

AGROCAMPUS OUEST

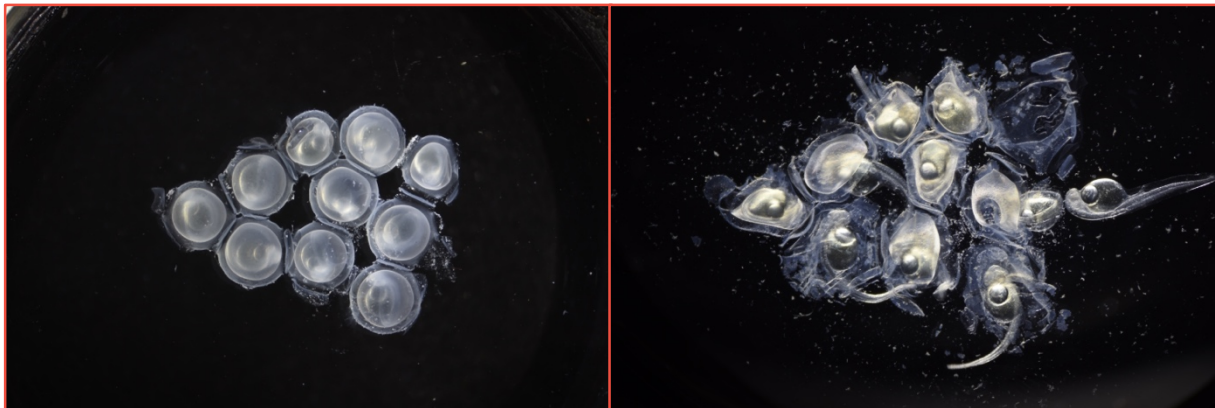
- CFR Angers
 CFR Rennes



Année universitaire : 2016 - 2017	Mémoire de fin d'études <input checked="" type="checkbox"/> d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage <input type="checkbox"/> de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage <input type="checkbox"/> d'un autre établissement (Étudiant arrivé en M2)
Spécialité : Agronomie	
Spécialisation (et option éventuelle) :	
Sciences halieutiques et aquacole (Aquaculture)	

Utilisation d'agents chimiques pour l'amélioration des phases post-fécondation chez la perche européenne *Perca fluviatilis*

Par : Morgan LECOQ



Soutenu à RENNES, le 13 septembre 2017

Devant le jury composé de :

Président : Dominique OMBREDANE

Maître de stage : Manuel POMPINI

Enseignant référent : DOMINIQUE OMBREDANE

Autres membres du jury :

Élodie REVEILLAC

Alexis FOSTIER

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation
«Patrimoine-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»
disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Remerciements

Ces remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant, de près ou de loin, permis la réalisation de ce travail, qui signe la fin d'une longue étape de la vie et le début d'une nouvelle encore plus longue.

Je remercie Yves MOUTOUNET, pour les échanges que nous avons pu avoir, et pour m'avoir fait confiance en me permettant de contacter la direction de l'écloserie Percitech.

Je ne peux qu'être reconnaissant envers toute l'équipe de cette écloserie, avec qui j'ai partagé ces 6 mois, qui m'ont fait vivre une expérience plus forte qu'un simple stage. En particulier Marc MICHAUD, collègue devenu ami, avec qui les heures les plus dures semblaient plus courtes.

Un grand merci à mes encadrants. Nelson DEOCARES, qui m'a formé et appris beaucoup sur l'aquaculture. Guirec DEWAVRIN, pour m'avoir donné ma chance à l'écloserie. Et Manuel POMPINI, pour m'avoir fait confiance à chaque étape, à chaque expérience, avec qui de simples propositions se transformaient en riches discussions.

Je remercie bien évidemment ma famille, pour m'avoir toujours suivi et aidé à pouvoir accomplir tout cela.

Enfin je remercie Marion, pour son soutien, ses longues et attentionnées relectures et ses conseils, jusqu'au dernier moment de la rédaction de ce rapport.

Table des matières

LISTE DES ANNEXES	I
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	II
LISTE DES FIGURES.....	II
LISTE DES TABLEUX	III
INTRODUCTION	1
1. CONTEXTE.....	4
1.1. LA PERCHE.....	4
1.2. CONDITIONS D'ELEVAGE CHEZ VALPERCA	5
1.3. LE RUBAN ET LES ŒUFS.....	6
1.4. LES PRODUITS	7
1.4.1. L'ACIDE TANNIQUE.....	9
1.4.2. PROTEASES.....	9
1.4.3. HYPOCHLORITE DE SODIUM	11
1.4.4. JUS D'ANANAS	11
1.4.4.1. Bromélaïne	11
1.4.4.2. Papaine.....	12
2. DISSOLUTION DU RUBAN	12
2.1. MATERIELS ET METHODES.....	12
2.1.1. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	12
2.1.2. CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	13
2.2. RESULTATS	14
2.2.1. OBSERVATIONS	14
2.2.2. MESURES.....	15
2.3. DISCUSSION.....	16
3. SYNCHRONISATION DES ECLOSIONS	17
3.1. MATERIEL ET METHODES	17
3.1.1. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	17
3.1.2. CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	18
3.1.4. MESURES.....	20
3.2. RESULTATS	21
3.2.1. TEST PRELIMINAIRE.....	21
3.2.2. TEST FINAL.....	22
3.3. DISCUSSION.....	25
4. DISCUSSION	26
CONCLUSION.....	27
BIBLIOGRAPHIE	29
SITOGRAFIE	35
ANNEXES.....	36

ANNEXE I	36
ANNEXE II	37
ANNEXE III	38
ANNEXE IV	39
ANNEXE V	40

Liste des annexes

- Annexe I : Plans d'expérience des tests sur la synchronisation des éclosions
- Annexe II : Courbe de température de l'eau d'incubation durant le test préliminaire
- Annexe III : Courbe de température de l'eau d'incubation durant le test final
- Annexe IV : Représentations graphiques de l'évolution des taux d'éclosions lors du test préliminaire, pour 5 et 15 minutes de réaction

Liste des illustrations

Liste des figures

- Figure 1. Évolution temporelle de la production de *Perca fluviatilis* en Europe de 1950 à 2015. Code couleur : Pêche, **Aquaculture** (FIGIS, 2017) 2
- Figure 2. Photographie d'une perche européenne *Perca fluviatilis* © Wikipédia Commons 4
- Figure 3. Photographie d'œufs de perche, a. Ruban en milieu naturel, b. Observation au microscope d'œufs de perche mettant en évidence le rôle de la ZRE dans la formation du ruban 6
- Figure 4. Photographies au MEB de l'ultrastructure du ruban, a. Réseau réticulaire de microtubules dans le ruban, b. Différentes formes de pores (i) dans le réseau de microtubules. D'après Formicki *et al.* (2009) 7
- Figure 5. Principe de manipulation pour la mesure de la distance de rupture 13
- Figure 6. Boîtes de dispersion des distances de rupture à différents temps de réactions pour les œufs traités à la papaine 15
- Figure 7. Évolution temporelle des taux d'éclosion – Expérience préliminaire – 1 minute de réaction. Code couleur : **Alcalase®** ; **Hypochlorite de sodium** ; **Bromélaïne** ; **Papaine** ; **Témoin**. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards en valeur positive et négative..... 22
- Figure 8. Évolution des taux d'éclosion moyen par femelle dans le temps après la fin de la réaction, par traitement. Les traits pleins correspondent au témoin (—). Les pointillés représentent le traitement Alcalase® (----). Code couleur : **Femelle F1**, **Femelle F2**, **Femelle F3**, **Femelle F4**, **Femelle F5**. Les barres d'erreur représentent les erreurs standard en valeur positive et négative 23
- Figure 9. Boîtes de dispersion des taux de survie pour chaque femelle et chaque traitement. Les traits pleins correspondent au témoin (—). Les pointillés représentent le traitement Alcalase® (----). Code couleur : **Femelle F1**, **Femelle F2**, **Femelle F3**, **Femelle F4**, **Femelle F5** 24
- Figure 10. Boîtes de dispersion des longueurs des larves en fonction des femelles, traitement confondu 24
- Figure 11. Boîtes de dispersion des log(ufc)/mL pour chaque traitement 25

Liste des tableaux

- Tableau 1. Études traitant de l'utilisation de produits chimiques dans le traitement de l'adhésivité des œufs de différentes espèces de poissons 8
- Tableau 2. Utilisation de l'acide tannique dans différentes études 9
- Tableau 3. Utilisation des protéases dans différentes études 10
- Tableau 4. Probabilités critiques associées aux ANOVA 15
- Tableau 5. Nombres d'œufs normalement développés dans chaque échantillon 18
- Tableau 6. Température de l'eau (°C) dans les incubateurs pendant l'incubation des échantillons du test préliminaire 19
- Tableau 7. Température de l'eau (°C) dans les incubateurs pendant l'incubation des échantillons du test final 19
- Tableau 8. Indication sur les temps de prises de mesures après la réaction et l'âge des larves..... 20

Introduction

Regroupant de nombreuses espèces à travers le monde, l'aquaculture joue aujourd'hui un rôle majeur dans l'apport de produits aquatiques, avec plus de 76 millions de tonnes produites en 2015. Cela représente 45% de la production totale. À l'échelle mondiale, l'aquaculture continentale est majoritaire par rapport à l'aquaculture marine (45 097 349 tonnes de poissons contre 6 810 121) (Xiaowei, 2017). Cependant, cette production est basée principalement sur deux espèces : la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et la carpe commune *Cyprinus carpio*. Ces dernières représentent respectivement 40 et 32% de la production d'eau douce européenne, avec 190 000 tonnes et 153 000 tonnes (FIGIS, 2017). La demande constante de la part des consommateurs pour ces deux espèces explique une focalisation sur cette production, laissant de côté le développement à grande échelle de l'élevage des autres espèces. Une diversification et un changement des modes de production sont aujourd'hui indispensables pour augmenter la production aquacole (Fontaine *et al.*, 2009).

Cette diversification est déjà visible. D'après la FAO, entre 1950 et 2005, le nombre d'espèces élevées est passé de 43 à 219. Malgré tout, la production croît plus vite que le nombre d'espèces élevées, principalement à cause de la raison évoquée précédemment. Si nous comparons l'élevage de nos jours à celui d'il y a 40 ans, près d'un quart des espèces actuelles n'était pas élevées. Cela prouve combien la diversification a joué un rôle important dans le développement de l'aquaculture. Plusieurs raisons expliquent cette volonté d'élever de nouvelles espèces : (1) limiter les captures de juvéniles pour le grossissement en maîtrisant leur cycle biologique (exemple du thon *Thunnus* spp. ou de l'anguille *Anguilla* spp.), (2) rechercher des espèces ayant un fort potentiel de croissance pour limiter les coûts et les risques lors des phases de grossissement, (3) exploiter des espèces à haute valeur symbolique mais dont les stocks halieutiques s'épuisent (exemple de la morue *Gadus morhua*), (4) trouver des espèces intégrant des critères de durabilité, comme le marché local, la faible demande en protéine animale, la production d'intrants, (5) créer une diversité pour le consommateur, (6) trouver des espèces pouvant être élevées dans des environnements particuliers ou difficiles. En Europe, le programme DIVERSIFY est un exemple de projet avec pour objectif l'amélioration de l'élevage de 6 espèces choisies pour leur potentiel aquacole. Deux espèces pour la culture continentale sont étudiées, le mulot gris *Mugil cephalus* et le sandre *Sander lucioperca*.

Actuellement, l'aquaculture continentale est basée majoritairement sur l'utilisation de systèmes de productions que l'on pourrait définir comme traditionnels : des bassins naturels comme les étangs, ou des circuits ouverts comme les raceway. Cependant, ces systèmes montrent des limites : de durabilité avec des problèmes de pollution de l'environnement, d'échappement d'individus, mais aussi d'adaptabilité aux espèces avec des contrôles de certains paramètres difficiles à cause des variations environnementales. Le développement des circuits recirculés est une option intéressante pour pallier ces problèmes. Cette technologie permet une réduction de la consommation d'eau en la traitant et en l'injectant à nouveau dans le circuit, une meilleure gestion des déchets qui sont isolés et peuvent être traités et un meilleur contrôle des paramètres physico-chimique (le faible apport d'eau neuve permet de gagner en stabilité) (Martins *et al.*, 2010). Malheureusement, cette technologie possède aussi certaines limites, qui sont principalement l'investissement financier important lors de sa mise en place. Cela est un frein pour un secteur dominé par les petites entreprises. Le manque de protocoles clairs pour une utilisation optimale de cette dernière peut aussi rendre son utilisation complexe.

La maîtrise du cycle de vie d'une espèce nouvelle est délicate mais nécessaire pour augmenter sa production. Les particularités de chaque espèce nécessitent le développement de méthodes spécifiques. Les premières phases de ce cycle, permettant d'obtenir les juvéniles, sont primordiales. Les éclosiers et les instituts de recherche ont ce rôle d'amélioration et

d'innovation dans la maîtrise de ces étapes. Les avancées technologiques et les programmes d'amélioration génétique assurent maintenant un apport de juvéniles de très bonne qualité en quantité suffisante. Cependant, les avancées faites au sein des écloséries ont une diffusion limitée par peur de perdre l'avantage stratégique qu'elles procurent.

La famille des Percidés regroupe des poissons d'eau douce répartis à travers l'hémisphère Nord. Sur plus de 235 espèces (Eschmeyer, Fong, 2017), certaines d'entre-elles montrent un intérêt économique pour la pêche professionnelle ou de loisir, mais aussi pour l'aquaculture. Quatre espèces en particulier sont intéressantes : en Amérique du Nord, la perche jaune *Perca flavescens* et le doré jaune *Sander vitreus* et en Europe la perche européenne *Perca fluviatilis* et le sandre *Sander lucioperca*. Biologiquement proches, elles profitent des avancées communes faites pour leur élevage.

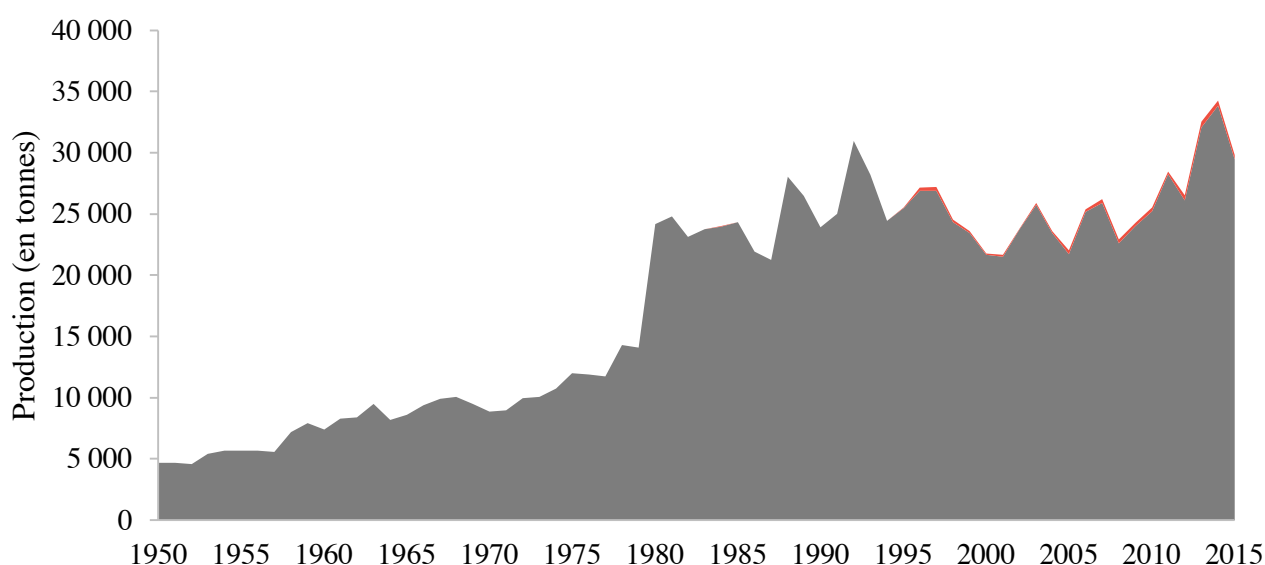


Figure 1. Évolution temporelle de la production de *Perca fluviatilis* en Europe de 1950 à 2015. Code couleur : Pêche ; Aquaculture (FIGIS, 2017)

En Europe et en Asie, les captures de perche européenne s'élevaient à 29 000 tonnes en 2015, contre 350 tonnes produites en aquaculture (Figure 1). Principalement pêchée, elle possède malgré tout un fort potentiel aquacole. En effet, la perche européenne est une espèce avec un marché traditionnel dans plusieurs pays européens, notamment les pays nordiques avec la Finlande et la Suède et les régions alpines de l'Allemagne, de la France, de l'Italie ou de la Suisse (Overton *et al.*, 2015). Si ce marché s'est avant tout créé grâce à une pêche importante dans ces pays, son élevage a débuté dans les années 1990. La perche est une espèce sensible aux variations environnementales et aux pathogènes. Un contrôle plus fin de ces points en système recirculé permet d'améliorer sa production. À la fin des années 1990, les études se sont multipliées sur l'élevage en circuit recirculé (Timmons *et al.*, 2013), permettant d'améliorer les phases de grossissement, mais aussi l'élevage larvaire. Cette dernière phase est en effet très spécifique chez la perche, principalement à cause de la phase d'incubation. En effet, les œufs ne sont pas libres mais liés les uns aux autres pour former un ruban qui peut mesurer jusqu'à 2 m de long 15 cm de largeur (Gillet, Dubois, 1995 ; Korzelecka *et al.*, 1998). Dans son environnement naturel, ce ruban se fixe sur divers supports (débris, végétaux) qui le maintiennent dans la colonne d'eau et permettent la fécondation par les mâles. Cette particularité oblige les écloséries à travailler avec des incubateurs innovants, en s'appuyant des

principes de bases décrits dans des ouvrages spécialisés. Dans un objectif d'intensification, les études concernant la reproduction contrôlée de la perche européenne se sont aussi multipliées. Initialement, la reproduction était réalisée à partir d'individus prélevés dans leur milieu naturel. Pour assurer un approvisionnement constant au cours d'une année, le contrôle des paramètres environnementaux permet un décalage des reproductions.

