



**HAL**  
open science

# Étude de la variabilité de l'embryogenèse chez la perche commune : développement d'approches alternatives

Maud Alix

## ► To cite this version:

Maud Alix. Étude de la variabilité de l'embryogenèse chez la perche commune : développement d'approches alternatives. Embryologie et organogenèse. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0292 . tel-01665494

**HAL Id: tel-01665494**

**<https://theses.hal.science/tel-01665494>**

Submitted on 16 Dec 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

*Université de Lorraine*  
*Ecole doctorale Sciences et Ingénierie Ressources Procédés Produits*  
*Environnement (RP2E)*  
*Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des produits animaux*  
*(URAFPA)*

# THESE

Présentée à l'Université de Lorraine pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Lorraine**

**Discipline : Sciences Agronomiques**

Présentée et soutenue publiquement le 15 décembre 2016 par

**Maud ALIX**

---

**Etude de la variabilité de l'embryogenèse chez la perche  
commune : développement d'approches alternatives.**

---

## Composition du jury

<b>Rapporteurs</b>	Mélanie Debiais-Thibaud	Maître de Conférences, ISEM, Université de Montpellier
	Catherine Labbé	Chargée de Recherche, LPGP, INRA, Rennes
<b>Examineurs</b>	Sylvie Rétaux	Directrice de Recherche, CNRS Gif-sur-Yvette
	Marc Legendre	Directeur de Recherche, ISEM, IRD, Montpellier
<b>Directeur de thèse</b>	Pascal Fontaine	Professeur, Université de Lorraine, Nancy
<b>Codirectrice de thèse</b>	Bérénice Schaerlinger	Maître de Conférences, Université de Lorraine, Nancy
<b>Membre invité</b>	Dominique Chardard	Maître de Conférences, Université de Lorraine, Nancy





## **Etude de la variabilité de l'embryogenèse chez la perche commune : développement d'approches alternatives**

Aujourd'hui, la durabilité du modèle de développement de l'aquaculture est de plus en plus questionnée et une des solutions proposées consisterait à diversifier la production piscicole *via* la domestication de nouvelles espèces comme la perche commune, *Perca fluviatilis*, une espèce d'eau douce tempérée très intéressante pour la diversification de l'aquaculture continentale européenne. De nombreux aspects de la biologie de sa reproduction sont connus cependant, peu d'informations sont disponibles sur son développement. Or, des défauts de développement précoce, dont les causes sont encore mal définies, impactent actuellement la qualité de la production piscicole. C'est dans ce contexte que cette thèse vise à caractériser les succès et défauts de développement embryonnaire chez la perche commune à travers trois axes principaux : (i) déterminer une table de référence de l'embryogenèse normale permettant (ii) définir les défauts de développement tels que les malformations dans des conditions d'élevage différentes et (iii) identifier les liens entre différents paramètres de développement embryonnaire afin de déterminer des profils de développement variables.

La première partie de ce travail a permis d'identifier la séquence précise de l'ontogenèse normale de cette espèce à travers la définition d'une table de développement embryonnaire alternative et flexible pour des espèces non-modèles, facilitant les comparaisons intra- et inter-espèces. Dans un second temps, l'identification la plus exhaustive possible de phénotypes anormaux a révélé 10 grandes catégories de malformations associées à des organes ou fonctions spécifiques. De plus, certains de ces défauts semblent fortement dépendants des conditions d'élevage des géniteurs ce qui permet d'identifier l'effet de potentiels facteurs extrinsèques sur le développement et d'améliorer les techniques de gestion des animaux. Enfin, l'ensemble de ces résultats et des paramètres mesurés durant l'embryogenèse ont permis d'effectuer une classification approfondie des pontes obtenues présentant des profils de développement similaires pour mettre en évidence des liens éventuels entre les divers phénotypes et paramètres utilisés. Les analyses de données effectuées ont montré que seulement 3 paramètres étaient nécessaires à la caractérisation de 4 profils de succès de développement variables : les taux de survie au début de l'organogenèse, d'éclosion et de malformations. A l'avenir, ces paramètres pourraient être généralisés permettant d'homogénéiser les critères d'évaluation du succès de développement chez d'autres espèces d'intérêt de poisson. L'ensemble de ces résultats constituent une base solide pour étudier l'effet des facteurs extrinsèques et/ou intrinsèques sur la qualité et le succès de développement embryonnaire.

**Mots clefs : Embryogenèse, Approches alternatives, Variabilité du développement, Malformations, Mortalités, Perche commune**

## **Study of the embryogenesis variability in the Eurasian perch: development of alternative approaches**

Currently, the durability of the aquaculture developmental model is clearly challenged and one solution consists to diversify the fish production by the domestication of new species such as the Eurasian perch (*P. fluviatilis*), a freshwater species promising and valuable for the diversification of European aquaculture. Several aspects of its reproductive biology are well known, nevertheless, only little information is available on its development. However, early developmental impairments, whose causes are unclear, actually impact the fish production quality. In this context, the present work aimed to characterize the developmental success and impairments in Eurasian perch on three main issues: (i) determine a model of normal embryogenesis table helping to (ii) define developmental impairments, in diverse rearing conditions and (iii) identify the relationships between various parameters of embryonic ontogenesis to characterize different patterns of developmental success.

The first part of this study allowed identifying the accurate timing of normal ontogenesis of this species through the definition of an alternative and flexible developmental table to describe non-model fish species, allowing the intra- and inter-specific comparisons. In the second part, the exhaustive characterization of abnormal phenotypes revealed 10 categories of deformities linked to specific organs or functions. Moreover, some of these categories seemed to be related to rearing-conditions of the breeders allowing identifying the potential effects of extrinsic factors on the development and improving the management of fish. Finally, the previous results and the parameters measured during embryogenesis help to classify the several spawns obtained with the same developmental pattern and to highlight the potential relationships between diverse phenotypes and parameters. In addition, the data analyses showed that only 3 parameters are reliable to assess the developmental success: survival rate at the onset of the organogenesis, hatching and deformities rates. Henceforth, these parameters and this classification could be generalized as a new strategy to assess the developmental success in other fish species. All of these results provide a good basic knowledge to study the potential effects of various extrinsic and/or intrinsic factors on the developmental success and the embryonic quality.

**Keywords: Embryogenesis, Alternative approaches, Developmental variability, Deformities, Lethalities, Eurasian perch**

Je tiens tout d'abord à remercier mes trois directeurs, Bérénice Schaerlinger, Pascal Fontaine et Dominique Chardard pour leur implication, leur soutien et leur confiance tout au long de cette thèse. Bérénice, je te remercie pour le temps que tu m'as accordé durant ces quatre années, pour tes conseils et la rigueur que tu as su me transmettre. Dominique, merci pour ta bonne humeur, ton aide et nos discussions toujours constructives. Enfin, Pascal, merci également pour ta confiance, pour m'avoir accueillie au sein de ton équipe, pour cette approche « paternelle » inimitable que tu as d'encadrer et bien sûr, merci pour les démonstrations de ton savoir-faire au Bowling.

Je tiens tout particulièrement à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté de consacrer leur temps à l'évaluation de ce travail de recherche. Je voudrais donc remercier Mme Mélanie Debiais-Thibaud, Maître de conférences à l'Université de Montpellier et Mme Catherine Labbé, Chargée de recherche à l'INRA à Rennes qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Mme Sylvie Rétaux, Directrice de recherche CNRS à Gif-sur-Yvette ainsi que M. Marc Legendre, Directeur de recherche à l'IRD et à l'ISEM de Montpellier pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de thèse, Julien Bobe, Patricia Cucchi, et Anne-Hélène Monsoro-Burq, qui ont contribué à la réflexion sur ce projet de thèse et ont accepté de le suivre.

Cette thèse est l'aboutissement d'un travail d'équipe qui a été effectué grâce à de nombreux collaborateurs que je tiens vraiment à remercier pour leur disponibilité, leur patience et leur aide :

Aux sociétés Lucas Perches, Asialor, GFA Kuhweg et la Pisciculture du Saulnois qui nous ont fourni les animaux et avec lesquels j'ai pu découvrir une partie de la profession de pisciculteur.

A Yves Le Roux pour son aide significativement précieuse en statistiques et ses conseils. Merci pour ta patience face à mes incompréhensions en analyses de données.

A Christophe Staub et Jean Luc Touzé pour leur aide sur toute la partie échographie. Merci d'avoir consacré vos journées à tester ces outils sur les poissons ainsi qu'à nous faire découvrir des spécialités locales. Un remerciement particulier à Christophe qui a consacré quelques journées à analyser les résultats obtenus, toujours dans la bonne humeur.

Pour l'aide conséquente qu'ils ont pu apporter durant les saisons de pontes, sans râler, malgré l'heure très matinale, merci à mes stagiaires, Omid, Jules et Paul ainsi qu'à l'ensemble des participants.

Je remercie les réseaux COST LARVANET et AQUAGAMETE pour leur soutien financier et les opportunités qu'ils m'ont offertes de pouvoir apprendre, me perfectionner et de présenter mes résultats lors de congrès internationaux.

Je remercie également toutes les personnes de l'équipe « Domestication en Aquaculture Continentale ». Durant ma thèse, le laboratoire est devenu ma maison secondaire (si pas principale) et les personnes que j'ai pu côtoyer dans ces locaux ont toutes contribué à mon enrichissement scientifique, professionnel et personnel ainsi qu'à l'aboutissement de ma thèse. Un grand merci donc à Marielle et sa bonne humeur contagieuse ; à Alain pour son humour à tout moment de la journée ; à Damien pour son sourire ; à Thomas pour la « chaleur humaine » que tu apportes, à nous, doctorants en fin de thèse ; à Fabrice pour nos échanges et à Daniel K. pour tes points de vues éclairés sur ces travaux. Merci à Alain Iuretig pour avoir pris soin de mes poissons mais également pour son amitié. Merci à Jean Brun-Bellut pour nos conversations et vos conseils avisés sur la recherche comme sur l'enseignement. Merci également à Catherine Larrière et Patricia Erndt pour leur aide durant toute cette thèse. Je n'oublie pas également mes compagnons perdus sur la route sinueuse de la thèse, Jennifer, Taina et Lola, et ceux qui ont réussi à trouver le bout du tunnel, Emilie et Juliette.

Un grand merci à toute l'équipe d'enseignement de l'IUT Nancy Brabois, Benjamin, Fred, Françoise, Helmut, Hélène, Jennifer, Gérard, François et Gaël qui m'ont accueilli chaleureusement et avec lesquels j'ai pu apprécier l'entraide, la bonne humeur, le partage de connaissances et de bons moments. Merci également à mes étudiants de GB2A avec lesquels j'ai pu m'évader de la recherche durant quelques heures. Ils m'ont sûrement plus appris que je ne l'ai fait.

Un petit mot à l'équipe de Montpellier que je remercie également. Evelyse pour m'avoir transmis tes connaissances en histologie avec patience et bonne humeur et qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Eva pour ton amitié et pour m'avoir appris à réussir une PCR avec humour. Mes sincères remerciements à Jehan-Hervé Lignot, mon premier encadrant, qui m'a formée et transmis sa passion de la recherche. Guy Charmantier pour m'avoir permis d'évoluer dans ce monde et avoir su trouver les mots justes.

