour induire la ponte hors-saison (Ciereszko et al., 1997). En y soumettant les poissons au mois d'août, ils ne pondent pas en janvier mais seulement au mois de mars, l'eau étant maintenue à 13°C. Les femelles témoins, quant à elles, sont injectées au mois d'avril. Un régime thermique modifié chez la perchaude entraîne un retard du développement des gonades et de la taille des ovocytes et l'ovulation n'est pas spontanée (Dabrowski et al., 1996). En mimant les conditions environnementales naturelles, Kolkovski et Dabrowski (1998) ont obtenu des pontes hors-saison chez cette espèce. Dabrowski et al. (2002) soumettent deux groupes de perchaude à un régime thermo-photopériodique naturel ou condensé en fin août. Un régime thermo-photopériodique condensé diminue la production *in vitro* de 17 β -oestradiol durant la vitellogenèse; en postvitellogenèse, la production de testostérone est augmentée.

Kayes et Calbert (1979) montre que la photopériode n'intervient guère dans la dernière phase du cycle de reproduction chez la perchaude. Les individus sont capturés au mois de février (2,5°C) et la ponte s'effectue au mois d'avril, comme en milieu naturel, après élévation de la température (9-13°C). Ces observations sont indépendantes du régime photopériodique auquel les poissons sont soumis.

Le black-bass à grande bouche, *Micropterus salmoides*, maintenu à 5°C pendant cinq mois, puis progressivement soumis à une température de 20°C en sept jours, pond 15 jours plus tard (Carlson, 1973).

Chez la perche commune, les variations de la température et de la photopériode jouent un rôle dans le succès de la reproduction. Ces deux paramètres environnementaux agissent vraisemblablement en interaction. Une connaissance parfaite de l'importance relative des différents facteurs environnementaux durant les principales étapes du cycle de reproduction est donc nécessaire afin de maîtriser la reproduction hors-saison et ainsi l'élevage intensif chez cette espèce. Chez la perchaude et la perche commune, en présence d'une photopériode constante, une diminution de la température de l'eau initie la gonadogenèse chez quelques

poissons (Dabrowski et al., 1994, 1996; Ciereszko et al., 1997; Migaud et al., 2002). La température est le facteur déterminant chez la perche commune (Bromage et al., 2001). Toutefois, son influence montre des limites sous photopériode constante (12L:12O) (Migaud et al. 2001, 2002). Suite à un programme comportant un refroidissement sur six semaines (22 à 6°C), un maintien au froid pendant cinq mois (6°C), et un réchauffement sur 1 mois (6 à 14°C), une forte hétérogénéité dans la réponse des géniteurs est observée: 31% des femelles se sont engagées dans un cycle de reproduction et 21% de celles-ci ont pondu. Migaud et al. (2001) ont montré qu'une vernalisation de cinq mois permettait d'obtenir un IGS comparable à celui observé en conditions naturelles, là où une période de trois mois n'est pas efficace (Sulistyo et al., 1997). Migaud et al. (2003) ont ensuite montré que la période de vernalisation optimum ne serait pas de cinq mois mais se situerait plutôt entre trois et cinq mois. De même un réchauffement rapide sur un mois est préférable à deux mois. Un meilleur taux de gonadogenèse arrivant à terme (33-38% contre 7-8%) et de ponte (31-33% contre 0%) sont observés (Migaud et al., 2003).

L'importance des variations de la photopériode dans le contrôle de la reproduction hors-saison chez la perche commune a été démontrée sous température ambiante (Migaud et al. 2003, 2004). En présence d'une photophase continue, les niveaux plasmatiques de testostérone et de 17 β -oestradiol sont très faibles en comparaison avec ceux relevés chez des poissons soumis à une photophase naturelle. Une photophase constante (16L:8O) induit une forte hétérogénéité dans la réponse des géniteurs, en terme de stéroïdes circulants et de développement gonadal, avec 54% des femelles maturant, toutefois avec un léger retard en comparaison aux poissons en conditions naturelles. La ponte est déclarée chez 30% des femelles. Une photopériode naturelle donne des résultats similaires à ceux observés en milieu nature. Une photophase naturelle simulée est également étudiée. Sous des conditions d'éclairage artificiel, les géniteurs réalisent une gonadogenèse normale, mais avec un léger retard de développement, et seul 55% des femelles maturant pondent. Chez la perche commune, seuls les effets de photopériodes constantes ont été testés (Migaud et al., 2002). Aucune donnée n'existe sur les effets d'un remplacement subit d'une photopériode constante longue par une photopériode constante courte.

2.2 Différentes stratégies d'induction hormonale

2.2.1 Les GnRHs (gonadotropin-releasing hormones) et leurs agonistes

Nombre de poissons présentent une série de dysfonctionnements des processus reproducteurs lors du maintien en captivité. Souvent, la maturation ovocytaire ne se produit pas à cause d'une déficience en gonadotropine II, GtHII (Zohar, 1989). Toutefois, l'hypophyse est toujours capable de synthétiser et de libérer des gonadotropines endogènes suite à un traitement approprié (Zohar et Mylonas, 2001). Consécutivement à des études réalisées chez des mammifères, Breton et Weil (1973) observent que des extraits hypothalamiques permettent une libération subite de GtH chez des femelles de carpes matures, *Cyprinus carpio carpio*. Toutefois, ce pic de GtH est trop faible et fugace pour induire la maturation ovocytaire (Zohar, 1988). L'induction de la maturation ovocytaire par les GnRHs est à mettre en relation avec une élévation des taux plasmatiques de gonadotropine supérieure à une durée de 24 heures, et avec une diminution de la production d'oestradiol (Van der Kraak et al., 1984).

Les GnRHs ont été synthétisées pour résister à la dégradation enzymatique à laquelle les formes natives sont soumises chez les poissons injectés. Ainsi, chez le carassin doré, *Carassius auratus*, ces agonistes superactifs ont une activité biologique supérieure à celle des GnRH natives, en terme de libération de GtH par l'hypophyse *in vitro* et *in vivo* (Peter et al., 1987) et d'affinité de liaison avec les récepteurs hypophysaires (Habibi et al. 1987). Ainsi, les doses efficaces de GnRH et de GnRH_a pour induire la maturation ovocytaire sont respectivement de 1 à 15 mg kg⁻¹ et de 1 à 100 µg kg⁻¹ (Donaldson et Hunter, 1983; Zohar, 1989). Van der Kraak et al. (1983) montrent que l'analogue LH-RH_a Dala6 a une activité biologique au moins 50 fois supérieure à celle de LH-RH chez le saumon coho, *Oncorhynchus kisutch*. Les GnRH_a présentent divers avantages par rapport aux gonadotropines (Zohar et Mylonas, 2001): pas de réponse immunitaire à long terme ni de transmission de maladies, un court-circuitage de la rupture endocrinienne, une plus grande ubiquité, et enfin une stimulation plus équilibrée par leur action directe ou non sur la libération d'autres facteurs nécessaires au bon déroulement de la maturation et de la ponte.

Chez un grand nombre de perciformes, le cerveau renferme trois formes de GnRHs: sGnRH, cGnRH II, et sbGnRH. Une administration combinée d'agonistes des sbGnRH et cGnRHII devraient pouvoir permettre une stimulation plus efficace (Zohar et Mylonas, 2001), le premier étant le plus apte à induire la maturation ovocytaire chez la daurade, *Sparus aurata*, et d'autres perciformes, le deuxième étant le plus puissant libérateur de LH.

Malgré une activité biologique supérieure des analogues, une injection unique ne permet pas une montée de LH suffisante pour induire une maturation ovocytaire complète. Ainsi, deux injections sont nécessaires chez la perchaude (Dabrowski et al., 1994), et la plupart des salmonidés (Donaldson et Hunter, 1983; Mylonas et al., 1992). Chez certaines espèces ou sous certaines conditions, deux injections ne sont toutefois pas encore suffisantes (Zohar et Mylonas, 2001). Ainsi, chez les femelles du bar d'Amérique, *Morone saxatilis*, présentant des ovocytes en post-vitellogenèse, deux injections permettent une élévation des taux plasmatiques de LH, de 17β-oestradiol et de testostérone, mais pas de 20β-S (17,20β,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one), et bien que 60% des femelles initient la maturation ovocytaire, aucun ovocyte n'atteint le stade de rupture de la vésicule germinative (GVBD, germinal vesicle breakdown).

Les systèmes de délivrance à long terme de GnRHa sont utilisés pour le contrôle de la maturation chez certaines espèces comme bar d'Amérique (Zohar et Mylonas, 2001). Ces polymères implantés intramusculairement permettent une diffusion de l'hormone sur une période de plusieurs jours ou plusieurs semaines. Ils ont démontré leur efficacité en induisant la maturation ovocytaire finale et l'ovulation chez la daurade (Zohar et al., 1995), chez le saumon chinook, *Oncorhynchus tshawytscha*, et le saumon atlantique (Mylonas et al., 1993; Zohar, 1996). Chez les Cyprinidés principalement (Peter et al., 1993), des antagonistes de la dopamine ont souvent été utilisés en combinaison avec la GnRHa.

Chez le saumon coho, Afonso et al. (1999) ont remarqué que le fadrozole, un inhibiteur de l'activité aromatasase, empêche la formation de 17β -oestradiol dans l'ovaire et permet l'augmentation de $17\alpha,20\beta$ -P ($17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one) nécessaire à l'induction de la maturation ovocytaire et de l'ovulation. Les niveaux de 17β -oestradiol, de $17\alpha,20\beta$ -P et de testostérone sont mesurés avant et 32 jours après injection de fadrozole sur des poissons en vitellogenèse. Six heures après injection, les taux de 17β -oestradiol diminuent significativement, ceux de $17\alpha,20\beta$ -P quant à eux augmentent. Plus grande est la dose injectée, plus longtemps les effets sont maintenus. Après 48 heures, les taux de testostérone sont significativement plus hauts. Ayant été démontré que des injections multiples retardent le développement ovocytaire, il serait intéressant, comme le suggère Zohar et Mylonas (2001), de mener d'autres recherches dans cette direction.

En plus de leur action au niveau de l'hypophyse, les GnRHs exercent un contrôle local sur les fonctions ovariennes. Une étude *in vitro* menée par Pati et Habibi (1999) montrent que les sGnRH et cGnRH-II présents chez le carassin doré, ainsi que différents variants, induisent par eux-mêmes le stade GVBD, indépendamment de la stéroïdogenèse. Aucun n'a d'effet sur la production basale de testostérone, sauf un variant, le lGnRH-III. Dans cette même étude, Pati et Habibi montrent pour la première fois des différences dans l'activité de divers GnRHs, en terme de reprise de la méiose et de stéroïdogenèse. En présence de GtH, seuls les sGnRH et lGnRH-III inhibent la reprise de la méiose et la stéroïdogenèse induite par stimulation gonadotrope. Les auteurs suggèrent également l'implication possible de plusieurs voies médiant les effets stimulateurs et inhibiteurs de sGnRH et lGnRH-III dans les ovaires de poissons rouges. Habibi et al. (1988) avaient déjà démontré les effets inhibiteurs d'un analogue ([D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9-NHET]-GnRH; tGnRH-A) sur la reprise de la méiose induite par la GtH et des progestagènes méiogéniques, d'une manière dépendante de la concentration. Ils ont également observé l'effet inhibiteur de cet analogue sur la production de testostérone, et dans une certaine mesure de DHP, induite par stimulation gonadotrope (Habibi et al., 1989), et ce durant les 8 premières heures d'incubation, aucun effet significatif n'étant relevé durant la période 8-48h. Leur hypothèse est que cette action inhibitrice sur la reprise de la méiose s'explique en partie par l'impact de ce même analogue sur le processus de stéroïdogenèse. Il est possible que celui-ci augmente l'activité de la 20α -HSD (20α -hydroxy-steroid dehydrogenase), comme cela a été observé chez le rat. A partir du HP dont la production n'est pas affectée, c'est la production d'un autre stéroïde, le $17\alpha, 20\alpha$ - dihydroxyprogesterone, qui serait favorisée, réduisant ainsi la production de testostérone et de $17\alpha,20\beta$ -P. La présence de ce métabolite a été rapportée chez la limande, *Limanda limanda*, et la plie, *Pleuronectes platessa*. La reprise de la méiose sous stimulation gonadotrope et progestagène est augmentée par la présence de testostérone ($1\mu\text{g/ml}$) *in vitro*. La même observation en présence de testostérone seule a été faite chez le carassin doré, et ce d'une manière dépendante de la concentration. Jalabert et Fostier (1984) ont remarqué que la testostérone stimule la synthèse de $17\alpha,20\beta$ -P dans des ovocytes de truite arc-en-ciel.

2.2.2 Utilisation des gonadotropines

En injectant des extraits hypophysaires de poissons à des poissons femelles, Houssay (1930) a mis pour la première fois en évidence les propriétés méiogéniques des hormones exogènes.

La gonadotropine maturationnelle régule le processus de maturation ovocytaire en deux étapes. Durant la première étape, les cellules folliculaires acquièrent la capacité de synthétiser le MIH (maturation-inducing hormone) tandis que l'ovocyte se prépare à y répondre, ce dernier événement étant défini comme l'OMC (ovocyte maturational competence) (Patino et al., 2000). Ensuite, le MIH libéré initie la reprise de la méiose. La première étape nécessite une synthèse protéique dépendante d'une transcription préalable. Les nouvelles protéines incriminées dans l'acquisition de l'OMC sont les connexines et les récepteurs au MIH (Patino et al., 2000).

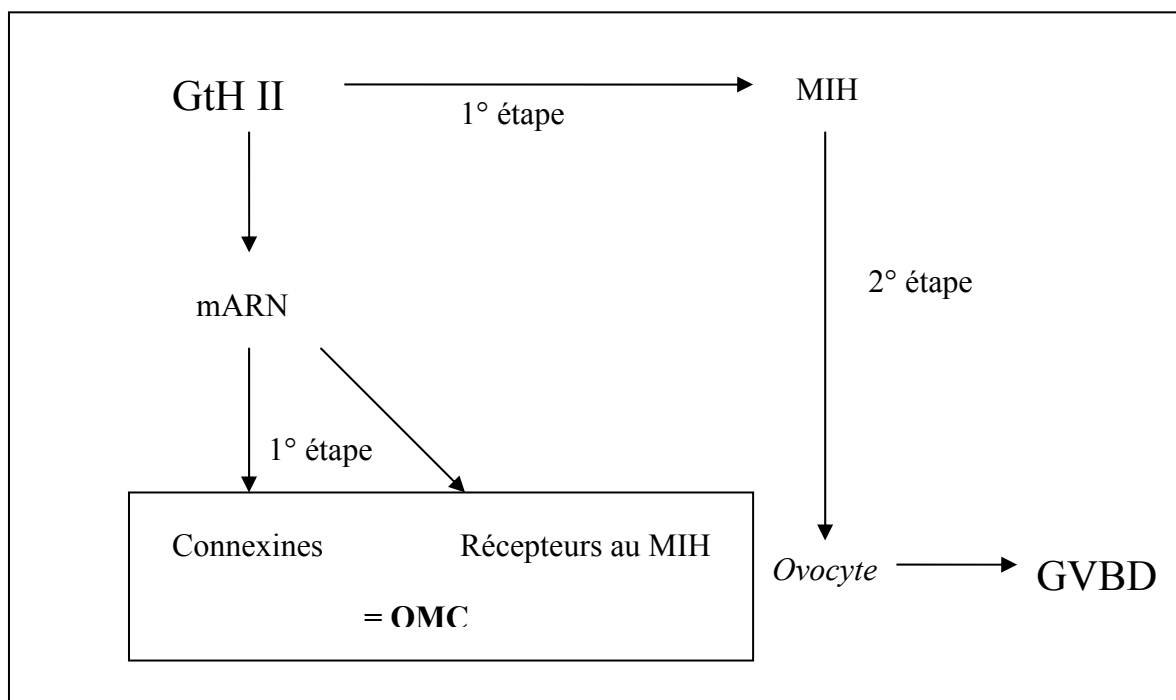


Figure 1 : Induction en deux étapes de la maturation ovocytaire par une gonadotropine maturationnelle (selon Patino et al., 2000).

Les extraits hypophysaires et les gonadotropines purifiées de poissons

L' hypophysation consiste à contrôler la maturation gonadique par injection d'extraits hypophysaires obtenus à partir d'individus sexuellement matures, notamment chez la carpe commune. Développée à partir des années 1930, cette technique est encore utilisée, notamment dans les pays en voie de développement car les hormones purifiées représentent un coût important (Zohar et Mylonas, 2000). Le traitement est standardisé et les doses efficaces établies, à savoir 2 à 10 mg d'extrait hypophysaire par kilo de poisson (Thalathiah et al., 1988).