Valperca SA est une entreprise suisse qui fonctionne selon ce principe. En regroupant une éclosérie et un site de grossissement, elle propose de la perche européenne adulte toute l'année. Fonctionnant en circuit recirculé, douze cycles de reproduction sont effectués au cours d'une année au sein de l'éclosérie, puis l'élevage se fait jusqu'à l'obtention d'alevins de 10 grammes qui sont ensuite transférés sur le site de grossissement et de transformation. Elle a été créée sur l'idée d'un biologiste de mieux maîtriser la culture de la perche en circuit recirculé et elle est rapidement devenue le 1^{er} producteur de perche en Suisse. Son statut de pionnier en Suisse lui confère une expérience indéniable dans l'élevage de perches. Cependant, comme expliqué précédemment, le marché suisse est important et l'entreprise se doit de maintenir sa position. Cela passe en grande partie par l'innovation de ses méthodes de production. Son système d'incubation est plus avancé que les incubateurs présentés dans la littérature scientifique. Il permet de limiter l'espace au sol utilisé, garantir des conditions d'incubation optimales ou encore concentrer les larves.

Ce stage s'inscrit dans cette optique d'innovation et de développement constants que possède l'entreprise. L'incubation doit réunir les conditions optimales pour que l'œuf atteigne l'éclosion avec un développement normal. Pour cela, une bonne composition gazeuse est primordiale (oxygène, azote, dioxyde de carbone), les stress (mécaniques, lumineux) doivent être limités, les attaques de pathogènes doivent aussi être contrôlées. Les œufs, lorsqu'ils sont libres, facilitent la réunion de ces paramètres et rendent cette phase plus simple à gérer. La circulation de l'eau entre chaque œuf est possible, ce qui facilite les échanges gazeux. Les œufs morts peuvent être facilement retirés (chez des espèces à œufs pélagiques comme *Dicentrarchus labrax* ou *Sparus aurata*, ils se déposent au fond de l'incubateur et peuvent être purgés (Morretti *et al.*, 1999)). L'incubation verticale permet de suivre un éventuel développement bactérien ou fongique. Retirer la mortalité réduit la charge en matière organique qui sert à de tels développements. Chez la perche, le ruban rend plus difficile les échanges gazeux jusqu'à son centre, empêche de retirer la mortalité qui est liée aux œufs encore vivants et peut aussi empêcher les larves d'éclore si elles sont trop en profondeur. Agir directement sur la structure du ruban est une solution pour améliorer la phase d'incubation et d'éclosion. La littérature scientifique s'est intéressée à ce ruban chez *Perca fluviatilis* et *Perca flavescens* et plus particulièrement sa formation (Mansour *et al.*, 2009a), sa structure (Formicki *et al.*, 2009) ou ses propriétés (Paxton, 2000 ; Almeida *et al.*, 2017). Cependant, alors que d'autres travaux ont été menés chez certaines espèces élevées (carpe, sandre, poisson-chat) pour améliorer l'incubation malgré les particularités de leurs œufs, aucun travail n'a été réalisé sur le ruban en lui-même.

Dans la présente étude, il a été choisi de se focaliser sur l'utilisation de réactifs chimiques pour modifier la structure du ruban après la phase de fécondation artificielle. À partir d'études réalisées sur les œufs d'autres espèces d'élevage, plusieurs réactifs ont été sélectionnés avec deux utilisations possibles :

- Dissoudre le ruban après la fécondation pour rendre les œufs libres et ainsi améliorer la phase d'incubation
- Dissoudre les œufs en fin d'incubation pour améliorer la phase d'éclosion (synchroniser les éclosions)

Nous nous sommes demandés quels sont les agents chimiques capables de modifier la structure du ruban et à quelle étape post-fécondation peuvent-ils présenter un intérêt pour améliorer les techniques de production en éclosion de perche européenne ?

Pour répondre à ces questions, différents points ont été analysés :

- L'effet sur la structure du ruban
- L'impact sur la survie des œufs et des larves

L'étude se divise en trois parties. Premièrement, nous allons revenir sur la perche et sa particularité qui est son ruban, ainsi que les réactifs sélectionnés. La deuxième partie se focalisera sur la dissolution du ruban post-fécondation pour obtenir des œufs libres. Enfin, la troisième partie traitera de la synchronisation des éclosions en fin d'incubation.

1. Contexte

1.1. La perche

La perche européenne *Perca fluviatilis* (Linné, 1758), est un poisson d'eau douce et saumâtre vivant dans les eaux tempérées de l'hémisphère Nord. C'est une espèce carnassière appartenant à la famille des Percidés et est une des 3 représentantes du genre *Perca* avec la perche jaune *Perca flavescens* et la perche de Schrenk *Perca schrenkii*. Elle possède les caractéristiques des autres espèces de sa famille, à savoir les nageoires dorsales séparées, épineuses et les nageoires pelviennes thoraciques. Cependant, elle est facilement reconnaissable, notamment grâce à ses nageoires pelviennes pouvant aller du rouge au jaune et ses bandes verticales noires sur ses flancs verdâtres. Ces bandes sont d'ailleurs utilisables pour identifier des individus (Hirsch, Eckmann, 2015) (Figure 2).



Figure 2. Photographie d'une perche européenne *Perca fluviatilis* © Wikipédia Commons

La perche européenne est principalement présente dans les eaux européennes, depuis l'est de la France et le Royaume-Uni jusqu'à la Sibérie. Elle a été largement introduite à travers l'Eurasie, mais aussi en Océanie et en Afrique (Craig, 2000). Supportant les eaux saumâtres, elle a colonisé un grand nombre d'environnement continentaux, des lacs jusqu'aux cours d'eau et les estuaires. Elle vit en bancs d'individus de même âge, s'abritant près des obstacles dans des zones calmes. Son optimum thermique est compris entre 22 et 28 °C, il est plus haut chez les juvéniles (24-29°C) et plus bas chez les larves (20-22°C) (Hokanson, 1977). Ces dernières présentent une phototaxie positive, c'est-à-dire qu'ils sont attirés par la lumière et contrairement aux autres percidés que ceux du genre *Perca*, les juvéniles et les adultes préfèrent des conditions où l'intensité lumineuse est forte (Ali *et al.*, 1977). C'est un prédateur dont les juvéniles vont se nourrir principalement de zooplancton et d'invertébrés, voire d'autres juvéniles de perches

en cas d'absence de proies et les adultes d'invertébrés et d'autres poissons. Le changement de régime alimentaire et le passage à la piscivorie est plus tardif, certaines populations deviennent piscivores à partir de 150 mm de longueur. Elle est malgré tout assez généraliste et sélectionne ses proies passivement. Elle chasse en majorité à l'aube et au crépuscule, limitant ainsi les risques de prédation (Feiner, Höök, 2015).

Perca fluviatilis est une espèce itéropare qui pond au printemps. La maturation est dimorphique. Chez les mâles, l'âge de la première maturation sexuelle varie entre 0 et 2 hivers passés, mesurant entre 5 et 12 cm. La spermatogénèse débute avant la ponte de l'année précédant le cycle de reproduction. En septembre, l'indice gonado-somatique (IGS) est maximal et les mâles possèdent des spermatozoïdes à partir de novembre (Sulistyo, 1998). L'IGS reste stable en hiver et la spermiation est effective de janvier jusqu'à la ponte (Sulistyo, 2000). Chez la femelle, la maturation sexuelle est plus tardive, entre 2 et 3 hivers, avec une taille comprise entre 12 et 18 cm (Thorpe, 1977). L'ovogénèse débute au mois de septembre, accompagnant la diminution de la température de l'eau. Le développement se poursuit jusqu'à la ponte, avec l'hydratation finale et la maturation. L'IGS est alors maximal (23%) (Le Cren, 1951). C'est à cette période que le ruban contenant les œufs va être formé. La température et la photopériode sont des éléments déterminants dans le bon déroulement du développement et la qualité des oocytes (Migaud *et al.*, 2004). Ces deux facteurs sont aussi essentiels lors de la ponte (Migaud *et al.*, 2002).

1.2. Conditions d'élevage chez Valperca

L'entreprise a mis en place des protocoles de décalages des pontes (Żarski *et al.*, 2017) et travaille sur une douzaine de cycles par an. Un cycle de ponte est associé à un lot de géniteurs, constitué de mâles et de femelles. Chaque lot possède son propre cycle de photo-thermopériode, qui est identique aux variations annuelles et naturelles, mais décalé dans le temps pour obtenir les pontes au moment voulu. Ces variations sont basées sur les travaux d'Abdulfatah (2010).

Les paramètres lumineux et thermiques ne sont pas les seuls éléments pour garantir les pontes. La qualité de l'eau doit être suivie et l'alimentation doit être adaptée pour correspondre aux besoins des individus en fonction des périodes de l'année. Pour la qualité de l'eau, chaque circuit est un circuit recirculé à petite échelle, avec un filtre à tambour pour la filtration des particules les plus grosses, un filtre à sable pour filtrer sur substrat les particules plus fines et un biofiltre pour traiter les molécules azotées. Pour l'alimentation, on distingue une période chaude, qui commence après la ponte (15°C) et dure 16 semaines jusqu'à la descente de température et une période froide. Les besoins n'étant pas les mêmes, un aliment différent est distribué à chaque période. Chaque aliment est composé d'un même aliment inerte (granulé) destiné à l'alimentation de maigre *Argyrosomus regius*, auquel on ajoute de l'huile adaptée aux besoins de la perche. Un type d'huile différent est utilisé à chaque période.

Comme expliqué précédemment, la température et la photopériode conditionnent la période de ponte. Il est possible de laisser les femelles pondre naturellement dans le bassin et laisser les mâles féconder les rubans. Les taux de fécondation sont cependant plus faibles dans ce cas, les risques de perdre le ruban sont plus importants à cause des systèmes de filtration et la manipulation lors de la récupération du ruban risque d'endommager ce dernier. L'écloserie pratique donc la fécondation artificielle. Un deuxième problème se pose alors, celui de la synchronisation des pontes. Si la température et la photopériode permettent d'obtenir des pontes de qualité chez les Percidés (Müller-Belecke, Zienert, 2008), ces dernières peuvent s'étendre sur plusieurs semaines. La stimulation hormonale est utilisée chez de nombreuses espèces, pour

améliorer la qualité et la synchronisation (Duncan *et al.*, 2008). Plusieurs hormones sont utilisables chez la perche, deux d'entre-elles sont conseillées, des analogues de la LHRH (*Luteinizing Hormone Releasing Hormone*) et la gonadotrophine humaine (hCG pour *human Chorionic Gonadotropin*) (Żarski *et al.*, 2015).

Chaque jour, la maturation des femelles est contrôlée pour les stripper au meilleur moment. Après stripping d'une femelle, le ruban est fécondé artificiellement en se basant sur le protocole de fertilisation artificielle proposée par Żarski *et al.* (2017). Le ruban strippé est placé dans une bassine puis mis en contact avec une solution d'activateur de sperme. Le sperme est ajouté 15 secondes après l'ajout de l'activateur. Le mélange est homogénéisé manuellement pour assurer une fécondation complète du ruban. Les bassines sont ensuite placées dans un bac contenant de l'eau d'incubation, permettant de maintenir le mélange à température constante. Après quelques heures sans manipulation, le ruban est placé en incubateur.

1.3. Le ruban et les œufs

Chez les poissons, la partie externe de l'œuf est une fine membrane, l'oolemma, recouverte d'une enveloppe, la *zona radiata*. Cette enveloppe est généralement divisée en deux couches, la *zona radiata interna*, qui a principalement un rôle de protection et la *zona radiata externa* (ZRE), responsable de la fixation (Riehl, Patzner, 1998). Chez *Perca fluviatilis* et *Perca flavescens*, cette ZRE joue un rôle particulier dans la fixation des œufs : la formation d'un ruban liant les œufs entre eux (Formicki *et al.*, 2009) (Figure 3).



Figure 3. Photographie d'œufs de perche, a. Ruban en milieu naturel, b. Observation au microscope d'œufs de perche mettant en évidence le rôle de la ZRE dans la formation du ruban.

Pouvant atteindre 5,5m de long (Korzelecka *et al.*, 1998), sa longueur est proportionnelle au nombre d'œufs qu'il contient (Gillet, Dubois, 1995) et à la longueur de la femelle qui l'a pondu (Dubois *et al.*, 1996). La taille de la ZRE change au cours de l'absorption d'eau post-fécondation, pouvant passer de 0,14 mm à 0,20 mm (Korzelecka *et al.*, 1998). Cette ZRE n'est pas une simple enveloppe qui lie les œufs entre eux mais possède une ultrastructure qui lui confère certaines propriétés. Formicki *et al.* (2009) ont étudié cette structure au microscope électronique à balayage (MEB) et mis en lumière la présence d'un réseau de microtubules sous la surface du ruban, formant de nombreux pores (Figure 4). Ce réseau formerait une sorte de squelette hydrostatique maintenu par le courant des fluides au sein du ruban. Une deuxième hypothèse serait que cette entrée d'eau par les pores au moment de la ponte créerait un courant d'aspiration qui faciliterait la fixation du ruban au substrat.

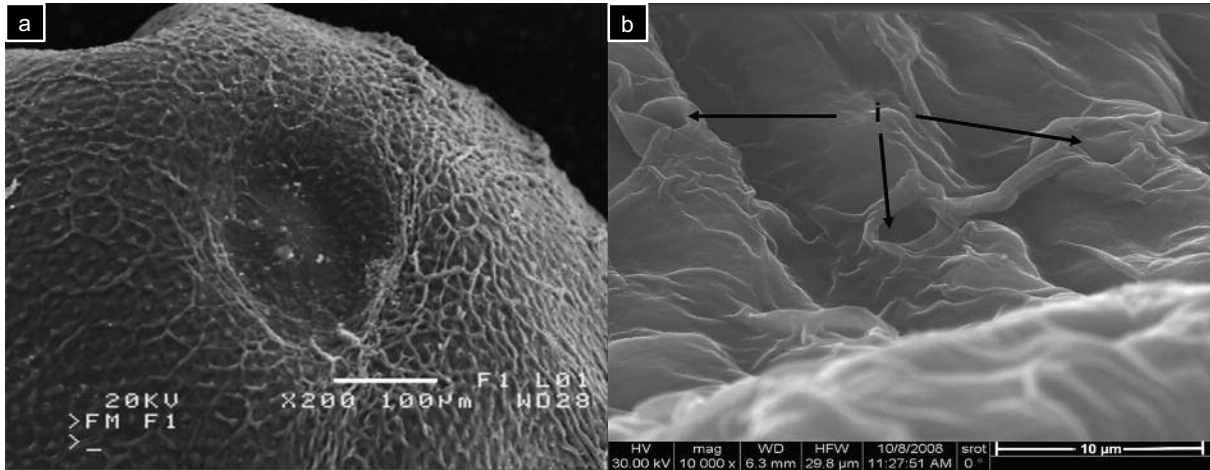


Figure 4. Photographies au MEB de l'ultrastructure du ruban, a. Réseau réticulaire de microtubules dans le ruban, b. Différentes formes de pores (i) dans le réseau de microtubules. D'après Formicki *et al.* (2009).

Sa formation doit encore être éclaircie. Le fluide ovarien sécrété par la femelle semble être un élément déterminant. Ce sont les protéines présentes dans ce dernier qui interviennent dans la liaison des ZRE. En effet un fluide ovarien déprotéinisé ne permet pas aux œufs d'être liés par la ZRE. Une fois en contact, on retrouve à la surface de la ZRE des protéines de même poids moléculaire que celles du fluide ovarien, qui ne sont pas présentes sur des œufs qui n'ont pas été en contact avec le fluide. Les protéines les plus importantes ont une masse moléculaire comprise entre 50 et 100 kDa. La coloration des tissus montre deux réactions de la ZRE : Une réaction au bleu alcian et au PAS (Periodic Acid Schiff) (Mansour *et al.*, 2009a). Ces deux colorations permettent de mettre en évidence la présence de polysaccharides et plus particulièrement les mucopolysaccharides.

La formation d'un ruban de qualité est le signe que toutes les étapes de la gamétogénèse se sont déroulées dans de bonnes conditions. Cette idée est validée par une étude menée par Castets *et al.* (2012), qui ont étudié 14 paramètres de la reproduction de la perche pour différentes pontes (par exemple la date de la ponte, le taux de fertilisation, le diamètre de l'oocyte, la durée d'éclosion) et ont déterminé les corrélations entre tous ces paramètres. Le taux de fragmentation (*Frr*), c'est-à-dire le pourcentage d'œufs libres lors de la ponte (*Frr* = 100% si tous les oocytes sont individualisés), est négativement corrélé aux autres paramètres reproductifs. Si les œufs sont libres lors de la ponte, cela veut dire que le développement ne s'est pas correctement déroulé. La qualité de la ponte et donc de la reproduction seront elles aussi mauvaises.

1.4. Les produits

La perche n'est pas la seule espèce à avoir développé une ZRE différente. Les modes de fixation des œufs chez les poissons sont nombreux. Rhiel et Patzner (1998) ont listé ces particularités, allant de la couche adhésive (chez le brochet *Esox lucius* ou le vairon *Phoxinus phoxinus*) à des structures en nid d'abeilles (chez la perche roumaine *Romanichthys valsanicola* ou la grémille *Gymnocephalus cernuus*) ou des microvillosités (chez la vandoise *Leuciscus leuciscus* ou le gardon *Rutilus rutilus*). Même si la majorité de ces espèces n'est pas élevée, certaines présentent malgré tout des spécificités qui doivent être prises en compte en élevage.