Bien évidemment, un grand merci à mes amis qui m'ont soutenue, parfois portée à bout de bras mais qui ont également fait preuve de beaucoup (mais beaucoup, beaucoup) de patience et de générosité envers moi. Sylvain Milla, éminent collègue et surtout très bon ami, merci pour nos réunions et discussions régulières à propos de sciences ... ou pas. Tu resteras ma référence *Mojitos* à tout jamais. Yannick, je te remercie de m'avoir transmis ton savoir-faire sur les perches avec énormément d'humour, même très tôt le matin. Merci également pour ton amitié, tes conseils, nos discussions et nos soirées. Je sais que tu en as déjà vus des remerciements de thèse, mais des comme ça ... Une seconde fois, merci à Patricia Cucchi pour m'avoir tout d'abord soutenue, puis encouragée, fait répéter, offert gîte et couvert depuis ces 4 années. *I also thank Daniel Zarski for his help in sciences, his friendship and for our discussions which contribute to my scientific and personal enrichment.*

Merci également à Matthieu, Brian, Sabine, Tatiana, Evelyne et Amine pour nos nombreuses soirées/discussions/excursions indispensables à ma survie (et celle de la filière vitivinicole et

brassicole). Je les remercie également pour nos fou-rires, nos activités manuelles de construction d'outils de recherche, pour ce bout de vie que nous avons partagé ensemble et tous ces souvenirs extraordinaires. En fait, je vous remercie pour tellement de choses que je pourrais écrire une 2<sup>ème</sup> thèse rien que pour ça. Donc tout simplement, merci.

Un remerciement spécial à Brian, mon compagnon de bureau avec lequel j'ai passé 3 merveilleuses années de chamailleries, des heures d'intense concentration (surtout en cette fin de thèse) mais aussi un peu moins sérieuses lorsque les bureaux étaient vides.

Je re-remercie mon Mamour de ma vie, mon petit kiwi des Andes, ma Sabine-mouth, mon rhododendron subaquatique, la lune de mes jours qui a su trouver les mots justes (ainsi que le vin) quand ça n'allait pas (mais également quand ça allait). Tu illumines ma vie et réchauffes mon cœur par ton sourire et ta joie de vivre.

Que dire de Benjamin, mon coloc, mon aide de laboratoire, mon remonte-moral et le plus important mon meilleur ami. Merci pour ces 10 mois de vie commune et ces 9 ans d'amitié sincère ...

Je pense également à mes amis qui m'ont toujours apporté leur soutien de près ou de loin, Adrien, Agathe, Yanouk, Lise, Matthieu, Anne-Laure, Guillaume, Camille, Aline, Nini et tous les autres. Je ne vais pas oublier les « rapportés », Céline, François, Doudou et Lili qui ont également largement contribué à la réussite de ce travail par leurs encouragements et leur amitié, tout simplement. Merci également à Monsieur Augereau pour son soutien durant toutes ces années.

Un énormissime merci à mes parents qui par leur soutien indéfectible, leur amour et leurs encouragements m'ont permis d'arriver jusque là. Maman, Papa, merci d'avoir cru en moi, merci pour votre aide, merci pour avoir fait de moi ce que je suis. Je remercie également mes frères (et ma belle-sœur), Lionel, Yann et Isabelle, mes cousins et cousines, et principalement Franck, Laurence, Claire, Manon, Lydia, Jean-François, Jean-Marc, Christelle et aussi Tonton Frédo, Jacky, Patrick, Jean-Claude, Alain, Tatie Chantal, Mimi, Jojo, Annick et Marie pour leur intérêt, leur patience et leur écoute lors de mes monologues trop souvent à base de poissons. Une grosse pensée pour Mamou qui m'a fait réviser la SVT au bac et pour mes grands-parents qui, j'espère, sont fiers de leur petite-fille.

Merci également à mes 3 chatons qui ont supporté les repas et les horaires décalés et su me donner beaucoup de réconfort. Enfin, merci pour tout à John-Basile ; pour ta patience, ta compréhension, pour ton courage pour me supporter (et ce n'est pas facile tous les jours je pense ...) et pour m'avoir aidée à arriver jusqu'au bout du bout du bout de cette thèse. Nous pouvons maintenant commencer notre nouvelle vie.

**LISTE DES  
ABREVIATIONS ET  
SYMBOLES**

## LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

---

<b>°C</b> Celsius degree	<b>FE</b> Free Embryos
<b>°d</b> degree Days	<b>Fd</b> Fins related-structure deformities
<b>A</b> Anterior	<b>Ff</b> Finfold
<b>Ac</b> Amacrine Cells	<b>For</b> Forebrain
<b>Ad</b> Axis deformity	<b>G1 and G2</b> Gastrulation steps 1 or 2
<b>ANOVA</b> Analysis Of Variance	<b>Gb</b> Gall bladder
<b>AP</b> Animal Pole	<b>Gc</b> Ganglion Cells
<b>Art</b> Artery	<b>Gm</b> Grey Matter
<b>At</b> Atrium	<b>H</b> Heart
<b>Avv</b> Atrioventricular valve	<b>HCA</b> Hierarchical Clustering Analysis
<b>Ba</b> Bulbus arteriosus	<b>Hd</b> Head deformities
<b>Bas</b> Basihyal	<b>Hind</b> Hindbrain
<b>Bb</b> Brush Border	<b>Hpa</b> Hatching peak age
<b>Bc</b> Bipolar Cells	<b>Hpd</b> Hatching peak date
<b>Bl</b> Blastoderm	<b>hpf</b> Hours Post Fertilization
<b>C</b> Cartilage	<b>Hr</b> Hatching rate
<b>Cb</b> Ceratobranchial arch	<b>Hyo</b> Hyosymplatic
<b>CC1 and CC2</b> Cell Cleavage steps 1 or 2	<b>Id</b> Minimum incubation duration
<b>Cd</b> Cardiac deformity	<b>Ie</b> Inner ear
<b>CHd</b> Corrected Hatching duration	<b>Inl</b> Inner Nuclear Layer
<b>Cm</b> Choroïdal Melanocytes	<b>Int</b> Intestine
<b>Cv</b> Caudal Vein	<b>Ip</b> Inner plexiform
<b>D</b> Dorsal	<b>J</b> Jaws
<b>Dd</b> Digestive deformity	<b>L</b> Lens
<b>DE</b> Développement embryonnaire	<b>Lct</b> Loose connective tissue
<b>Dien</b> Diencephalon	<b>Ld</b> Lipid Droplet
<b>dpf</b> Days Post Fertilization	<b>Li</b> Liver
<b>DV</b> Dorso-Ventral axis	<b>Lu</b> Lumen
<b>E</b> Eyes	<b>M</b> Mouth
<b>Ed</b> Eyes deformity	<b>Md</b> Mouth deformity
<b>EDF</b> Extended Depth of Focus	<b>MVd</b> Multivariable deformity
<b>En</b> Encephalon	<b>Mel</b> Melanophores
<b>Enp</b> Endocrine Part of the Pancreas	<b>Mes</b> Mesencephalon
<b>Ep</b> Epithelial Projection	<b>Mha</b> Mean hatching age
<b>Es</b> Esophagus	<b>Mid</b> Midbrain
<b>Etp</b> Ethmoïd Plate	<b>MI</b> Muscle Layer
<b>Exp</b> Exocrine part of the Pancreas	<b>mm</b> Millimeter

## LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

---

<b>Mov</b> Medulla oblongata	<b>Tel</b> Telencephalon
<b>Mye</b> Myelencephalon	<b>Ub</b> Urinary bladder
<b>Myo</b> Myotomes	<b>Ud</b> Urinary deformities
<b>NHE</b> Newly Hatched Embryos	<b>UE</b> Unhatched Embryos
<b>Nt</b> Notochord	<b>V</b> depending on the context Ventral in the figure 20 or Ventricle in the figures 22, 24 and 25
<b>O</b> Operculum	<b>Va</b> depending on the context Valve in the figure 26 or Ileorectal valve in the figure 28
<b>O1 to O5</b> Organogenesis steps 1 to 5	<b>Vc</b> Visual cells
<b>Ob</b> Olfactory bulb	<b>VP</b> Vegetative Pole
<b>Oc</b> Otic capsule	<b>Wm</b> White matter
<b>Od</b> Other deformities	<b>Y</b> Yolk
<b>Ole</b> Olfactory epithelium	<b>Yd</b> Yolk deformity
<b>Olp</b> Olfactory pits	<b>YSL</b> Yolk Syncitial Layer
<b>Onl</b> Outer Nuclear Layer	<b>CI1</b> Two cells
<b>Opc</b> Optic Nerve Chiasma	<b>CI2</b> 8 cells
<b>Opn</b> Optic Nerve	<b>CI3</b> 32 cells
<b>Ote</b> Optic tectum	<b>CI4</b> 128 cells
<b>P</b> Posterior	<b>CI5</b> Asynchronous cell divisions
<b>Pa</b> Pancreas	<b>CI6</b> 512 cells
<b>Pal</b> Palaquadrate	<b>CI7</b> High Blastula
<b>Par</b> Parachordal	<b>Ga1</b> 30% epiboly
<b>PCA</b> Principal Component Analysis	<b>Ga2</b> 50% epiboly
<b>Pf</b> Pectoral fins	<b>Ga3</b> Embryonic shield
<b>PPP</b> Pondeurs printaniers précoces	<b>Ga4</b> 70% epiboly
<b>PRF</b> Pond reared fish	<b>Ga5</b> Cell migration slowing down
<b>Prd</b> Pronephric ducts	<b>Ga6</b> Bud stage
<b>R</b> Rectum	<b>Ga7</b> A/P axis
<b>RAS</b> Recirculating aquaculture system	<b>Ga8</b> Tail bud closure
<b>RRF</b> RAS reared fish	<b>Gf1</b> Otic capsule
<b>Rsc</b> Rostral semicircular canal	<b>Gf2</b> Kupffer's vesicle
<b>Sb</b> Swim bladder	<b>Gf3</b> Translocation
<b>Sc</b> Spinal chord	<b>Gf4</b> Otic vesicle
<b>SD</b> Standard Deviation	<b>Gf5</b> Body contraction
<b>Seq</b> Squamous epithelium	<b>Gf6</b> Squamous epithelium
<b>Sr_24</b> Survival rate at 24 hpf	<b>Gf7</b> Tail free
<b>Sr_48</b> Survival rate at 48 hpf	
<b>Sr_72</b> Survival rate at 72 hpf	
<b>Sto</b> Stomach	



## LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

---

<b>Gf8</b> Otoliths apparition	<b>D2</b> Liver anlage
<b>Gf9</b> Melanophores on the yolk	<b>D3</b> Pancreas anlage
<b>Gf10</b> Eye pigmentation onset	<b>D4</b> Esophagus anlage
<b>Gf11</b> Embryo straightening	<b>D5</b> Brush Border
<b>Gf12</b> Pronephric duct	<b>D6</b> Pharynx
<b>Gf13</b> Urinary bladder	<b>D7</b> Gall bladder + bile
<b>Gf14</b> Eye pigmentation	<b>D8</b> Swim Bladder
<b>Gf15</b> Olfactory pits	<b>D9</b> Peristaltis undulations
<b>Gf16</b> Melanophores on the body	<b>D10</b> Jaw movements
<b>Gf17</b> Mouth open	<b>V1</b> Optic vesicle
<b>Gf18</b> Coordinated Pectoral fins movement	<b>V2</b> Lens
<b>Gf19</b> Gills formation	<b>V3</b> Marginal zone
<b>Gf20</b> First oral feeding	<b>V4</b> Outer nuclear layer
<b>C1</b> Heart visible	<b>V5</b> Ganglion cell
<b>C2</b> First heart beating	<b>V6</b> Inner plexiform
<b>C3</b> Circulation on the yolk	<b>V7</b> Inner nuclear layer
<b>C4</b> Vitelline vessel formation	<b>V8</b> Visual cell layer
<b>C5</b> Cardiac cavity enlarging	<b>V9</b> Outer plexiform
<b>C6</b> Erythrocytes circulation	<b>V10</b> Choroïdal melanocytes
<b>C7</b> Ventral circulation	
<b>C8</b> Circulation toward gills	
<b>C9</b> Circulation toward somite	
<b>M1</b> Notochord formation	
<b>M2</b> Somitic muscles	
<b>M3</b> Notochord vacuolated	
<b>M4</b> Pectoral bud	
<b>M5</b> Cartilage apparent	
<b>M6</b> Last pharyngeal cartilages	
<b>N1</b> Spinal cord	
<b>N2</b> Telencephalon	
<b>N3</b> Myelencephalon	
<b>N4</b> Diencephalon	
<b>N5</b> Mesencephalon	
<b>N6</b> Metencephalon	
<b>N7</b> Optic chiasm	
<b>N8</b> Optic nerve	
<b>D1</b> Intestinal anlage	