Toutefois, la teneur en LH grandement variable, la présence d'autres hormones pouvant affecter la physiologie du poisson traité, ainsi que la transmission potentielle de maladies sont autant de désavantages liés à cette technique (Zohar et Mylonas, 2000). La production de LH, partiellement ou totalement purifiée, a donc été envisagée par chromatographie, ainsi que réalisée chez le saumon et la carpe. Etant donné leur spécificité, ces gonadotropines sont utilisées uniquement chez des espèces voisines.

En réponse à l'hypophysation, la stéroïdogenèse est modifiée selon le stade ovocytaire (Levavi-Zermonsky et Yaron, 1986). Elle l'est en faveur d'une production de 17β -oestradiol si les ovocytes présentent leur vésicule germinale en position centrale. Après migration de celle-ci, c'est la synthèse de 17α - 20β -P qui se trouve augmentée, tandis qu'on observe une diminution passagère de 17β -oestradiol.

Fostier et al. (1979) ont montré que des carpes communes injectées à deux reprises avec cGTH présentent une élévation du niveau de 17β -oestradiol. Même si les niveaux de 17β -oestradiol sont bas à la fin de la vitellogenèse, les structures restent sensibles à une stimulation exogène.

Kagawa et al. (2003) ont montré *in vitro* que la LH, et non la FSH, stimule l'activité aromatasase chez la daurade japonaise, *Pagrus major*. Chez les Salmonidés, la FSH et la LH sont presque aussi efficaces *in vitro* pour augmenter la production de 17β -oestradiol (Suzuki et al., 1988).

Chez la carpe commune, des extraits hypophysaires stimulent la synthèse de $17\alpha,20\beta$ -P seulement chez des poissons ayant reçu un premier traitement, un homogénat hypophysaire, *in vivo* (Kime et Bieniarz, 1987). Ce priming permet également la migration de la vésicule germinale (Epler et al. 1987) et la sensibilité au MIH *in vitro* (Jalabert et al., 1977). Des carpes sont sacrifiées trois à 24 heures après avoir reçu un priming (Kime et al., 1987). La proportion d'ovocytes présentant une vésicule germinale périphérique augmente avec le temps après le traitement. Les follicules sont ensuite incubés pendant 24 heures en présence d'homogénat hypophysaire, à une température optimale de 20°C. La dissolution de la vésicule germinale est observée dans 50% des ovocytes incubés 24 heures après priming. Il n'y a pas de différence concernant la production de testostérone et de 17-hydroxyprogestérone entre des poissons ayant reçu ou non un priming (Epler et al., 1987).

Une gonadotropine partiellement purifiée, la SG-G100 (1µg/ml), induit une élévation significative des niveaux de $17\alpha,20\beta$ -P et de progestérone chez le saumon masou, *Oncorhynchus rhodurus*. Les niveaux de 17β -oestradiol, déjà élevés dans le milieu contrôle, voient leur concentration simplement doublée (Young et al., 1982)

Habibi et al. (1989) ont observé chez le carassin doré, les effets d'une stimulation gonadotrope sur la stéroïdogenèse *in vitro*. Durant les 24 premières heures d'incubation des follicules, la cGtH permet une sécrétion de testostérone et de 17α -hydroxyprogesterone plus importante. De même, l'administration d'une dose croissante de cGtH est corrélée à une proportion croissante du stade GVD. Les auteurs n'ont toutefois pas su mettre en évidence de relation dose-réponse en terme de production de $17\alpha,20\beta$ -P. En effet, c'est seulement au cours des 24 heures suivantes qu'on observe des niveaux importants de $17\alpha,20\beta$ -P, ceux de testostérone étant alors faibles. Dès lors, trois hypothèses sont émises:

- bien que non mesurable, la quantité de $17\alpha,20\beta$ -P est efficiente pour réinitier la méiose
- le $17\alpha,20\beta$ -P est rapidement métabolisée en d'autres produits non reconnus
- le $17\alpha,20\beta$ -P n'est pas le MIH.

In vivo, des composés présentant une activité GnRH-like pourraient prévenir la stéroïdogenèse et la maturation dans les oocytes. Ainsi, une préincubation de dix-huit heures, en interrompant *in vitro* l'action de ces facteurs, augmente la production de $17\alpha,20\beta$ -P (Habibi et al., 1989).

La gonadotropine chorionique humaine

L'utilisation de cette gonadotropine, d'une demi-vie assez importante (Ohta et Tanaka, 1997), a débuté à partir des années 1970. Chez les poissons, on procède souvent à une seule injection, entre 100 et 4000 UI par kilogramme (Zohar et Mylonas, 2000). A titre d'exemple, la maturation ovocytaire et l'ovulation ont été obtenues chez le maquereau espagnol, *Scomber japonicus*, en captivité, par une simple injection d'hCG (Shiraishi et al., 2005). Tout comme pour l'administration des GnRHs, différents systèmes permettant la diffusion de cette gonadotropine existent, afin de limiter les manipulations.

Contrairement aux GnRHs qui requièrent l'activation préalable des gonadotropines hypophysaires pour induire la maturation, les gonadotropines exogènes stimulent directement les gonades (Hodson et Sullivan, 1993). De même, elles se montrent plus efficaces que les GnRHs pour stimuler les premiers stades de la gonadogenèse. Chez l'anguille japonaise, *Anguilla japonica*, l'hCG ou la sGtH induisent la gonadogenèse complète en captivité (Ohta et al., 1996). Henry et al. (1998) suggèrent que l'hypophyse doit d'abord être exposée aux stéroïdes ovariens - la testostérone, dans leur étude - avant que la GnRH ne puisse stimuler la synthèse de GtH.

Chez des perchaudes (Dabrowski et al., 2002), *in vitro*, les productions basales de 17β -oestradiol et de testostérone par les tissus ovariens sont les plus élevées en octobre-novembre et avant la ponte, respectivement. L'hCG stimule la sécrétion de 17β -oestradiol durant toute la vitellogenèse (octobre à janvier), et de testostérone surtout en début de vitellogenèse. Avant la ponte, la production de testostérone est également stimulée, ce qui n'est pas le cas pour l'oestradiol. Ceci s'explique par une diminution de l'activité aromatisation et non une insensibilité à l'hCG. L'utilisation de celle-ci n'a jamais été envisagée chez la perche commune.

Chez le tambour brésilien, *Micropogonias undulatus*, l'exposition *in vivo* ou *in vitro* à l'hCG prépare les ovocytes à maturer (Patino et Thomas, 1990; Trant et Thomas, 1988). Un priming préalable permet la synthèse de MIH *in vitro*. Kagawa et al. (1994) montrent qu'une incubation en présence gonadotrope (10 UI/ml) induit la compétence maturationnelle et la dissolution de la vésicule germinale chez la daurade japonaise. Chez le gourami bleu, *Trichogaster trichopterus*, un priming *in vivo* avec cGtH et hCG induit la compétence maturationnelle (Degani et Boker, 1992). L'injection d'hCG augmente la proportion d'ovocytes en vitellogenèse. Quelques dissolutions de la vésicule germinale sont également observées, tandis que l'addition *in vitro* de $17\alpha,20\beta$ -P principalement, et de 17α -hydroxyprogesterone, en augmente significativement la proportion. Un priming *in vivo* par cGtH cause une sensibilité à hCG *in vitro*. Sous stimulation gonadotrope, les ovocytes du bar d'Amérique, subissent la GVBD *in vitro* (King et al., 1994). La production de testostérone et d'oestradiol fait progressivement place à une production significative de DHP, ainsi qu'à une augmentation légère de 20β -S. Les doses adéquates d'hCG pour induire la maturation dans des ovaires complètement développés ont été déterminées *in vivo* chez le tambour rayé, *Micropogonias furnieri*, par Garcia-Alonso et Vizziano (2004). Ces auteurs mettent en évidence des relations temps-réponse et dose-réponse. Des doses de 100 et 300 UI/kg de masse corporelle induisent la maturation après 48 heures de traitement, et une dose de 500 UI/kg de masse corporelle après 72 heures. Toutefois, seule l'administration de 300UI/kg de masse corporelle mime également la dynamique ovarienne naturelle. La maturation est induite par des doses de 100 à 500 UI/kg de masse corporelle chez le Tambour brésilien, et de 100UI/kg de masse corporelle chez l'acoupa pintade, *Cynoscion nebulosus*, (Trant et Thomas, 1989; Patino et Thomas, 1990; Thomas et Trant, 1989). L'hCG n'affecte pas la maturation

ovocytaire chez la carpe (Galas et al., 1999). L'injection d'hCG provoque des changements significatifs de la stéroïdogénèse et stimule la maturation ovocytaire finale chez la limande (Canario et Scott, 1990) et la plie (Scott et Canario, 1990). Chez la limande, les niveaux de $17\alpha,20\beta$ -P, qui est probablement le MIH chez cette espèce, montrent une élévation significative et très variable (entre 1 et 10 ng ml^{-1}). Il y a une diminution des niveaux de 17β -oestradiol dans les 24 heures, tandis qu'il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne la testostérone. La plupart des autres stéroïdes en C21 voient leur taux de sécrétion significativement augmenté.

2.2.3 Intervention des facteurs de croissance

Les “Insulin-like growth factor” (IGFs)

Différents auteurs rapportent l'action stimulante de l'insulin-like growth factor-I sur le processus d'aromatation (Maestro et al., 1997; Behl et Pandey, 1999). La sensibilité des follicules de carpe commune vis-à-vis d'IGF-I, en terme d'activité aromatasase, s'acquiert durant le développement folliculaire *in vivo*, l'oestradiol pouvant induire la réponse *in vitro* (Behl et Pandey, 1999). De même, ces auteurs montrent une régulation différentielle par IGF-I de la synthèse de 17 β -oestradiol et de progestérone *in vitro*. L'IGF-I n'a aucun effet sur la production de progestérone par des follicules larges (> 2mm), tandis que l'accumulation d'oestradiol durant les 48 heures de culture est affectée de manière dépendante de la dose (0,3-100ng/ml).

L'insulin-like growth factor-I stimule *in vitro* l'expression du gène de la P450arom ainsi que l'activité aromatasase chez la daurade japonaise (Kagawa et al., 2003). Il amplifie également ces mêmes effets médiés par stimulation gonadotrope, probablement en favorisant une multiplication des récepteurs à la LH. C'est le seul facteur de croissance effectif à ce niveau. Ces mêmes auteurs ont mis en évidence une régulation différentielle de la stéroïdogénèse par IGF-I dans les cellules de la granulosa et celles de la thèque. Comme l'ont également montré Maestro et al. (1997), la production de testostérone est inhibée, si bien qu'IGF-I n'affecte positivement la production de 17 β -oestradiol qu'en présence de testostérone dans le milieu d'incubation.

Kagawa et al. (1994) ont montré que les IGF-I (10nM) et IGF-II (13nM) peuvent induire la dissolution de la vésicule germinale chez la daurade japonaise *in vitro*. Toutefois, IGF-I s'est montré le plus efficace à cet égard. Ces auteurs proposent deux rôles possibles pour IGF-I dans le processus de maturation ovocytaire (figure 2). Il agit directement au niveau de l'ovocyte par récepteurs membranaires interposés, indépendamment de tout stéroïde sexuel et de la compétence maturationnelle. De plus, il induit cette compétence maturationnelle. Si le 17 α ,20 β -P ne peut induire la maturation ovocytaire seul, il en est capable après une préincubation en présence d'IGF-I. L'hCG (10 UI/ml) est également capable d'induire cette compétence (Patino et Kagawa, 1999). Chez le fondule, *Fondulus heteroclitus*, l'IGF-I induit la dissolution de la vésicule germinale sans affecter stéroïdogénèse et a un rôle plus proximal que le MIH, l'induction étant plus rapide avec le facteur de croissance (Negatu et al., 1998). Patino et Kagawa (1999) ont montré que l'IGF-I (10 nM) stimule l'apparition des jonctions communicantes homologues (entre les cellules de la granulosa) et hétérologues (entre les cellules de la granulosa et l'ovocyte) dans des follicules intacts chez la daurade japonaise. Une augmentation de ces jonctions est associée à l'acquisition de la compétence maturationnelle. York et al. (1993) avaient obtenu des résultats similaires avec l'hCG chez le tambour brésilien. Chez l'Acoupa pintade, l'IGF-I induit la compétence maturationnelle. Toutefois, cette observation est ici à mettre en relation avec la capacité d'IGF-I à multiplier les récepteurs des progestagènes méiotiques (Thomas et Ghosh, 1995). Signalons que la gonadotropine est plus efficace à cet égard. Les actions d'IGF-I diffèrent chez deux espèces du genre *Morone*. Chez le bar blanc, *Morone chrysops*, un recombinant rhIGF-I (100nM) induit *in vitro* la compétence maturationnelle mais pas la dissolution de la vésicule germinale (Weber et Sullivan, 2005). Chez le bar d'Amérique, IGF-I (100nM) et IGF-II déclenchent, indépendamment de la voie stéroïdienne la dissolution de la vésicule germinale, ce qui n'est pas le cas pour la compétence maturationnelle (Weber et Sullivan, 2000). Une efficacité croissante apparente des hormones de la famille de l'insuline (dans l'ordre: insuline, IGF-II,

IGF-I) est généralement observée (Weber et Sullivan, 2000; Kagawa et al., 1994). Maestro et al. (1995) montrent que l'action gonadotrope sur la production de $17\alpha,20\beta$ -P est renforcée par IGF-I chez le saumon coho, probablement par sa liaison aux cellules folliculaires. IGF-I affecte les voies enzymatiques de telle sorte que la production de $17P4$ (17-hydroxy-4-pregnene-3,20-dione) diminue, et que sa conversion en $17,20B$ -P augmente. L'incubation de follicules intacts en présence du recombinant rhIGF-I affecte également la stéroïdogénèse chez le bar d'Amérique (Weber et Sullivan, 2000). On observe une augmentation des concentrations en 17β -oestradiol et 20β -S et une diminution de la concentration en testostérone. Les niveaux 20β -S et de 17β -oestradiol augmentent en réponse au facteur de croissance. Ce sont les dérivés immédiats du $17,20\beta$ -P et de la testostérone, respectivement. Ces derniers voient leur taux réduits ou bien sous le seuil de détection. L'augmentation d'E2 est en relation avec une augmentation de l'activité aromatasase. Toutefois, l'IGF-I a un effet minimal sur la synthèse *in vitro* de 20β -S chez cette espèce. L'augmentation de sa concentration étant à mettre en relation avec une utilisation et un métabolisme faible par des follicules incompetents.

Un rhIGF-I analogue (des(1,3)IGF-I) est plus efficace à induire la stéroïdogénèse que rhIGF-I, suggérant que les protéines de liaison peuvent inhiber les actions d'IGF-I. Les mécanismes intracellulaires par lesquels l'IGF-I induit la dissolution de la vésicule germinale, la compétence maturationnelle, et une stéroïdogénèse dirigée vers la synthèse du MIH ne sont pas très connus (Weber et Sullivan, 2000).

Kagawa et al. (1994) montrent que les gonadotropines, les facteurs de croissance, et les progestagènes méiotiques nécessitent pour leur mise en oeuvre une synthèse protéique, qui est probablement impliquée dans l'activation du MPF. Toutefois, contrairement à ce qui est observé pour les gonadotropines, les processus impliquant les facteurs de croissance ne requièrent pas de transcription (Kagawa et al., 1994; Patino et Kagawa, 1999 ; Weber et Sullivan, 2000). Patino et Kagawa (1999) proposent dès lors qu'IGF-I médie, au moins en partie, la formation des jonctions communicantes induite par stimulation gonadotrope pendant acquisition de la compétence maturationnelle chez la daurade japonaise (figure 2).

Weber et Sullivan (2000) montrent que le processus de réinitiation de la méiose par rhIGF-I est plus précoce mais aussi plus lent, qu'en présence d'une stimulation gonadotrope. Ils avancent plusieurs explications possibles. Toutefois leur étude constitue un modèle précieux concernant les actions précoces de l'insulin-like growth factor-I sur la maturation chez les perciformes.