Le cas le plus commun est celui des œufs adhésifs. Des études concernant la réduction de ce phénomène sont présentées dans le Tableau 1 :

Tableau 1. Études traitant de l'utilisation de produits chimiques dans le traitement de l'adhésivité des œufs de différentes espèces de poissons

Espèces	Auteurs	Produits testés	Réduction de l'adhésivité
<i>Acipenser baerii</i>	Feledi <i>et al.</i> , 2011	Lait	+
		Amidon	-
		Urée + acide tannique	+
<i>Acipenser ruthenus</i>	Pšenička, 2016	Argile	+
		Acide tannique	+
		Hypochlorite de sodium	+
		Urée + acide tannique	+
<i>Acipenser transmontanus</i>	Kowtal <i>et al.</i> , 1986	Urée + acide tannique	+
		Sulfite de sodium + acide tannique	+
<i>Clarias garepinus</i>	Asraf <i>et al.</i> , 2013	Urée	+
<i>Cyprinus carpio</i>	Mansour <i>et al.</i> , 2009	Chélateurs	-
		Alcalase®	+
<i>Heterobranchius bidorsalis</i>	Ekokotu et Nwachi, 2014	Jus d'ananas	+
<i>Labrus bergylta</i>	Grant <i>et al.</i> , 2016	Acide tannique	-
		Sulfite de sodium	-
		L-cystéine	-
		Alcalase®	+
<i>Sander lucioperca</i>	Demska-Zakes <i>et al.</i> , 2005	Acide tannique	+
		Alcalase®	+
<i>Stizostedion vitreum</i>	Krisan <i>et al.</i> , 2016 Krise <i>et al.</i> , 1986	Protéase pancréatique bovine	+
		Acide tannique	+
		Bentonite	-
<i>Tinca tinca</i>	Linhart <i>et al.</i> , 2000	Alcalase®	+
		Lait + argile	+

On remarque que certains produits sont toujours efficaces dans la réduction de l'adhésivité des œufs. On retrouve le lait, l'urée, l'acide tannique, l'hypochlorite de sodium, les enzymes (Protéase pancréatique bovine, Alcalase®) et le jus d'ananas.

L'adhésivité des œufs est provoquée par la présence en surface de structures spécifiques qui vont interagir avec un substrat pour s'y fixer. Ces structures ont été présentées précédemment. Pour réduire l'adhésivité de ces œufs, il y a donc deux solutions : recouvrir l'œuf à l'aide d'un produit, qui va empêcher les structures d'adhérer aux surfaces et dégrader ces structures. Les produits utilisés seront donc passifs ou actifs. Le lait est un agent passif dont les molécules vont se lier aux structures adhésives et donc empêcher l'adhésion. Dans le cas de la perche, nous cherchons à modifier la structure du ruban et donc à dégrader la ZRE. Nous avons alors besoin d'agents actifs, qui sont capables d'attaquer les protéines de cette ZRE.

Notre choix s'est donc porté sur ces autres produits que nous allons détailler par la suite. Le cas du jus d'ananas est particulier et nécessite lui aussi d'être détaillé.

1.4.1. L'acide tannique

L'acide tannique ($C_{76}H_{52}O_{46}$) est un acide de la famille des tannins. Les tannins sont des polyphénols présents naturellement dans les végétaux. Aussi appelé acide gallotanique, il regroupe les tannins extraits de certaines ressources naturelles, qui sont hydrolysables. Il est extrait principalement des espèces du genre *Quercus*, les chênes, du genre *Rhus*, les sumacs et aussi de *Caesalpinia spinosa*. Il existe sous forme de poudre amorphe allant du blanc au brun clair. Ses principales propriétés sont les suivantes : masse molaire de 1701,19 g/mol ; densité de 2,12 g/cm³ ; solubilité de 2850 g/L d'eau, pKa = 10.

L'acide tannique est utilisé en industrie pour traiter la corrosion du fer, en agroalimentaire pour ses propriétés astringentes (agent de saveur, stabilisateur de couleur, exhausteur de goût) ou encore en médecine comme anti diarrhéique. Son utilisation en aquaculture est principalement pour la réduction de l'adhésivité des œufs pendant l'incubation (Stickney, 2000). Comme présenté précédemment, il est efficace chez plusieurs espèces (Feledi *et al.*, 2011 ; Pšenička, 2016 ; Demska-Zakes *et al.*, 2005 ; Kowtal *et al.*, 1986 ; Krise *et al.*, 1986). Le tableau 2 regroupe leur utilisation :

Tableau 2. Utilisation de l'acide tannique dans différentes études

Auteur	Utilisation	Concentration	Durée
Feledi <i>et al.</i> , 2011	Rinçage	0,25 g/L	3 x 20 secondes
Pšenička, 2016	Rinçage	1 g/L	1 minute
Kowtal <i>et al.</i> , 1986	Rinçage	1 g/L	1 minute
Krise <i>et al.</i> , 1986	Solution	0,25 g/L	4 minutes
Demska-Zakes <i>et al.</i> , 2005	Solution	0,5 ; 1 ; 1,5 g/L 1 ; 1,5 g/L	5 minutes 2 minutes

Les concentrations et les temps de réactions varient grandement entre études. Ces variations sont principalement dépendantes de l'espèce en question. Les structures des ZRE sont différentes et donc le réactif doit agir dans des proportions différentes.

Pour les expériences, nous avons utilisé l'acide tannique proposé par la société de produits chimiques Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) (code produit 403040)

1.4.2. Protéases

Les protéases sont des enzymes qui agissent au niveau des liaisons peptidiques des protéines, par protéolyse. Elles appartiennent à une famille plus grande, celle des hydrolases, car elles utilisent une molécule d'eau pour briser la liaison. On les retrouve dans tous les règnes du vivant. Il existe une grande variété de protéases. Nous allons donc présenter celles utilisées dans les études citées précédemment dans le tableau 3.

Tableau 3. Utilisation des protéases dans différentes études

Auteur	Enzyme	Concentration	Concentration (équivalent Sigma-Aldrich)	Temps (minutes)
(Grant <i>et al.</i> , 2016)	Alcalase®	0,5%	0,125%	25 - 30
		1% - 2%	0,25% - 0,5%	15 - 20
		3%	0,75%	15 - 17
		4%	1%	12 - 15
(Horváth, 1980)	Alcalase®	10 g/L	1%	3-5
(Krise <i>et al.</i> , 1986)	Protéase pancréatique bovine	0,01%	idem	35
(Kristan <i>et al.</i> , 2016)	Alcalase®	0,5% ; 1% ; 1,5% ; 2%	idem	2
(Linhart <i>et al.</i> , 2000)	Alcalase®	5, 10, 15 20 mL/L	0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2%	2
(Mansour <i>et al.</i> , 2009b)	Alcalase®	5 unités/mL	NA	5

Deux protéases sont citées dans ce tableau. La première est l'Alcalase®. C'est une enzyme extraite du bacille *Bacillus licheniformis*. Ce bacille est une bactérie gram-positif commune dans le sol. Il forme des spores en cas de mauvaises conditions environnementales. Il est anaérobique facultatif et peut jouer un rôle de dénitrificateur. Cette enzyme est utilisée à échelle industrielle, dans de nombreux domaines. C'est la première protéase de la famille des Subtilisin à avoir été isolée, en 1947. Elle a été mise sur le marché en 1963 par l'entreprise Novozyme (Bagsværd, Danemark) comme détergent ménager. Elle est utilisable dans les conditions de pH compris entre 6 et 10, avec un optimum entre 8-9 et de températures entre 10 et 80°C, 60°C étant son optimum.

La deuxième protéase est la protéase pancréatique bovine de type I. Elle fait partie de la famille des trypsines, des endoprotéases à sérine. Les trypsines sont des enzymes que l'on retrouve chez de nombreuses espèces du règne animal, jouant un rôle dans la dégradation des protéines lors de la digestion. Ses optima de pH et de température sont donc fortement dépendant de l'écologie et de la biologie des espèces chez lesquelles on les trouve. Elles sont utilisées en culture cellulaire, pour empêcher les cellules adhérentes de se fixer aux parois des boîtes de Pétri (Fong *et al.*, 2017). Les trypsines sont aussi utilisées pour la déchoriation, par exemple chez *Brachydario renio*, lors de l'étude des stades embryonnaires (Collodi *et al.*, 1992). La trypsine bovine fait partie des premières isolées (Stroud *et al.*, 1974). Son optimum de pH est compris en 7 et 9 (Bergmeyer *et al.*, 1974) et sa température en 45 et 76°C (Venkatesh, Sundaram, 1998).

Le tableau 3 montre une grande variabilité dans les concentrations et les temps de réactions utilisés. À l'inverse de l'acide tannique qui est une molécule unique, les propriétés des enzymes varient grandement entre fournisseurs et pour chaque fournisseur, des activités enzymatiques différentes peuvent être proposées. C'est le cas pour l'Alcalase®. Horváth (1980) utilise de l'Alcalase® produite par Novo Industry, possédant une activité enzymatique de 2,4 AU/g. Grant *et al.* (2016) et Linhart (2000) utilisent l'Alcalase® produite par Merck (code 126741-500), avec une activité enzymatique donnée de 0,75 AU/mL. La densité est aussi donnée, 1,25g/mL, ce qui revient à une activité de 0,6 AU/mL. L'unité AU représente une unité

d'Anson. Cette unité donne « la quantité d'enzyme qui, sous conditions spécifiques, va digérer de l'hémoglobine dénaturée à l'urée à un taux initial de telle sorte que cela produit une quantité de produit soluble dans l'acide trichloracétique par minute, donnant la même couleur avec le réactif de Folin-Ciocalteu qu'un milliéquivalent de tyrosine à 25°C à pH 7,5 » (Sigma-Aldrich).

Pour les expériences, nous avons utilisé les enzymes proposées par Sigma-Aldrich :

- Alcalase[®], 2,4 AU/g (code produit P480)
- Protéase pancréatique bovine, type I, 5 U/mg (code produit P4630)

1.4.3. Hypochlorite de sodium

L'hypochlorite de sodium, de formule NaClO, est un composé chimique sous forme de poudre blanche très instable que l'on trouve plus couramment en solution aqueuse avec du chlorure de sodium pour former l'eau de Javel. C'est un produit souvent utilisé comme désinfectant ou décolorant pour ses réactions avec de nombreux produits (métaux, acides, peroxydes). Il est utilisé par Pšenička (2016) sur l'esturgeon de Sibérie (*Acipenser ruthenus*). Ses principales propriétés sont les suivantes : masse molaire de 74,442 g/mol ; densité de 1,11 g/cm³ ; solubilité de 293 g/L d'eau, pKa = 7,52.

Son pouvoir oxydant fort sur les groupements –OH le rend intéressant pour la désinfection. Il est déjà couramment utilisé en aquaculture comme agent désinfectant. Les concentrations et temps de réactions conseillés par Pšenička (2016) sont donc faibles : 0,03% pendant 40 secondes.

Pour les expériences, nous avons utilisé l'hypochlorite de sodium proposé par Sigma-Aldrich, contenant entre 4 et 4,99% de chlore (code produit 239305).

1.4.4. Jus d'ananas

Comme l'hypochlorite de sodium, un seul article traite de l'effet du jus d'ananas sur la réduction de l'adhésivité des œufs, chez le poisson-chat africain (*Heterobranchus bidorsalis*). Les concentrations utilisées sont relativement faibles (1, 3 et 5% de jus d'ananas frais). Une explication donnée par les auteurs sur l'effet du jus d'ananas serait la présence d'enzymes végétales dans le jus frais. Elles agiraient, comme dans le cas des enzymes présentées plus haut, sur la surface des œufs pour qu'ils n'adhèrent plus.

1.4.4.1. Bromélaïne

La bromélaïne est une endoprotéase à cystéine qui se trouve dans la tige de l'ananas (*Ananas comosus*). Son numéro EC est le 3.4.22.32. Elle appartient à la famille des peptidases C1. Elle est utilisée en médecine à des fins thérapeutiques dans de nombreux cas grâce à ses propriétés fibrinolytiques, anti-œdémateuses, anti-thrombotiques et anti-inflammatoires (Pavan *et al.*, 2012). On peut la retrouver dans le fruit mais elle est principalement présente dans la tige, un coproduit de l'ananas, qui rend cette ressource économiquement intéressante. De plus, les techniques d'extraction et de purification sont nombreuses (Chaurasiya, Umesh Hebbar, 2013 ; Devakate *et al.*, 2009 ; Ketnawa *et al.*, 2012 ; Soares *et al.*, 2012). En plus des propriétés thérapeutiques, elle est aussi utilisée en industrie agroalimentaire (Ha *et al.*, 2012).

Dans les expériences, nous avons utilisé la bromélaïne proposée par Sigma-Aldrich (code produit B4882), sous forme de poudre avec une activité supérieure 3U/mg.

1.4.4.2. Papaine

Les recherches sur la bromélaïne nous ont indiqué que la famille des peptidases C1 à laquelle elle appartient possède une autre enzyme couramment utilisée en industrie agroalimentaire, extraite elle aussi d'un végétal, la papaine. De plus, nous avons découvert que cette enzyme était aussi utilisée à la création de l'entreprise lors de la phase d'éclosion, pour faciliter ces dernières. La papaine est elle aussi une peptidase à cystéine extraite de la papaye (*Carica papaya*). Son nombre EC est le 3.4.22.2. Ses propriétés sont utilisées pour attendrir la viande (Abdel-Naeem, Mohamed, 2016 ; Barekat, Soltanizadeh, 2017). L'aquaculture a aussi su tirer profit de cette enzyme, notamment en alimentation, en ajoutant la papaine à l'aliment pour faciliter la digestion des protéines végétales (Van Hai, 2015 ; Mo *et al.*, 2016).

Dans les expériences, nous avons utilisé la papaine proposée par Sigma-Aldrich, sous forme de poudre avec une activité supérieure 3U/mg (code produit 76220).

2. Dissolution du ruban

Alors que chez d'autres espèces de la famille des Percidés, un traitement préalable est réalisé pour réduire l'adhésivité des œufs, les écloseries et instituts de recherche travaillant sur la perche se sont contentés de travailler avec le ruban entier, à l'aide d'incubateurs particuliers. On peut trouver des exemples dans les travaux de Kucharczyk *et al.* (1996) ou de Żarski *et al.* (2017). L'important est de maintenir le ruban en quasi-suspension dans la colonne d'eau, pour éviter qu'une proportion des œufs se retrouvent sans apport d'eau et donc sans apport d'oxygène. Le ruban est un élément qui rend plus complexe les manipulations ou les traitements de désinfection des œufs lors de la mise en incubation. De plus, comme évoqué précédemment le ruban empêche aussi de retirer les œufs morts, qui restent alors dans le circuit d'incubation et augmentent les risques de développement bactérien et fongique.

L'objectif est ici de dissoudre le ruban qui lie les œufs entre eux pour obtenir des œufs libres qui peuvent être mis en incubation selon des méthodes plus classiques : en bouteilles coniques (utilisé chez les poissons marins avec des œufs pélagiques) ou en plateaux (utilisés principalement chez les salmonidés) (Watson, Chapman, 2000).

Aucune étude n'existant sur ce sujet, nous allons réaliser de nombreux tests (de produits, de concentrations et de temps de réaction) afin d'avoir une vision globale de ce qu'il est possible de faire.

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Matériel biologique

Nous avons utilisé des rubans issus de pontes spontanées dans les bassins. En effet, lors des phases de remontée de température et de photopériode, certaines femelles pondent avant la période de ponte prévue. Ces rubans ne sont pas fécondables pour plusieurs raisons : le contact avec l'eau les a activés, or l'activation des œufs après contact avec l'eau ne dure que 2,5 minutes chez la *Perca fluviatilis* (Żarski *et al.*, 2012) ; la collecte de sperme n'a pas eu lieu en dehors de la période prévue, il n'y a donc pas de laitance disponible ; enfin la ponte n'ayant pas été contrôlée, il y a un fort risque de contamination bactérienne ou fongique.

Chaque matin, le bassin contenant le lot prêt à pondre était inspecté pour récupérer les éventuels rubans pondus. Le ruban prélevé était alors conservé le temps de la préparation des tests dans une bassine contenant de l'eau du bassin, renouvelée pour maintenir la température de cette dernière.

Des fragments de masse égale étaient prélevées pour les réactions à l'aide de ciseaux et d'une pince courbe.

2.1.2. Conditions expérimentales

Les réactions ont été réalisées dans des boîtes de Pétri, contenant 40 mL du réactif à concentration déterminée.

La phase la plus sensible est celle du rinçage des œufs après réaction. Ce dernier doit se faire le plus rapidement possible pour stopper les réactions, avec précaution pour ne pas abimer mécaniquement les œufs. Lors des réactions, comme lors de l'incubation, le ruban empêche la bonne circulation des fluides entre les œufs, il faut donc une agitation pour homogénéiser la réaction dans la boîte de Pétri. Pour cela, un plateau a été confectionné, permettant de maintenir 6 boîtes de Pétri, d'agiter et de rincer ces 6 boîtes simultanément. Le rinçage était permis grâce à un couvercle en maille fine (600 µm), qui lorsque le plateau était plongé dans un bac d'eau neuve, permettait la circulation de l'eau dans les boîtes et ainsi de stopper les réactions (Annexe I).

Les tests suivant ont été réalisés :

- Pour l'acide tannique, 3 concentrations ont été testées, 0,5 g/L, 1 g/L et 1,5 g/L, avec 6 temps, 1, 2, 5, 10, 15 et 20 minutes
- Pour la protéase pancréatique bovine, la concentration de 0,01% (Krise *et al.*, 1986) a été testée, pendant 30, 40 et 50 minutes
- Pour l'Alcalase[®], les concentrations 0,5 et 1% ont été testées, pendant 1, 2, 5, 10, 15 et 20 minutes
- Pour l'hypochlorite de sodium, la concentration 0,03% a été testée, pendant 30s, 40s, 1, 2, 5 et 10 minutes
- Pour la papaïne, sans article servant de référence, la concentration 0,1% a été testée pendant 1, 2, 5, 10, 15 et 20 minutes
- Nous n'avons pas eu le temps de tester la bromélaïne, mais nous voulions la tester sous les mêmes conditions que la papaïne

Nous avons procédé de 2 manières différentes. Dans un premier temps, nous avons effectué un test purement qualitatif. L'objectif était d'observer le résultat de la réaction sur le ruban, de voir comment la structure était modifiée, si le produit semblait intéressant ou non. Les résultats sont donc basés sur des observations. Dans un deuxième temps, nous avons essayé de mesurer un éventuel changement de structure du ruban. L'objectif principal étant de séparer les œufs les uns des autres, nous avons décidé de quantifier l'effet du réactif sur cette séparation. Pour cela, nous avons mesuré la distance à laquelle la liaison entre deux œufs rompait, à l'aide d'enregistrement vidéo. Deux œufs étaient placés sur un support gradué, l'un fixé et l'autre écarté lentement jusqu'à la rupture de la liaison. Cette distance était alors mesurée et enregistrée (Figure 5). Pour chaque triplet « réactif – concentration – temps », 10 doublets d'œufs étaient utilisés. Plusieurs rubans ont été utilisés pour ces expériences. Pour chaque ruban, nous avons mesuré cette valeur sur 10 doublets d'œufs n'ayant pas subi de réaction, pour que l'effet du produit soit comparable à un ruban non modifié.