# TABLE DES MATIERES

<b>RESUME.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>II</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES.....</b>	<b>VI</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>ETAT DE L'ART .....</b>	<b>4</b>
<b>I. LA REPRODUCTION CHEZ LES TELEOSTEENS .....</b>	<b>5</b>
<b>A. L'induction.....</b>	<b>5</b>
<b>B. La gamétogenèse.....</b>	<b>6</b>
<b>C. De la maturation finale à la fécondation .....</b>	<b>7</b>
<b>D. Physiologie de la reproduction .....</b>	<b>8</b>
<b>II. LE DEVELOPPEMENT DES TELEOSTEENS .....</b>	<b>12</b>
<b>A. L'ontogenèse .....</b>	<b>12</b>
1. La théorie de l'ontogenèse graduelle .....	12
2. La théorie de l'ontogenèse saltatoire.....	13
3. Ontogenèse directe ou indirecte ?.....	15
4. Variabilité de l'ontogenèse et plasticité phénotypique.....	16
<b>B. La période embryonnaire .....</b>	<b>19</b>
1. L'embryogenèse et ses limites .....	19
2. Qu'est ce qu'un embryon ?.....	23
<b>C. Les anomalies lors de l'embryogenèse .....</b>	<b>25</b>
1. Mortalités précoces .....	25
2. Malformations communes.....	26
<b>D. Etat des lieux des recherches en biologie du développement chez les poissons ?.....</b>	<b>28</b>
1. L'utilisation des différentes théories de l'ontogenèse : l'exemple de l'embryogenèse.....	28
2. Variabilité et limites de la description de la période embryonnaire .....	29
<b>III. VARIATION DES SUCCES ET PERFORMANCES DE REPRODUCTION :</b>	
<b>DES OUTILS D'EVALUATION AUX FACTEURS IMPLIQUES.....</b>	<b>31</b>
<b>A. Les outils et indicateurs de qualité de la reproduction.....</b>	<b>31</b>
1. Indicateurs post-fécondation durant le développement précoce .....	31
2. Indicateurs prédictifs de la qualité des ovules.....	33
<b>B. Les facteurs influençant la reproduction et son succès .....</b>	<b>35</b>
1. Pendant la gamétogenèse .....	35
2. Après l'émission des gamètes .....	37
3. Facteurs influençant l'embryogenèse.....	37

<b>IV. L'AQUACULTURE : SYSTEME D'ELEVAGE ET DOMESTICATION, LEURS IMPACTS SUR LA BIOLOGIE DES TELEOSTEENS.....</b>	<b>42</b>
<b>A. Les systèmes d'élevage en aquaculture.....</b>	<b>42</b>
1. Quels sont les systèmes d'élevage en aquaculture aujourd'hui ?.....	42
2. Impact de ces systèmes sur la reproduction et le développement .....	43
<b>B. La domestication des poissons ? .....</b>	<b>45</b>
1. Impact de la domestication sur la biologie des poissons en général .....	45
2. Impact de la domestication sur la reproduction .....	46
3. Limites des études sur la domestication et la reproduction .....	49
<b>V. LE MODELE BIOLOGIQUE : LA PERCHE COMMUNE .....</b>	<b>51</b>
<b>A. La reproduction.....</b>	<b>52</b>
1. Maturité et dimorphisme sexuel chez la perche commune .....	52
2. Le Cycle de reproduction.....	53
3. Ovogenèse.....	55
<b>B. Développement de la perche commune .....</b>	<b>58</b>
1. Caractéristiques de la ponte et de l'œuf.....	59
2. Embryogenèse normale.....	60
3. Dérégulations lors de l'embryogenèse .....	63
4. La perche commune : une espèce de référence pour les pondeurs printaniers précoces ? .....	64
<b>PROBLEMATIQUE.....</b>	<b>68</b>
<b>MATERIEL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>70</b>
<b>CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA PERCHE COMMUNE.....</b>	<b>74</b>
<b>CONTEXTE .....</b>	<b>75</b>
<b>ARTICLE 1: AN ALTERNATIVE DEVELOPMENTAL TABLE TO DESCRIBE NON-MODEL FISH SPECIES EMBRYOGENESIS: APPLICATION TO THE DESCRIPTION OF THE EURASIAN PERCH (<i>PERCA FLUVIATILIS L. 1758</i>) DEVELOPMENT.....</b>	<b>77</b>
<b>I. ABSTRACT.....</b>	<b>77</b>
<b>II. BACKGROUND.....</b>	<b>79</b>
<b>III. METHODS .....</b>	<b>83</b>
<b>A. Origin of fish, broodstock .....</b>	<b>83</b>
<b>B. Hatcheries management and water quality.....</b>	<b>83</b>
<b>C. Gametes collection and fertilization.....</b>	<b>84</b>
<b>D. Study of the developmental progress by microscopy and time lapse microscopy.....</b>	<b>84</b>
<b>E. Fixation and histology .....</b>	<b>85</b>

<b>F.</b>	<b>Determination of the first oral feeding period</b> .....	<b>85</b>
<b>G.</b>	<b>Comparison of the developmental process between free and embedded embryos.</b> .....	<b>86</b>
<b>H.</b>	<b>Statistical analysis</b> .....	<b>87</b>
<b>IV.</b>	<b>RESULTS</b> .....	<b>88</b>
<b>A.</b>	<b>The zygote period (0-2.5 hpf)</b> .....	<b>88</b>
<b>B.</b>	<b>The cell cleavage period (2.5-24 hpf)</b> .....	<b>89</b>
<b>C.</b>	<b>The gastrulation period (24-50 hpf)</b> .....	<b>91</b>
<b>D.</b>	<b>The organogenesis period (50 hpf to 15 dpf)</b> .....	<b>91</b>
1.	Organogenesis 1 (O1) stage from the first cell differentiation to the first heart beatings (2-4 dpf). .....	92
2.	Organogenesis 2 (O2) stage from the first heart beatings to the differentiation of the organs associated to the digestive system (4-7 dpf).....	92
3.	Organogenesis 3 (O3) stage from the differentiation of the organs associated to the digestive system to the mouth opening (7-10 dpf). .....	96
4.	Organogenesis 4 (O4) stage from the mouth opening to the first coordinated movements (10-11 dpf). .	98
5.	Organogenesis 5 (O5) stage from the first coordinated movements to the first food intake (11-15 dpf).	98
<b>E.</b>	<b>First oral feeding (15 dpf)</b> .....	<b>100</b>
<b>F.</b>	<b>Comparison of the developmental process between hatched embryos and their unhatched counterparts</b> .....	<b>103</b>
<b>G.</b>	<b>Description of the eyes development</b> .....	<b>104</b>
<b>H.</b>	<b>Description of the digestive system ontogeny</b> .....	<b>105</b>
<b>V.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>107</b>
<b>A.</b>	<b>Establishment of the developmental table of the Eurasian perch.</b> .....	<b>107</b>
1.	The zygote period .....	107
2.	The cell cleavage period .....	108
3.	The gastrulation period .....	112
4.	The organogenesis period .....	112
<b>B.</b>	<b>Definition of the embryonic-to-larval transition</b> .....	<b>115</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>116</b>
<b>VII.</b>	<b>ACKNOWLEDGEMENT</b> .....	<b>117</b>
<b>VIII.</b>	<b>ADDITIONAL FILES</b> .....	<b>117</b>
	<b>RESUME</b> .....	<b>118</b>
	<b>CHAPITRE II : MALFORMATIONS EMBRYONNAIRES CHEZ LA PERCHE</b>	
	<b>COMMUNE</b> .....	<b>120</b>
	<b>CONTEXTE</b> .....	<b>121</b>
	<b>ARTICLE 2: DEFORMITIES IN NEWLY HATCHED EMBRYOS OF EURASIAN PERCH POPULATIONS ORIGINATING FROM TWO DIFFERENT REARING SYSTEMS</b> .....	<b>123</b>

<b>I. ABSTRACT.....</b>	<b>123</b>
<b>II. INTRODUCTION.....</b>	<b>124</b>
<b>III. METHODS .....</b>	<b>126</b>
<b>A. Broodstock and eggs management.....</b>	<b>126</b>
1. Rearing protocol of LPRF.....	126
2. Rearing protocol of RRF.....	126
3. In vitro fertilization and incubation of the embryos.....	127
<b>B. Characterization and occurrence of deformities .....</b>	<b>127</b>
1. Observations of living embryos .....	127
2. Histological study .....	128
<b>C. Data analyses .....</b>	<b>128</b>
<b>IV. RESULTS.....</b>	<b>129</b>
<b>A. Macroscopic and histological description of embryonic deformities .....</b>	<b>129</b>
1. Axis deformities.....	129
2. Mouth deformities.....	129
3. Yolk deformities .....	129
4. Cardiac deformities.....	129
5. Eyes deformities.....	132
6. Digestive system deformities .....	132
7. Fins related-structure deformities .....	132
8. Urinary system deformities.....	135
9. Head deformities .....	135
10. Multivariable deformities .....	135
<b>B. Potential relationships between the categories of deformities .....</b>	<b>135</b>
<b>C. Incidence of deformities categories according to the global effect of biotic and abiotic factors linked to the rearing system.....</b>	<b>138</b>
<b>V. DISCUSSION .....</b>	<b>139</b>
<b>VI. ACKNOWLEDGMENT.....</b>	<b>141</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>142</b>
<b>CHAPITRE III : VARIABILITE DES SUCCES DE DEVELOPPEMENT .....</b>	<b>144</b>
<b>CONTEXTE .....</b>	<b>145</b>
<b>ARTICLE 3: AN ORIGINAL APPROACH TO ASSESS THE DEVELOPMENTAL SUCCES OF FRESHWATER TELEOST APPLIED TO THE EURASIAN PERCH. 147</b>	
<b>I. ABSTRACT.....</b>	<b>147</b>
<b>II. BACKGROUND.....</b>	<b>148</b>
<b>III. METHODS .....</b>	<b>150</b>