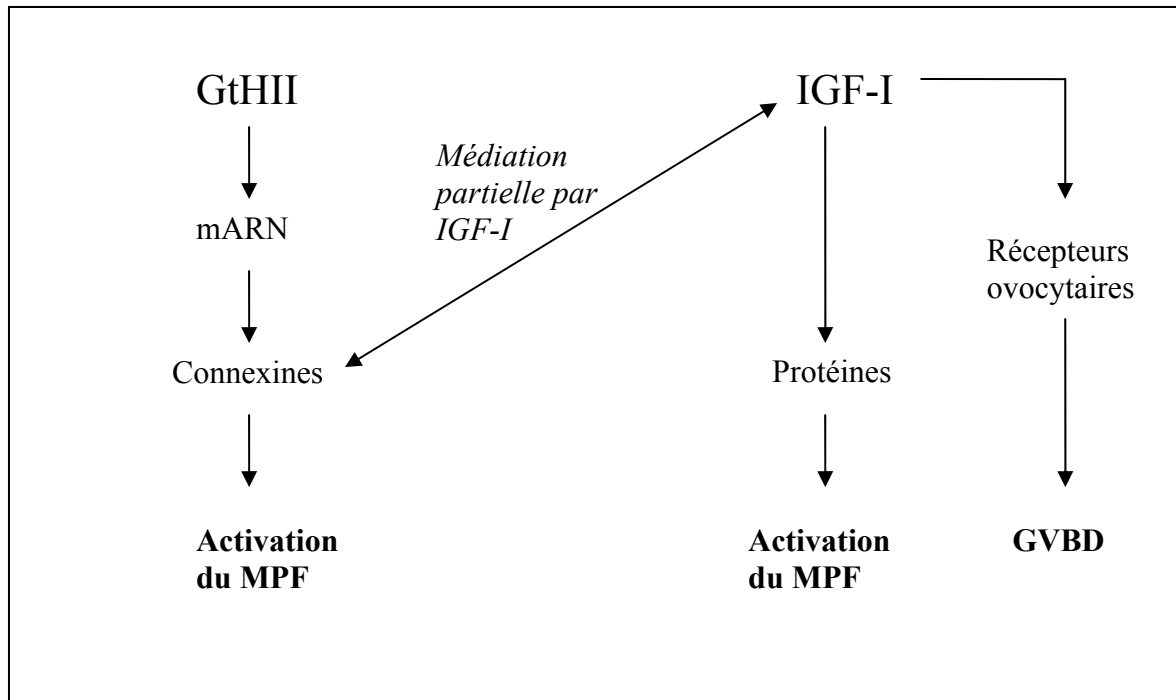


Figure 2 : Synthèse des effets d'IGF-I sur l'induction de la maturation
D'après Kagawa et al. (1994) ; Patino et Kagawa (1999).

L'insuline

Le recours à l'IGF-I en complément d'un traitement destiné à déclencher la maturation ovocytaire n'est pratiquement pas envisageable, d'un point de vue économique. A cet égard, Dasgupta et al. (2001) ont ouvert de nouvelles perspectives en démontrant pour la première fois l'efficacité de l'insuline, seule ou en soutien d'une stimulation gonadotrope, à réinitier la méiose chez la carpe indienne, *Labeo rohita*. L'effet additif de leur combinaison repose sur le fait qu'insuline et gonadotropine ont des voies d'actions différentes, en témoigne une sensibilité différente aux inhibiteurs de la transcription et de la traduction.

Auparavant, seule une étude menée par Kagawa et al. (1994) avait montré que l'insuline (1 μ M) pouvait induire par elle-même la maturation. Un effet minime avait également rapporté par Lessman (1985) chez le carassin doré. Par contre l'insuline augmente significativement l'effet maturationnel du 17 α ,20 β -P chez ces deux espèces, ainsi que chez la carpe indienne (Dasgupta et al., 2001). Srivastava et Van der Kraak (1994) ont montré que l'insuline (4 μ g/ml) ne renforce pas l'action gonadotrope sur la production de testostérone et de 17 β -oestradiol par des ovocytes en vitellogenèse de poisson rouge. Par contre, elle renforce son action sur la production de testostérone lorsque les ovocytes sont en postvitellogenèse, cela de manière dépendante du temps et de la dose (0,4-40 μ g/ml). Ils montrent ainsi que la sensibilité évolue avec le développement folliculaire.

Le mécanisme d'action de l'insuline reste toutefois inconnu (Dasgupta et al., 2001). Les auteurs proposent une action directe sur la membrane ovocytaire ou bien via les couches folliculaires en produisant un médiateur. Le processus nécessite une synthèse protéique mais sans transcription préalable. De plus, une relation dose-réponse a été établie, la quantité optimale étant 6,3 μ M. Le choix de l'insuline ainsi que son dosage dépend de l'espèce (Kagawa et al., 1994; Dasgupta et al., 2001).

Avec des doses inférieures, l'IGF-I se montre toutefois plus efficient que l'insuline à réinitier la méiose chez la carpe indienne. Maestro et al. (1997) incriminent deux classes séparées de récepteurs, ceux à IGF-I étant plus nombreux et d'affinité supérieure.

L'hormone de croissance

Singh et Thomas (2002) montrent, chez l'Acoupa pintade, que bGH (bovine growth hormone) (50ng/ml) stimule *in vitro* la production de testostérone et de E2, d'une manière dépendante de la dose. Un traitement combiné avec hCG montre approximativement une réponse égale à la somme des réponses propres, indiquant probablement que bGH ne renforce pas l'action de la gonadotropine.

L'hormone de croissance stimule l'activité aromatasase, moyennant la synthèse de nouvelles protéines, en plus d'une étape plus précoce dans la voie de synthèse de l'oestradiol.

Chapitre 2: Matériels et méthodes

1. Problématique et objectifs

Chez la perche commune, les processus de maturation gonadique sont stimulés par les variations annuelles de la température et de la photopériode. Une température constante entre 20-23°C est favorable à la croissance, par contre le développement gonadique aboutissant à la maturation ovocytaire n'est pas possible. La maturation gonadique peut être induite artificiellement par la modulation de ces deux facteurs environnementaux que sont la température et la photopériode. Toutefois, la qualité des oeufs produits s'en trouve réduite. La compréhension des mécanismes d'inhibition en conditions de non-vernalisation, et de stimulation par la vernalisation, permettrait une meilleure maîtrise du contrôle de la reproduction hors-saison chez cette espèce.

Deux approches sont envisagées : l'expérimentation *in vivo* et un modèle d'étude *in vitro*. L'expérimentation *in vivo* a pour but de comparer les processus de maturation gonadique chez des géniteurs ayant subi la vernalisation ou soumis à des conditions constantes de température et de photopériode. Afin d'étudier la capacité de stéroïdogenèse des femelles issues des deux groupes, des tissus ovariens ont été prélevés et mis en culture, additionnée de diverses doses de hCG et/ou d'IGF-I. Leur réponse est comparée après stimulation de la stéroïdogenèse par des traitements hormonaux, après 6 heures.

2. Matériel biologique

2.1 Conditionnement des poissons

L'expérimentation est réalisée à partir d'une population de poissons monosexes femelles produite par le CEFRA-ULG à Tihange, qui conduit également les manipulations des conditions d'élevage.

Tandis qu'un groupe de 60 poissons subit la vernalisation (CN = conditions naturelles), un autre groupe de 60 poissons est maintenu depuis fin septembre dans des conditions environnementales constantes (CC = conditions constantes) de température (20-22°C) et de photopériode (12L/12O). Ces poissons sont répartis entre deux bassins d'élevage (B1 et B2) pour chaque traitement.

Deux jours avant chaque prélèvement, cinq poissons du bassin B1 et du bassin B2 sont anesthésiés par du phénoxy-éthanol, et reçoivent ensuite une stimulation hormonale à base d'hCG (100UI/kg), via une injection (I) dans la cavité péritonéale. De ces deux bassins, cinq autres poissons, les témoins (T), sont également prélevés. Ces quatre lots sont alors répartis dans quatre nouveaux bassins.

2.2 Prélèvements

Les dates de prélèvement sont programmées en fin janvier, fin février et fin mars 2005. Après l'assomage des poissons, les prélèvements sanguins sont effectués grâce à des seringues munies d'une aiguille préalablement héparinée. Le sang est stocké dans des tubes eppendorfs placés dans une caisse isotherme garnie de glace. Au laboratoire, ces tubes sont centrifugés (30 min à 4500 rpm et 10°C), et le plasma obtenu est conservé à -20°C dans l'attente des dosages radio-immunologiques. Les poissons sont ensuite pesés, mesurés et disséqués. Le cerveau et l'ovaire sont prélevés et pesés. Le cerveau et un morceau d'ovaire sont placés dans la glace avant d'être conservé à -80°C, dans l'attente du dosage de l'activité aromatasé. Un autre morceau d'ovaire, destiné à la culture *in vitro*, est conservé dans la glace, baignant dans une solution de Cortland modifiée. Un dernier morceau d'ovaire est placé dans du Bouin.

2.3 Culture in vitro de tissus ovariens

Les cultures de tissus ovariens sont réalisées dans des plaques multi-puits de 1 ml. Au laboratoire, chaque tissu ovarien est divisé en six morceaux pesant 200mg chacun. Différents traitements sont comparés:

- T1: 1ml milieu de Cortland modifié, sans hormones
- T2: 1ml milieu de Cortland modifié, additionné de hCG 25UI/ml
- T3: 1ml milieu de Cortland modifié, additionné de hCG 50UI/ml
- T4: 1ml milieu de Cortland modifié, additionné de IGF-I 50nM
- T5: 1ml milieu de Cortland modifié, additionné de IGF-I 100nM
- T6: 1ml milieu de Cortland modifié, additionné de IGF-I 50nM et de hCG 25UI

Le milieu de Cortland modifié (Wolf et Quimby, 1969) est composé de (g/l): 7,25 NaCl; 0,38 KCl; 0,23 CaCl₂.2H₂O; 1,0 NaHCO₃; 0,41 NaH₂PO₄.H₂O; 0,23 MgCl₂.6H₂O; 0,23 MgSO₄.7H₂O; 1 bovine serum albumen; 5,20 Hepes; 0,03 pénicilline; 0,05 streptomycine; pH 7,7

Un test préliminaire a été réalisé afin de déterminer la durée de vie des tissus ovariens dans le milieu de Cortland. Sur base de l'apparition de noyaux pycnotiques, un temps d'incubation de 6 heures a été choisi parmi les temps suivants: 0, 3, 6 et 24 heures. En soutien des observations histologiques, un dosage de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) a été réalisé lors du test préliminaire ainsi que pour chaque date de prélèvement. Les activités sont comparées après 6 heures d'incubation et on a montré qu'elles étaient équivalentes pour le test préliminaire et les trois dates de prélèvement. Une incubation de 6 heures paraît donc judicieuse.

Tps 0	Tps 3	Tps 6	Tps 24
0,028	0,023	0,017925	0,0146375

Tableau 1 : Activité LDH lors du test préliminaire

Culture 1	Culture 2	Culture 3
0,00407	0,00678	0,02011

Tableau 2 : Activité LDH pour les 3 cultures

3. Paramètres étudiés

3.1 Indice morpho-anatomique

Un indice morpho-anatomique a été mesuré chez les perches en expérimentation :

$$\text{- Indice gonadosomatique (IGS, \%)} = [\text{Mg/M}] \times 100$$

Où: M = masse corporelle du poisson (g), Mg = masse des gonades (g)

3.2 Dosage de l'activité aromatase

L'activité aromatase a été estimée uniquement sur le cerveau. Les tissus sont préalablement homogénéisés. Le système d'homogénéisation choisi utilise le couple « potter verre/verre ». Les tissus sont homogénéisés pendant 15 sec à trois reprises sur de la glace. La masse fraîche est diluée dix fois. Les homogénats sont congelés à -80°C jusqu'au dosage.

La réaction d'aromatation se caractérise par la consommation de trois molécules de NADPH et d'oxygène pour chaque molécule d'oestrogène produite. Une molécule d'eau est également libérée. Le substrat est l' androsténédione marquée par le tritium ^3H . En mesurant la radioactivité contenue dans l'eau produite et en exprimant cette dernière par unité de protéines et de temps, une évaluation spécifique de l'activité enzymatique est possible. La première étape consiste en la préparation de solution d'incubation «enzyme-substrat» et en l'incubation pendant 60 min à 30°C , sous une agitation lente. Un essai se caractérise par l'utilisation de quatre tubes eppendorf de 1,5ml: deux T0 (dont le témoin) et deux T60 (dont le témoin). Les témoins ne contiennent pas de NADPH. La réaction est effective dans le seul tube T60 contenant du NADPH, les trois autres tubes constituant en réalité différents témoins. La deuxième étape consiste en la centrifugation et l'extraction de la phase aqueuse contenant la radioactivité produite par l'aromatation de l'androsténédione marquée. Au cours de cette étape, les culots initiaux sont récupérés et congelés à -20°C pour le dosage ultérieur des protéines par la méthode de Lowry. Enfin, 100 μl de phase aqueuse sont prélevés et analysés en scintillation liquide. Le liquide scintillant est l'aqualuma. Les résultats obtenus sont exprimés en coups par minute (cpm) puis transformés en fraction molaire (fmol). Le protocole complet se trouve en annexe.

3.3 Dosages radio-immunologiques

Les dosages sont effectués selon la méthode de dosage radio-immunologiques (RIA, Radioimmunoassay) décrite par Jalabert et Fostier (1986). La testostérone et le 17 β -oestradiol sont dosés dans le plasma et dans le milieu de culture, tandis que la 11-ketotestostérone ne l'est que dans le plasma. L'anticorps de 17 α ,20 β -dihydroxyprogesterone étant indisponible, son dosage n'a pas été réalisé. Pour chaque stéroïde, deux extractions avec un mélange cyclohexane/éthylacétate (1v/1v) sont réalisées sur une quantité de 150 μl de l'échantillon, placée dans un tube en verre. La double extraction produit une rupture des liaisons hormones-protéines. Le principe de ce dosage repose sur la compétition entre l'hormone à doser dans l'échantillon et la même hormone en quantité connue marquée par un élément radioactif (^3H), émettant des radiations bêta, à l'encontre d'un anticorps spécifique. Dans un premier temps, l'hormone froide est mise en contact avec l'anticorps spécifique. Elle se trouve ainsi sous deux formes: libre ou complexée. On ajoute ensuite l'hormone marquée. La quantité d'anticorps et d'hormone marquée reste constante. Toute augmentation de la

concentration en hormone froide entraîne une réduction du taux de fixation de l'hormone marquée. Par la suite, après une incubation de douze heures à 4°C, on sépare par centrifugation, décantation et rinçage, l'hormone marquée complexée à l'anticorps de l'hormone marquée libre. Il est dès lors possible de mesurer la radioactivité de l'une de ces deux fractions et d'en déduire la concentration en hormone froide présente dans l'échantillon. Une gamme d'étalonnage est préalablement établie en duplicat avec des étalons standards, qui comportent des quantités croissantes d'hormone pure (5, 8, 12, 20, 35, 55, 90, 150, 250, 400, 650, 1100, 1800 et 3000 pg/ml). La quantité d'hormone de chaque échantillon est dosée en double et déduite d'après la courbe d'étalonnage. Le liquide scintillant utilisé est l'Ecoscint A. La lecture de l'immunoréactivité de chaque tube se fait à l'aide d'un compteur Beckmann LS6000IC avec un temps de comptage de trois minutes par tube. Ce compteur donne une valeur en coup par minute (cpm) qui doit être transformée en concentration (pg/tube). La quantité réelle d'hormone présente dans l'échantillon est calculée selon la formule suivante:

$$\text{Cc. (pg/ml)} = \frac{\text{Cc. (pg/tube)} \times \text{qt de tampon reprise des stéroïdes extraits } (\mu\text{l}) \times 1000}{\text{Qt de plasma initiale utilisée pour le dosage } (\mu\text{l}) \times \text{qt de plasma extraite } (\mu\text{l})}$$

Signalons que, pour chaque hormone, une mesure de la radioactivité naturelle (background) et une mesure de la fixation totale sont réalisées. Le protocole complet se trouve en annexe.

3.4 Histologie

3.4.1 Préparation des lames histologiques

Pour chaque poisson, un morceau de gonade est fixé dans du Bouin (75% d'acide picrique, 20% de formol et 5% d'acide acétique glacial). La réalisation des lames histologiques se compose de six grandes étapes. Au cours de la déshydratation, d'une durée totale de 12 heures, les échantillons passent automatiquement dans différents bains (4 bains de méthanol absolu, 4 bains de toluol et 4 bains de paraffine). Cette étape prépare les tissus à être pénétrés par la paraffine. Les échantillons subissent ensuite l'enrobage avec de la paraffine. Après durcissement des blocs, une coupe d'une épaisseur de 4µm est réalisée au microtome. Les tissus sont ensuite étalés sur des lames « superfrost ». La coloration utilisée est un trichrome à froid (Bleu de Célestin, hémalum, phloxine, vert lumière). L'association du Bleu de Célestin et de l'hémalum colore les noyaux des ovocytes en bleu foncé. La phloxine colore les protéines en rouge. Le vert lumière colore les tissus conjonctifs en vert. Le montage des lames consiste à couvrir la lame d'une lame couvre-objet préalablement enduite de DPX. Le protocole complet se trouve en annexe.

3.4.2 Analyse des coupes histologiques

Pour chaque lame histologique, la proportion des différents stades ovocytaires a été définie. Le stade ovocytaire est déterminé selon Rinhard *et al.* (1993). Seuls les ovocytes dont la section passe par le noyau sont pris en compte. La mesure moyenne des diamètres

ovocytaires des stades les plus avancés a été réalisée, à partir de 20 ovocytes par coupe. Il n'y a pas de résultat pour le deuxième prélèvement car les échantillons sont perdus.