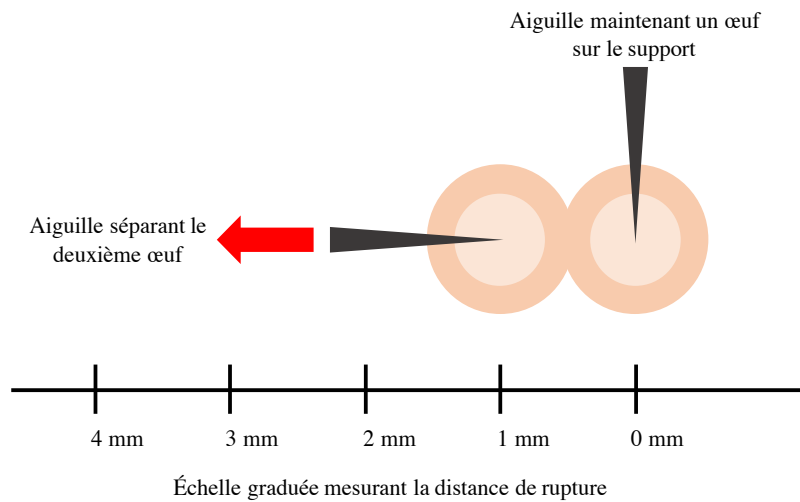


Figure 5. Principe de manipulation pour la mesure de la distance de rupture

2.2. Résultats

2.2.1. Observations

Acide tannique

L'acide tannique n'a aucun effet sur la séparation des œufs. Les différentes concentrations ou les temps de réactions n'y font rien. Le ruban reste intègre, ainsi que les œufs. On peut observer un léger blanchiment du ruban et des œufs (à partir de 15 minutes à 0,5 g/L et 5 minutes à 1 g/L).

Protéase pancréatique bovine

La réaction avec la protéase ne provoque pas de séparation des œufs. Une agitation manuelle plus forte permet la formation de gros fragments de rubans. Pas de blanchiment apparent du ruban.

Alcalase®

On peut observer une légère fragmentation à toutes les concentrations. Cependant, les œufs sont très fragiles, le rinçage provoque une rupture de la paroi des œufs, qui se vident, alors que le ruban est toujours présent, à partir de 5 minutes. Un film lipide se forme à la surface des boîtes de Pétri, issu des globules lipidiques contenus dans les œufs. Un léger blanchiment apparaît quelques heures après le rinçage.

Hypochlorite de sodium

La réaction ne provoque pas de séparation des œufs. De même, on n'observe pas de blanchiment du ruban, même après une exposition prolongée au réactif. Une agitation mécanique permet de fragmenter grossièrement le ruban après 10 minutes de réaction.

Papaine

Il n'y a pas de séparation des œufs lors de la réaction et avec la simple agitation du plateau. Cependant, lorsque les œufs sont manipulés pour être observés, ils sont facilement séparables, même après un temps de réaction d'une minute. Pas de blanchiment apparent du ruban.

2.2.2. Mesures

Nous avons construit des modèles d'analyse de variance sous R pour chaque réactif testé. La variable à expliquer est la distance lors de la rupture de la liaison entre les œufs. La variable explicative est le temps de réaction.

Pour l'acide tannique, la protéase pancréatique bovine, l'Alcalase® et l'hypochlorite de sodium, il n'y a pas d'effet de la concentration et du temps de réaction sur la distance de rupture. Les probabilités critiques associées à chacun des tests sont renseignées dans le tableau 4 :

Tableau 4. Probabilités critiques associées aux ANOVA

Réactif	Concentration	<i>p-value</i>
Acide tannique	0,5 g/L	0,64
	1 g/L	0,25
	1,5 g/L	0,27
Protéase	0,01%	0,88
Hypochlorite de sodium	0,03%	0,49
Papaïne	0,1%	0,0002
Alcalase®	0,5%	0,933
	1%	0,3382

En revanche, le temps de réaction a un effet sur la distance de rupture dans le cas de la papaïne ($p\text{-value} < 0,0002$). Les distances sont plus faibles lorsque le temps de réaction augmente, comme le montre la figure 6 :

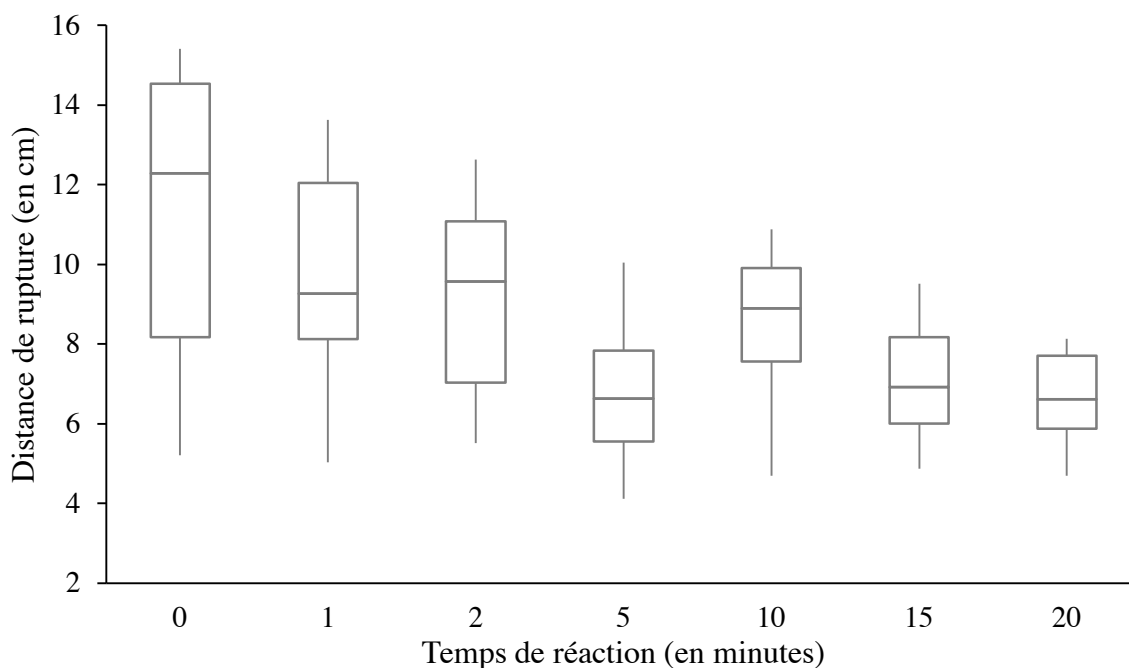


Figure 6. Boîtes de dispersion des distances de rupture à différents temps de réactions pour les œufs traités à la papaïne.

2.3. Discussion

Chez *Perca fluviatilis* ou *Perca flavescens*, le ruban a été totalement intégré dans les méthodes et les protocoles d'écloseries. Des innovations sont cependant toujours intéressantes pour l'amélioration des modes de production. Cette étude est basée sur la résolution de certains problèmes qui, même s'ils n'empêchent pas de produire des alevins, peuvent être un frein à l'intensification.

La phase de test qualitative a permis de rapidement montrer les avantages et limites de certains produits. Hormis l'Alcalase[®], les différents réactifs permettent de conserver l'intégrité des œufs. Même s'ils ne favorisent pas la dissolution du ruban, il est toujours intéressant de noter qu'ils n'attaquent pas les œufs. En effet, ce sont des produits qui peuvent être fréquemment utilisés en aquaculture (surtout l'hypochlorite de sodium) et mieux connaître leurs impacts sur les œufs, donc savoir qu'ils ne vont pas attaquer ces derniers, est un avantage. Le blanchiment est un indicateur de changement de structure de la surface des œufs ou du ruban. Il faut faire très attention à ces changements. Nous l'avons vu précédemment, de nombreux pores se trouvent à la surface du ruban et permettent les échanges de fluides. Un changement de structure peut être le signe que ces pores se retrouvent obstrués. Pšenička (2016) a montré que l'hypochlorite de sodium oxyde la couche superficielle des œufs. Une telle modification pourrait se montrer fatale pour le bon développement des œufs par la suite. On peut considérer une telle modification comme partielle ou insuffisante.

À l'inverse, un produit comme l'Alcalase[®] montre une modification trop forte. On peut remarquer un changement dans la structure du ruban, qui devient plus gélatineux, mais l'attaque se fait en profondeur et dissout aussi la membrane de l'œuf.

Enfin, la papaine montre les résultats les plus prometteurs. Une réelle différence pouvait se ressentir lors de la manipulation des œufs. Cette différence est observée sur les mesures de distances de rupture, plus l'exposition au réactif est longue, plus la distance pour séparer deux œufs est courte ($p\text{-value} < 0,0002$). Son utilisation par le passé dans l'entreprise semble justifiée.

Comme le suggèrent Grant *et al.* (2016), les œufs et leur mode de fixation sont autant de critères variables qui impliquent que des réactifs adaptés doivent être utilisés. En effet, lors de leurs expérimentations chez la tanche *Tinca tinca*, l'Alcalase[®] s'est montrée très efficace pour dissoudre la couche adhésive à la surface de l'œuf, sans attaquer ce dernier. La perméabilité du ruban est donc un facteur à prendre en compte lors de l'utilisation de réactifs. Le choix des réactifs était basé sur leur utilisation dans d'autres études, par leur occurrence et leur résultat. Les résultats obtenus ici nous permettent de suggérer que seules des enzymes ont la capacité de dissoudre cette structure particulière chez la perche.

Cette étude se focalisait sur l'action d'agents chimiques mais les résultats indiquent qu'une action chimique seule n'est pas suffisante pour séparer les œufs. Une action mécanique pourrait faciliter les processus de séparation en minimisant les concentrations et les temps de réaction. En effet, la phase de post-fertilisation est une phase sensible pour l'œuf. Chez les salmonidés, il est préférable de ne pas provoquer de stress mécaniques après 36h de post-fertilisation (Watson, Chapman, 2000).

Un point négatif lors de cette étude a été la non possibilité d'approfondir les recherches à partir des résultats obtenus. En effet, la dernière session d'expériences devait avoir lieu lors de la ponte de Juin. Cette ponte n'a cependant pas permis d'obtenir un nombre suffisant de rubans pour effectuer à la fois les expériences de synchronisation des éclosions et ces approfondissements.

Lors de ces approfondissements, les points suivant auraient dû être étudiés :

- Focalisation sur la papaine, tester les interactions concentration/temps de réaction
- Test de la bromélaïne

- Étude de l'ajout d'une action mécanique à l'action chimique

Les résultats obtenus alors seront de solides aides dans l'amélioration des processus d'incubation et de la biosécurité chez Valperca SA.

3. Synchronisation des éclosions

L'éclosion est une phase sensible durant laquelle les larves subissent un changement brutal de conditions environnementales. En effet, elles quittent l'œuf, qui est un milieu protecteur et propice à leur développement, pour se retrouver dans un milieu sauvage, où les paramètres physico-chimiques varient et où le risque de prédation augmente. En passant au stade larvaire, elles entrent dans une phase où les mortalités sont les plus importantes. Les facteurs maternels sont importants pour assurer de bonnes éclosions et des larves de bonne qualité. Cela passe par la qualité des œufs, l'apport en énergie par le globule lipidique, mais aussi la ponte. Ce dernier facteur a été démontré comme important dans les taux d'éclosions chez *Perca fluviatilis*. Une ponte en début de saison est signe de meilleurs taux d'éclosions (Castets *et al.*, 2012). Les facteurs environnementaux ont aussi leur importance. Des micro-variations de conditions du milieu peuvent apparaître au sein d'un groupe d'œufs issu d'une même ponte (Bradbury *et al.*, 2004). La perche montre une forte sensibilité à la température lors de la phase d'éclosion, pouvant durer 3 jours à 19°C et 5 jours à 15°C (Żarski *et al.*, 2017).

L'asynchronie des pontes est un phénomène commun chez les ovipares. Laurel *et al.* (2008) ont émis l'hypothèse que des éclosions étalées dans le temps augmenteraient les chances pour certaines larves de rencontrer des conditions environnementales favorables, mais aussi réduiraient la compétition entre larves.

Une autre problématique de l'asynchronie des éclosions se trouve dans le stade de développement de chaque individu. Une étude de Alix *et al.* (2015) a montré qu'il n'y avait pas de différence de taille entre des individus ayant éclos et des individus n'ayant pas encore éclos, à âge (calculé en °jours) égal. De plus, l'âge de première nutrition orale était le même (15 jours après fécondation).

En écloserie, le contrôle des paramètres physico-chimiques de l'eau, ainsi que l'absence de prédation, rendent les avantages de l'asynchronie dans la nature nuls. Ajoutés à cela les résultats des travaux de Alix *et al.* (2015), la synchronisation des éclosions montre tout son intérêt.

Pour répondre à l'objectif de cette partie, à savoir si un réactif chimique permettait de synchroniser les éclosions, deux phases de test ont été réalisées.

Une phase préliminaire, se déroulant pendant la ponte du mois de Mai, permet d'identifier un réactif susceptible d'aider à la synchronisation.

Une phase finale, cette fois pendant la ponte de Juin, se focalise sur un réactif identifié et étudie sa viabilité en production.

3.1. Matériel et méthodes

3.1.1. Matériel biologique

Après deux à trois heures d'attente, pour s'assurer que la fécondation a bien eu lieu, les échantillons sont prélevés. Chaque fragment est découpé à l'aide de ciseaux et d'une pince courbe. Ils sont ensuite placés dans des pinces à thé identifiées à l'aide d'un code donnant le réactif, le temps de réaction et la femelle ou l'échantillon. Les pinces sont finalement placées en incubateur.

Pour le test préliminaire, quatre femelles ont été utilisées (F1, F2, F3, F4). Avec un fragment par réactif et par temps, 15 fragments par femelle ont été prélevés, soit 60 fragments.

Pour le test final, le premier prélèvement a été fait sur quatre femelles différentes (F1, F2, F3, F4). Chaque fragment contient entre 30 et 40 œufs. Cinq jours après la mise en incubation, une vérification de l'état des œufs et de l'avancement du développement embryonnaire fut réalisée. Chaque échantillon était placé dans une boîte de Pétri pour compter le nombre d'œufs avec un développement normal. Cette étape était nécessaire car la ponte de Juin était mauvaise et la mortalité au sein des rubans importante. Cette vérification permettait de s'assurer du nombre suffisant d'œufs nécessaire au bon déroulement de l'expérience. Après comptage, le nombre d'œufs vivants dans chaque échantillon était le suivant (Tableau 5) :

Tableau 5. Nombres d'œufs normalement développés dans chaque échantillon

ALCALASE				TÉMOIN			
F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
31	9	3	36	22	5	23	18
15	5	2	30	10	7	35	30
31	8	38	29	11	4	2	32
25	2	19	11	24	6	0	16
40	5	3	17	51	11	40	31
14	7	3	32	15	10	4	20

Il a été décidé de prélever à nouveau des fragments de ruban sur deux femelles différentes, pour remplacer la femelle F2 et ajouter une cinquième femelle F5, comblant ainsi la forte mortalité dans les échantillons. Ces échantillons furent prélevés à partir de rubans fécondés le même jour que les quatre premiers utilisés. Le développement était alors le même. Finalement, le nombre d'échantillons s'élevait à 60.

Les plans d'expériences des deux tests sont présentés en Annexe I.

3.1.2. Conditions expérimentales

D'après la littérature, les œufs de *Perca fluviatilis* éclosent en moyenne à 165 °jours après la mise en incubation (Żarski *et al.*, 2017). Dans les conditions de production de l'écloserie, les éclosions débutent en général plus tôt, vers 145-155 °jours. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette différence, les microvariations de températures qui sont autant de micro stress, l'utilisation d'une hormone différente.

L'objectif de cette étude étant de définir si un réactif facilite les éclosions, nous devons être capable d'attribuer toutes les éclosions au réactif. Nous devons donc être assurés qu'aucune larve n'a éclos avant la réaction. Pour cela, nous avons décidé de procéder aux réactions à 135 °jours.

Test préliminaire

Quatre réactifs ont été testés. Après passage en revue des différents articles mentionnant l'utilisation de ces réactifs, les concentrations suivantes ont été choisies :

- Papaine à 0,1%
- Bromélaïne à 0,1%
- Alcalase® à 0,5%

- Hypochlorite de sodium à 0,03%

Pour chaque réactif, 3 temps de réaction ont été testés, 1, 5 et 15 minutes.

Un traitement témoin est aussi étudié. Les temps de réactions sont respectés, sans réactif, pour que les conditions de stress soient les mêmes.

Les pinces ont été placées en incubateur du 07/05 au 16/05. Les températures de l'eau étaient les suivantes (Tableau 6) :

Tableau 6. Température de l'eau (°C) dans les incubateurs pendant l'incubation des échantillons du test préliminaire

Jours		Température		
Du	Au	Minimum	Moyenne	Maximum
07/05/17	10/05/17	13,09	13,20	13,33
10/07/17	13/05/17	14,02	14,18	14,35
13/05/17	14/05/17	14,51	14,58	14,69
14/05/17	16/05/17	14,81	14,95	15,16

L'annexe II représente la courbe de température de l'eau d'incubateur sur toute la période d'incubation.