<b>A. Broodstock and spawns management</b> .....	<b>150</b>
1. Broodstock management.....	150
2. Hatchery management.....	151
3. Water quality.....	151
<b>B. Estimation of the survival rates</b> .....	<b>151</b>
<b>C. Examination of hatching parameters</b> .....	<b>153</b>
<b>D. Determination of deformities occurrence</b> .....	<b>153</b>
<b>E. Statistical analyses</b> .....	<b>153</b>
<b>IV. RESULTS</b> .....	<b>154</b>
<b>A. Identification of the relationships existing between parameters characterizing the survival rates, hatching phase and deformities occurrence</b> .....	<b>154</b>
<b>B. Definition of spawn clusters according to their developmental success</b> .....	<b>156</b>
<b>C. Characterization of the spawn clusters</b> .....	<b>159</b>
<b>D. Identification of different pattern of development during embryogenesis</b> .....	<b>159</b>
<b>V. DISCUSSION</b> .....	<b>163</b>
<b>VI. ACKNOWLEDGMENT</b> .....	<b>165</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>166</b>
<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....	<b>168</b>
<b>A. Approche alternative du développement embryonnaire</b> .....	<b>169</b>
1. Démarche scientifique dans la construction de la table de développement.....	169
2. Comparaison interspécifique du développement d'espèce en fonction de la perche commune.....	172
3. Utilisation de l'approche alternative pour les comparaisons interspécifiques.....	176
4. Comparaisons interspécifiques : les grandes conclusions .....	182
<b>B. Mesures et variabilités du succès de développement chez les Téléostéens</b> .....	<b>185</b>
1. Qu'est-ce que le succès de développement et les limites des méthodes d'évaluation actuelles? .....	185
2. Développement d'une approche originale.....	191
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>197</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>201</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>204</b>
<b>LISTE DES INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES</b> .....	<b>206</b>
<b>LISTE DES ESPECES</b> .....	<b>208</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>211</b>
<b>VALORISATION SCIENTIFIQUE DES TRAVAUX DE THESE</b> .....	<b>228</b>







**INTRODUCTION  
GENERALE**

Depuis plus d'une vingtaine d'années, l'aquaculture mondiale, comprenant les espèces marines et continentales, a subi un essor phénoménal. En effet, suite à l'augmentation croissante des demandes des marchés en produits aquatiques ainsi qu'à l'épuisement des stocks naturels et la stagnation des captures de la pêche, la production aquacole est passée de 17 millions de tonnes en 1990 à 73,8 millions de tonnes en 2014 (FAO, 2016). Malgré cette croissance, l'aquaculture d'aujourd'hui, et plus particulièrement la pisciculture, repose principalement sur l'élevage d'un faible nombre d'espèces domestiquées (Fontaine *et al.*, 2009). En effet, 85 % de la production de poissons seraient assurés par l'élevage de seulement 15 espèces sur les 33 200 actuellement connues (Lazard et Levêque, 2009). L'introduction de ces espèces en dehors de leur aire naturelle de distribution comporte des risques : diminution de la biodiversité par l'introduction de ces espèces potentiellement invasives dans de nouveaux milieux, transfert de pathogènes à d'autres espèces hôtes ou modification des écosystèmes (Fontaine *et al.*, 2009). Par conséquent, la durabilité de ce modèle actuel de développement de l'aquaculture est de plus en plus questionnée.

Face à ce contexte, une des alternatives proposées est la diversification de la production piscicole par la domestication de nouvelles espèces autochtones aux zones d'élevage et à fort potentiel aquacole, permettant de répondre de façon durable à la demande des consommateurs en s'appuyant sur des marchés de niche où la demande est bien souvent supérieure à l'offre (Fontaine, 2009 ; Fontaine *et al.*, 2009). Cela permettrait de développer une pisciculture mieux intégrée aux territoires mais également de diminuer les risques environnementaux précédemment cités. Dès les années 90, quelques espèces ont été sélectionnées pour une diversification de l'aquaculture continentale. Parmi ces espèces, figure la perche commune, (*Perca fluviatilis*) (Fontaine, 2009 ; Fontaine *et al.*, 2009).

Une des fonctions clefs lors d'un processus de domestication d'une nouvelle espèce est la fonction de reproduction, dont l'enjeu majeur est la maîtrise de son cycle sur plusieurs générations dans des conditions contrôlées, tout en obtenant de bonnes performances reproductives (gamètes, embryons et larves) (Teletchea et Fontaine, 2014). Cependant, au cours de ce processus de domestication, cette fonction biologique, parmi beaucoup d'autres, va être fortement modifiée. Par conséquent, les succès de reproduction des espèces en cours de domestication dans des conditions d'élevage sont actuellement très variables, diminuant de façon importante la production piscicole et limitant les possibilités de sélection génétique (Bobe, 2015). Un des principaux paramètres limitant ce succès de reproduction est la qualité des gamètes des poissons et notamment, celle des ovules qui contiennent la plus grande partie du matériel moléculaire nécessaire au bon développement de la progéniture (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013).

La qualité ovocytaire peut être définie comme la capacité d'un ovule à être fécondé et à se développer en un embryon normal (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013 ; Bobe, 2015). L'obtention d'ovules de bonne qualité est donc un enjeu central lié, au préalable, au bon déroulement

d'un cycle de reproduction et nécessaire pour un développement embryonnaire harmonieux. Le contrôle de nombreuses étapes est nécessaire pour obtenir de bonnes performances de reproduction car beaucoup de facteurs peuvent influencer la qualité des gamètes. Afin de déterminer l'origine des potentielles variations de la qualité des gamètes et de la réussite du développement des embryons, il est nécessaire d'évaluer le succès de chacune des étapes. Aujourd'hui, de nombreux outils sont développés afin de mesurer le succès et les performances de reproduction. Malheureusement, un grand nombre d'entre eux sont d'intérêt limité, peu reproductibles et espèces-dépendants. De plus, ces indicateurs ne nous permettent pas encore de prédire le succès de reproduction.

Par conséquent, la connaissance de la fonction de reproduction est nécessaire afin de comprendre le développement des individus. Cela implique l'étude de l'ensemble de son cycle incluant le bon déroulement de la maturation ovocytaire, la caractérisation de la qualité des gamètes ainsi que l'étude des premiers stades de vie tel que le développement embryonnaire, notamment chez des espèces peu connues comme la perche commune.

Afin de bien comprendre les enjeux globaux liés au cycle de reproduction et les potentiels impacts de celui-ci sur le succès de développement, la première partie de ma synthèse bibliographique portera sur l'état des connaissances actuelles des mécanismes biologiques et physiologiques sous-jacents à l'obtention de gamètes de qualité.

Cette qualité étant le point de départ des premiers stades de vie des individus, notamment de l'embryogenèse, la seconde partie détaillera les connaissances actuelles sur les différentes théories du développement, plus ou moins controversées, ainsi que la caractérisation et le déroulement de la période embryonnaire.

Les variations du succès et des performances de reproduction ont déjà été évoquées. Les outils d'évaluation de ce succès, ainsi que les facteurs déterminants impliqués, seront développés dans la troisième partie. Une attention particulière sera portée sur les limites de ces indicateurs.

Parmi ces facteurs pouvant influencer le bon déroulement du cycle de reproduction, la qualité des gamètes ainsi que les premiers stades de vie, l'impact des conditions d'élevage et d'un processus de domestication sera exposé dans la quatrième partie de cette synthèse bibliographique.

Enfin, dans le contexte de domestication de nouvelles espèces aquacoles d'intérêt et de l'utilisation de la perche commune comme candidate à la diversification de l'aquaculture, l'ensemble des points précédemment abordés seront détaillés pour notre espèce de référence.

# ÉTAT DE L'ART

## **I. La reproduction chez les Téléostéens**

La grande diversité d'espèces de Téléostéens dans le monde s'accompagne d'une diversité d'habitats, de comportement et de modes de reproduction (Jalabert, 2005). Cela entraîne également de nombreuses adaptations appelées stratégies de reproduction telles que l'âge et la taille à la maturité sexuelle, la fécondité, les conditions de pontes, la taille des ovules et des larves ou encore les différents modes de développement (Teletchea *et al.*, 2009a). Plusieurs classifications des poissons se sont basées sur ces stratégies de reproduction. Balon a mis en place une classification écologique de l'ensemble des poissons vivant dans laquelle sont décrites près de 32 guildes reproductives (Balon, 1975a). Elles correspondent à des catégories de taxons de poissons formées à partir de critères spécifiques comme le développement précoce, le comportement ainsi que le substrat de reproduction. D'autres auteurs, (Teletchea *et al.*, 2009a)(2009a) proposent de regrouper les poissons d'eau douce en 10 groupes formés en fonction de certains traits reproducteurs structurants (température pendant la ponte, incubation des œufs et élevage larvaire, durée de l'incubation en degrés jours, taille de la l'embryon à l'éclosion, saison de la ponte et soins parentaux) (Teletchea *et al.*, 2009a). La description et l'étude de la fonction clef de reproduction, à commencer par son cycle, apparaissent indispensables pour la compréhension du développement précoce et de la biologie générale des poissons ainsi que pour la gestion de ces derniers, notamment chez les espèces nouvellement domestiquées. De plus, l'identification des facteurs pouvant influencer le cycle de reproduction, chez ces espèces, pourrait permettre de grandes avancées dans le domaine de l'aquaculture afin d'améliorer le succès et les performances de reproduction.

Le cycle de reproduction des Téléostéens peut être décomposé en plusieurs évènements physiologiques successifs : l'induction du cycle, la gamétogenèse (spermatogenèse et ovogenèse) et la saison de reproduction avec l'expulsion des gamètes mâles et femelles (Fostier et Jalabert, 2004 ; Wang *et al.*, 2010). La compréhension et la description biologique de l'ensemble de ces étapes, des facteurs les influençant ainsi que des outils permettant leur évaluation sont d'une importance primordiale pour contrôler ce cycle et produire une descendance de qualité. Même si la diversité des espèces entraîne des stratégies de reproduction différentes, le processus de maturation ovocytaire possède des caractéristiques communes chez toutes ces espèces (Lubzens *et al.*, 2010).

### **A. L'induction**

L'induction d'un cycle de reproduction est caractérisée par des divisions mitotiques d'une partie des ovogonies présentes dans l'ovaire suivies par l'entrée de ces dernières en méiose (Figure 1) (Patino et Sullivan, 2002). Ce cycle est très souvent contrôlé par les facteurs environnementaux chez les Téléostéens. En effet, la reproduction des poissons est fortement adaptée aux conditions du milieu dans lequel ils se trouvent. Ces conditions peuvent varier notamment en fonction des rythmes

saisonniers ou des migrations durant le cycle de vie de certaines espèces. Chez les poissons d'eau tempérée, les principaux facteurs permettant l'entrée dans un cycle de reproduction et le processus de la gamétogenèse sont généralement des variations de photopériode et/ou de température (Wang *et al.*, 2010). D'autres facteurs plus anecdotiques comme la physico-chimie de l'eau ou encore des facteurs sociaux (pour les espèces hermaphrodites principalement) peuvent avoir également un rôle dans l'induction d'un cycle de reproduction (Jalabert, 2005).

## **B. La gamétogenèse**

Suite à l'induction du cycle par un signal environnemental, les ovaires présentent des ovogonies entourées de cellules somatiques qui formeront les couches folliculaires de l'ovocyte (Figure 1). Les ovogonies recrutées pour la reproduction vont suivre plusieurs étapes de croissance et de maturation. Cette gamétogenèse est divisée en plusieurs phases : la croissance prévitellogénique, la vitellogenèse endogène et exogène et enfin la maturation ovocytaire finale (Figure 1) (Patino et Sullivan, 2002). La croissance prévitellogénique est donc initiée à partir de la première division méiotique et les ovogonies sont alors appelées ovocytes. L'ovocyte, durant cette période, est appelé ovocyte primaire ou stade I (chez le poisson zèbre, *Danio rerio*) et est arrêté en fin de prophase I de la méiose. Au début de cette étape, l'ovocyte primaire est entouré d'une monocouche de cellules somatiques de la *granulosa*, d'une lame basale et d'une monocouche de cellules somatiques associées à des vaisseaux sanguins constituant la thèque (Babin *et al.*, 2007). Ces couches cellulaires ainsi que l'ovocyte forment le follicule ovarien. Ces cellules somatiques auront un rôle dans la stéroïdogénèse lors de la maturation et la croissance ovocytaire. Durant la phase prévitellogénique, les cellules de la *granulosa* vont se multiplier et l'ovocyte synthétise de façon très active de l'ARN pendant que des ARN ribosomiaux et ARNm (par exemple, ARNm des récepteurs de la Vitellogénine) sont transportés et accumulés dans le cytoplasme de l'ovocyte (Babin *et al.*, 2007). De plus, le follicule ovarien commence à synthétiser une matrice extra-ovocytaire au niveau de la membrane entourant l'ovocyte. Cette matrice contient des microvillosités, localisées face aux cellules de la *granulosa*, qui permettront les échanges avec la circulation sanguine. Durant ce processus, la taille de l'ovocyte augmente de 20 à 140  $\mu\text{m}$  chez le poisson zèbre (Babin *et al.*, 2007).