<i>Stade ovarien</i>	<i>Stade ovocytaire présent dans l'ovaire</i>	<i>Description de l'ovocyte le plus avancé</i>
(1) Immature	Ovocyte protoplasmique.	Ovocytes sans substances vitellogéniques.
(2) Prévitellogenèse précoce	Ovocyte protoplasmique et ovocyte en prévitellogenèse précoce.	Apparition de vésicules de glycoprotéines sur 2 ou 3 rangées en périphérie du cytoplasme.
(3) Prévitellogenèse avancée	Ovocyte protoplasmique et ovocyte à différents stades de la prévitellogenèse.	Ovocyte avec cytoplasme rempli de vésicules glycoprotéiques, différenciation des membranes folliculaires.
(4) Vitellogenèse précoce	Ovocyte protoplasmique, ovocyte à différents stades de la prévitellogenèse et ovocyte en vitellogenèse précoce.	Les globules de vitellus (lipoprotéines) apparaissent et occupent 2 à 3 rangées en périphérie du cytoplasme.
(5) Vitellogenèse avancée	Ovocyte protoplasmique et ovocyte à différents stades de la prévitellogenèse et de la vitellogenèse.	Le cytoplasme est rempli de globules de vitellus qui repoussent en périphérie les vésicules de glycoprotéines. Apparition du micropyle et migration du noyau vers celui-ci.
(6) Maturation finale	Ovocyte protoplasmique et ovocyte à différents stades de la prévitellogenèse et vitellogenèse, apparition de GVBD (germinal vesicle breakdown) et ovule.	Accolement et éclatement du noyau près du micropyle. Reprise de la méiose jusqu'à la métaphase de la deuxième division (bloqué jusqu'ici en prophase I) et enfin ovulation.
(7) Interponte	Ovocyte protoplasmique et ovocyte à différents stades de la prévitellogenèse et vitellogenèse, apparition de follicules postovulatoires.	Hypertrophie des cellules granulaires et thécales et ensuite apparition d'autophagocytose.
(8) Postponte (non observée)	Ovocyte protoplasmique et follicules pré et post ovulatoires.	Les cellules de la granulosa s'hypertrophient et la substance vitelline dégénère.

Tableau 3 : Description des différents stades ovariens du goujon (adapté de Rinchart et al., 1993).

4. Analyse statistique

En ce qui concerne les proportions ovocytaires, un test d'homogénéité des proportions a été réalisé ($p = 0,05$). Pour les autres données, la totalité des analyses statistiques a été réalisée avec le programme STATISTICA. Nous avons procédé à une analyse par ANOVA I. L'unité statistique est le bassin ($n=2$, avec 5 poissons par bassin). Après avoir montré la normalité de la population, nous avons vérifié l'homogénéité des variances ($p=0,05$), par le Hartley/Bartlett. Nous avons mis en évidence des différences par le test de Scheffé. Lorsque les variances ne sont pas homogènes, nous avons utilisé le test de Kruskal-Wallis.

Chapitre 3: Présentation des résultats

Ce mémoire se fixe trois objectifs principaux. En étudiant deux groupes de poissons élevés dans des conditions environnementales soit constantes soit naturelles, le premier but poursuivi est de déterminer le stade critique à partir duquel l'inhibition du processus de maturation est effective chez des poissons maintenus en conditions constantes. Les capacités de stéroïdogénèse de ces deux populations sont ensuite comparées *in vivo*, et notamment l'effet d'une stimulation gonadotrope administrée chez les poissons non matures. Un dernier objectif est de comparer *in vitro*, et en terme de stéroïdogénèse, la réponse des tissus soumis à différentes combinaisons hormonales.

Les poissons en conditions naturelles (CN), constantes témoins (CCT) et injectés (CCI) sont comparés au sein d'une même date de prélèvement. L'attribution des lettres pour montrer la présence ou l'absence d'une différence significative est donc réalisée par date. Notons également que des variabilités parfois fort importantes autour de la moyenne ne permettent pas de différencier deux populations de valeurs, qui sont pourtant graphiquement bien différentes. Ceci parce que l'unité statistique choisie est le bassin. Les valeurs présentées représentent la moyenne + écart type avec $n = 2$ (2 bassins, 5 poissons par bassin).

1. Comparaison des processus de gonadogenèse *in vivo*

Chez deux groupes de poissons (CN vs CC), les processus de maturation ovocytaire ont été comparés en janvier, février et mars. A cette fin, nous avons entrepris le calcul de l'indice gonadosomatique, puis procédé à des observations au niveau histologique. Les niveaux des stéroïdes circulants ont également été mesurés.

1.1 L'Indice gonadosomatique (IGS)

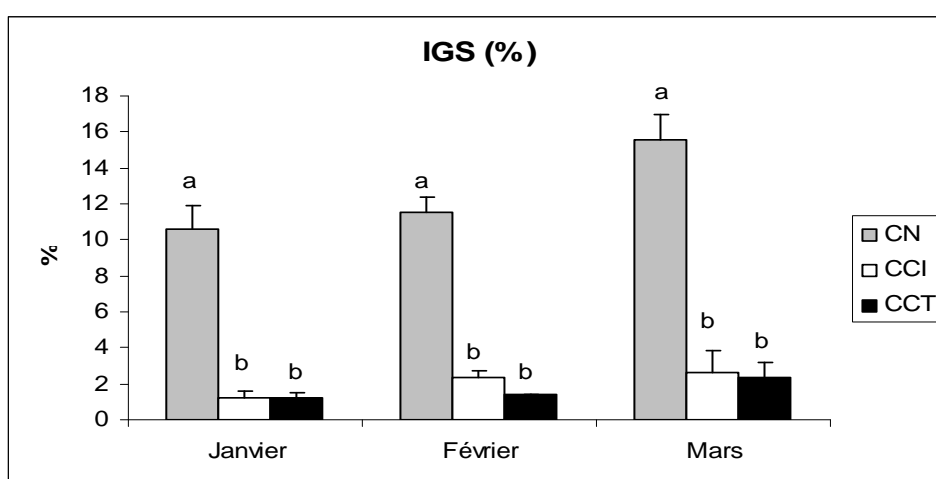


Figure 3 : Evolution de l'indice gonadosomatique.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

Outre l'augmentation attendue de l'IGS au cours du temps chez les poissons en conditions naturelles ou matures ($15 \pm 1\%$ en mars), les valeurs présentées par ces poissons sont systématiquement très différentes de celles qu'on observe chez les poissons en conditions constantes. Ainsi, les poissons non matures présentent des valeurs moyennes inférieures à 3% au mois de mars. On observe également qu'il n'y a pas d'effet net résultant de la stimulation hormonale reçue in vivo chez les poissons non matures. Enfin, chez ces poissons, les valeurs restent assez semblables au cours du temps.

1.2 La maturation gonadique

L'observation histologique des gonades a permis de préciser les proportions des différents stades observés ainsi que les diamètres ovocytaires des stades les plus avancés. Rappelons que les analyses histologiques n'ont pu être réalisées au mois de février, car le matériel biologique a été perdu.

1.2.1 Les Proportions ovocytaires

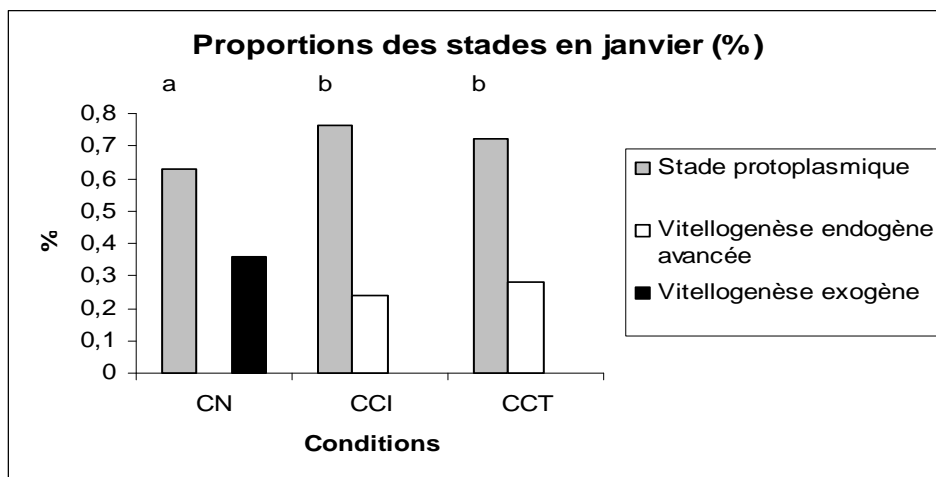


Figure 4 : Proportions des différents stades ovocytaires en janvier

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

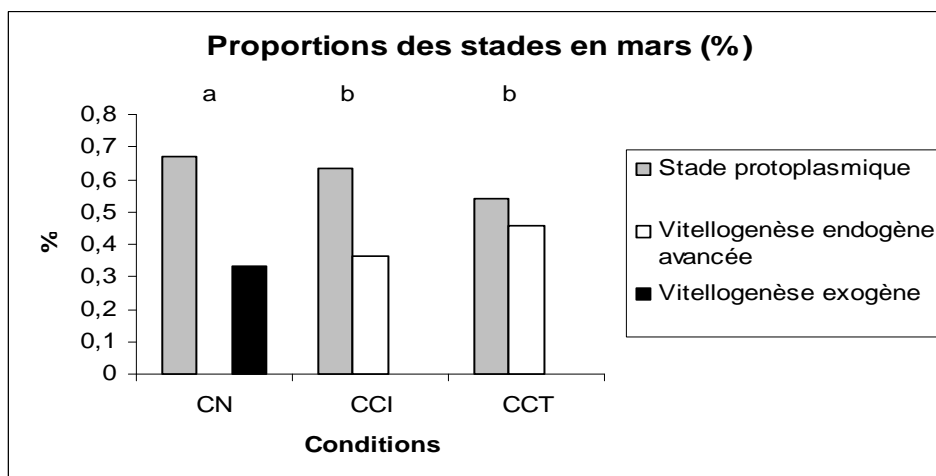


Figure 5 : Proportions des différents stades ovocytaires en mars

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

En janvier et en mars, les populations ovocytaires des poissons en conditions naturelles sont composées de deux stades : les ovocytes protoplasmiques, qui constituent environ les deux tiers de la population et les ovocytes en vitellogenèse exogène qui en constituent le tiers restant. Les populations ovocytaires des poissons maintenus en conditions constantes sont également constituées de deux stades, toutefois les ovocytes les plus avancés se trouvent en vitellogenèse endogène avancée. Ainsi, en janvier et en mars, les populations ovocytaires des poissons matures sont significativement différentes des populations ovocytaires des poissons non matures. Il n'y a visiblement pas d'effet de l'injection hormonale.

1.2.2 Les diamètres ovocytaires

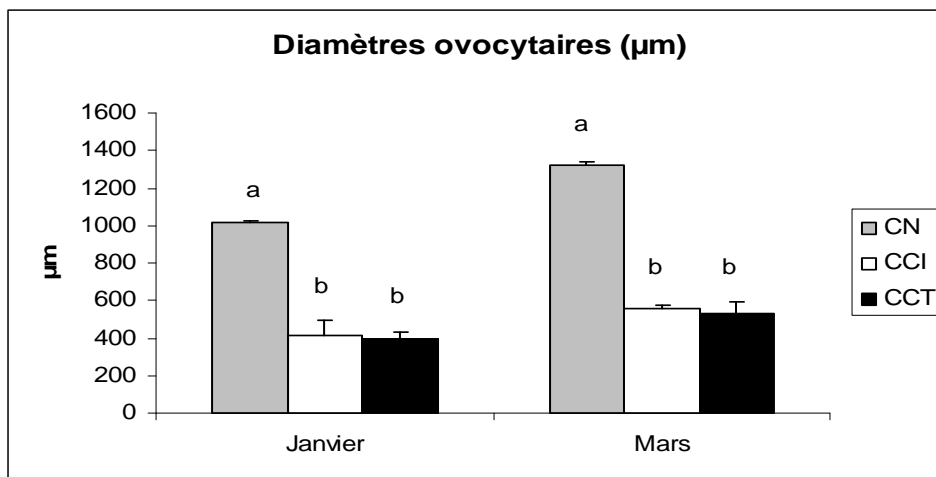


Figure 6 : Evolution des diamètres ovocytaires entre janvier et mars

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

Les diamètres ovocytaires des stades les plus avancés, à savoir la vitellogenèse exogène en conditions naturelles et la vitellogenèse endogène avancée en conditions constantes, sont présentés à la figure 6. Outre l'augmentation attendue du diamètre ovocytaire des poissons matures entre janvier et mars (1011 ± 16 et $1322 \pm 16 \mu\text{m}$ respectivement), les diamètres relevés chez les poissons en conditions constantes, bien qu'augmentant légèrement, n'évoluent toutefois guère (de 412 ± 78 à $561 \pm 18 \mu\text{m}$ pour les poissons injectés). Les valeurs entre les conditions naturelles et constantes sont significativement différentes, les stades correspondants étant différents. Il n'y a pas d'effet visible résultant de la stimulation hormonale reçue in vivo.

2. Comparaison de la stéroïdogénèse *in vivo*

Les niveaux circulants de testostérone, de 17β -oestradiol et de 11-kétotestostérone sont présentés aux figures 7 à 9. L'évolution de l'activité aromatasase est rapportée à la figure 10.

2.1 La testostérone

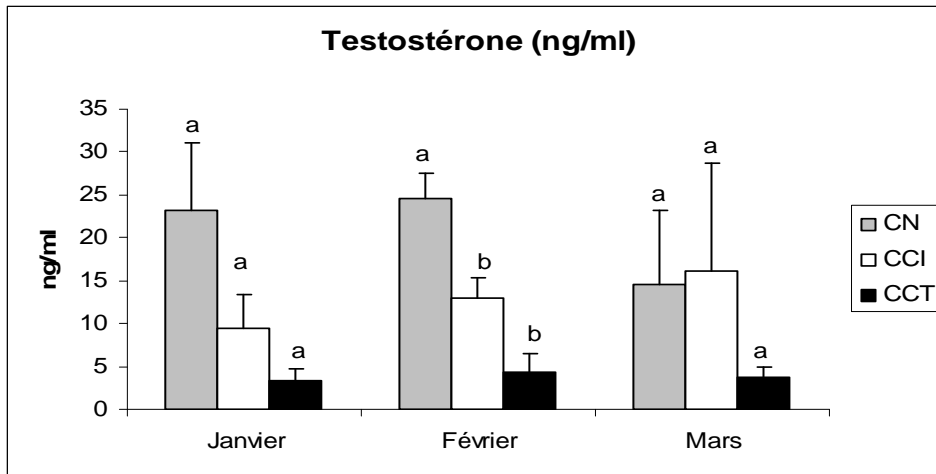


Figure 7 : Evolution des niveaux de testostérone dans le plasma.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

La tendance générale est la diminution des niveaux de testostérone dans le plasma en conditions naturelles, les niveaux en janvier et en mars étant respectivement de 23 ± 7 et de 14 ± 8 ng/ml. La capacité de stéroïdogénèse chez les poissons matures est nettement supérieure à celle des poissons élevés en conditions constantes, une grande variabilité des mesures pouvant masquer des différences significatives en janvier et en mars. Toutefois, l'effet d'une injection *in vivo* chez les poissons non matures, se marque clairement par rapport aux poissons témoins, malgré une variabilité importante. De plus, tandis que les valeurs observées chez les poissons témoins restent assez stables, l'effet de l'injection semble se marquer de façon plus prononcée avec le temps, jusqu'à atteindre au mois de mars des valeurs similaires à celles observées en conditions naturelles.

2.2 L'oestradiol

La figure 6 présente l'évolution des niveaux de 17β -oestradiol dans le plasma. Comme pour la testostérone, la tendance générale est à la diminution des niveaux de 17β -oestradiol chez les poissons en conditions naturelles, les valeurs étant de 6 ± 4 ng/ml en janvier et de 2 ± 1 ng/ml en mars. Bien que des différences significatives n'aient été montrées qu'en janvier, la stéroïdogénèse est ici aussi nettement supérieure chez les poissons matures. L'effet de l'injection est bien réel en février et en mars, bien que les différences ne soient pas montrées comme étant significatives à cause de la variabilité importante. En février et mars, les valeurs sont alors semblables à celles relevées chez les poissons matures.