Comme dans l'expérience 1, le point critique est la phase de rinçage. Cette étape est d'autant plus délicate qu'à ce stade, les œufs sont très sensibles et le moindre stress peut les faire éclore. Pour limiter ces stress, un dispositif a été fabriqué. Ce dernier est constitué de 5 canaux de réaction parallèles et d'un canal de rinçage perpendiculaire en amont des 5 canaux. Un canal de réaction contient un réactif à la concentration voulue. Les pinces contenant les œufs sont placées dans ces canaux à des temps différents pour que la fin de la réaction ait lieu simultanément. Le rinçage se fait ensuite par une entrée d'eau d'incubation dans le canal perpendiculaire, qui va irriguer chaque canal de réaction par le biais de perforations. Le rinçage se fait donc automatiquement, en flux continu, sans toucher aux pinces (Annexe I).

Une fois le rinçage terminé, chaque pince est vidée dans une boîte de Pétri contenant 40 mL d'eau d'incubation.

Test final

Seule l'Alcalase® a été choisie pour le test final, à partir des résultats du test préliminaire, à la concentration 0,5%, avec un temps de réaction de 10 minutes. Un traitement témoin, comme précédemment, est réalisé, en eau d'incubation.

Les pinces ont été placées en incubateur du 02/06 au 12/06. Les températures de l'eau étaient les suivantes (Tableau 7) :

Tableau 7. Température de l'eau (°C) dans les incubateurs pendant l'incubation des échantillons du test final

Jours		Température		
Du	Au	Minimum	Moyenne	Maximum
02/06/17	03/06/17	11,73	11,84	11,95
03/06/17	05/06/17	12,17	12,43	12,65
05/06/17	12/06/17	12,85	13,62	13,91

L'annexe III représente la courbe de température de l'eau d'incubateur sur toute la période d'incubation.

Les réactions sont réalisées dans deux seaux, l'un contenant une solution d'Alcalase® à 0,5%, l'autre contenant de l'eau d'incubation. Les pinces sont placées dans chaque seau pendant 10 minutes, puis un apport continu d'eau d'incubation dans les seaux permet le rinçage des pinces, sans les déplacer. Après rinçage, chaque pince est vidée dans une boîte de Pétri contenant 40 mL d'eau d'incubation.

Le test préliminaire nous a montré que l'eau contenue dans les boîtes de Pétri n'étant pas renouvelée, une accumulation de matière organique et un développement bactérien ont lieu, ce qui diminue la qualité de l'eau et peut impacter la survie des larves. Nous avons décidé de renouveler une partie de l'eau des boîtes Pétri chaque jour. 15 mL d'eau étaient prélevés et remplacés par un volume égal d'eau d'incubation (37,5% de renouvellement).

3.1.4. Mesures

Pour déterminer un produit utilisable en routine, deux paramètres principaux devaient être vérifiés :

- Le taux d'éclosion, c'est à dire le nombre de larves écloses à un instant t sur le nombre total d'œufs fécondés et développés
- Le taux de survie, c'est-à-dire le nombre de larves vivantes en fin d'expérience sur le nombre total d'œufs fécondés et développés.

Pour calculer ces paramètres, des enregistrements vidéo à différents temps furent réalisés. Le tableau 8 indique les différents enregistrements par test :

Tableau 8. Indication sur les temps de prises de mesures après la réaction et l'âge des larves

Enregistrement	Test préliminaire		Test final	
	Temps post-réaction (en heures)	Âge en °jours	Temps post-réaction (en heures)	Âge en °jours
t ₁	0,5	126	1	135
t ₂	1,5	127	2	135
t ₃	2,5	128	3	136
t ₄	12	134	4	137
t ₅	43	156	5	137
t ₆			14	144
t ₇			24	151
t ₈			48	169
t ₉			72	186

Chaque enregistrement nous donne le nombre d'éclosions et le nombre de larves actives. Nous pouvons donc suivre l'évolution de ces paramètres dans le temps.

Pour le test final, nous avons mesuré deux paramètres supplémentaires :

- La longueur des larves vivantes à t₉

- Le teneur en bactéries contenue dans l'eau des boîtes de Pétri à t_9

La longueur des larves est obtenue à partir de photographies des boîtes de Pétri, sur lesquelles des mesures à l'aide du logiciel Adobe® Photoshop® (Adobe, San José, Californie, États-Unis) sont réalisées. Nous avons construit un modèle d'analyse de variance sous R. La variable à expliquer est la longueur des larves. Les variables explicatives sont le traitement et la femelle.

Les tests bactériens sont réalisés comme suit :

- 1 mL d'eau est prélevé par boîte de Pétri. Les prélèvements des 6 échantillons d'une femelle sont mélangés.
- Des dilutions successives sont réalisées en ajoutant un mL de solution à diluer dans une fiole stérile de 9 mL de lécithine. Nous diluons à 10^{-3} et 10^{-4} .
- L'ensemencement se fait sur un Petrifilm™ (3M™, Saint Paul, Minnesota, États-Unis). 1 mL de solution est déposé sur le Petrifilm™ qui sert de milieu de culture pour les bactéries.
- Le Petrifilm™ est placé à l'étuve à 22°C pendant 48h.
- Le comptage se fait après 48h. On calcule le nombre moyen de colonies comptées sur trois cases d'un Petrifilm™ choisies aléatoirement. On multiplie ensuite ce nombre d'un facteur 10^x , avec x la dilution utilisée. On obtient alors un quantité d'ufc (unité formant colonie). Le passage au \log_{10} permet la comparaison entre les traitements.

3.2. Résultats

3.2.1. Test préliminaire

Taux d'éclosion

Nous présentons ici le temps de réaction 1 minute comme exemple (Figure 7). Les courbes représentant les taux d'éclosion des deux autres temps de réaction se trouvent en annexe IV.

Ces courbes montrent deux évolutions distinctes des taux d'éclosion. La première concerne l'Alcalase® seule. 30 minutes seulement après la fin de la réaction, le taux moyen d'éclosion entre les 4 femelles traitées atteint 35,52% (respectivement 69,12% et 77,84%) pour 1 minutes de réaction (resp. 5 minutes et 15 minutes). Les éclosions augmentent rapidement après, pour atteindre 85,35% (resp. 76,01% et 95,91%) deux heures plus tard. Puis cette augmentation du taux d'éclosion diminue. À t_5 , nous obtenons 100% d'éclosions (resp. 94,57% et 100%).

La deuxième évolution regroupe les 3 autres réactifs ainsi que le témoin. Pour les 3 temps de réactions, les taux d'éclosion ne dépassent pas les 25% à t_3 . Ils évoluent conjointement jusqu'à t_4 , les tests de variance ne montrent pas d'effet du traitement entre la papaine, la bromélaïne, l'hypochlorite de sodium et le témoin, de t_1 à t_4 . De t_1 à t_4 , les tests d'analyse de variance montrent qu'il y a un effet du traitement sur les taux d'éclosions, effet que l'on attribue seulement à l'Alcalase®, qui affiche des taux d'éclosions significativement supérieurs aux 4 autres. À t_5 , il n'y a plus d'effet du traitement.

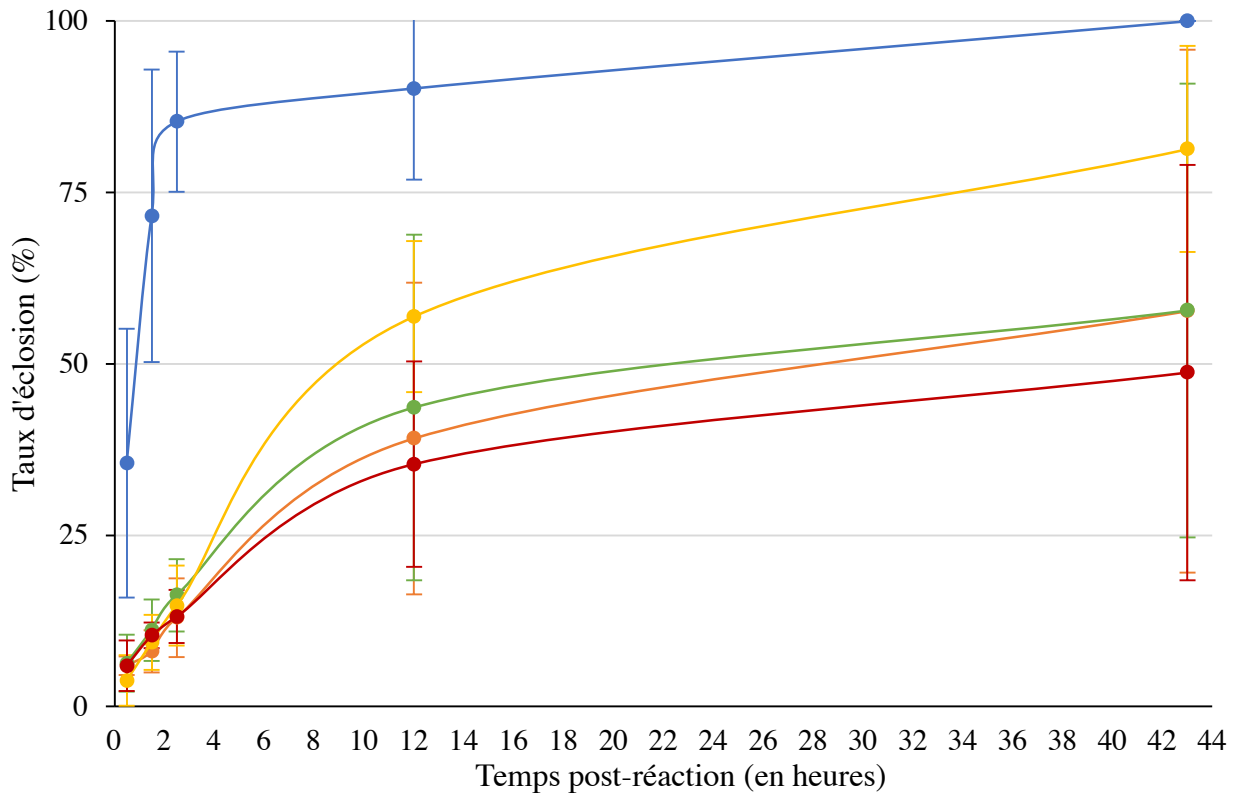


Figure 7. Évolution temporelle des taux d'éclosion – Expérience préliminaire – 1 minute de réaction. Code couleur : Alcalase® ; Hypochlorite de sodium ; Bromélaïne ; Papaïne ; Témoin. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards en valeur positive et négative.

Taux de survie

En fin d'expérience, à t_5 , seules quelques boîtes contenaient des larves encore vivantes. L'observation au microscope de toutes les boîtes a montré qu'un fort développement bactérien avait eu lieu. Cela s'explique par le fait que l'eau des boîtes n'était pas renouvelée, les larves se développent aussi. Il y a donc une accumulation de facteurs pouvant nuire à la survie des larves. La forte mortalité dans les boîtes ne pouvant pas être seulement attribuée aux traitements et vu le nombre trop faible de données, les taux de survie lors du test préliminaire n'ont pas été calculés.

3.2.2. Test final

Taux d'éclosion

La figure 8 correspond à l'évolution des taux d'éclosion après les réactions. L'effet traitement est ici très visible ($p\text{-value} < 2,2 \cdot 10^{-16}$). Deux groupes de courbes se distinguent, les courbes des traitements à l'Alcalase® dans la partie supérieure du graphique et les courbes témoins dans la partie inférieure. Entre les 5 femelles au sein de chaque traitement, l'évolution est similaire. En effet, il n'y a pas d'effet femelle au sein d'un traitement ($p\text{-value} > 0,6$). Enfin, il n'y a pas d'effet temps non plus pour un traitement donné ($p\text{-value} = 0,1$).

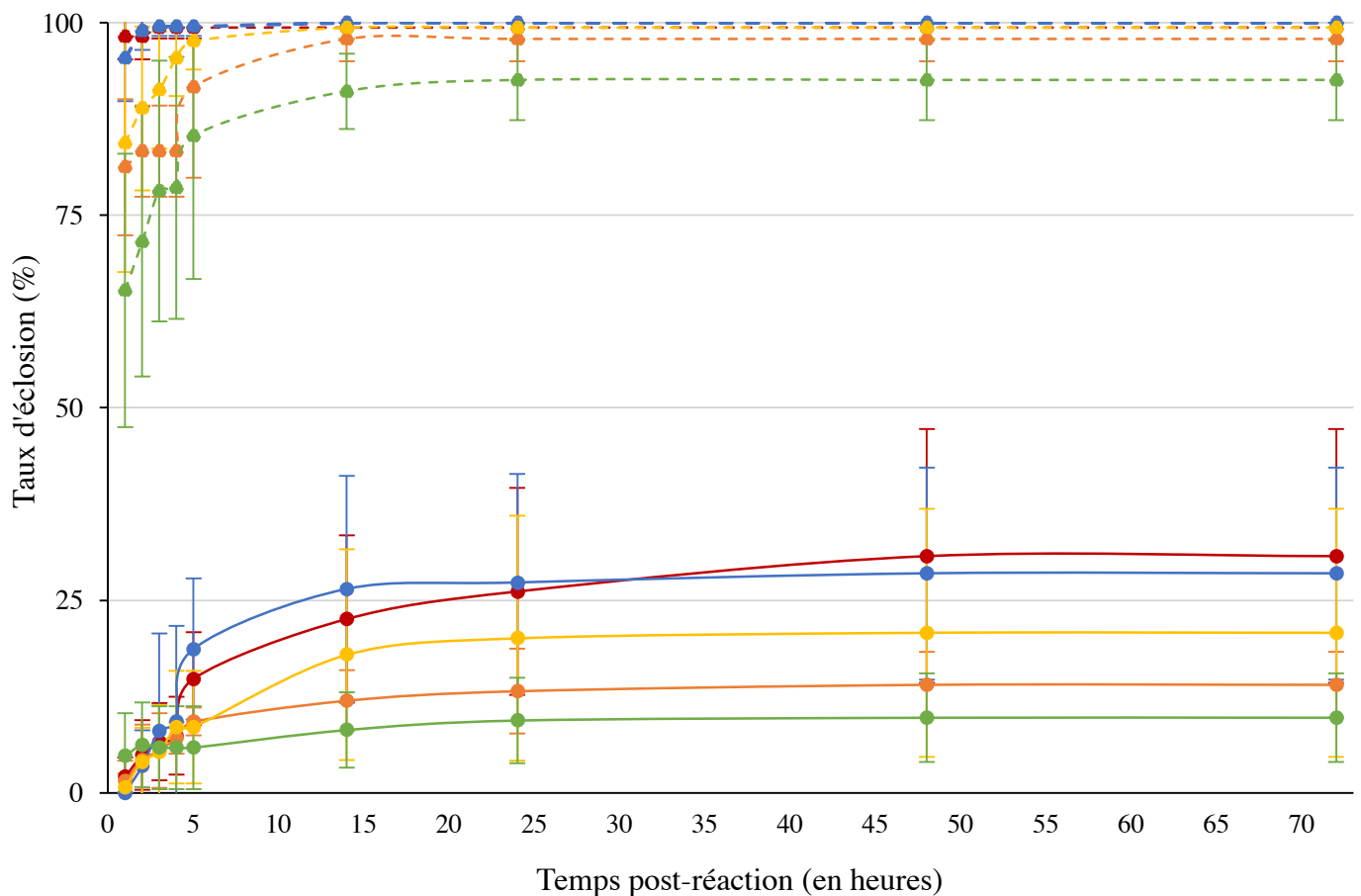


Figure 8. Évolution des taux d'éclosion moyen par femelle dans le temps après la fin de la réaction, par traitement. Les traits pleins correspondent au témoin (—). Les traits pointillés représentent le traitement Alcalase® (----). Code couleur : **Femelle F1** ; **Femelle F2** ; **Femelle F3** ; **Femelle F4** ; **Femelle F5**. Les barres d'erreur représentent les erreurs standard en valeur positive et négative.

Taux de survie

Les taux de survies sont calculés à t_0 . Les boîtes de dispersion des taux pour chaque traitement et chaque femelle sont présentés dans la figure 9. Nous utilisons un modèle d'analyse de variance pour expliquer les taux de survie en fonction du traitement et des femelles. Le traitement à l'Alcalase® a un effet positif sur les taux de survie ($p\text{-value} < 5.10^{-9}$). Femelles confondues, le taux moyen de survie pour le traitement à l'Alcalase® est de 47%, contre 13 pour le témoin. Un effet femelle est aussi significatif ($p\text{-value} < 0,0002$). Cet effet est attribué principalement à la femelle F5.