La vitellogenèse endogène, ou vitellogenèse de type I, correspond au stade ovocytaire II ou alvéole cortical. Cette phase permet la différenciation des couches folliculaires, l'incorporation des ARNm et produits maternels retrouvés dans les ovocytes matures, pilotant les étapes les plus précoces du développement, ainsi que l'accumulation par endocytose de larges quantités de lipides et de faibles quantités de glycoprotéines comme la Vitellogénine (Figure 1) (Patino et Sullivan, 2002). Ces glycoprotéines vont être concentrées dans des alvéoles corticales arrangées en cercles concentriques qui s'ancrent à la périphérie de l'ovocyte et qui seront utilisées lors de la fécondation (Babin *et al.*, 2007). Durant cette période, l'accumulation de lipides en termes de quantité est prédominante par



rapport à celle de Vitellogénine et des globules vitellins. A la périphérie de la membrane ovocytaire, entre les microvillosités, des évènements d'exocytose forment une couche protectrice de l'ovocyte nommée *zona radiata* (ZR), *zona pellucida* (ZP), membrane vitelline ou chorion selon les auteurs (Babin *et al.*, 2007). La ZR est perforée par des canaux permettant le passage des microvillosités. Une seconde enveloppe est sécrétée par les cellules de la granulosa dont les rôles principaux sont la protection, l'adhésion et la flottaison des ovules, selon les espèces. Durant la phase de vitellogenèse endogène, la taille des ovocytes varie de 140 à 340  $\mu\text{m}$ , chez le poisson zèbre.

La vitellogenèse exogène ou vitellogenèse de type II, correspond à une large incorporation de protéines vitellines ainsi que de lipides et de vitamines dans les ovocytes de stade III et entraîne une phase de croissance de l'ovocyte pouvant atteindre jusqu'à 95% de sa taille finale (Figure 1) (Patino et Sullivan, 2002). La taille de ces derniers passe de 340 à 690  $\mu\text{m}$  chez le poisson zèbre. Cela implique une augmentation de la masse des ovaires pouvant atteindre 20 à 25 % du poids de la femelle au moment de la ponte, contre moins de 1 % au début du cycle de reproduction (Jalabert, 2005). La Vitellogénine, un complexe de phospholipoprotéines synthétisée principalement dans le foie et nécessaire à l'embryon durant son développement, est acquise depuis le plasma de façon exogène par endocytose (Babin *et al.*, 2007). Durant la croissance vitellogénique, la Vitellogénine va être incorporée dans le follicule ovarien et son clivage protéolytique engendre des protéines vitellines, appelées Lipovitelline et Phosvitine. L'accumulation de ces protéines va entraîner un déplacement des alvéoles corticales vers la périphérie et le cortex de l'ovocyte (Figure 1). En fonction des espèces, ces protéines vitellines vont pouvoir être stockées dans des globules vitellins (Patino et Sullivan, 2002). La phosvitine aura un rôle dans la minéralisation et le développement du squelette des embryons ainsi que dans des fonctions métaboliques. Lors de cette étape de vitellogenèse, les évènements d'exocytose au niveau de la membrane de l'ovocyte continuent et forment la ZR interne. Cela entraîne le déplacement de la première couche protectrice de l'ovocyte vers les cellules de la granulosa pendant que ces dernières continuent de sécréter la seconde enveloppe de l'ovocyte. Une polarité de l'ovocyte est également initiée au niveau des futurs pôles animal et végétal (Lyman-Gingerich et Pelegri, 2007). Le pôle animal contiendra éventuellement le pronucléus femelle, le micropyle et sera le lieu du clivage cellulaire lors de l'embryogenèse alors que le pôle végétal va contenir le vitellus. De plus, durant le stade III et jusqu'à la fin de la maturation ovocytaire, la vésicule germinale, ou noyau de l'ovocyte, commence à migrer vers le pôle animal (Babin *et al.*, 2007).

### C. De la maturation finale à la fécondation

Une fois la vitellogenèse terminée, les ovocytes en stade IV terminent leur développement par la maturation ovocytaire finale (MOF), précédant l'ovulation. Durant ce processus, la première division méiotique est achevée et la seconde débute jusqu'en métaphase II, juste avant l'ovulation. Plusieurs changements morphologiques ont alors lieu au sein de l'ovocyte permettant la fécondation

(Migaud *et al.*, 2003 ; Żarski *et al.*, 2015). A ce stade, les ovocytes contiennent de nombreuses molécules comme des ARNm maternels, des protéines, des lipides, des vitamines, des facteurs de croissance et des hormones, importantes pour le développement de l'embryon (Lubzens *et al.*, 2010). Des mécanismes associés à l'hydratation des ovocytes sont également mis en place à ce moment et participent à la qualité ovocytaire, comme la décomposition de protéines vitellines libérant des acides aminés et de petits peptides, qui ont un rôle d'osmorégulation, permettant l'influx de l'eau dans l'ovocyte. Durant cette période, la vésicule germinale termine sa migration vers le pôle animal jusqu'au stade de la rupture de la vésicule germinale, la méiose reprend, le premier globule polaire est formé et l'ovocyte croît encore de 10 à 15 % afin d'atteindre sa taille finale (Munro et Lam, 1996 ; Patino et Sullivan, 2002 ; Babin *et al.*, 2007 ; Lubzens *et al.*, 2010). Cette croissance est principalement due à la protéolyse des protéines du vitellus, l'hydratation et le taux élevé de transcription et/ou traduction des produits maternels préalablement incorporés (Babin *et al.*, 2007). Les globules vitellins fusionnent avec les globules lipidiques pour former le vitellus. Chez certaines espèces, comme les espèces pélagophiles, les globules lipidiques fusionnent entre eux et produisent une large gouttelette lipidique. Enfin, l'assimilation de produits exogènes lors de ce stade semble terminée, entraînant la rétraction des microvillosités présentes dans la membrane vitelline.

Suite à la reprise de la méiose, durant la métaphase, deux cellules sont produites : un large ovocyte (stade V) et le premier globule polaire qui dégénère. L'ovocyte entreprend la seconde division méiotique qui est arrêtée en métaphase II et la ZR se transforme en chorion. Au moment de l'ovulation, cet ovocyte se sépare des couches somatiques l'entourant. Ce mécanisme serait contrôlé par un système de phéromones ou directement lié à la production d'hormones provoquée par le comportement de reproduction chez le mâle et induisant l'ovulation (Babin *et al.*, 2007). De fait, chez certaines espèces, cette ovulation est synchronisée avec l'expulsion du sperme (Patino et Sullivan, 2002). Dès que l'ovule entre en contact avec l'eau, cela induit des changements morphologiques et cellulaires : cette étape est nommée l'activation. L'ovule change alors de forme pour devenir plus rond, suite à l'entrée d'eau dans celui-ci, et le chorion se dilate autour de l'ovule. De plus, les facteurs maternels sont redistribués à travers la cellule en formation et l'exocytose du contenu des alvéoles corticaux débute entre la membrane vitelline et le chorion. Les facteurs relâchés par ces alvéoles corticaux entraînent une restructuration de cette membrane vitelline permettant son expansion (Babin *et al.*, 2007). Le sperme va pouvoir rentrer dans l'ovocyte à travers le micropyle, positionné au pôle animal de l'ovule, induire la réaction corticale et la fin de la 2<sup>nde</sup> division méiotique ainsi que l'expulsion du 2<sup>ème</sup> globule polaire (Patino et Sullivan, 2002).

#### **D. Physiologie de la reproduction**

Comme décrit auparavant, la gamétogenèse chez les Téléostéens est initiée par un signal d'origine environnementale (Babin *et al.*, 2007). Cela entraîne l'activation de l'axe neuroendocrinien

gonades-cerveau-hypophyse dont une cascade de neuro-hormones menant à la libération de Gonadolibérines ou *Gonadotropin-Releasing Hormone* (GnRH) ainsi que différents acteurs tels que des gonadotropines (LH/FSH) et des stéroïdes sexuels (œstradiol, testostérone) (Brooks *et al.*, 1997 ; Patino et Sullivan, 2002). La FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) ou hormone gonadotrope I (GtHI), chez de nombreuses espèces, a un rôle dominant dans l'initiation de la gamétogenèse et durant la vitellogenèse (Figure 1). Par exemple, lors de l'étape de vitellogenèse endogène (stade II ou alvéole corticale), les femelles produisent de la FSH. Cette synthèse se maintient durant toute cette période puis décroît avant la maturation finale des ovocytes (Nagahama, 1994). Les récepteurs spécifiques de la FSH se situent dans les cellules de la granulosa et de la thèque. Chez les Salmonidés, l'augmentation de FSH dans le plasma entraîne une production folliculaire de 17- $\beta$ -œstradiol sécrétée dans les vaisseaux sanguins de la thèque (Patino et Sullivan, 2002 ; Jalabert, 2005). L'œstradiol permet, à son tour, de stimuler la production hépatique du principal précurseur de protéines vitellines, la Vitellogénine, et de protéines nécessaires pour la formation du chorion de l'ovule, comme la Choriogénine H (Devlin et Nagahama, 2002). La Vitellogénine est également impliquée dans le rétrocontrôle négatif des niveaux d'œstradiol chez la truite arc-en-ciel afin d'assurer un contrôle précis de la reproduction.

La stimulation de la croissance et du développement ovocytaire est issue de l'effet de l'œstradiol sur les gonades mais également indirectement, de l'expression de gènes de tissus non gonadiques (Devlin et Nagahama, 2002). Chez certaines espèces, la production ovarienne d'œstradiol peut être stimulée par l'hormone gonadotrope II ou LH. Généralement, la LH agit plus tard que la FSH durant la gamétogenèse, à la fin de la vitellogenèse et lors de la maturation ovocytaire finale notamment sur les cellules folliculaires pour stimuler la synthèse de progestérones (Figure 1). Ces progestérones contrôlent la maturation finale de l'ovocyte ainsi que l'ovulation (Brooks *et al.*, 1997). En plus de l'œstradiol et des progestérones, la synthèse de FSH et de LH stimule également la production de différents androgènes comme la testostérone ou la 11-kétotestostérone par les cellules folliculaires. Ces androgènes pourraient avoir un rôle dans la production d'œstradiol dans les follicules vitellogéniques chez le médaka (*Oryzias latipes*) (Nagahama, 1994).

La dernière étape de l'ovogenèse est l'ovulation dont l'induction nécessite une nouvelle production d'hormone gonadotrope, LH, stimulant les cellules folliculaires ovariennes qui produisent des progestérones induisant la maturation de l'ovocyte (*Maturation-Inducing Hormone* ou MIH) (Lubzens *et al.*, 2010). Ces MIH, le 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) et le 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one (20  $\beta$ -S), vont permettre la synthèse et l'activation de facteurs de maturation (MPF) qui agissent sur la membrane interne du noyau de l'ovocyte et entraînent une destruction de cette enveloppe ainsi que la rupture de la vésicule germinale conduisant à l'ovulation (Nagahama, 1994 ; Babin *et al.*, 2007).