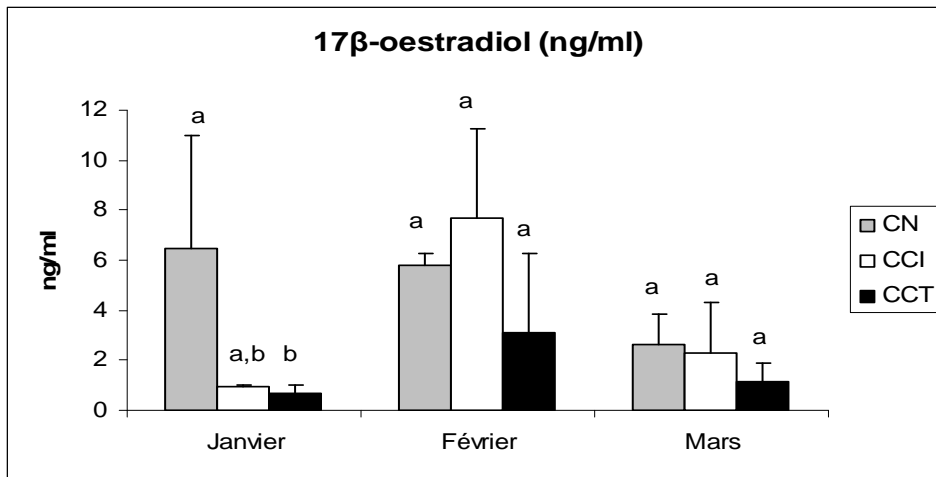


Figure 8 : Evolution des niveaux de 17β-oestradiol dans le plasma.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

2.3 La 11-kétotestostérone

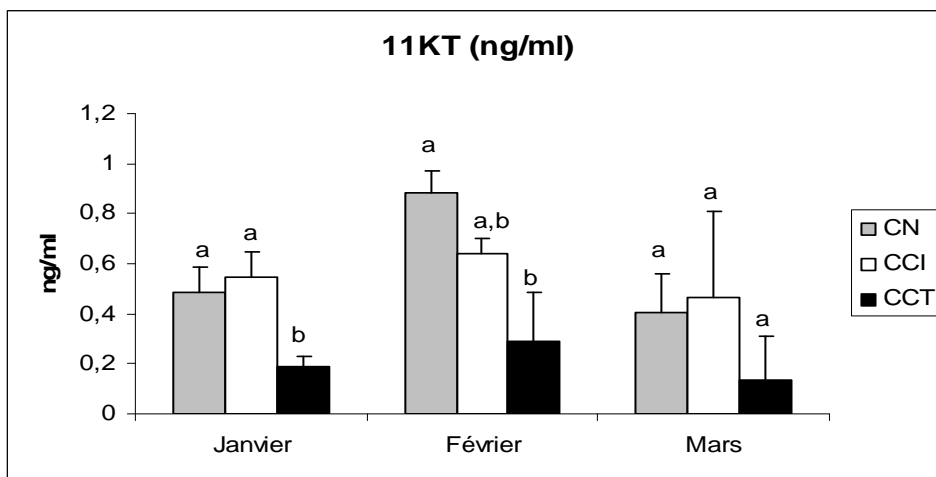


Figure 9 : Evolution des niveaux de 11-kétotestostérone dans le plasma.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

Notons bien que les valeurs obtenues pour la 11-kétotestostérone sont très faibles. Les capacités de stéroïdogenèse des poissons matures sont nettement supérieures à celles des poissons non matures, des différences significatives étant observées en janvier et février. L'effet de la stimulation hormonale est marqué entre les poissons non matures traités et les témoins. A ce propos, nous observons des différences significatives en janvier.

2.4 L'activité aromatase

Nous nous sommes également intéressés à l'activité aromatase, laquelle est connue pour être responsable de l'aromatation des androgènes en oestrogènes (figure 10).

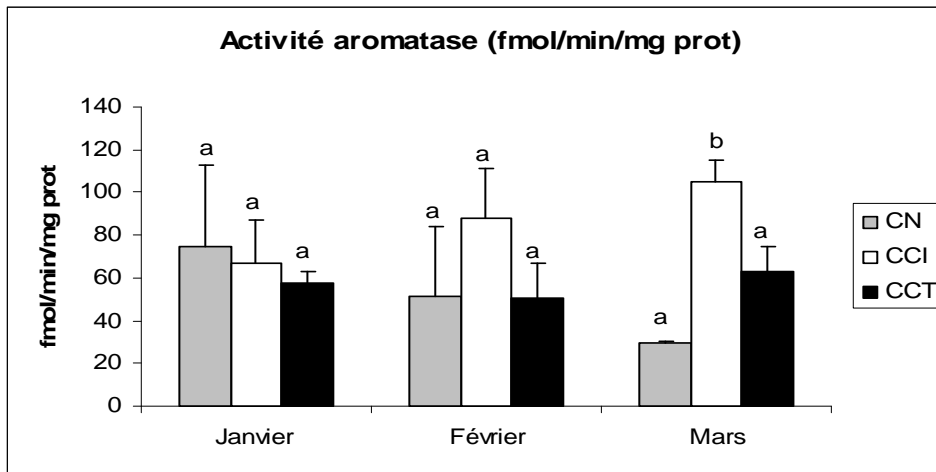


Figure 10 : Evolution de l'activité aromatase

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

Si les différences significatives ne sont pas marquées dans le temps, il n'en reste pas moins que des tendances nettes peuvent être établies suite à l'étude des profils obtenus. Ainsi, l'activité aromatase est semblable en janvier et en février chez les poissons matures et non matures. En mars, suite à sa diminution chez les poissons matures et son maintien chez les poissons non matures, elle devient supérieure chez ces derniers. L'effet de l'injection se marque à partir de février, une augmentation de l'activité aromatase étant observée jusqu'en mars.

3. Comparaison des capacités de stéroïdogénèse *in vitro*

Rappelons que les tissus ovariens sont soumis à six traitements. Le premier consiste en un contrôle car le milieu de culture ne contient aucune hormone exogène, tandis que les autres traitements comparent la stéroïdogénèse induite par différentes combinaisons hormonales. Signalons que les stéroïdes relargués dans le milieu s'accumulent pendant toute la durée de l'incubation, ce qui explique que les valeurs soient si élevées.

3.1 Production de testostérone

3.1.1 Milieu contrôle

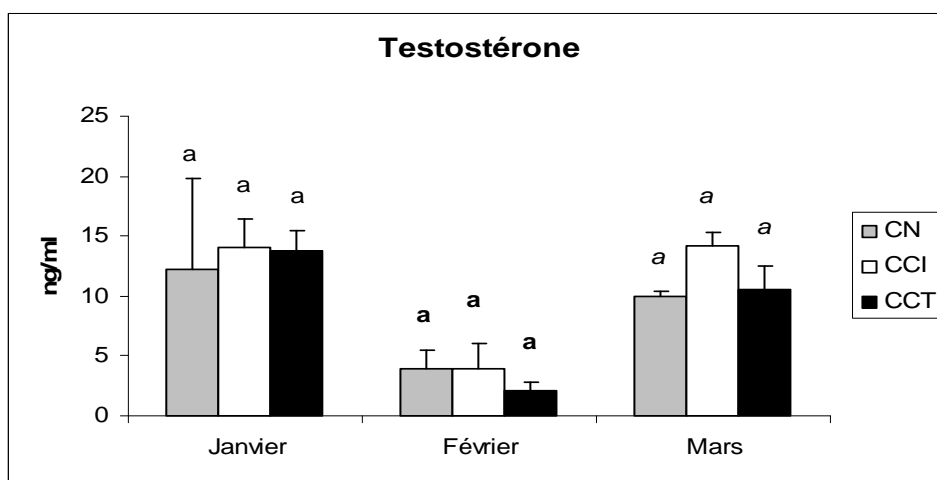


Figure 11 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture sans hormones exogènes.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

Globalement, le relargage de testostérone par les tissus ovariens matures et non matures issus des poissons maintenus en conditions constantes est comparable. Cela ne semble toutefois pas être le cas en février bien que les différences ne soient pas non plus montrées comme étant statistiquement significatives. Si cette dernière différence est bien réelle, un effet de l'injection reçue *in vivo*, semble alors se manifester en février. La tendance générale est une diminution du relargage avec le temps, plus particulièrement en février.

3.1.2 Réponses aux traitements

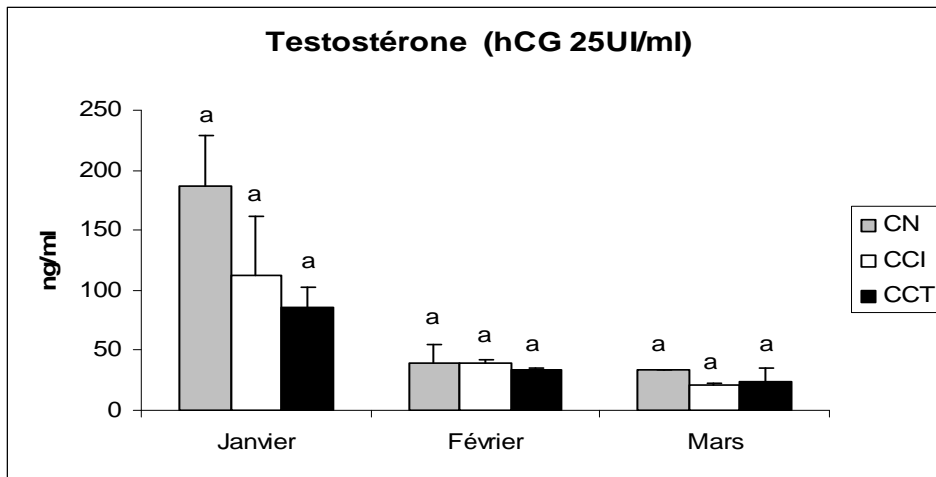


Figure 12 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture additionné de hCG 25UI/ml.
 Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

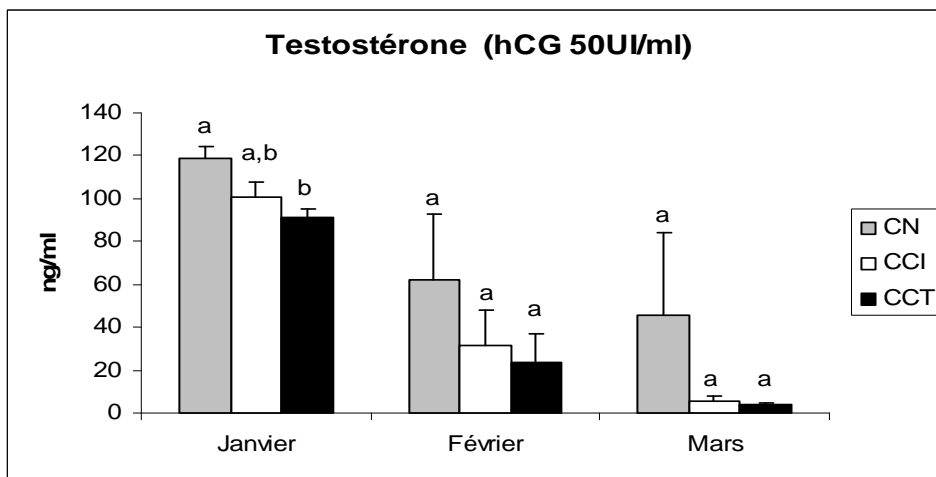


Figure 13 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture additionné de hCG 50UI/ml.
 Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

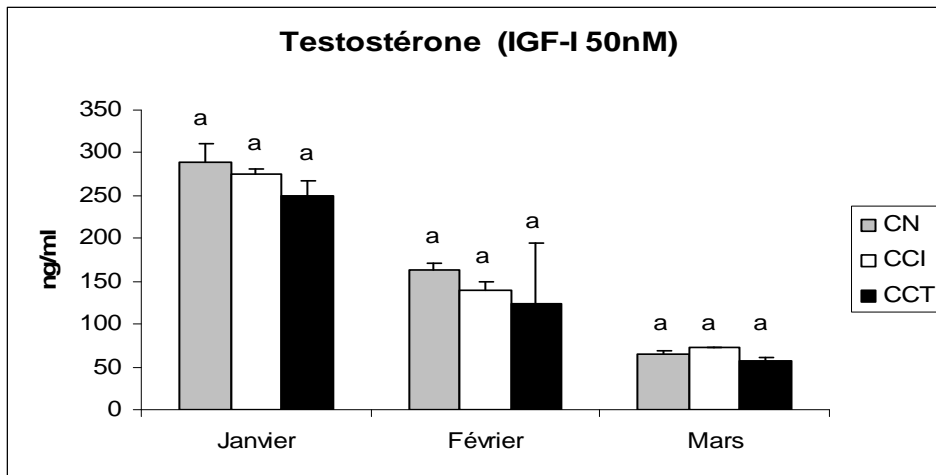


Figure 14 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture additionné de IGF-I 50nM.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

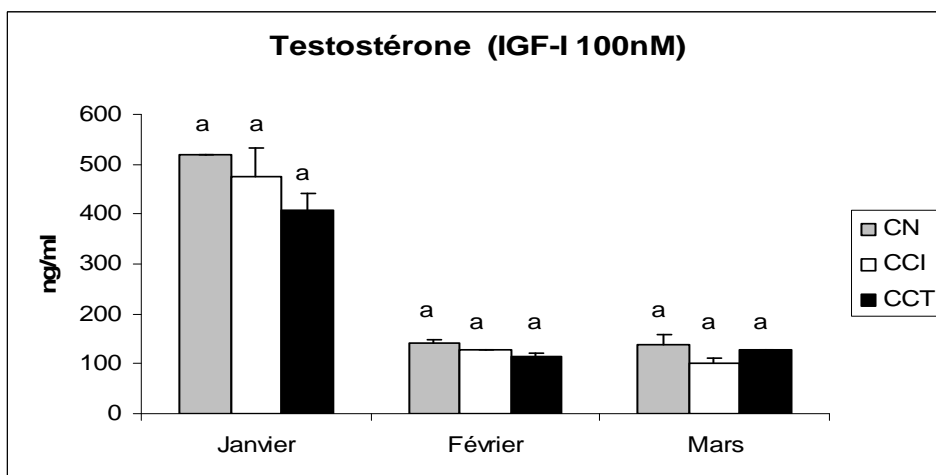


Figure 15 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture additionné de IGF-I 100nM.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

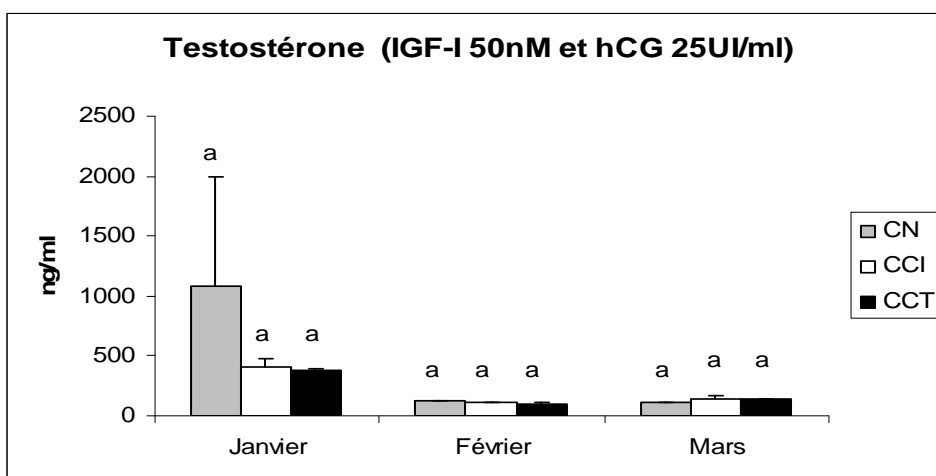


Figure 16 : Relargage de testostérone dans un milieu de culture additionné de IGF-I 50nM et hCG 25UI/ml.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

Les résultats montrant le relargage de testostérone par les tissus ovariens soumis aux traitements hormonaux sont présentés aux figures 12-16. Tous les résultats présentés dans ces figures montrent une diminution de la réponse avec le temps, tout comme nous l'avons précédemment montré *in vivo* une diminution pour la stéroïdogénèse.

Avec l'hCG 25UI/ml, les poissons matures présentent un relargage plus important en janvier en terme de production de testostérone (186 ± 42 ng/ml). Cette réponse diminue avec l'élévation de la dose à 50UI/ml tout en restant significativement plus élevée comparativement aux poissons non matures (figures 10-11). Les réponses sont comparables entre les deux types de conditions en février et en mars avec l'hCG 25UI/ml. Avec une dose de 50UI/ml, les réponses ne sont plus comparables en février et mars, malgré le manque de différences statistiques.

Les traitements à base d'IGF-I induisent sans exception des réponses qui sont comparables, quel que soit l'état de maturité des tissus ovariens. Un relargage supérieur en réponse à une dose double d'IGF-I est observé (289 ± 20 contre 518 ng/ml pour les poissons matures en janvier).

La combinaison de l'IGF-I et de l'hCG induit également une réponse en apparence supérieure des tissus des poissons matures en janvier (1080 ± 921 ng/ml), en soulignant toutefois une variabilité extrêmement importante. En février et mars, la combinaison induit des réponses similaires chez les poissons matures ou non.

Le fait que certains poissons aient reçu précédemment une injection hormonale *in vivo* ne semble pas avoir une influence majeure sur les résultats observés, même si il est néanmoins visible que les tissus de ces derniers présentent une réponse qui est généralement un peu supérieure. Toutefois, aucune différence significative n'est observée à ce niveau.