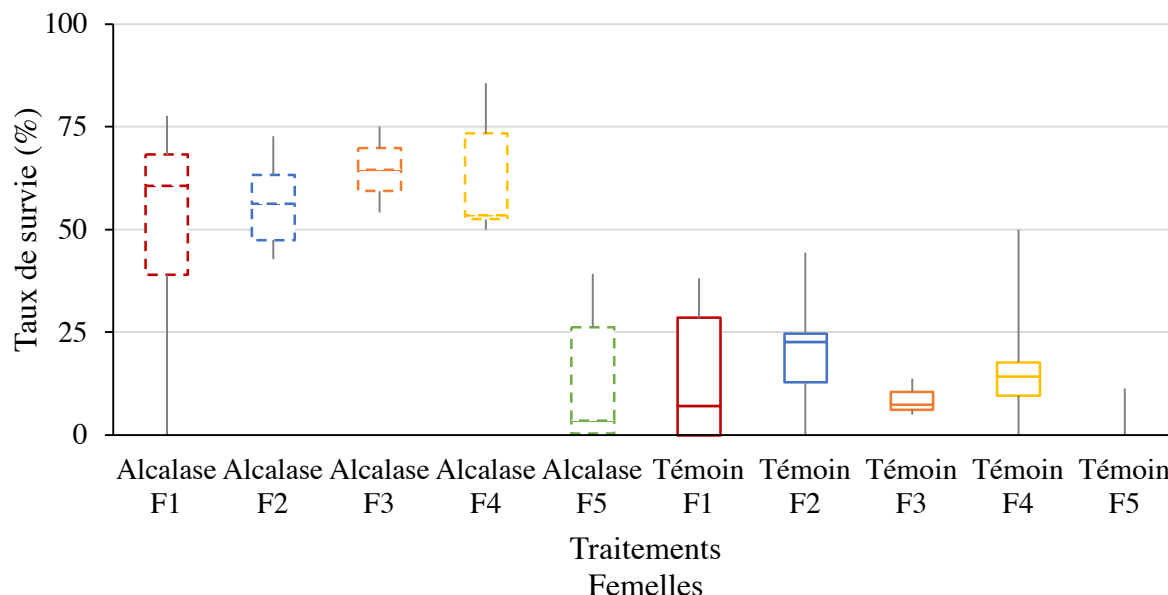


Figure 9. Boîtes de dispersion des taux de survie pour chaque femelle et chaque traitement. Les traits pleins correspondent au témoin (—). Les pointillés représentent le traitement Alcalase® (- - -). Code couleur : **Femelle F1** ; **Femelle F2** ; **Femelle F3** ; **Femelle F4** ; **Femelle F5**

Longueur des larves

L'analyse de variance montre qu'il n'y a pas d'effet du traitement sur la taille des larves ($p\text{-value} = 0,2$). Cependant, il y a un effet femelle ($p\text{-value} = 3,6.10^{-5}$). Les larves issues de la femelle F4 sont significativement plus longues ($p\text{-value} = 4.10^{-5}$). La figure 10 représente les longueurs moyennes des larves issues des 5 femelles (tout traitement confondu) :

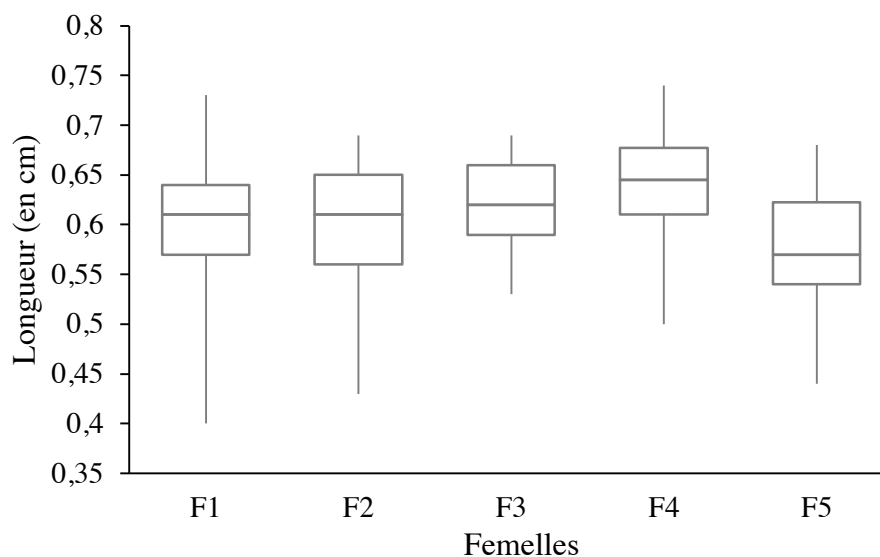


Figure 10. Boîtes de dispersion des longueurs des larves en fonction des femelles, traitement confondu

Charge bactérienne

Seul le comptage à la dilution 10^{-4} était possible. La comparaison entre les charges bactériennes des deux traitements ne montre pas d'effet de ces derniers (p -value = 0,4) (Figure 11). On considère en général qu'une différence de $\log(\text{ufc})$ est significative lorsqu'elle est supérieure à 0,5. Ici, la différence entre la plus petite valeur d'un traitement et la plus grande d'un autre est inférieure à 0,5.

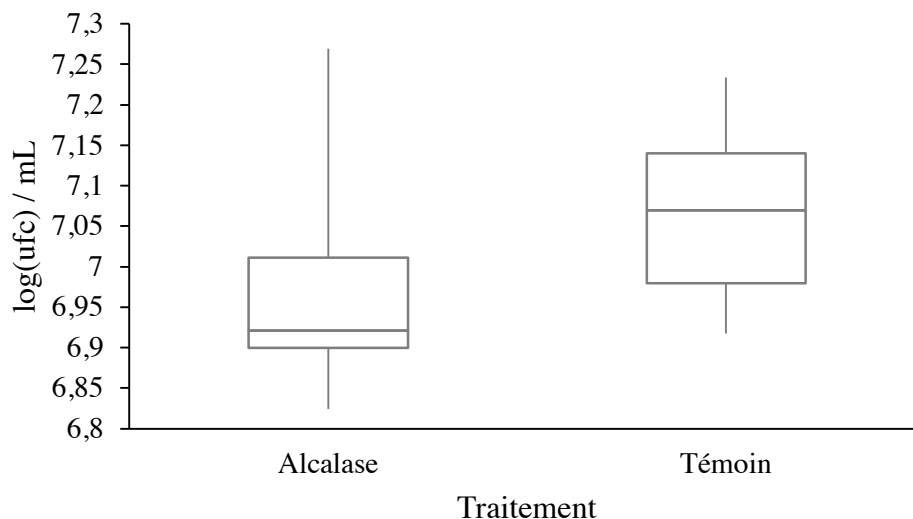


Figure 11. Boîtes de dispersion des $\log(\text{ufc})/\text{mL}$ pour chaque traitement

3.3. Discussion

Lors de l'éclosion, plusieurs facteurs entrent en jeu pour permettre la percée de l'œuf par la larve. Les larves secrètent une enzyme, la chorionase, qui va dégrader la partie interne de l'œuf. Cette enzyme se trouve dans une glande qui va l'accumuler et la libérer au moment de l'éclosion (Luczynski *et al.*, 1987). Après un certain temps passé dans l'eau, le ruban change aussi de structure, il devient plus fragile. Enfin, l'activité des larves augmente lorsque leur développement permet l'éclosion. Cette action mécanique, ajoutée à la fragilisation de l'œuf et du ruban, permet l'éclosion.

Nous montrons ici que l'utilisation d'un réactif chimique, l'Alcalase[®], a plusieurs impacts dans le phénomène d'éclosion. Lors du test préliminaire, ses effets ont été directement visibles. Ces résultats étaient prévisibles. En effet, les expériences de dissolution du ruban ont montré que l'Alcalase[®], à défaut de dissoudre le ruban, dissolvait les œufs qui éclataient rapidement.

Avec plus de 75% d'éclosions 3 heures après la fin de la réaction, il est clair que cette enzyme favorise les éclosions. Le test final montre qu'il n'y a pas de variation significative au cours du temps des taux d'éclosions. La synchronisation souhaitée est obtenue, avec la majorité des éclosions se faisant quelques heures après la réaction puis seulement quelques éclosions supplémentaires pendant les heures qui suivent. Cependant, plusieurs éléments restaient à vérifier.

Premièrement, la survie des larves. Les observations montrent qu'il ne reste qu'une petite partie des œufs dans les boîtes de Pétri, ces derniers ayant été totalement dissous par l'enzyme. Les éclosions sont donc forcées, ce n'est pas une simple fragilisation. Cela implique que l'on va considérer comme écloses, car sorties de l'œuf, une larve vivante comme une larve morte. Cela explique aussi les taux d'éclosion importants dans le cas du traitement à

l'Alcalase®. L'intérêt de ce réactif ne doit donc pas seulement s'expliquer par les taux d'éclosion. L'étude des taux de survie nous donne une réponse. Cette étude se fait à t_9 pour s'assurer que les œufs non éclos sont morts et ne nécessitent pas un temps supplémentaire pour éclore. À t_9 , il y a donc des larves vivantes ou mortes (pour plusieurs raisons, dans l'œuf ou après éclosion, naturellement ou à cause du traitement). Nous avons donc le nombre de larves vivantes que nous pouvons diviser par le nombre total d'œuf œillés comptés au début du test. Les résultats obtenus sont surprenants. En plus de ne pas affecter la survie des larves, le traitement augmente ce taux de survie (47% pour le traitement contre 13% pour le témoin). Une autre précaution doit être prise lors de l'interprétation de ce résultat. Une partie des œufs contient des embryons malformés, facilement observable au microscope. L'Alcalase® peut aussi faire éclore ces embryons, alors qu'ils n'auraient pas eu la force d'éclore naturellement. Il faut donc différencier les larves vivantes normales et les larves vivantes malformées pour le traitement à l'Alcalase®. Si on peut en observer pendant les premiers enregistrements, elles meurent rapidement et n'expliquent pas ce nombre plus grand de larves vivantes à t_9 . Ce résultat suggère donc que naturellement, un certain nombre d'embryons (34% d'après les résultats), sont normalement développés, mais ne parviennent pas à éclore.

Un deuxième élément concerne le développement des larves. Comme expliqué précédemment, les éclosions dans le traitement à l'Alcalase® peuvent être considérées comme forcées. Même si, comme l'ont montré Alix *et al.* (2015) le développement est le même entre une larve éclore et un embryon encore dans l'œuf, il faut s'assurer que le traitement n'impacte pas le bon développement des larves. Les résultats sur les longueurs des larves à t_9 montrent qu'il n'y a pas d'effet négatif du traitement sur la taille des larves.

L'analyse de la charge bactérienne associée à chaque traitement n'a pas montré de différence entre les deux traitements. L'hypothèse initiale était que l'Alcalase®, en dissolvant les œufs, fasse passer en solution les molécules issues de cette dégradation. Le renouvellement d'eau permettrait donc de retirer une partie de ces molécules organiques utilisées par les bactéries pour leur développement. Si cette hypothèse est réfutée par les résultats, la dégradation des œufs reste avantageuse en production.

Contrairement aux boîtes de Pétri, le renouvellement d'eau en circuit d'incubation est important et constant. Les molécules en solutions sont éliminées plus facilement. Lors de la récupération des larves pour le passage en bassins larvaires, il y a souvent transfert de restes d'œufs qui s'accumulent dans les incubateurs. Ces particules sont autant de sources de pollution pour l'eau des larves et peuvent obstruer les systèmes de filtration qui sont petits à cause de la taille des larves. Limiter ces transferts est donc un moyen supplémentaire d'améliorer la qualité de l'eau et de diminuer les taux de mortalité.

Les résultats obtenus sont prometteurs et pourraient se montrer être une avancée majeure pour la production de larves chez Valperca SA.

4. Discussion

De nombreux agents chimiques sont utilisés en éclosion, principalement dans un objectif de désinfection. Nous pouvons citer les exemples de l'ozone, de l'eau de Javel ou du peroxyde d'hydrogène. L'ozone permet de traiter l'eau en oxydant la matière organique. L'eau de Javel est efficace pour désinfecter le matériel d'éclosion. Le peroxyde peut être utilisé pour désinfecter les œufs avant leur mise en incubation (Allan, Burnell, 2013). Cependant, il faut être vigilant lors de leur utilisation, les risques pour les poissons ainsi que le personnel sont nombreux. La ponte et l'éclosion étant deux étapes sensibles, il faut agir avec précaution. Après la ponte, il ne faut pas interférer avec les processus de fertilisation. Cependant, une action tardive ne permet pas d'obtenir les avantages attendus. Il faut réussir à séparer les œufs assez rapidement pour ne pas retarder la mise en incubation et ainsi ne pas avoir à travailler avec la

contrainte du ruban. Même temporairement, il nous obligerait à utiliser des installations spécialement conçues pour lui en plus des installations mises en place pour les œufs libres. Lors de l'éclosion, le problème majeur est le dosage pour ne pas risquer une action du réactif sur les larves écloses, tout en dégradant assez les œufs. Ce même problème se pose après la fécondation, pour obtenir une dégradation du ruban sans impacter les œufs.

Une autre contrainte se trouve dans la variabilité inter-espèce de la structure et de la composition des œufs. Cette dernière nous impose de nombreuses combinaisons de « réactifs/concentration/temps de réaction » pour trouver l'agent chimique qui donne des résultats. Les résultats de cette étude montrent que les enzymes semblent être les plus efficaces dans le cas de *Perca fluviatilis*. Cela peut paraître logique lorsque l'on observe attentivement le ruban. C'est une structure épaisse, organisée, qui lie les œufs pendant plusieurs jours. Une dissolution de ce dernier nécessite donc une réaction chimique puissante, que seules les enzymes semblent être en mesure de délivrer. Chez d'autres espèces, la membrane des œufs s'avère être la structure de résistance de ces derniers. Chez la perche, cette membrane est plus fragile car c'est le ruban qui offre une protection. Leur dégradation est alors plus simple.

Ces contraintes connues, les deux études ont pu être menées et les premiers résultats obtenus. Concernant la dissolution du ruban, les résultats permettent seulement d'orienter de futures recherches. Ces dernières pourront se focaliser sur la papaine. Les observations indiquent aussi qu'une action mécanique, ajoutée à l'action chimique, peut donner des résultats intéressants. Des tests réalisés à l'aide d'un agitateur magnétique ont montré qu'une fragmentation est possible.

Les résultats les plus intéressants sont ceux portant sur la synchronisation des éclosions. Après seulement deux tests, la synchronisation a bien été effective, permettant par la même occasion une augmentation du taux de survie. Des points restent cependant encore à étudier avant une application en production. Par exemple, il faut définir une quantité de réactif à utiliser par masse de ruban ajoutée afin d'obtenir les résultats attendus. En effet, l'Alcalase® est un réactif coûteux (103 francs Suisse pour 50 mL de solution), il est important de déterminer le coût d'utilisation de ce produit et donc de savoir si les avantages procurés par cette synchronisation sont rentables. Les avantages sont attendus principalement lors des premiers stades de développement des larves et des alevins. Premièrement, les températures étant différentes entre l'eau d'incubation et l'eau du secteur larvaire, les larves écloses et transférées ont alors une croissance plus rapide que les larves encore dans les œufs. Au sein d'un même lot, on retrouve alors des larves de tailles différentes et cette différence est difficile à corriger et souvent amplifiée avec le temps. Celle-ci conduit aussi à du cannibalisme et oblige à effectuer des tris réguliers, qui sont consommateurs de main d'œuvre, d'espace et sources de stress pour les poissons. La synchronisation des éclosions permet d'obtenir des lots plus homogènes et limite les problèmes dans les stades de développement suivants. Deuxièmement, dans l'incubateur, les attaques bactériennes ou fongiques sont fréquentes après un certain temps à cause de la dégradation du ruban et des œufs, source de matière organique. Ces attaques fragilisent les larves et une contamination du secteur larvaire est également possible. En réduisant le délai d'éclosion, il est possible de limiter aussi ces attaques.

Conclusion

Cette étude s'inscrit dans une volonté de Valperca SA de développer une nouvelle façon de travailler avec le ruban de la perche. À partir d'un nombre limité de réactifs potentiellement capables de modifier la structure de ce dernier, les tests ont été menés sur les deux étapes post-fécondation. Si pour la première partie, les tests n'ont pas été concluants pour une application directe en production, ceux de la deuxième partie portant sur la synchronisation ont montré des

résultats intéressants. Le but premier de réduire la période d'éclosion a été atteint grâce à l'Alcalase[®], avec un grand nombre d'éclosions quelques heures après l'ajout du réactif. Un résultat surprenant est l'augmentation du taux de survie, qui indique qu'en plus de synchroniser les éclosions, le traitement augmenterait le nombre de larves obtenues. Des approfondissements sont cependant nécessaires avant une utilisation en production, pour permettre la rédaction d'un protocole. Ce dernier devra définir clairement les quantités à utiliser, ainsi que les différentes étapes, notamment le rinçage auquel il faut apporter une attention particulière pour garantir une bonne utilisation de l'enzyme et les résultats attendus.

Avec ces résultats, Valperca SA peut réfléchir d'une manière nouvelle l'organisation de ses différents secteurs et de ses installations, avec la possibilité d'augmenter sa production, lui permettant de garder sa place de leader sur le marché suisse.

Bibliographie

ABDEL-NAEEM, Heba H.S. et MOHAMED, Hussein M.H., 2016. Improving the physico-chemical and sensory characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain. In : *Meat Science*. août 2016. Vol. 118, p. 52-60. DOI 10.1016/j.meatsci.2016.03.021.

ABDULFATAH, Abdulbaset, 2010. *Etude du déterminisme environnemental du cycle de reproduction chez la perche commune (Perca fluviatilis)* [en ligne]. S.l. : s.n. Disponible à l'adresse : <http://www.theses.fr/2010INPL054N/document>.

ALI, M. A., RYDER, R. A. et ANCTIL, M., 1977. Photoreceptors and Visual Pigments as Related to Behavioral Responses and Preferred Habitats of Perches (*Perca* spp.) and Pikeperches (*Stizostedion* spp.). In : *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. octobre 1977. Vol. 34, n° 10, p. 1475-1480. DOI 10.1139/f77-212.

ALIX, Maud, CHARDARD, Dominique, LEDORÉ, Yannick, FONTAINE, Pascal et SCHAERLINGER, Berenice, 2015. An alternative developmental table to describe non-model fish species embryogenesis: application to the description of the Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L. 1758) development. In : *EvoDevo* [en ligne]. décembre 2015. Vol. 6, n° 1. [Consulté le 21 février 2017]. DOI 10.1186/s13227-015-0033-3. Disponible à l'adresse : <http://www.evodevojournal.com/content/6/1/39>.

ALLAN, Geoff L et BURNELL, Gavin, 2013. *Advances in aquaculture hatchery technology*. Oxford : Woodhead. ISBN 978-0-85709-119-2.

ALMEIDA, L. Zoe, GUFFEY, Samuel C., KRIEG, Tyler A. et HÖÖK, Tomas O., 2017. Predators Reject Yellow Perch Egg Skeins. In : *Transactions of the American Fisheries Society*. 2 janvier 2017. Vol. 146, n° 1, p. 173-180. DOI 10.1080/00028487.2016.1249294.