La reproduction est une fonction clef chez les poissons présentant de nombreuses stratégies au sein des Téléostéens. La durée de l'ensemble des étapes de gamétogenèse peut varier en fonction des espèces, de plusieurs mois à un an. De plus, l'étape de gamétogenèse, notamment la vitellogenèse, nécessite un important investissement métabolique de la part de la femelle (Jalabert, 2005). En effet, cette étape de vitellogenèse permet l'accumulation de quantités de protéines vitellines plus ou moins importantes, d'ARNm et de lipides conditionnant, en partie, le bon déroulement du développement embryonnaire des Téléostéens. La clarification de ces notions et la description des stades précoces de développement, fortement impactés par l'histoire de vie des géniteurs, est nécessaire pour la compréhension et le pilotage de la fonction de reproduction chez les Téléostéens.

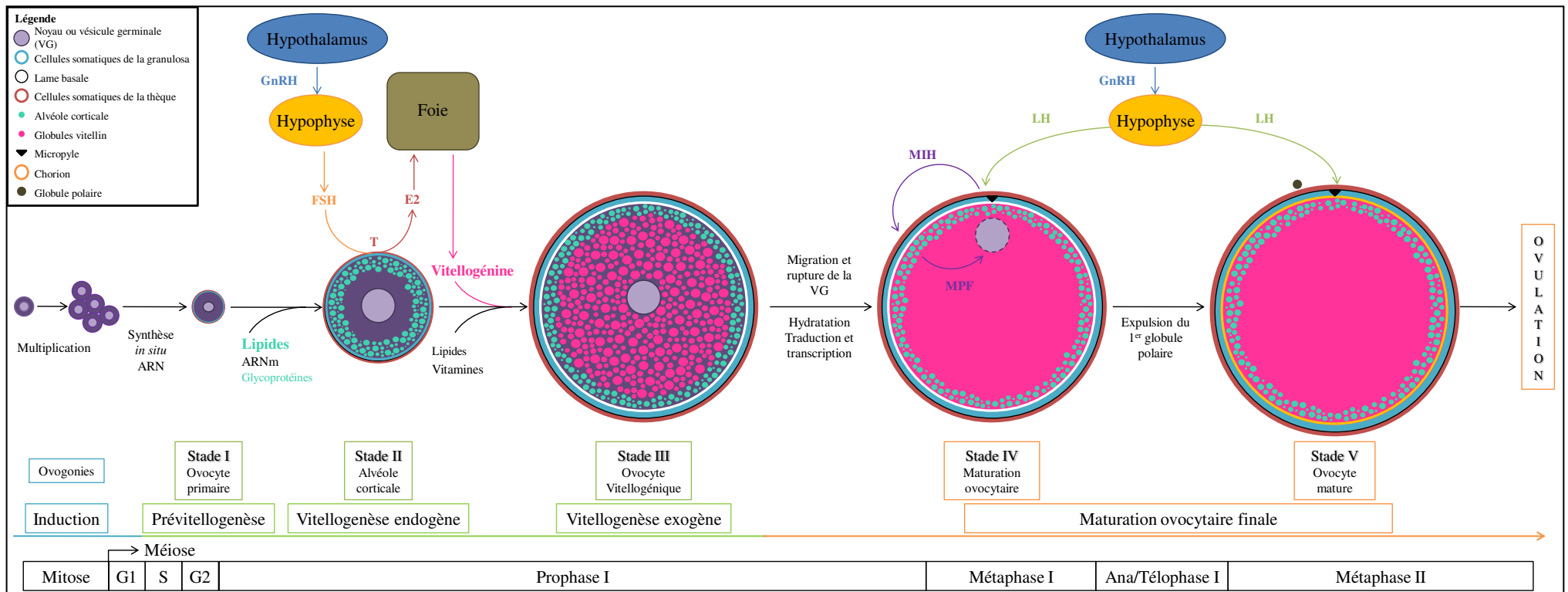


Figure 1 : Schéma récapitulatif du cycle de reproduction chez les femelles de Téléostéens, de l'induction à l'ovulation.

Schéma inspiré de Lubzens *et al.*, 2010.

## II. Le développement des Téléostéens

Aujourd'hui, les études dans le domaine de la biologie du développement nécessitent l'identification et la définition de « stades de développement normaux ». Leur rôle est de standardiser les étapes du développement afin de faciliter les comparaisons inter-espèces et de prendre en compte les variations individuelles lors de l'ontogenèse (Hopwood, 2007). De plus, ces « stades de développement normaux » sont également considérés comme des standards qui facilitent l'étude de potentielles anomalies pouvant apparaître lors de l'ontogenèse. Cependant, l'utilisation de théories de l'ontogenèse variées, d'une nomenclature spécifique à chaque étude et de ces « stades normaux » empêche l'homogénéisation et la comparaison des études effectuées.

L'ontogenèse chez les organismes multicellulaires est un processus débutant lors de l'activation d'une cellule unique, l'ovule, et se terminant lors de la mort de l'individu (Balon, 1990 ; Kunz, 2004) et peut être divisé en 5 périodes : embryonnaire, larvaire, juvénile, adulte et sénescence (Balon, 1975b, 1990, 1999 ; Urho, 2002 ; Teletchea et Fontaine, 2011). Néanmoins, leurs frontières semblent encore largement discutées comme la transition entre les périodes embryonnaire et larvaire ou la métamorphose pour les juvéniles (Balon, 1990 ; Kováč et Copp, 1999 ; Penaz, 2001 ; Urho, 2002 ; Teletchea et Fontaine, 2011). D'autres limites, moins discutées, méritent d'être tout de même définies, comme le début de l'ontogenèse. Afin d'identifier ces limites, différentes théories se sont efforcées de définir et comprendre l'ontogenèse des poissons.

### A. L'ontogenèse

Ce processus d'ontogenèse inclut des périodes qualifiées de « constructives » comme les périodes embryonnaire et larvaire ainsi qu'une période dite « destructive », la sénescence (Greenwood, 1989). L'étude de l'ontogenèse, notamment des premiers stades de vie des organismes, est fondamentale et permet d'acquérir des connaissances sur les histoires de vie des espèces utilisables dans les pratiques actuelles d'aquaculture (Tong *et al.*, 2013). Actuellement, il existe deux théories permettant de décrire et comprendre l'ontogenèse : la théorie graduelle et la théorie saltatoire.

#### 1. La théorie de l'ontogenèse graduelle

La théorie de l'ontogenèse graduelle présente le développement selon un processus continu (Kamler, 2002). L'évolution des structures et des fonctions lors de l'ontogenèse est alors rendue possible grâce à une accumulation de petits changements non visibles (Balon, 1990, 2001). Les seules modifications brutales importantes de forme ou/et de fonction admises dans ce courant de pensée sont les métamorphoses (comme chez les insectes) (Balon, 1990, 2001). Cette méthode de description est celle qui est généralement enseignée. De fait, peu d'études précisent appartenir à ce courant de pensée. Cependant, de nombreuses tables de développement peuvent induire le lecteur dans un processus

graduel. Par exemple, une des principales descriptions séquentielles de l'ontogenèse correspond à l'identification progressive de l'apparition de nouveaux organes et/ou tissus. Afin d'établir cette séquence, la référence utilisée principalement le nombre de somites. Ces tables opérationnelles permettent la description de l'ontogenèse de façon simple pour des espèces modèles déjà connues et largement adaptées aux conditions de laboratoire (poisson zèbre, médaka). Ces adaptations impliquent notamment de faibles variations dans le déroulement du développement. De par ces caractéristiques, ces tables sont considérées comme suivant un schéma graduel pour cette étude.

## 2. La théorie de l'ontogenèse saltatoire

La théorie saltatoire décrit l'ontogenèse comme un développement discontinu ou une séquence composée de longs états stables, appelés étapes, entrecoupés de changements rapides, nommés seuils (Balon, 1990, 2001). Différents types d'histoires de vie chez les poissons ont été identifiées grâce à la mise en place de cette théorie. De plus, elle a permis de caractériser et proposer une homogénéisation des types d'intervalles présents tout au long du cycle de vie des poissons et de l'ontogenèse.

### a) *Qu'est-ce que l'ontogenèse saltatoire ?*

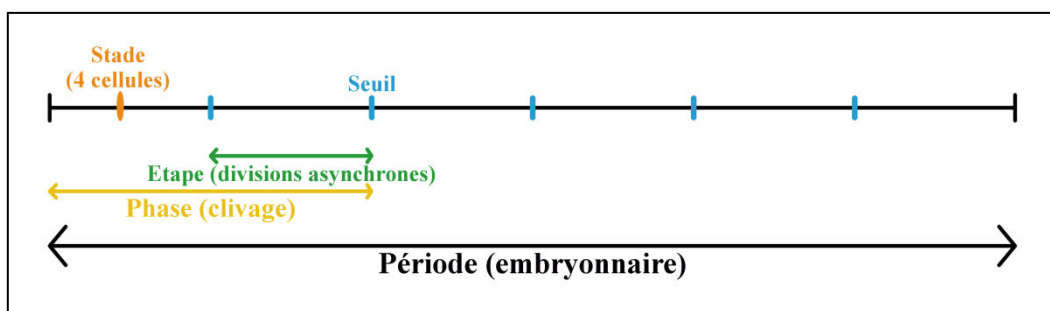
La théorie dite saltatoire permet de décrire l'ontogenèse selon une série d'états stables ponctués par des seuils naturels d'instabilités structurelles et physiologiques conduisant au développement d'un individu de plus en plus complexe et spécialisé (Duellman, 1989 ; Greenwood, 1989 ; Balon, 1990, 2001). L'ébauche de cette théorie a été pour la première fois appliquée à l'ontogenèse des poissons par Vasnetsov et Kryzhanovsky *et al.* en 1953 puis reprise et affinée par Balon (Kryzhanovsky *et al.*, 1953 ; Vasnetsov, 1953 ; Balon, 1979). La première version de ce courant de pensée reposait sur une séquence d'étapes, comme la croissance et la morphogenèse, séparées par de rapides sauts. Dans la formulation de sa théorie, Balon reprend cette idée d'étapes, comme états d'équilibre et caractérise les sauts rapides par des seuils (Balon, 1986). Durant ces états d'équilibre (homéorhétiques), des mécanismes de différenciation des cellules, tissus ou organes, évoluant à différentes vitesses, vont pouvoir s'accumuler jusqu'à ce changement rapide, permettant d'atteindre un nouvel état d'équilibre et d'initier une nouvelle fonction vitale (première prise de nourriture exogène, premiers battements du cœur...). Cette théorie est utilisée chez des groupes d'espèces tels que les insectes ou les amphibiens (Duellman, 1989). Chez le têtard, période précoce de la vie des amphibiens, différents états stables peuvent être décrits : (i) présence de branchies et absence de nutrition, (ii) absence de branchies mais présence de nutrition, (iii) séparation des pattes avant et réduction de la queue, (iv) dégénérescence des parties larvaires de la bouche et (v) formation des mâchoires (Duellman, 1989). Cependant, afin d'utiliser ce modèle en biologie du développement, il est nécessaire d'accomplir une étude intégrative et précise de l'ensemble des aspects du développement – morphologiques, biochimiques, physiologiques, comportementaux et écologiques – permettant de

définir exactement les seuils naturels de l'ontogénèse d'un individu, les états d'équilibre et les changements rapides (Balon, 1979, 1990).

b) *Comment définir les intervalles lors du développement ?*

Selon la théorie de l'ontogénèse saltatoire mise en avant chez les poissons par Balon, des termes généraux peuvent être utilisés afin de nommer les différents intervalles de développement des poissons, de façon hiérarchique, et unifier la nomenclature utilisée (Figure 2) (Balon, 1975b, 1999) :

- La période, le plus long et le principal intervalle de l'ontogénèse (embryonnaire, larvaire ...). Chaque période est séparée par un seuil décisif.
- La phase, identifiée par des niveaux de développement morphologiques et physiologiques spécifiques (clivage cellulaire, gastrulation ou encore organogénèse).
- L'étape ou *Step*, caractérisant des intervalles naturels de morphogénèse importante et de croissance. Ces étapes semblent être spécifiques de chaque guild, taxon et espèce.
- Le stade, qui correspond à un moment de développement défini, immédiat et observé et non pas un intervalle (comme le stade 128 cellules, 70% d'épibolie ou le stade œillé).