3.2 Production d'œstradiol

3.2.1 Milieu contrôlé

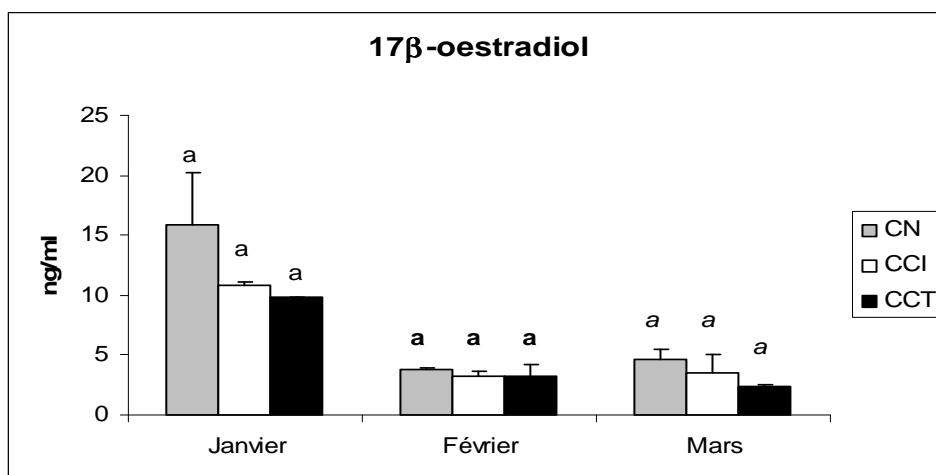


Figure 17 : Relargage de 17β-oestradiol dans un milieu de culture sans hormones exogènes.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

Les tissus des poissons matures présentent un relargage supérieure à celui des tissus des poissons non matures, même si aucune différence significative n'a été montrée. Au mois de février, le relargage semble toutefois comparable entre les poissons matures ou non matures. Il semble ne pas y avoir d'effet marqué de l'injection reçue in vivo. La tendance est un relargage moindre au cours du temps comme pour la production de testostérone.

3.2.2 Réponses aux traitements

Tous les résultats présentés aux figures 16-20 montrent une diminution de la réponse avec le temps, tout comme nous avons précédemment montré in vivo pour la stéroïdogénèse.

Quelle que soit la dose d'hCG, le relargage d'œstradiol est plus important pour les ovaires matures comparativement aux ovaires non matures. En effet, des différences significatives ont été calculées en février et en mars pour la dose de 25UI/ml, ou en janvier et mars pour la dose de 50I/ml. Une dose deux fois supérieure d'hCG permet un relargage plus important dans le milieu. Ainsi, les valeurs observées pour les poissons matures en janvier sont de 46 ± 10 pour une de 50UI/ml contre 154 ± 19 ng/ml avec l'hCG.

Le relargage d'œstradiol est plus important pour les ovaires matures en février, et ce aux deux doses d'IGF-I. Une dose deux fois supérieure d'IGF-I permet un relargage plus important dans le milieu. Ainsi, les valeurs observées pour les poissons matures en janvier sont de 107 ± 13 ng/ml pour une dose de 50nM, contre 190 ± 21 ng/ml pour une dose de 100nM.

Des relargages significativement différents sont relevés en février avec la combinaison des deux hormones. De même, en janvier des différences importantes sont visibles. Les valeurs observées en janvier chez les poissons matures

Le fait que certains poissons aient reçu précédemment une injection hormonale in vivo ne semble généralement pas avoir une influence majeure sur les résultats observés. Toutefois, si aucune différence significative n'est observée à ce niveau, des effets sont marqués de façon ponctuelle, par exemple en janvier pour le traitement combinant l' IGF-I et l'hCG.

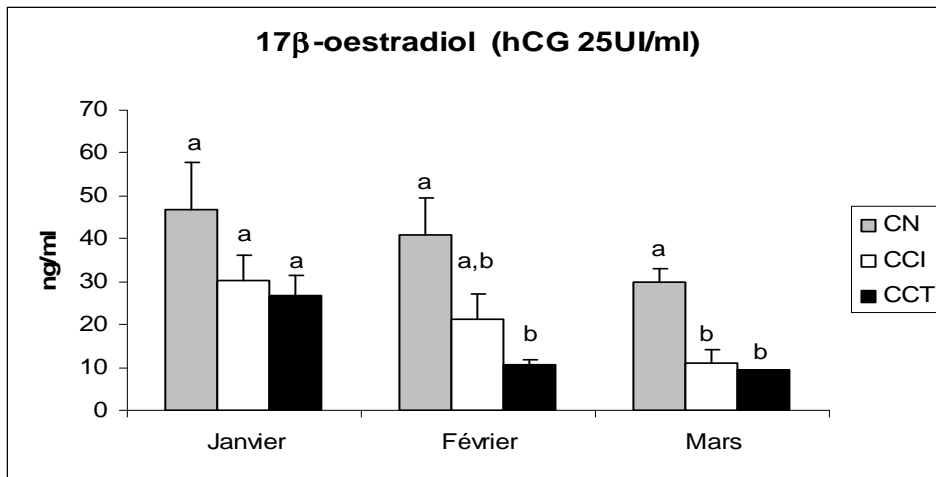


Figure 18 : Relargage de 17β-oestradiol dans un milieu de culture additionné de hCG 25UI/ml.
 Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

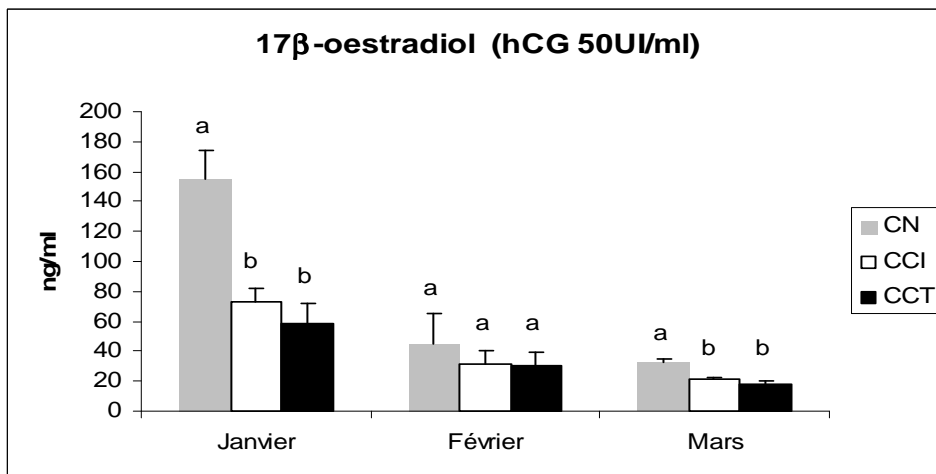


Figure 19 : Relargage de 17β-oestradiol dans un milieu de culture additionné de hCG 50UI/ml.
 Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

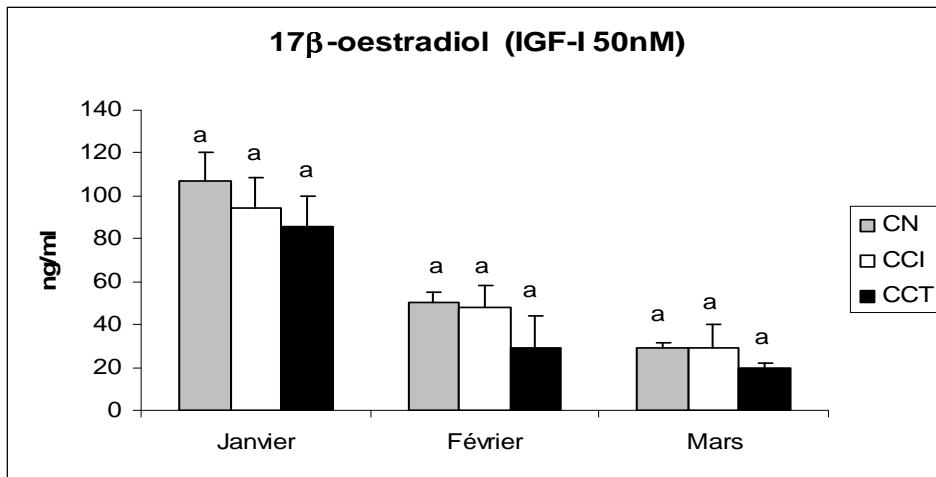


Figure 20 : Relargage de 17β-oestradiol dans un milieu de culture additionné de IGF-I 50nM.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

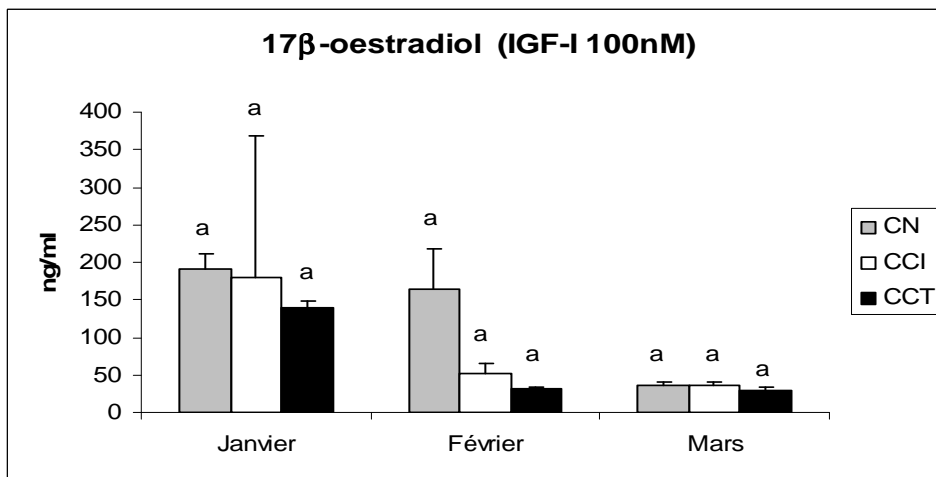


Figure 21 : Relargage de 17β-oestradiol dans un milieu de culture additionné de IGF-I 100nM.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

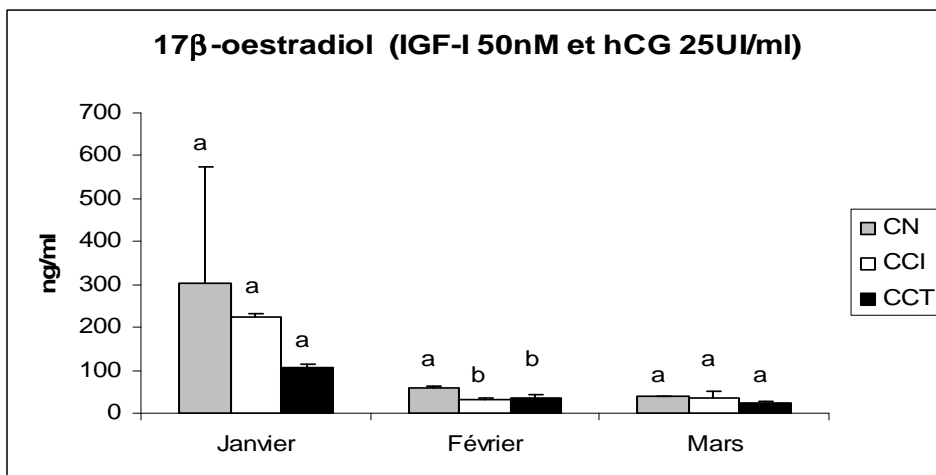


Figure 22 : Relargage de 17β-oestradiol dans un milieu de culture additionné de IGF-I 50nM et hCG 25UI/ml.

Les valeurs ne sont comparables que pour une même date, celles partageant la même lettre n'étant pas significativement différentes.

Chapitre 4: Discussion des résultats

1. Comparaison *in vivo* des processus de gonadogenèse

Parmi les résultats que nous avons obtenus, l'indice gonadosomatique traduit l'absence de maturation gonadique chez les poissons élevés en conditions de température et de photopériode constantes. En mars, les valeurs observées sont inférieures à 3%, alors que les poissons matures présentent des valeurs avoisinant les 15%. Toutefois, comme le montre la littérature, l'IGS continue encore à augmenter jusqu'à la période de ponte - signe du maintien d'une vitellogenèse active - jusqu'à atteindre des valeurs de 25% (Sulistyo et al., 1998). Il est bien connu que les poissons maintenus sous des conditions constantes de température et de photopériode présentent une croissance normale, avec cependant une inhibition des processus de gonadogenèse. Diverses études ont montré que les variations circannuelles de la température constituent le facteur déterminant permettant l'initiation du cycle reproducteur chez la perche commune (Bromage et al., 2001). Sous photopériode constante (12L:12O), un programme comportant un refroidissement sur six semaines (22 à 6°C), un maintien au froid pendant cinq mois (6°C), et un réchauffement sur 1 mois (6 à 14°C), permet à quelques poissons d'initier la gonadogenèse (Migaud et al., 2002). Un réchauffement rapide sur un mois est préférable à deux mois, tandis qu'une période de vernalisation optimum se situerait plutôt entre trois et cinq mois. Dans un second temps, plusieurs auteurs ont également démontré l'importance des variations circannuelles de la photopériode dans le contrôle de la reproduction hors-saison chez la perche commune. Sous température ambiante, une photophase continue inhibe le processus de gonadogenèse tandis qu'une photophase constante (16L:8O) induit une forte hétérogénéité dans la réponse des géniteurs (Migaud et al. 2003, 2004). Seule une photopériode naturelle donne des résultats similaires à ceux observés en milieu naturel, tandis qu'une simulation artificielle de la photopériode naturelle autorise gonadogenèse normale, mais avec un léger retard de développement, et seul 55% des femelles mûrissant pondent. Toutefois, il convient de souligner que seuls les effets de photopériodes constantes ont été testés chez la perche commune. Chez la perchaude, Kayes et Calbert (1979) montrent que la photopériode n'intervient guère dans la dernière phase du cycle de reproduction. L'inhibition du processus de gonadogenèse en conditions constantes est un fait établi

Un des buts poursuivis par ce mémoire est de déterminer le stade critique de développement ovocytaire. Nous avons observé que les poissons matures et ceux qui n'initient pas de cycle de reproduction présentent des populations ovocytaires qui diffèrent nettement entre elles. Deux stades ovocytaires sont présents, la perche présentant un développement ovarien de type groupe-synchrone. Outre le stade protoplasmique, les poissons en maturation présentent une deuxième population composée d'ovocytes en vitellogenèse exogène, tandis que les poissons dont la maturation est inhibée présentent seulement des ovocytes en vitellogenèse endogène avancée. Ces populations restent qualitativement inchangées entre janvier et mars ; aucun ovocyte des poissons non mûrissant ne passe en vitellogenèse exogène, ce qui démontre bien qu'il y a inhibition de la maturation ovocytaire. L'observation des diamètres ovocytaires des stades les plus avancés illustre également ce propos. Les diamètres sont évidemment fonctions des stades ovocytaires. Ainsi, nous observons deux classes de taille, les ovocytes en conditions constantes restant dans la même classe de taille entre janvier et mars. Ces observations nous autorisent à supposer que le stade critique du développement ovocytaire chez la perche commune en conditions constantes

est le stade de la vitellogenèse exogène. De tels résultats n'ont pas encore été rapportés dans la littérature.

Notre étude montre que l'inhibition des processus régissant le démarrage du stade de vitellogenèse exogène serait due aux faibles niveaux circulants de stéroïdes, signe d'une faible capacité de stéroïdogenèse, même si l'activité aromatasase n'est pas altérée. Le phénomène d'aromatase est une réaction enzymatique qui s'intègre dans un système biologique complexe caractérisé par de nombreuses interactions, elle est donc soumise à de nombreuses régulations. L'activité aromatasase étant comparable entre les poissons matures et les poissons non matures en février et en mars, l'absence de maturation chez les poissons maintenus en conditions constantes ne peut s'expliquer que par les niveaux faibles en testostérone chez ces poissons. La faiblesse de ces mêmes niveaux explique également qu'une activité aromatasase supérieure chez les poissons non matures par rapport aux poissons matures en mars, n'induit pas pour autant une production supérieure de 17β -oestradiol. Pareillement, toujours au mois de mars, si les taux de testostérone entre les poissons matures et les poissons injectés sont similaires, une activité aromatasase nettement supérieure chez les poissons stimulés n'exclut pas que les niveaux observés de 17β -oestradiol soient similaires dans les deux groupes.

Les niveaux élevés de testostérone et de 17β -oestradiol, de même que leur diminution, sont à mettre en relation avec le processus d'accumulation du vitellus. En ce qui concerne les niveaux faibles de 11-KT, signalons que de telles valeurs sont normales car il s'agit de populations monosexes femelles. Les téléostéens sont les seuls animaux chez lesquels il est possible de changer le sexe et d'obtenir ainsi des populations monosexes (Bieniarz et Epler, 1992). Les mâles XY et XX présentent les mêmes capacités reproductrices et il est donc possible de croiser les seconds avec des femelles afin d'obtenir des populations monosexes femelles (Rougeot et al., 2003).