ASRAF, Amirul, MUCHLISIN, Zainal Abidin et SITI-AZIZAH, Mohd Nor, 2013. Removal of Eggs Adhesiveness of African catfish (*Clarias gariepinus*) at Different Concentrations of Urea Solution. In : *Aceh International Journal of Science and Technology*. 31 décembre 2013. Vol. 2, n° 3, p. 94-97. DOI 10.13170/AIJST.0203.04.

BAREKAT, Sorour et SOLTANIZADEH, Nafiseh, 2017. Improvement of meat tenderness by simultaneous application of high-intensity ultrasonic radiation and papain treatment. In : *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. février 2017. Vol. 39, p. 223-229. DOI 10.1016/j.ifset.2016.12.009.

BERGMAYER, Hans Ulrich, WILLIAMSON, Dermot H. et GAWEHN, Karlfried (éd.), 1974. *Methods of enzymatic analysis. Vol. 2: [...]. 2. engl. ed.* Weinheim : Verl. Chemie [u.a.]. ISBN 978-0-12-091302-2.

BRADBURY, Ian R., CAMPANA, Steven E., BENTZEN, Paul et SNELGROVE, Paul VR, 2004. Synchronized hatch and its ecological significance in rainbow smelt *Osmerus mordax* in St. Mary's Bay, Newfoundland. In : *Limnology and Oceanography*. 2004. Vol. 49, n° 6, p. 2310-2315.

CASTETS, M.-D., SCHAERLINGER, B., SILVESTRE, F., GARDEUR, J.-N., DIEU, M.,

CORBIER, C., KESTEMONT, P. et FONTAINE, P., 2012. Combined analysis of *Perca fluviatilis* reproductive performance and oocyte proteomic profile. In : *Theriogenology*. juillet 2012. Vol. 78, n° 2, p. 432-442.e13. DOI 10.1016/j.theriogenology.2012.02.023.

CHAURASIYA, Ram Saran et UMESH HEBBAR, H., 2013. Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. In : *Separation and Purification Technology*. juin 2013. Vol. 111, p. 90-97. DOI 10.1016/j.seppur.2013.03.029.

COLLODI, Paul, KAME, Yuto, ERNST, Ted, MIRANDA, Cristobal, BUHLER, Donald R. et BARNES, David W., 1992. Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo and adult tissues. In : *Cell biology and toxicology*. 1992. Vol. 8, n° 1, p. 43-61.

CRAIG, John F., 2000. *Percid fishes: systematics, ecology, and exploitation*. Oxford ; Malden, MA : Blackwell Science. Fish and aquatic resources series, 3. ISBN 978-0-632-05616-3. QL638.P4 C73 2000

DEMSKA-ZAKES, Krystyna, ZAKES, Zdzislaw et ROSZUK, Jakub, 2005. The use of tannic acid to remove adhesiveness from pikeperch, *Sander lucioperca*, eggs. In : *Aquaculture Research*. octobre 2005. Vol. 36, n° 14, p. 1458-1464. DOI 10.1111/j.1365-2109.2005.01370.x.

DEVAKATE, R.V., PATIL, V.V., WAJE, S.S. et THORAT, B.N., 2009. Purification and drying of bromelain. In : *Separation and Purification Technology*. janvier 2009. Vol. 64, n° 3, p. 259-264. DOI 10.1016/j.seppur.2008.09.012.

DUNCAN, N, MYLONAS, C et MAÑANÓS, E, 2008. Reproduction and Control of Ovulation, Spermiation and Spawning in Cultured Fish. In : CABRITA, Elsa, ROBLES, Vanesa et HERRÁEZ, Paz (éd.), *Methods in Reproductive Aquaculture* [en ligne]. S.l. : CRC Press. p. 3-80. [Consulté le 19 juillet 2017]. ISBN 978-0-8493-8053-2. Disponible à l'adresse : <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780849380549.sec1>.

EKOKOTU, Paterson Adogbeji et NWACHI, Oster Francis, 2014. Use of pineapple juice in the elimination of egg stickiness in mudfish (*Heterobranchus bidorsalis*). In : *Global Journal of Bio-Science and Biotechnology*. 2014. Vol. 3, p. 161-163.

FEINER, Zachary S. et HÖÖK, Tomas O., 2015. Environmental Biology of Percid Fishes. In : KESTEMONT, Patrick, DABROWSKI, Konrad et SUMMERFELT, Robert C. (éd.), *Biology and Culture of Percid Fishes* [en ligne]. Dordrecht : Springer Netherlands. p. 61-100. [Consulté le 20 juillet 2017]. ISBN 978-94-017-7226-6. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-7227-3_2.

FELEDI, Tibor, KUCSKA, Balázs et RÓNYAI, András, 2011. Effect of different fertilization and egg de-adhesion methods on the artificial propagation of Siberian sturgeon. In : *Archives of Polish Fisheries* [en ligne]. 1 janvier 2011. Vol. 19, n° 2. [Consulté le 11 juillet 2017]. DOI 10.2478/v10086-011-0014-7. Disponible à l'adresse : <http://www.degruyter.com/view/j/aopf.2011.19.issue-2/v10086-011-0014-7/v10086-011-0014-7.xml>.

FONG, David, DUCEPPE, Nicholas et HOEMANN, Caroline D., 2017. Mesenchymal stem

cell detachment with trace trypsin is superior to EDTA for in vitro chemotaxis and adhesion assays. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications*. mars 2017. Vol. 484, n° 3, p. 656-661. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.01.171.

FONTAINE, Pascal, LEGENDRE, Marc, VANDEPUTTE, Marc et FOSTIER, Alexis, 2009. Domestication de nouvelles espèces et développement durable de la pisciculture. In : *Cahiers Agricultures*. 2009. Vol. 18, n° 2-3, p. 119-124.

FORMICKI, Krzysztof, SMARUJ, Izabella, SZULC, Joanna et WINNICKI, Aleksander, 2009. Microtubular Network of the Gelatinous Egg Envelope Within the Egg Ribbon of European Perch, *Perca fluviatilis* L. In : *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*. 1 décembre 2009. Vol. 39, n° 2, p. 147-151. DOI 10.3750/AIP2009.39.2.10.

GILLET, C. et DUBOIS, J. P., 1995. A survey of the spawning of perch (*Perca fluviatilis*), pike (*Esox lucius*), and roach (*Rutilus rutilus*), using artificial spawning substrates in lakes. In : *Hydrobiologia*. 1995. Vol. 300, n° 1, p. 409-415.

GRANT, B., PICCHI, N., DAVIE, A., LECLERCQ, E. et MIGAUD, H., 2016. Removal of the adhesive gum layer surrounding naturally fertilised ballan wrasse (*Labrus bergylta*) eggs. In : *Aquaculture*. avril 2016. Vol. 456, p. 44-49. DOI 10.1016/j.aquaculture.2016.01.016.

HA, Minh, BEKHIT, Alaa El-Din A., CARNE, Alan et HOPKINS, David L., 2012. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. In : *Food Chemistry*. septembre 2012. Vol. 134, n° 1, p. 95-105. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.02.071.

HIRSCH, Philipp E. et ECKMANN, Reiner, 2015. Individual identification of Eurasian perch *Perca fluviatilis* by means of their stripe patterns. In : *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters*. septembre 2015. Vol. 54, p. 1-4. DOI 10.1016/j.limno.2015.07.003.

HOKANSON, Kenneth E. F., 1977. Temperature Requirements of Some Percids and Adaptations to the Seasonal Temperature Cycle. In : *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. octobre 1977. Vol. 34, n° 10, p. 1524-1550. DOI 10.1139/f77-217.

HORVÁTH, L., 1980. Use of a Proteolytic Enzyme to Improve Incubation of Eggs of the European Catfish. In : *The Progressive Fish-Culturist*. avril 1980. Vol. 42, n° 2, p. 110-111. DOI 10.1577/1548-8659(1980)42[110:UOAPET]2.0.CO;2.

KETNAWA, Sunantha, CHAIWUT, Phanuphong et RAWDKUEN, Saroat, 2012. Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. In : *Food and Bioproducts Processing*. juillet 2012. Vol. 90, n° 3, p. 385-391. DOI 10.1016/j.fbp.2011.12.006.

KORZELECKA, Agata, BONISŁAWSKA, Małgorzata et WINNICKI, Aleksander, 1998. Structure, size and spatial distribution of perch (*Perca fluviatilis* L.) egg components during incubation. In : *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* [en ligne]. 1998. Vol. 1, n° 1. Disponible à l'adresse : <http://www.ejpau.media.pl/volume1/issue1/fisheries/art-05.html>.

KOWTAL, G. V., CLARK, W. H. et CHERR, G. N., 1986. Elimination of adhesiveness in eggs from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: chemical treatment of fertilized eggs. In :

Aquaculture. 1986. Vol. 55, n° 2, p. 139–143.

KRISE, William F., BULKOWSKI-CUMMINGS, Loretta, SHELLMAN, A. David, KRAUS, Keith A. et GOULD, Rowan W., 1986. Increased Walleye Egg Hatch and Larval Survival after Protease Treatment of Eggs. In : *The Progressive Fish-Culturist*. avril 1986. Vol. 48, n° 2, p. 95-100. DOI 10.1577/1548-8640(1986)48<95:IWEHAL>2.0.CO;2.

KRISTAN, Jiri, BLECHA, Miroslav et POLICAR, Tomas, 2016. Alcalase treatment for elimination of stickiness in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) eggs under controlled conditions. In : *Aquaculture Research*. décembre 2016. Vol. 47, n° 12, p. 3998-4003. DOI 10.1111/are.12850.

KUCHARCZYK, Dariusz, KUJAWA, Roman et MAMCARZ, Andrzej, 1996. New Experimental Incubation Unit for Eggs of the Perch *Perca fluviatilis*. In : *The Progressive Fish-Culturist*. octobre 1996. Vol. 58, n° 4, p. 281-283. DOI 10.1577/1548-8640(1996)058<0281:NEIUFE>2.3.CO;2.

LAUREL, B. J., HURST, T. P., COPEMAN, L. A. et DAVIS, M. W., 2008. The role of temperature on the growth and survival of early and late hatching Pacific cod larvae (*Gadus macrocephalus*). In : *Journal of Plankton Research*. 24 mai 2008. Vol. 30, n° 9, p. 1051-1060. DOI 10.1093/plankt/fbn057.

LE CREN, E. D., 1951. The Length-Weight Relationship and Seasonal Cycle in Gonad Weight and Condition in the Perch (*Perca fluviatilis*). In : *The Journal of Animal Ecology*. novembre 1951. Vol. 20, n° 2, p. 201. DOI 10.2307/1540.

LINHART, O., GELA, D., FLAJŠHANS, M., DUDA, P., RODINA, M. et NOVÁK, V., 2000. Alcalase enzyme treatment for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L. In : *Aquaculture*. décembre 2000. Vol. 191, n° 4, p. 303-308. DOI 10.1016/S0044-8486(00)00433-6.

LUCZYNSKI, M., STRZCZEK, J. et BRZUZAN, P., 1987. Secretion of hatching enzyme and its proteolytic activity in coregoninae (*Coregonus albula* L and *C. lavaretus* L) embryos. In : *Fish Physiology and Biochemistry*. septembre 1987. Vol. 4, n° 2, p. 57-62. DOI 10.1007/BF02044314.

MANSOUR, N., LAHNSTEINER, F. et PATZNER, R.A., 2009a. Ovarian fluid plays an essential role in attachment of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* eggs. In : *Theriogenology*. mars 2009. Vol. 71, n° 4, p. 586-593. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.09.039.

MANSOUR, N., LAHNSTEINER, F. et PATZNER, R.A., 2009b. Physiological and biochemical investigations on egg stickiness in common carp. In : *Animal Reproduction Science*. août 2009. Vol. 114, n° 1-3, p. 256-268. DOI 10.1016/j.anireprosci.2008.09.005.

MARTINS, C.I.M., EDING, E.H., VERDEGEM, M.C.J., HEINSBROEK, L.T.N., SCHNEIDER, O., BLANCHETON, J.P., D'ORBCASTEL, E. Roque et VERRETH, J.A.J., 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. In : *Aquacultural Engineering*. novembre 2010. Vol. 43, n° 3, p. 83-93. DOI 10.1016/j.aquaeng.2010.09.002.

MIGAUD, Hervé, FONTAINE, Pascal, KESTEMONT, Patrick, WANG, Neil et BRUN-BELLUT, Jean, 2004. Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. In : *Aquaculture*. novembre 2004. Vol. 241, n° 1-4, p. 561-574. DOI 10.1016/j.aquaculture.2004.07.031.

MO, W.Y., LAU, R.S.S., KWOK, A.C.K. et WONG, M.H., 2016. Use of soybean meal and papain to partially replace animal protein for culturing three marine fish species: Fish growth and water quality. In : *Environmental Pollution*. décembre 2016. Vol. 219, p. 815-820. DOI 10.1016/j.envpol.2016.07.059.

MORRETTI, Alessandro, PEDINI FERNANDEZ-CRIADO, Mario, CITTOLIN, Giancarlo et GUIDASTRI, Ruggero, 1999. *Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream*. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 978-92-5-104380-6. SH167.S33 M36 1999

MÜLLER-BELECKE, Andreas et ZIENERT, Steffen, 2008. Out-of-season spawning of pike perch (*Sander lucioperca* L.) without the need for hormonal treatments. In : *Aquaculture Research*. septembre 2008. Vol. 39, n° 12, p. 1279-1285. DOI 10.1111/j.1365-2109.2008.01991.x.

OVERTON, Julia L., TONER, Damien, POLICAR, Tomáš et KUCHARCZYK, Dariusz, 2015. Commercial Production: Factors for Success and Limitations in European Percid Fish Culture. In : KESTEMONT, Patrick, DABROWSKI, Konrad et SUMMERFELT, Robert C. (éd.), *Biology and Culture of Percid Fishes* [en ligne]. Dordrecht : Springer Netherlands. p. 881-890. [Consulté le 20 juillet 2017]. ISBN 978-94-017-7226-6. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-7227-3_35.

PAVAN, Rajendra, JAIN, Sapna, SHRADDHA et KUMAR, Ajay, 2012. Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. In : *Biotechnology Research International*. 2012. Vol. 2012, p. 1-6. DOI 10.1155/2012/976203.

PAXTON, C, 2000. Resistance of perch eggs to attack by aquatic fungi. In : *Journal of Fish Biology*. septembre 2000. Vol. 57, n° 3, p. 562-570. DOI 10.1006/jfbi.2000.1332.

PŠENIČKA, Martin, 2016. A novel method for rapid elimination of sturgeon egg stickiness using sodium hypochlorite. In : *Aquaculture*. février 2016. Vol. 453, p. 73-76. DOI 10.1016/j.aquaculture.2015.11.039.

RIEHL, Rüdiger et PATZNER, Robert A., 1998. Minireview: The modes of egg attachment in teleost fishes. In : *Italian Journal of Zoology*. janvier 1998. Vol. 65, n° sup1, p. 415-420. DOI 10.1080/11250009809386857.

SOARES, Paulo A.G., VAZ, Antônio F.M., CORREIA, Maria T.S., PESSOA, Adalberto et CARNEIRO-DA-CUNHA, Maria G., 2012. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. In : *Separation and Purification Technology*. septembre 2012. Vol. 98, p. 389-395. DOI 10.1016/j.seppur.2012.06.042.

STICKNEY, Robert R. (éd.), 2000. *Encyclopedia of aquaculture*. New York : Wiley.

ISBN 978-0-471-29101-5. SH20.3 .E53 2000

STROUD, Robert M., KAY, Lois M. et DICKERSON, Richard E., 1974. The structure of bovine trypsin : Electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and at 2.7 Å resolution. In : *Journal of Molecular Biology*. février 1974. Vol. 83, n° 2, p. 185-208. DOI 10.1016/0022-2836(74)90387-8.

SULISTYO, I, 2000. Reproductive cycle and plasma levels of steroids in male Eurasian perch *Perca fluviatilis*. In : *Aquatic Living Resources*. mars 2000. Vol. 13, n° 2, p. 99-106. DOI 10.1016/S0990-7440(00)00146-7.

SULISTYO, Isdy, 1998. *Contribution à l'étude et à la maîtrise du cycle de reproduction de la perche eurasienne Perca fluviatilis L.* S.l. : s.n.

THORPE, J., 1977. *Synopsis of biological data on the perch Perca fluviatilis Linnaeus, 1758 and Perca flavescens Mitchell, 1814* [en ligne]. S.l. : Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO fisheries synopsis, 113. Disponible à l'adresse : <https://books.google.ch/books?id=2pmRnQAACAAJ>.

TIMMONS, Michael B, EBELING, James M et NORTHEASTERN REGIONAL AQUACULTURE CENTER (U.S.), 2013. *Recirculating aquaculture*. S.l. : s.n. ISBN 978-0-9712646-5-6.

VAN HAI, Ngo, 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. In : *Aquaculture*. septembre 2015. Vol. 446, p. 88-96. DOI 10.1016/j.aquaculture.2015.03.014.

VENKATESH, R. et SUNDARAM, P. V., 1998. Modulation of stability properties of bovine trypsin after in vitro structural changes with a variety of chemical modifiers. In : *Protein engineering*. 1998. Vol. 11, n° 8, p. 691-698.

WATSON, Craig A. et CHAPMAN, Frank A., 2000. *Artificial incubation of fish eggs*. S.l. : University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.

XIAOWEI, Zhou, 2017. *Global Aquaculture Summary Information 2015* [en ligne]. mars 2017. S.l. : FAO. Disponible à l'adresse : <http://www.fao.org/3/a-bs235e.pdf>.

ŻARSKI, D., HORVÁTH, A., HELD, J. A. et KUCHARCZYK, D., 2015. Artificial Reproduction of Percid Fishes. In : KESTEMONT, Patrick, DABROWSKI, Konrad et SUMMERFELT, Robert C. (éd.), *Biology and Culture of Percid Fishes* [en ligne]. Dordrecht : Springer Netherlands. p. 123-161. [Consulté le 19 juillet 2017]. ISBN 978-94-017-7226-6. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-7227-3_4.