**Figure 2 : Schéma récapitulatif de la nomenclature des intervalles de l'ontogénèse chez le poisson utilisée par Balon (1975b, 1979).**

Les termes entre parenthèses ne sont que des exemples.

Enfin, le seuil ou *threshold* est un évènement qui sépare les étapes et correspond à une combinaison de brefs sauts du développement, représentés par une modification fonctionnelle brusque et/ou l'acquisition d'une nouvelle capacité lors de l'ontogénèse (Balon, 1979, 1990). Un nombre important de changements de caractéristiques de l'ontogénèse est nécessaire afin de déterminer l'apparition d'un seuil (ontogénèse de différents systèmes, comportement différent, mouvement des cellules ou organes). Par conséquent, ces seuils peuvent être considérés comme sensibles ou des moments vulnérables du développement car l'absence d'acquisition des nouvelles capacités qu'ils confèrent pourraient entraîner des malformations ou mortalités importantes.



### 3. Ontogenèse directe ou indirecte ?

Une des conséquences de la théorie de l'ontogenèse saltatoire est l'histoire de vie des poissons, citée auparavant : cinq périodes distinctes ; l'embryon, la larve, le juvénile, l'adulte et le sénescant (Balon, 1975b, 1990, 1999 ; Urho, 2002 ; Teletchea et Fontaine, 2011). Cependant, l'histoire de vie de certaines espèces pourrait être décrite par quatre périodes seulement : embryon, juvénile, adulte et sénescant. Ces deux types de développement, indirect et direct, correspondant à deux modèles d'histoires de vie, altricial et précocial, respectivement, sont principalement la conséquence d'une différence de vitellogenèse (Figure 3).

Dans le cas du développement indirect, un faible investissement dans la vitellogenèse produit des ovules avec un vitellus de petite taille et/ou de faible densité, soit peu de réserves et de nutriments lors du développement de l'embryon (Flegler-Balon, 1989). L'individu poursuit son développement avec une période transitoire – appelée période larvaire – durant laquelle la nutrition exogène est importante et l'animal acquiert des organes/tissus/fonctions temporaires, jusqu'à l'étape de la métamorphose. La métamorphose, d'un point de vue morphologique, correspond à la dégénérescence de quelques caractéristiques temporaires larvaires, la formation de nouvelles structures adultes mais certaines d'entre elles communes aux deux périodes restent en place. La période larvaire entraîne souvent de forts taux de mortalités dû (i) au coût énergétique très important engendré par la métamorphose et (ii) à la prédation, l'absence de nourriture dans certains cas ainsi que les facteurs environnementaux (Kamler, 2008). Par conséquent, cette période est définie comme la plus sensible de l'histoire de vie des poissons (Kamler, 2008). De plus, le développement de structures transitoires n'est pas économique en énergie. Cependant, la période larvaire comporte des avantages puisque la plupart des larves vivent dans des niches différentes de celles des adultes, ce qui évite les compétitions pour la nourriture (Balon, 1990). De plus, elle pourrait permettre une plus grande dispersion de l'espèce dans son milieu naturel. Dans le règne animal, cette dispersion de l'espèce est un aspect important pour les espèces sessiles ou sédentaires comme chez les gastéropodes, bivalves, échinodermes ou urochordés. Chez les poissons marins, la dispersion est également importante pour les espèces avec des comportements territoriaux forts (Flegler-Balon, 1989). Finalement, la période larvaire est présente chez de nombreux groupes de métazoaires : la larve trochophore chez les mollusques, la larve pluteus chez l'oursin, la chenille chez le papillon ou le têtard chez les amphibiens (Flegler-Balon, 1989) ce qui démontre son importance au cours de l'histoire de vie de certaines espèces.

L'ontogenèse directe, quant à elle, est associée à un nombre d'ovules plus restreint mais qui présente une plus large quantité et densité de vitellus. Pour l'embryon, cette stratégie est certainement moins coûteuse en énergie puisqu'elle ne comporte pas les inconvénients du développement indirect. En revanche, l'investissement parental est important en termes de vitellogenèse (ovules plus grands et

denses) et la fécondité plus faible comme chez certaines espèces d'amphibiens (Duellman, 1989). Chez les espèces à développement direct (beaucoup de Salmonidés comme la truite commune (*Salmo trutta*), mais aussi la bouvière (*Rhodeus sericeus*) ou la gobie à tâches noires (*Neogobius melanostomus*) (Flegler-Balon, 1989)), l'éclosion est retardée ainsi que la prise de nourriture exogène. Lorsque la nutrition exogène débute, l'individu présente un phénotype définitif, appelé juvénile (Flegler-Balon, 1989), souvent plus grand que les espèces à développement indirect (Balon, 1999). Cela peut être expliqué par le fait que l'ovule présente une taille plus grande ainsi que des réserves vitellines plus denses. Chez les amphibiens, les réserves vitellines disponibles pour le développement sont le 1<sup>er</sup> facteur qui influence la taille de l'embryon à l'éclosion ainsi que son stade de développement (Duellman, 1989). Or, la taille et l'état de développement à l'éclosion sont des paramètres écologiques importants chez les animaux aquatiques (Flegler-Balon, 1989). En effet, le risque de prédation augmente lorsque la taille des individus diminue de par leur plus faible capacité à nager. Au contraire, l'augmentation de la taille et un individu plus développé à l'éclosion induisent une meilleure capacité à s'échapper (nage plus rapide) mais aussi à attraper des proies (Flegler-Balon, 1989). Chez les espèces de poissons à développement direct, le juvénile sera donc plus apte à coloniser des habitats adultes (Balon, 1999).

Les développements direct et indirect peuvent être définis par le nombre d'ovules pondus ainsi que la quantité et la densité du vitellus de ces ovules, tendance décrite chez les anoures, les gastéropodes, les céphalopodes et les oursins (Flegler-Balon, 1989). Ces paramètres sont également étroitement liés aux stratégies de reproduction des poissons et à la classification des guildes de Balon (Balon, 1975a). En effet, le système de guildes de reproduction permet de classer les poissons en fonction du type de reproduction caractérisé par : (i) le type de substrat (gravier, plantes, rochers), (ii) l'investissement parental (soins parental ou non) et (iii) le type de développement précoce. Les guildes obtenues sont classées en fonction d'un investissement parental croissant soit une tendance à l'augmentation de quantité et de densité du vitellus ainsi que la diminution ou suppression de la période larvaire. De plus, chaque guildes étant liée au substrat sur lequel l'espèce va pondre, les caractéristiques développementales de l'embryon reflètent la réponse à différents paramètres de l'environnement (comme la disponibilité en oxygène ou la pression des prédateurs) (Flegler-Balon, 1989).

#### 4. Variabilité de l'ontogenèse et plasticité phénotypique

Comme décrit précédemment, et d'après la définition des guildes de Balon (1975a), le développement embryonnaire reflète les stratégies d'adaptation au milieu (Balon, 1975a). A chaque génération, les variabilités lors de ce développement vont induire de la plasticité développementale (Vilizzi et Kováč, 2014). Cette plasticité du développement permet, avec le même génotype de produire plusieurs phénotypes en fonction des conditions environnementales locales grâce à des

variations épigénétiques venant compléter les variations génétiques (Vilizzi et Kováč, 2014). Cette plasticité peut notamment s'exprimer au moment de changements rapides dans le développement précoce des individus. Par conséquent, les seuils définis dans la théorie saltatoire par Balon (1979) et considérés comme les intervalles les plus importants de l'ontogenèse, sont ces phases durant lesquelles les adaptations à l'environnement peuvent survenir et le devenir de l'ontogenèse est déterminé (Balon, 1979). Dans ce cadre, le phénotype définitif d'un individu sera construit à l'aide d'informations génétiques ainsi que de sources épigénétiques (Balon, 2004a). Ainsi à chaque cycle de reproduction successif, en conséquences des variations de sources épigénétiques, des formes altriciales et précociales sont produites mais plus spécialisées que la génération d'avant (période larvaire plus courte ou diminution du nombre d'ovocytes, par exemple) (Balon, 2004a). Cette théorie de l'ontogenèse saltatoire permet donc de prendre en compte une grande variabilité inter et intraspécifique de développement en fonction des conditions environnementales et des générations successives mais permet également une comparaison plus aisée entre toutes ces différentes formes.

Malgré une nomenclature très fine et l'identification des différentes histoires de vie, certaines phases, notamment le début de l'ontogenèse (clivage et gastrulation), semblent peu précises dans la théorie saltatoire. En effet, Balon n'arrive pas à déterminer si un changement dans le cycle mitotique, le clivage, ou encore de la multiplication des cellules à leur différenciation, peut être considéré comme un seuil (Balon, 1979). Le changement de statut cellulaire (division synchrone ou asynchrone, migration, différenciation) semble être une transition importante qui, lors d'un dysfonctionnement, pourrait entraîner d'importantes anomalies du développement (mortalité précoce, malformations) ayant un impact sur le succès de l'éclosion, la qualité embryonnaire ou larvaire puisqu'elle correspond à de nouveaux mécanismes mis en place lors de l'ontogenèse (Dosch *et al.*, 2004 ; Wagner *et al.*, 2004). Par conséquent, l'étude des périodes précoces du développement semble indispensable.