Un second objectif est de comparer les capacités de stéroïdogenèse chez des poissons matures et non matures, et notamment l'effet d'une stimulation gonadotrope *in vivo* sur cette stéroïdogenèse. Nous avons donc injecté de l'hCG à une moitié des poissons qui ne démarrent pas de cycle reproducteur en conditions constantes de température et de photopériode. Les résultats présentés dans ce mémoire montrent que les effets de cette injection se marquent très clairement en terme de stéroïdogenèse. En effet, suite à l'injection, les poissons non matures présentent une stéroïdogenèse comparable à celle des poissons matures. Cela s'observe en mars pour la testostérone, en février et en mars pour l'oestradiol et lors des trois prélèvements pour la 11-kT. En présence toutefois d'une grande variabilité dans les observations, il semblerait donc que la réponse à l'injection est plus ou moins marquée suivant le mois où les prélèvements sont effectués. Ainsi, des niveaux comparables pour l'oestradiol en février et en mars peuvent peut-être s'expliquer par une augmentation de l'activité aromatasase chez les poissons injectés, en parallèle avec un effet croissant de l'injection sur la sécrétion de testostérone au cours des trois prélèvements. Si ce n'est pour induire la ponte (Kucharczyk et al., 1996), il apparaît qu'aucune étude ne rapporte l'utilisation *in vivo* d'hCG chez la perche commune. Ohta et al. (1996) ont montré qu'une gonadogenèse complète est induite chez l'anguille japonaise. D'autre part, Fostier et al. (1979) ont montré que si les niveaux de 17β -oestradiol sont bas, les structures restent sensibles à une stimulation exogène en la fin de la vitellogenèse. Notons que des niveaux supérieurs de 17β -oestradiol qui sont rencontrés chez les poissons injectés ne permettent aucune répercussion sur le développement des ovocytes, le délai entre l'injection et le sacrifice des poissons étant trop court.

Pour l'essentiel, le stade critique dans l'inhibition de la gonadogenèse chez la perche commune semble donc être le stade de vitellogenèse exogène. Retenons également l'effet de la stimulation hormonale sur la stéroïdogenèse chez les poissons non matures. Cette stéroïdogenèse modifiée est comparable à ce qui est observé chez les poissons en maturation, mais visiblement en fin du processus de vitellogenèse. On peut supposer qu'une stimulation gonadotrope exogène n'est sans doute pas suffisante à elle seule pour induire une gonadogenèse en janvier, si les poissons sont maintenus sous une température et une photopériode constante. Il aurait été intéressant d'observer l'effet d'une injection d'hCG sur une partie des poissons en conditions naturelles, pour voir si cette injection est efficace dès le mois de janvier chez de tels poissons. D'autre part, la réponse positive à la stimulation gonadotrope obtenue en mars chez les poissons injectés, indiquerait qu'un régime hormonal adéquat est capable d'induire une gonadogenèse efficiente en conditions constantes.

2. Comparaison des capacités de stéroïdogénèse

Un troisième objectif poursuivi par ce mémoire était de comparer, en terme de stéroïdogénèse *in vitro*, les deux groupes de poissons au niveau de leur réponse à des traitements hormonaux (hCG et IGF-I). Si la littérature ne renseigne rien en ce qui concerne le recours à ces hormones chez la perche commune, plusieurs auteurs rapportent l'utilisation *in vitro* de l'hCG et de l'IGF-I, seules ou en combinaison (Behl et Pandey, 1999 ; Maestro et al., 1997 ; Kagawa et al., 2003). Ainsi, chez la perchaude soumise à des conditions naturelles, l'hCG stimule la sécrétion *in vitro* de 17β -oestradiol durant toute la vitellogenèse, et de testostérone surtout en début de vitellogenèse (Dabrowski et al., 2002).

Dans notre étude, les tissus ovariens incubés avec ou sans hormones exogènes montrent une diminution de la réponse avec le temps, en relation avec la diminution de la capacité de stéroïdogénèse décrite précédemment *in vivo*. De plus, la capacité de stéroïdogénèse est plus élevée pour les ovaires matures que pour les non matures en cas de stimulation par l'hCG et non par l'IGF-I. Ce dernier traitement entraîne une plus forte stimulation quelle que soit la dose. Ainsi, avec l'IGF-I, le relargage de testostérone est sans exception comparable chez les poissons matures et non matures. Sauf en février, les réponses pour la sécrétion de 17β -oestradiol sont également comparables entre les différents types de tissus ovariens. Chez d'autres espèces de poissons, l'IGF-I ne semble pas être si efficace que chez la perche. En effet, Maestro et al. (1997) rapportent que l'IGF-I n'affecte positivement la production de 17β -oestradiol qu'en présence de testostérone dans le milieu d'incubation (Maestro et al., 1997). Soulignons aussi que Behl et Pandey (1999) ont montré que la sensibilité *in vitro* des follicules de carpe commune vis-à-vis d'IGF-I est présent chez des follicules développés. Ainsi, pendant les premières 48h d'incubation, l'IGF-I n'a pas d'effet sur le processus d'aromatation dans une populations de petits follicules (< 2mm), seule une population de follicules larges (>2mm) répondant positivement. L'utilisation de doses d'IGF-I se montre efficace chez la perche, provoquant un relargage supérieur pour la testostérone et le 17β -oestradiol. Behl et Pandey (1999) montrent ainsi que l'accumulation d'oestradiol durant les 48 heures d'une culture est affectée de manière dépendante de la dose (0,3-100ng/ml). Une dose double d'hCG ne donne quant à elle des résultats supérieurs que pour le relargage de 17β -oestradiol dans notre étude.

Les traitements combinant l'IGF-I et l'hCG, donnent de moins bons résultats, des relargages comparables étant le fruit d'observations ponctuelles. Des résultats moins bons de la combinaison reflètent peut-être le chevauchement des effets propres de ces deux facteurs. Toutefois, Kagawa et al. (2003) ont montré chez la daurade japonaise que l'IGF-I amplifie les effets d'une stimulation gonadotrope en terme d'activité aromatasase, probablement par une multiplication des récepteurs à la LH.

Dans notre travail, la capacité de stéroïdogénèse *in vitro* n'est pas significativement différente entre les poissons non matures témoins et les injectés. Cela peut s'expliquer par la courte durée de stimulation *in vivo* et la simplification de la réalité biologique qu'offre la culture *in vitro*. Dans le milieu de culture, les ovocytes sont soustraits à l'influence de la stimulation endogène, la réponse de stéroïdogénèse n'étant alors que principalement dictée par la combinaison hormonale présente dans le milieu de culture. Les ovocytes des poissons injectés présenteraient encore simplement quelques traces de la stimulation reçue *in vivo*.

Chapitre 5: Conclusions et perspectives

Dans le but de contribuer à une meilleure compréhension des processus d'inhibition de la gonadogenèse chez les poissons non vernalisés, nous avons procédé à deux approches expérimentales à partir de deux groupes de poissons, l'un en maturation et l'autre maintenu en conditions contrôlées (12L:12O et 20-22°C). Une approche *in vivo*, tout d'abord, a permis l'identification du stade critique de développement ovocytaire. Nos résultats montrent que les poissons en conditions constantes de température et photopériode n'atteignent pas le stade de vitellogenèse exogène à cause d'un faible niveau circulant de stéroïdes. Néanmoins la capacité potentielle de stéroïdogenèse ne semble pas altérée car l'activité aromatasase n'est pas diminuée et d'autre part une stimulation gonadotrope induit une production de stéroïde comparable à celles des poissons en conditions naturelles au mois de mars. Les résultats indiquent aussi que l'efficacité de cette action stimulante augmente tout au long de la période de reproduction.

Une seconde approche, *in vitro* cette fois, a permis de comparer les capacités de réponse en terme de stéroïdogenèse, en présence de différents traitements hormonaux (hCG et IGF-I). Différentes doses ont été testées, ainsi que la combinaison des deux hormones. Les résultats de cette étude *in vitro* confirment la capacité potentielle des ovaires des poissons en conditions constantes de répondre positivement à une stimulation gonadotrope, les réponses étant comparables aux ovaires des poissons en conditions naturelles. Les résultats les meilleurs semblent être obtenus par le facteur de croissance IGF-I, et cela aux deux doses étudiées.

A l'avenir, il sera nécessaire de confirmer ces résultats qui sont observés pour la première fois chez la perche commune. De même, concernant l'approche *in vivo*, il aurait été intéressant d'observer l'effet de la stimulation gonadotrope chez une partie des poissons vernalisés. Plusieurs axes de recherches peuvent être définis. Il sera nécessaire de mener une démarche multidisciplinaire afin de caractériser, à différents niveaux d'organisation, les mécanismes qui inhibent chez les poissons non vernalisés, la mise en place de la vitellogenèse exogène. On pourra envisager de recourir à des traitements gonadotropes continus *in vivo* chez des poissons en conditions constantes, au lieu d'une injection ponctuelle comme dans notre travail. Une voie prometteuse semble être l'étude de l'impact de l'IGF-I sur la stéroïdogenèse *in vitro*.

Enfin, les résultats intéressants de la réponse de stéroïdogenèse *in vitro* doivent être précisés afin de permettre eux aussi une meilleure compréhension de l'inhibition de la stéroïdogenèse. Il est probablement possible d'améliorer l'effet combiné des deux hormones, en testant par exemple d'autres doses pendant une culture plus longue. A l'issue d'une telle culture, il serait intéressant de déterminer le stade ovocytaire le plus avancé pour chaque combinaison hormonale. L'optimisation des conditions expérimentales semble être un prérequis avant la répétition des mesures, pour avoir des résultats réellement comparables. Le protocole de la culture *in vitro* implique de mettre en incubation des morceaux de tissus pesant 0,2g. La qualité de la pesée peut être une source de variabilité importante. Les ovaires ne présentaient aucune structure compacte permettant une manipulation aisée, l'amas de follicules ayant plutôt tendance à se désagréger. Une optimisation de cette opération est également à rechercher.

Chapitre 6: Références bibliographiques

1. Afonso, L. O., Iwama, G. K., Smith, J. & Donaldson, E. M. Effects of the aromatase inhibitor Fadrozole on plasma sex steroid secretion and ovulation rate in female coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, close to final maturation. *Gen Comp Endocrinol* 113, 221-9 (1999).
2. Arnol, C. R. Controlled year-round spawning of red drum, *Sciaenops ocellatus* in captivity. *Contrib Mar Sci* 30, 65-70 (1988).
3. Behl, R. & Pandey, R. S. Effect of insulin-like growth factor-1 on steroidogenesis in cultured carp ovarian follicles: interactions with estradiol. *Indian J Exp Biol* 37, 138-42 (1999).
4. Bieniarz, K. & Epler, P. Advances in reproductive endocrinology of fish. *J Physiol Pharmacol* 43 215-22 (1992).
5. Billard, R. & Breton, B. Control of reproduction and fish farming. In: B. Lofts & W.N. Holmes (eds), *Current trends in comparative endocrinology*, 1221-1229. Hong Kong University press, Hong Kong (1985).
6. Billard, R. & Breton, B. Sensibilité à la température des différentes étapes de la reproduction chez la truite arc-en-ciel. *Cahiers du Laboratoire de Montereau* 5, 5-24 (1977).
7. Borg, B., Peute, J., Reschke, M. & Van des Hurk, R. Effects of photoperiod and temperature on testes,. (1986).
8. Breton, B. & Weil, C. Effets du LH/FSH-RH synthétique et d'extraits hypothalamiques de carpe sur la sécrétion d'hormone gonadotrope in vivo chez la carpe (*Cyprinus carpio* L.). *C.R. Acad. Sci. Paris* 27, 2061-2064 (1973).
9. Breton, B., Maise, G. & Lemenn, E. Contrôle photopériodique de la saison de reproduction en salmoniculture: une expérience pilote en Bretagne. *Bull. Fr. Piscic* 288, 35-45 (1983).
10. Bromage, N., Elliot, J. A. K., Springate, J. R. C. & Whitehead, C. The effects of constant photoperiods on the timing of spawning in the rainbow trout. *Aquaculture* 43, 213-223 (1984).
11. Bromage, N. et al. Photoperiodism and the control of reproduction and development in farmed fish. In: B. Lahlou & P. Vitiello (eds), *Coastal and estuarine studies*, 43, *Aquaculture: fundamental and applied research*, 81-102. American Geophysical Union, Washington, D.C. (1993).
12. Bromage, N. R., Porter, M. & Randall, C. The environmental regulation of maturation in farmed fish finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197, 63-98 (2001).
13. Bromage, N. R. et al. Photoperiodic control of teleost reproduction *Prog Comp Endocrinol* 342 (1990).
14. Canario, A. V. & Scott, A. P. Plasma levels of ovarian steroids, including 17 alpha-20 alpha-dihydroxy-4-pregnen-3-one and 3 beta,17 alpha,20 alpha-trihydroxy-5 beta-pregnane, in female dabs (*Limanda limanda*)--marine flatfish--induced to mature and ovulate with human chorionic gonadotrophin. *Gen Comp Endocrinol* 77, 177-91 (1990).
15. Carlson, A. R. & Hale, J. G. Early maturation of brook trout in the laboratory. *Prog Fish Cult* 35, 150-153 (1973).
16. Ciereszko, R. E., Dabrowsky, K. & Ciereszko, A. Effects of temperature and

- photoperiod on reproduction of female yellow perch *Perca flavescens*: Plasma concentrations of steroid hormone, spontaneous and induced ovulation, and quality of eggs. *J World Aquacult Soc* 28, 344-356 (1997).
17. Craig, V. S., Berlinsky, D. L. & Hodson, R. G. Reproduction. In: R.M. Harrell (Ed). *Striped bass and other morone culture, development in aquaculture and fisheries science*, vol. 30, Elsevier Sciences, p. 11-73. (1997).
 18. Craig, J. F. *The biology of perch and related fish*, Croom Helm, London. 333p. (1987).
 19. Cyr, D. G. & Eales, J. G. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Rev Fish Biol Fish* 6, 165-200 (1996).
 20. Dabrowski, K., Ciereszko, R. E., Ciereszko, A. & Ottobre, J. S. In vitro production of ovarian steroids in yellow perch (*Perca flavescens*): effects of photothermal manipulation, gonadotropin and phorbol ester. *Reprod Biol* 2, 163-86 (2002).
 21. Dabrowski, K. et al. Reproductive physiology of yellow perch (*Perca flavescens*): environmental and endocrinological cues. *J Appl Ichthyol* 12, 139-148 (1996).
 22. Dabrowski, K., Ciereszko, A., Ramseyer, L., Culver, D. & Kestemont, P. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and ovulation in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquaculture* 120, 171-180 (1994).
 23. Dasgupta, S., Basu, D., Kumar, L. R. & Bhattacharya, S. Insulin alone can lead to a withdrawal of meiotic arrest in the carp oocyte. *J Biosci* 26, 341-7 (2001).
 24. Davies, P. & Bromage, N. R. The effects of fluctuating seasonal and constant temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in females rainbow trout. In: Scott, A.P., Sumpter, J., Kime, D., Roffe, M. (Eds.). *Proceedings of IV International Symposium of reproductive physiology of fish. Fish Symp.* 91, p.166. (1991).
 25. Degani, G. & Boker, R. Sensitivity to maturation-inducing steroids and gonadotropin in the oocytes of blue gourami *Trichogaster trichopterus* (Anabantidae, Pallas, 1170). *Gen Comp Endocrinol* 85, 430-439 (1992).
 26. Devauchelle, N. Reproduction décalée du bar (*Dicentrarchus labrax*) et de la daurade (*Sparus aurata*). In: Barnabé, G., Billard, R. (Eds.). *L'aquaculture du bar et des sparidés*, INRA, Paris, p. 53-61. (1984).
 27. Donaldson, E. M. & Hunter, G. A. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes In: Hoar, W.S., Randall, D.J. & Donaldson, E.M. (Eds). *Reproduction*, vol. IXB, Academic Press, Orlando, FL, pp.351-403. (1983).
 28. Duncan, N. J., Selkirk, C., Porter, M., Magwood, S. & Bromage, N. R. The effect of altered photoperiods on maturation of male and female Atlantic Salmon (*Salmo salar*), observations of different responses and mechanisms. In: Taranger, G.L., Norberg, B., Stefansson, S., Hansen, T., Kjesbu, O., Andersson, E. (Eds.). *Proceedings of VIth International Symposium on reproductive physiology of fish*, Bergen 4-9 July 99, p.344. (1999).
 29. Epler, P., Kime, D. E., Son, N. K. & Bieniarz, K. Effects of carp hypophyseal homogenate doses, incubation times, and temperatures on carp oocyte maturation and steroidogenesis in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 66, 343-52 (1987).
 30. Fontaine, P. et al. Involvement of sex steroids in final stages of oogenesis in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Fish physiology and Biochemistry* 28, 331-