ŻARSKI, D., HORVÁTH, á., KOTRIK, L., TARGOŃSKA, K., PALIŃSKA, K., KREJSZEFF, S., BOKOR, Z., URBÁNYI, B. et KUCHARCZYK, D., 2012. Effect of different activating solutions on the fertilization ability of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., eggs. In : *Journal of Applied Ichthyology*. décembre 2012. Vol. 28, n° 6, p. 967-972. DOI 10.1111/jai.12098.

ŻARSKI, Daniel, HORVÁTH, Ákos, BERNÁTH, Gergely, KREJSZEFF, Sławomir,

RADÓCZI, János, PALIŃSKA-ŻARSKA, Katarzyna, BOKOR, Zoltán, KUPREN, Krzysztof et URBÁNYI, Béla, 2017. *Controlled Reproduction of Wild Eurasian Perch* [en ligne]. Cham : Springer International Publishing. [Consulté le 23 février 2017]. SpringerBriefs in Environmental Science. ISBN 978-3-319-49375-6. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-49376-3>.

Sitographie

ESCHMEYER, W. N. et FONG, J. D., 2017. CAS - Catalog of Fishes - Species by Family. In : [en ligne]. 30 juin 2017. [Consulté le 17 juillet 2017]. Disponible à l'adresse : <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/speciesbyfamily.asp>.

FIGIS, 2017. FAO Fisheries & Aquaculture - Fisheries Global Information System (FIGIS). In : *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [en ligne]. 2017. [Consulté le 20 juillet 2017]. Disponible à l'adresse : <http://www.fao.org/fishery/figis/en>.

Annexes

Annexe I

Dispositifs expérimentaux



Dispositifs expérimentaux utilisées pour les deux tests. En haut, utilisé lors de la partie sur la dissolution du ruban, en bas, utilisé lors du test préliminaire de la partie sur la synchronisation des éclosions

Annexe II

Plans d'expérience des tests sur la synchronisation des éclosions

Test préliminaire

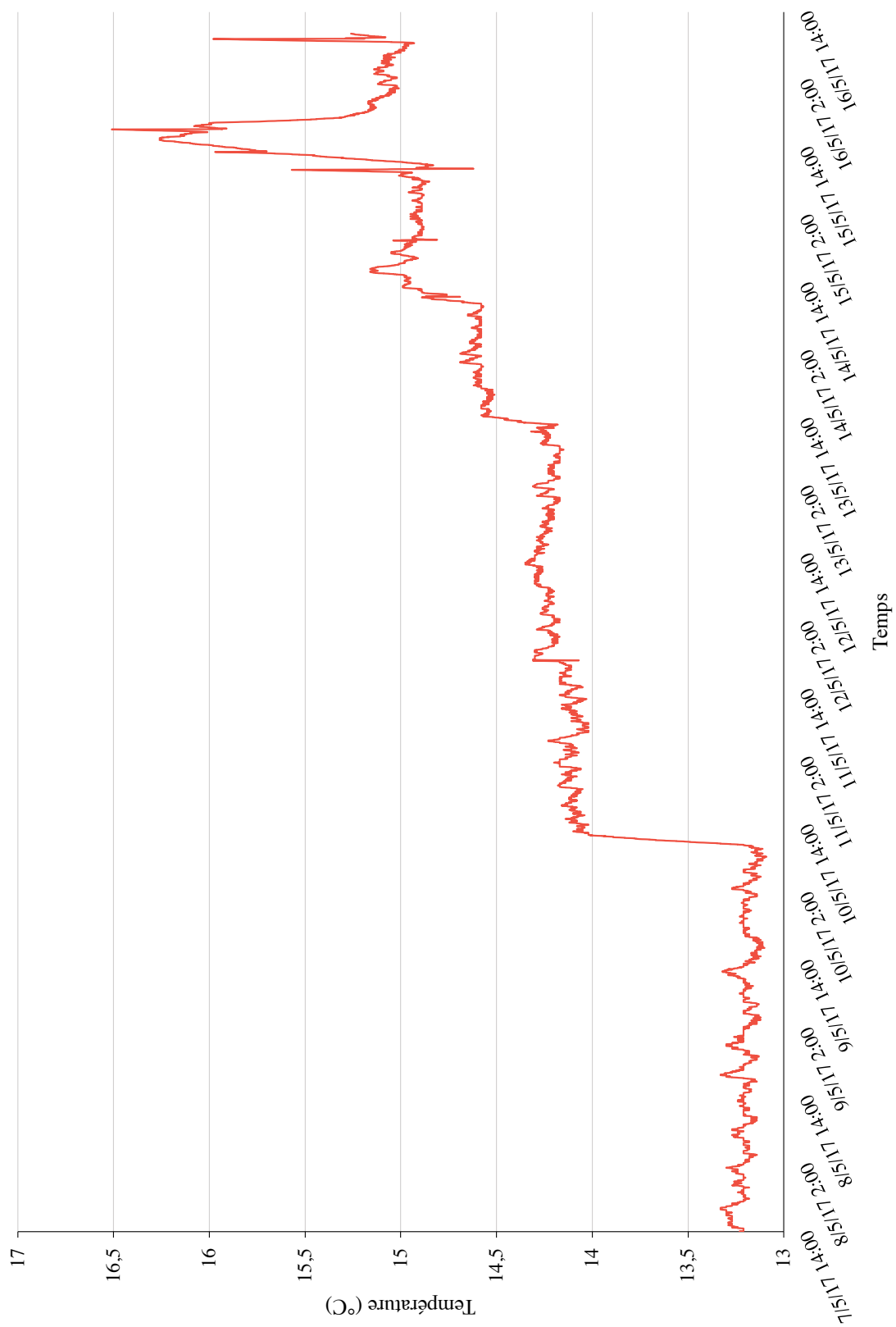
Temps	1				5				15			
Femelle Réactif	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
Alcalase®	A.1.F1	A.1.F2	A.1.F3	A.1.F4	A.5.F1	A.5.F2	A.5.F3	A.5.F4	A.15.F1	A.15.F2	A.15.F3	A.15.F4
Papaïne	P.1.F1	P.1.F2	P.1.F3	P.1.F4	P.5.F1	P.5.F2	P.5.F3	P.5.F4	P.15.F1	P.15.F2	P.15.F3	P.15.F4
Bromélaïne	B.1.F1	B.1.F2	B.1.F3	B.1.F4	B.5.F1	B.5.F2	B.5.F3	B.5.F4	B.15.F1	B.15.F2	B.15.F3	B.15.F4
Hypochlorite de sodium	H.1.F1	H.1.F2	H.1.F3	H.1.F4	H.5.F1	H.5.F2	H.5.F3	H.5.F4	H.15.F1	H.15.F2	H.15.F3	H.15.F4
Témoin	T.1.F1	T.1.F2	T.1.F3	T.1.F4	T.5.F1	T.5.F2	T.5.F3	T.5.F4	T.15.F1	T.15.F2	T.15.F3	T.15.F4

Test final

Traitement	Alcalase®						Témoin					
Échantillon Femelle	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
F1	A.F1.1	A.F1.2	A.F1.3	A.F1.4	A.F1.5	A.F1.6	T.F1.1	T.F1.2	T.F1.3	T.F1.4	T.F1.5	T.F1.6
F2	A.F2.1	A.F2.2	A.F2.3	A.F2.4	A.F2.5	A.F2.6	T.F2.1	T.F2.2	T.F2.3	T.F2.4	T.F2.5	T.F2.6
F3	A.F3.1	A.F3.2	A.F3.3	A.F3.4	A.F3.5	A.F3.6	T.F3.1	T.F3.2	T.F3.3	T.F3.4	T.F3.5	T.F3.6
F4	A.F4.1	A.F4.2	A.F4.3	A.F4.4	A.F4.5	A.F4.6	T.F4.1	T.F4.2	T.F4.3	T.F4.4	T.F4.5	T.F4.6
F5	A.F5.1	A.F5.2	A.F5.3	A.F5.4	A.F5.5	A.F5.6	T.F5.1	T.F5.2	T.F5.3	T.F5.4	T.F5.5	T.F5.6

Annexe III

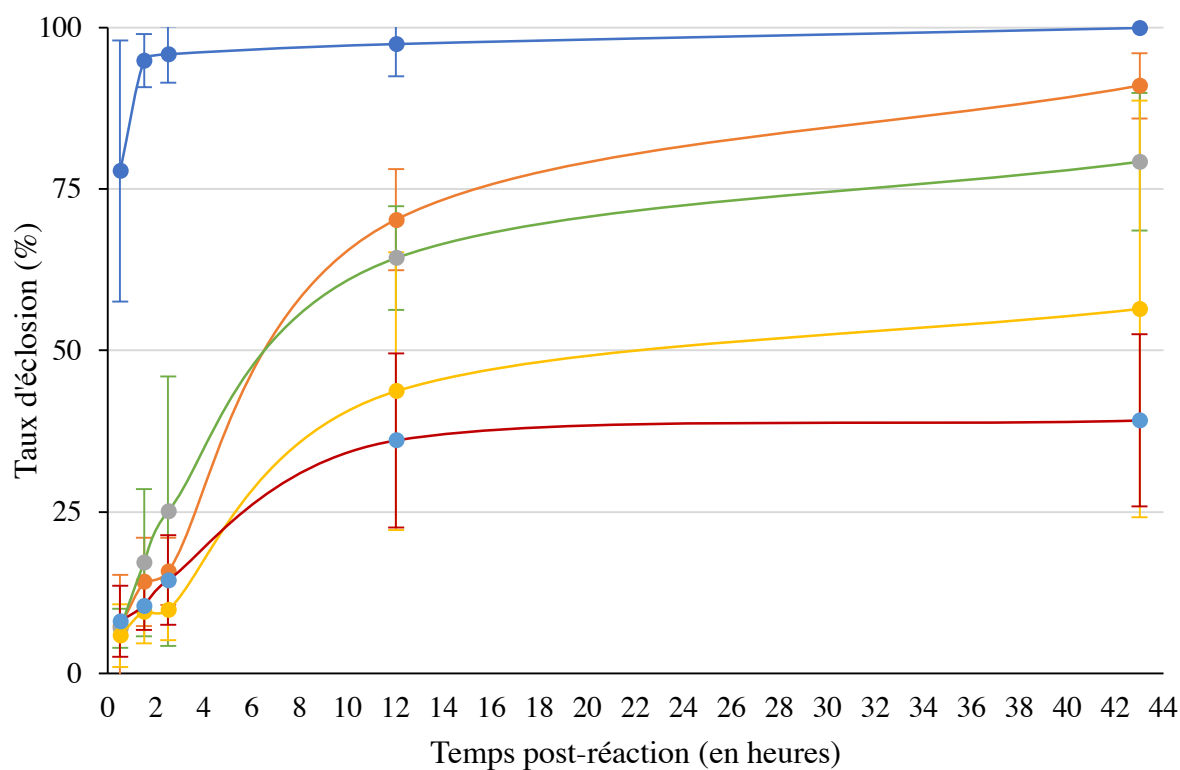
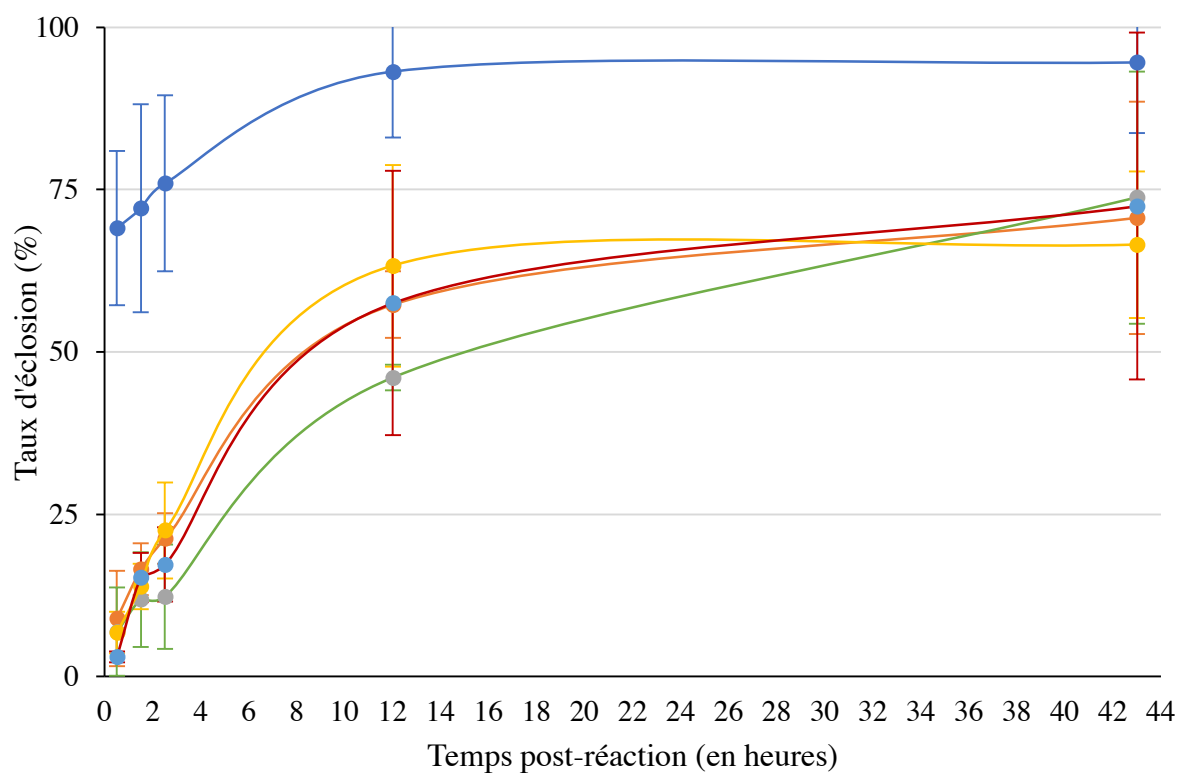
Courbe de température de l'eau d'incubation durant le test préliminaire



Évolution temporelle de la température de l'eau d'incubation au cours du test préliminaire. Enregistrements réalisés à l'aide des sondes de température du système de suivi de l'écloserie.

Annexe V

Représentations graphiques de l'évolution des taux d'éclosions lors du test préliminaire, pour 5 et 15 minutes de réaction



Évolution temporelle des taux d'éclosion – Expérience préliminaire – En haut : 5 minutes de réaction, en bas : 15 minutes de réaction. Code couleur : Alcalase® ; Hypochlorite de sodium ; Bromélaïne ; Papaine ; Témoin. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards en valeur positive et négative.



Diplôme : Ingénieur
Spécialité : Agronomie
Spécialisation / option : Sciences Halieutiques et Aquacoles / Aquaculture
Enseignant référent : Dominique OMBREDANE

Auteur(s) : Morgan LECOQ

Date de naissance* : 25/05/1993

Nb pages : 34 Annexe(s) : 4

Année de soutenance : 2017

Organisme d'accueil : Valperca SA

Adresse : Le Grand Pâquier

1373 Chavornay

SUISSE

Maître de stage : Manuel POMPINI

Titre français : Utilisation d'agents chimiques pour l'amélioration des phases post-fécondation chez la perche européenne *Perca fluviatilis*

Titre anglais : Improvement of European perch's post-fecundation stages using chemicals

Résumé : Les œufs des poissons possèdent des particularités interspécifiques qui peuvent se montrer problématiques pour certaines phases d'élevage. Chez la perche européenne *Perca fluviatilis*, les œufs sont entourés par une matrice glycoprotéique qui les lie entre eux et forme un long ruban. En écloserie, ce dernier complique l'incubation ou l'éclosion. Cette étude a pour objectif de trouver un réactif permettant de réduire ces contraintes en agissant sur la structure du ruban ou des œufs. Les travaux ont été divisés en deux parties, utilisant à chaque fois des rubans issus de l'écloserie de la société suisse Valperca SA. Premièrement, nous avons cherché à dissoudre le ruban après la fertilisation artificielle dans le but d'obtenir des œufs libres. Parallèlement, nous avons voulu synchroniser les éclosions en dissolvant le ruban et la membrane des œufs. Les réactifs testés, choisis à partir de la bibliographie existante, étaient les suivants : l'acide tannique, l'Alcalase[®], la protéase bovine pancréatique, l'hypochlorite de sodium, la bromélaïne et la papaïne. Les tests de dissolution du ruban se sont montrés peu concluants bien que la papaïne semble pouvoir agir sur le ruban. Des recherches plus approfondies sont nécessaires. Les tests de synchronisation ont quant à eux donné des résultats plus intéressants. L'Alcalase[®] s'est montrée très efficace, permettant d'obtenir plus de 75% d'éclosions 3 heures après la réaction, augmentant par la même occasion le nombre de larves obtenues. Ces résultats sont prometteurs pour l'entreprise mais nécessitent tout de fois des tests à plus grande échelle avant d'être appliqués en production.

Abstract: Fish eggs have interspecific particularities that can be problematical during a few farming phases. In European perch *Perca fluviatilis* eggs are surrounded by a glycoproteic matrix tying them together and forming a long ribbon. The latter is a source of complication in hatcheries during incubation or hatching. The aim of this study is to find a reagent reducing those complications by affecting the ribbon or the eggs' structures. Work has been divided in two parts, using for each of them ribbons collected from the Valperca SA's hatchery. On the one hand, we tried to dissolve the ribbon after artificial fertilization in order to obtain free eggs. On the other hand, we tried to synchronize hatchings by dissolving the ribbon and the eggs membrane. The following reagents were chosen from existing bibliography and tested: tannic acid, Alcalase[®], protease from bovine pancreas, sodium hypochlorite, bromelain and papain. Tests of the first part were not conclusive even though papain seems to be the able to modify the ribbon structure. Further researches are needed. However, synchronization tests gave interesting results. Alcalase[®] was very efficient, giving a hatching rate higher than 75% 3 hours after the chemical reaction, increasing in the same time the number of larvae obtained. Those results are encouraging for the firm but bigger tests still need to be done.

Mots-clés : Aquaculture, écloserie, perche, incubation, ruban

Key Words: Aquaculture, hatchery, perch, incubation, ribbon