- 332 (2003).
31. Fontaine, P. et al. Involvement of sex steroids in final stages of oogenesis in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Fish Physiol Biochem* 28, 331-332 (2003).
 32. Galas, J., Epler, P. & Stoklosowa, S. Seasonal response of carp (*Cyprinus carpio*) ovarian cells to stimulation by various hormones as measured by steroid secretion: tissue culture approach. *Endocrine regulations* 33, 125-132 (1999).
 33. Garcia-Alonso, J. & Vizziano, D. Induction of oocyte maturation in the white croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae) by human chorionic gonadotropin. *Braz J Biol* 64 (2004).
 34. Gillet, C., Rideau, I. & Breton, B. Effects of acclimatization to long days et the end of the reproductive cycle on the timing of ovulation and on gonadotropin secretion in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Bull Fr Pêche Piscic* 350-351, 241-253 (1998).
 35. Girin, M. & Devauchelle, N. Décalage de la période de reproduction par raccourcissement des cycles photopériodiques et thermiques chez des poissons marins. *Ann Biol anim Bioch Biophys* 18, 1059-1065 (1978).
 36. Habibi, H. R., Van Der Kraak, G., Fraser, R. & Peter, R. E. Effect of a teleost GnRH analog on steroidogenesis by the follicle-enclosed goldfish oocytes, in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 76, 95-105 (1989).
 37. Habibi, H. R., Van Der Kraak, G., Bulanski, E. & Peter, R. E. Effect of teleost GnRH on reinitiation of oocyte meiosis in goldfish, in vitro. *Am J Physiol* 255, 268-73 (1988).
 38. Habibi, H. R. et al. Fonctionnal relationship betweenne receptor binding and biological activity for agonists of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones in the pituitary of goldfish (*Carassius auratus*). *Biol Reprod* 40, 1152-1161 (1989).
 39. Henderson, N. Influence of light and temperature on the reproductive cycle of the eastern brook trout. *J Fish Res Board Can* 20, 859-897 (1963).
 40. Henry, J. C., McLean, E., Mayer, I. & Donaldson, E. M. Inductions of precocios maturation in masculinized Atlantic salmon by treatment with sustained-release LHRH and testosterone. *Aquacult Int* 6, 261-168 (1998).
 41. Hodson, R. & Sullivan, C. V. Induced maturation and spawning of domestic and wild striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), broodstock with implanted GnRH analogue and injected hCG. *Aquacult Fish Manage* 24, 389-398 (1993).
 42. Hoover, E. E. & Hubbard, H. Modification of the sexual cycle in trout by control of light. *Copeia* 4, 206-210 (1937).
 43. Houssay, B. A. Accion sexual de la hipofisis en los peces y reptiles. *Rev soc Arg Biol* 106, 686-688 (1930).
 44. Hunter, J. R., Lo, N. C. H. & Leong, R. J. H. Batch fecundity in multiple spawning fishes. In: Lasker, R., (ed.), *An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: Application to the northern anchovy, *Engraulis mordax**. NOAA Technical Report NMFS; 36, 67-78. (1985).
 45. Kagawa, H., Kobayashi, M., Hasegawa, Y. & Aida, K. Insulin and insulin-like growth factors I and II induce final maturation of oocytes of red seabream, *Pagrus major*, in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 95, 293-300 (1994).
 46. Kagawa, H., Gen, K., Okuzawa, K. & Tanaka, H. Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. *Biol Reprod* 68, 1562-8 (2003).

47. Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K. & Hirose, K. Development of maturational competence of oocytes of red seabream, *Pagrus major*, after human chorionic gonadotropin treatment in vitro requires RNA and proteins synthesis. *Gen Comp Endocrinol* 94, 199-206 (1994).
48. Kayes, T. B. & Calber, H. E. Effects of photoperiod and temperature on the spawning of yellow perch (*Perca flavescens*). *Proc World Maric Soc* 10, 306-316 (1979).
49. Kime, D. E. et al. The temporal sequence of changes in oocyte maturation and ovarian steroid hormone production during induced ovulation in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Gen Comp Endocrinol* 68, 313-21 (1987).
50. King, W. t., Thomas, P. & Sullivan, C. V. Hormonal regulation of final maturation of striped bass oocytes in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 96, 223-33 (1994).
51. Kissil, G. W., Lupatsch, I., Elizur, A. & Zohar, Y. Long photoperiod delayed spawning and resulting increased somatic growth in gilthead seabream (*Sparus auratus*). *Aquaculture* 3-4, 363-379 (2000).
52. Kohler, C. C., Sheeman, R. J., Habicht, C., Madison, J. A. & Kayes, T. B. Habituation to captivity and controlled spawning of white bass. *Trans Amer Fish Soc* 123, 964-974 (1994).
53. Kolkovski, S. & Dabrowsky, K. Off-season spawning of yellow perch. *Progress Fish Culturist* 60, 133-136 (1998).
54. Levavi-Zermonsky, B. & Yaron, Z. Changes in gonadotropin and ovarian steroids associated with oocytes maturation during spawning induction in the carp. *Gen Comp Endocrinol* 62, 89-98 (1986).
55. Maestro, M. A. et al. Ovarian receptors for insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) and effects of IGF-I on steroid production by isolated follicular layers of the preovulatory coho salmon ovarian follicle. *Gen Comp Endocrinol* 106, 189-201 (1997).
56. Malison, J. A., L.S., P., Kayes, T. B., Hansen, J. F. & Held, J. A. Induction of out-of-season spawning in walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquaculture* 163, 151-161 (1998).
57. Malservisi, A. & Magnin, E. in *Nat Can* 929-945 (1968).
58. Mananos, E., Zanuy, S. & Carrillo, M. Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effect on gonadal development and plasma estradiol and vitellogenin levels. *Fish Physiol Biochem* 16, 211-222 (1997).
59. Marza, V. D. *Histophysiologie de l'ovogenèse*. Hermann, Paris. (1938).
60. Mc Carty, C. E., Chamberlain, G. W., Miget, R. J. & Haby, M. G. Design and operation of a photoperiod/temperature spawning system for red drum. *Red Drum Aquacult*, 44-45 (1990).
61. Migaud, H., Gardeur, J. N., Kestemont, P. & Fontaine, P. Off-season spawning of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture international* 12, 87-102 (2003).
62. Migaud, H. et al. Synthesis of sex steroids in final oocyte maturation and induced ovulation in female Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquat. Living Resour* 16, 380-388 (2003).
63. Migaud, H., Fontaine, P., Kestemont, P., Wang, N. & Brun-Bellut, J. Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *J Aquaculture* (2004).
64. Migaud, H. et al. Influence of photoperiod regimes on the Eurasian perch

- gonadogenesis and spawning. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 395-397 (2003).
65. Migaud, H., Fontaine, P., Kestemont, P., Wang, N. & Brun-Bellut, J. Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture* (2004).
 66. Migaud, H., Fontaine, P., Sulisty, I., Kestemont, P. & Gardeur, J. N. Induction of out-of-season spawning in Eurasian perch *Perca fluviatilis*: effects of the cooling and chilling period length. *World Aquaculture Society congress, AQUA 2000, Nice*, p. 473 (2001).
 67. Mylonas, C. C., Hinshaw, J. M. & Sullivan, C. V. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture* 106, 379-392 (1992).
 68. Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K. & Hirose, K. Milt production in the Japanese eel *Anguilla japonica* induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin. *Fish Sci* 62, 44-49 (1996).
 69. Ohta, H. et al. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol Biochem* 17, 163-169 (1997).
 70. Pati, D. & Habibi, H. R. Direct action of GnRH variants on goldfish oocyte meiosis and follicular steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 160, 75-88 (2000).
 71. Patino, R. & Thomas, P. Gonadotropin stimulates 17 alpha,20 beta,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one production from endogenous substrates in Atlantic croaker ovarian follicles undergoing final maturation in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 78, 474-8 (1990).
 72. Patino, R. & Thomas, P. Effects of gonadotropin on ovarian intrafollicular processes during the development of oocyte maturational competence in a teleost, the Atlantic croaker: evidence for two distinct stages of gonadotropin control of final oocyte maturation. *Biol reprod* 43, 818-827 (1990).
 73. Patino, R., Yoshizaki, G., Thomas, P. & Kagawa, H. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129, 427-439 (2001).
 74. Patino, R. & Kagawa, H. Regulation of gap junctions and oocyte maturational competence by gonadotropin and insulin-like growth factor-1 in ovarian follicles of red seabream. *Gen Comp Endocrinol* 115, 454-462 (1999).
 75. Peter, R. E., Habibi, H. R., Marchant, T. A. & Nahorniak, C. S. Vertebrate GnRH: phylogeny and structure-function relationships. *Ann NY Acad Sci* 519, 299-309 (1987).
 76. Peter, R. E., Lin, H.R., Van Der Kraak, G. & Little, M. Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. In: Muir, J.F., Roberts, R.J. (Eds.), *Recent advances in aquaculture*. Blackwell Scientific, New York, 613 pp. (1993).
 77. Peter, R. E. & Yu, K. L. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev Fish Biol Fish* 7, 173-197 (1997).
 78. Poncin, P. Observations sur le contrôle environnemental de la reproduction du barbeau fluviatile *Barbus barbus* (L.) en captivité. Effets de la température et de la photopériode. *Cah Ethol Appliquée* 4, 357-358 (1984).
 79. Poncin, P., Mélard, C. & Philippart, J. C. Utilisation de la température et de la photopériode pour contrôler la maturation sexuelle en captivité de trois espèces de poissons cyprinidés européens : *Barbus barbus* (L.), *Leuciscus cephalus* (L.) et *Tinca tinca* (L.) - Résultats préliminaires. *Bull Fr Pêche Piscic*

- 304, 1-12 (1987).
80. Poncin, P. Effects of different photoperiods on the reproduction of the barbel, *Barbus barbus* (L.) reared at constant temperature. *J Fish Biol* 35, 395-400 (1989).
 81. Rinchard, J., Poncin, P. & Kestemont, P. Croissacne ovocytaire et régulation stéroïdienne chez les poissons à pontes unques et multiples: une revue. *Annls Limnol* 34, 211-225 (1998).
 82. Rougeot, C. et al. Comparative study of the reproductive characteristics of XY male and hormonally sex-reversed XX male Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Theriogenology* 62, 790-800 (2004).
 83. Scott, A. P. & Canario, A. V. Plasma levels of ovarian steroids, including 17 alpha, 21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione and 3 alpha,17 alpha, 21-trihydroxy-5 beta-pregnan-20-one, in female plaice (*Pleuronectes platessa*) induced to mature with human chorionic gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol* 78, 286-98 (1990).
 84. Scott, A. P., Witthames, P. R., Turner, R. J. & Canario, A. V. M. Plasma concentrations of ovarian steroids in relation to oocyte final maturation and ovulation in female plaice sampled at sea *J Fish Biol* 52, 128-145 (1998).
 85. Scott, D. B. C. Environmental timing and the control of reproduction in teleost fish. *Symp Zool Soc Lond* 44, 105-132 (197ç).
 86. Selman, K. & Wallace, R. A. Cellular aspects od oocyte growth in teleosts. *Zool Sci* 6, 211-231 (1989).
 87. Shiraishi, T. et al. Reproductive parameters of the chub mackerel *Scomber japonicus* estimated from hCG-induced final oocyte maturation and ovulation in captivity. (2005).
 88. Singh, H. & Thomas, P. Mechanism of stimulatory action of growth hormone on ovarian steroidogenesis in spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. *General and comparative endocrinology* 89, 341-353 (1993).
 89. Srivastava, R. K. & Van Der Kraak, G. Effects of activators of different intracellular signaling pathways on steroid production by goldfish vitellogenic ovarian follicles. *Gen Comp Endocrinol* 93, 181-191 (1994).
 90. Srivastava, R. K. & Van Der Kraak, G. Insulin as an amplifier of gonadotropin action on steroid production: mechanisms and sites of action in goldfish prematuration full-grown ovarian follicles. *General and comparative endocrinology* 95, 60-70 (1994).
 91. Sulisty, I. et al. Reproductive cycle and plasma levels of sex steroids in female Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquat Living Resour* 11, 101-110 (1998).
 92. Sulisty, I. et al. Reproductive cycle and plasma levels steroids in male Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquat Living Resour* 13, 99-106 (2000).
 93. Sulisty, I. et al. Effect of photothermal manipulations on reproductive response in perch *P. fluviatilis* L. In: Creswell L., Harache, Y. (Eds.). 2nd International Workshop on aquaculture of percid fish. Martinique, May 4, European aquaculture society, 349-350. (1997).
 94. Takashima, F. & Yamada, Y. Control of maturation in masu salmon by manipulation of photoperiod. *Aquaculture* 43, 243-257 (1984).
 95. Taranger, G. L. et al. Photoperiodic control of growth , incidence of sexual maturation and ovulation in adult Atlantic salmon. In: Scott, A.P., Sumpter, J., Kime, D., Roffe, M. (Eds.). *Proceedings of IV International Symposium on reproductive physiology of fish. Fish Symp* 91, pp 143-147, Sheffield. (1991).

96. Taranger, G. L. et al. Abrupt changes in photoperiod affect age of maturity, timing of ovulation and plasma testosterone and oestradiol-17B profiles in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 162, 85-98 (1998).
97. Taranger, G. L. et al. Mechanisms underlying photoperiod effects on age at maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 177, 47-60 (1999).
98. Thalathiah, S., Ahmad, A. O. & Zaini, M. S. Induced spawning techniques practised at Batu Berendam, Melaka, Malaysia. *Aquaculture* 74, 23-33 (1988).
99. Thomas, P., Pinter, J. & Das, S. Upregulation of the maturation-inducing steroid membrane receptor in spotted seatrout ovaries by gonadotropin during oocyte maturation and its physiological significance. *Biol reprod* 64, 21-29 (2001).
100. Thomas, P. & Trant, J. M. Evidence that 17alpha,20beta,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one is a maturation inducing hormone in spotted seatrout. *Fish Physiol. Biochem* 7, 185-191 (1989).
101. Thomas, P. & Holt, G. J. Red drum and other sciaenids. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell, Oxford, pp. 118-137. (1995).
102. Trant, J. M. & Thomas, P. Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced in vitro by ovaries of Atlantic croaker oocytes. *Gen Comp Endocrinol* 75, 405-412 (1989).
103. Van Der Kraak, G., Dye, H. M. & Donaldson, E. M. Effects of LH-RH and Des-Gly10[D-Ala6]LH-RH-ethylamide on plasma sex steroid profiles in adult female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol* 55, 36-45 (1984).
104. Van Der Kraak, G., Lin, H. R., Donaldson, E. M., Dye, H. M. & Hunter, G. A. Effects of LH-RH and Des-Gly10[D-Ala6]LH-RH-ethylamide on plasma gonadotropin levels and oocyte maturation in adult female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol* 49, 470-6 (1983).
105. Wallace, R. A. & Selman, K. Cellular dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am Zool* 21, 325-343 (1981).
106. Weber, G. M. & Sullivan, C. V. Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro final oocyte maturation and ovarian steroidogenesis in striped bass, *Morone saxatilis*. *Biol Reprod* 63, 1049-57 (2000).
107. Weber, G. M. & Sullivan, C. V. Insulin-like growth factor-I induces oocyte maturational competence but not meiotic resumption in white bass (*Morone chrysops*) follicles in vitro: evidence for rapid evolution of insulin-like growth factor action. *Biol Reprod* 72, 1177-86 (2005).
108. Weber, G. M. & Sullivan, C. V. In vitro hormone induction of final oocyte maturation in striped bass (*Morone saxatilis*) follicle is inhibited by blockers of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129, 467-473 (2001).
109. Whitehead, C. & Bromage, N. R. Effects of constant long and short day photoperiods on the reproductive physiology and spawning of the rainbow trout. *J Endocrinol* 87, 6-7 (1980).
110. York, W. S., Patino, R. & Thomas, P. Ultrastructural changes in follicle cell-oocyte associations during development and maturation of the ovarian follicle in Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol* 92, 402-418 (1993).
111. Young, G., Kagawa, H. & Nagahama, Y. Oocyte maturation in the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): in vitro effects of salmon gonadotropin, steroids, and cyanoketone (an inhibitor of 3 beta-hydroxy-delta 5-steroid dehydrogenase). *J Exp Zool* 224, 276-75 (1982).

112. Zohar, Y. & Mylonas, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99-136 (2001).
113. Zohar, Y. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: basic and applied considerations. In: Zohar, Y., Breton, B. (Eds.), *Reproduction in fish: Basic and applied aspects in endocrinology and genetics*. INRA Press, Paris, p.47-62. (1988).
114. Zohar, Y. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. In Shilo, M., Sarig, S. (Eds.), *Fish culture in warm water systems: problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, pp.65-119. (1989).
115. Zohar, Y. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. *Bull Natl Res Inst Aquacult Suppl.* 3, 43-48 (1996).
116. Zohar, Y., Elizur, A., Sherwood, N. M., Rivier, J. F. & Zmora, N. Gonadotropin-releasing potencies of the three native forms of gonadotropin-releasing hormones present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen Comp Endocrinol* 97, 289-299 (1995).