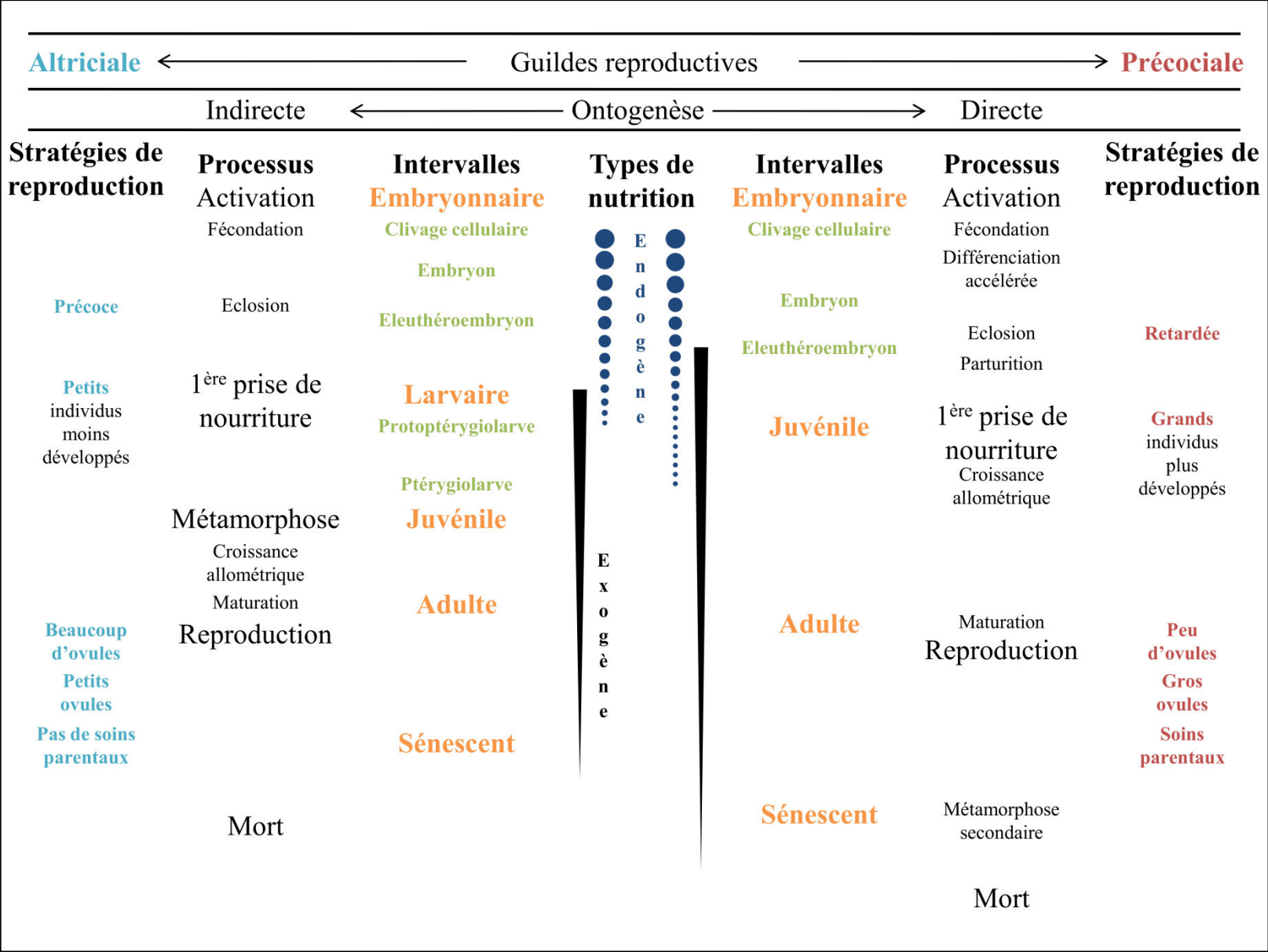


Figure 3 : Comparaison des histoires de vie chez les poissons et des types d'acquisition des nutriments. D'après Balon, 1999.

## **B. La période embryonnaire**

La période embryonnaire est la première du cycle de vie d'un poisson. Elle est par conséquent très importante pour le devenir du phénotype définitif d'un individu. D'après Balon, la période embryonnaire est caractérisée par une nutrition exclusivement endogène depuis le vitellus ou les nutriments parentaux (Balon, 1975b, 2004a ; Liew *et al.*, 2006). Selon d'autres auteurs, cette même période correspond à l'intervalle durant lequel l'embryon reste dans son enveloppe (Urho, 2002). Ces différents points de vue varient en fonction de la limite définie pour le passage de la vie embryonnaire à la vie larvaire.

### **1. L'embryogenèse et ses limites**

L'embryogenèse est un processus très dynamique et a un grand rôle dans la création et la future disposition d'un phénotype adulte viable et normal (Balon, 1990 ; Pinder et Gozlan, 2004). Selon la littérature, le développement embryonnaire peut être divisé en plusieurs phases. Chez les Téléostéens en général, Balon (1975b) décrit trois phases correspondant au clivage, à l'embryon et à l'éleuthéroembryon (embryon libre) (Balon, 1975b). Cependant, dans le cas du poisson zèbre, exemple de théorie graduelle, les auteurs ont choisi de découper l'embryogenèse en sept phases : zygote, clivage cellulaire, blastula, gastrula, segmentation, pharyngula et éclosion (Kimmel *et al.*, 1995). Le nombre de phases lors du développement embryonnaire varie principalement en fonction de la théorie de l'ontogenèse utilisée mais également en fonction des limites définies pour cette période.

#### **a) *Variation de la terminologie de l'embryogenèse***

La bibliographie en biologie du développement des poissons contient de nombreux termes différents se référant souvent aux mêmes phases de développement. Les auteurs choisissent des termes spécifiques, pouvant varier suivant les publications, les années, l'évolution des théories et les limites associées à certaines périodes de développement, pour désigner un individu (Korwin-Kossakowski, 2008). Les périodes de l'ontogenèse les plus sujettes à ce genre de problèmes sont également celles difficiles à définir : la transition embryon-larve et la métamorphose. Par exemple, sur l'analyse de 28 articles portant sur le développement ou la période embryonnaire, 11 termes différents (parfois au sein d'un même article) réfèrent à l'individu lors de la transition embryon-larve (Tableau 1).

D'un point de vue purement sémantique, les termes constitués des préfixes pré- et post- ainsi que les expressions « post-embryonnaire » ou « stade nage libre » ne semblent pas pertinents pour décrire un stade de développement d'un organisme (Balon, 1975b, 1990). En effet, ces termes sont, dans le premier cas, peu logiques et peu précis (une pré-larve correspond à un embryon, tout stade de développement est avant ou après un autre stade de développement, il ne peut pas être nommé par un autre terme que celui qui lui correspond). Cela peut entraîner une confusion dans l'identification des

stades de développement observés ainsi qu'une incompréhension pour le lecteur. Dans le second cas, les expressions permettent de nommer des stades d'ontogenèse précoce après éclosion mais toujours sans précision.

Référence	Terminologie	Limite période embryonnaire
(Balon, 1975b)		
(McElman et Balon, 1979)	Eleuthéroembryon	Nutrition exogène
(Cunningham et Balon, 1985)		
(Simon, 2015)	Larve avec vitellus	
(Kamler, 2008)	Larve à nutrition vitelline	
(Kimmel <i>et al.</i> , 1995)		Eclosion
(Hill et Johnston, 1997)		
(Morrison <i>et al.</i> , 2001)		
(Faria <i>et al.</i> , 2002)		
(Hall <i>et al.</i> , 2004)		Nutrition exogène
(Lugowska, 2009)		
(Korzelecka-Orkisz <i>et al.</i> , 2010)	Larve	Eclosion
(Hinaux <i>et al.</i> , 2011)		
(Teletchea et Fontaine, 2011)		
(Cucchi <i>et al.</i> , 2012)		Nutrition exogène
(Tong <i>et al.</i> , 2013)		
(Trabelsi <i>et al.</i> , 2013)		Eclosion
(Kratochwil <i>et al.</i> , 2015)		
(Paine et Balon, 1984a, 1984b)		Nutrition exogène
(Cunningham et Balon, 1985)		
(Balon, 1990)		
(Crawford et Balon, 1994)		
(Balon, 1999)	Embryon libre	Nutrition exogène
(Balon, 2002)		
(Pinder et Gozlan, 2004)		
(Liew <i>et al.</i> , 2006)		
(Kupren <i>et al.</i> , 2016)		
(Crawford et Balon, 1994)		Nutrition exogène
(Sucré <i>et al.</i> , 2009)	Embryon	
(Kratochwil <i>et al.</i> , 2015)		
(Iwamatsu, 2004)	Alevin	Eclosion
(Kratochwil <i>et al.</i> , 2015)		
(Mansueti, 1964a)	Prolarve	
(Hall <i>et al.</i> , 2004)	Larve à flottaison libre	Nutrition exogène
(Diaz <i>et al.</i> , 2002)		
(Sucré <i>et al.</i> , 2009)	Pré-larve	
(Oliveira-Almeida <i>et al.</i> , 2014)	Larve nage libre	Eclosion

**Tableau 1 : Différents termes appliqués aux individus lors de la transition embryon-larve.**

Malgré de nombreuses études portant sur le développement embryonnaire des poissons, les limites de cette période sont encore très controversées dans le monde scientifique et entraînent une grande variabilité dans la description de l'embryogenèse (Kováč et Copp, 1999). D'une part, le début

de l'embryogenèse, qui semble peu discuté, reste imprécis dans les études de développement. D'autre part, la fin de la vie embryonnaire et le passage à l'état larvaire divisent encore les auteurs. En effet, deux écoles de pensées s'affrontent pour définir cette transition (Kováč et Copp, 1999 ; Penaz, 2001 ; Urho, 2002 ; Teletchea et Fontaine, 2011). La première définit cette limite lors de l'éclosion alors que la seconde est en faveur de la première prise de nourriture exogène. Afin d'éclaircir la définition de la période embryonnaire utilisée dans cette étude, ces différentes limites nécessitent d'être précisées.

b) *Fécondation ou activation*

La plupart des auteurs définissent le début de l'ontogenèse d'un organisme multicellulaire, et donc de la période embryonnaire, par la fécondation au sens strict du terme correspondant à la fusion des deux pronucléi, mâle et femelle (Mansueti, 1964a ; Faria *et al.*, 2002 ; Hall *et al.*, 2004 ; Lugowska, 2009 ; Cucchi *et al.*, 2012 ; Kratochwil *et al.*, 2015). Cependant, la fécondation, en tant que processus, n'est pas instantanée ; elle correspond à la combinaison de plusieurs événements pouvant, selon les espèces, durer de quelques secondes à plus de 20 heures (chez la perche commune et les Salmonidés, respectivement) (Kunz, 2004). En effet, Balon décrit que le processus de fécondation débute par l'activation de l'ovule dans l'eau, induisant des changements importants dans cette cellule (libération du blocage de l'ovocyte en stade métaphase II de la division méiotique, réaction corticale, formation de l'espace périvitellin et du blastodisque ...) et se terminant par la fusion des pronucléi mâle et femelle (Balon, 1990 ; Kunz, 2004). Partant de ce constat, certaines études considèrent que le début de l'ontogenèse se situe lors de l'activation de l'ovule dans l'eau soit avant la fécondation au sens strict du terme (Balon, 1975b, 1990 ; Paine et Balon, 1984a, 1984b ; Cunningham et Balon, 1985 ; Crawford et Balon, 1994 ; Kunz, 2004). Cette limite semble la plus précise et pertinente pour définir le début du développement d'un individu puisqu'elle prend en compte l'ensemble des changements cellulaires du processus de fécondation et principalement la libération du blocage de l'ovocyte en métaphase II, permettant la reprise du développement. Cependant, il faut noter que chez certaines espèces, une partie de ces modifications cellulaires peuvent également arriver dans un ovule non fécondé (la brème bordelière et le rotengle, *Blicca bjoerkna* et *Scardinius erythrophthalmus*, respectivement) et même le conduire aux premières divisions cellulaires (comme chez le brochet, *Esox lucius* (Kunz, 2004)). De plus, chez des organismes à reproduction parthénogénétique ou gynogénétique, la fusion des deux pronucléi n'existe pas et le terme « fécondation » *stricto sensu* ne peut pas être utilisé pour définir le début de l'ontogenèse. Enfin, d'un point de vue purement pratique, il est plus aisé d'identifier l'activation que la fécondation au sens strict du terme, notamment chez les espèces où ce processus dure quelques heures.

c) *L'éclosion ou première prise de nourriture exogène*

La deuxième limite controversée en biologie du développement correspond au passage de la période embryonnaire à la période larvaire (éclosion ou première prise de nourriture exogène).



L'éclosion correspond à un processus impliquant des mouvements de l'embryon, provoquant des extensions mécaniques de l'enveloppe de l'œuf ainsi qu'une digestion enzymatique (Reyes *et al.*, 1992 ; Balon, 1999 ; Korwin-Kossakowski, 2012). La digestion du chorion est induite par des enzymes qui, à l'approche de l'éclosion, sont sécrétées par des glandes unicellulaires appelées glandes d'éclosion. Ces glandes sont distribuées à différents endroits de l'embryon en fonction de l'espèce, comme la tête, l'épithélium de la bouche, la cavité pharyngiale ou encore au niveau du vitellus (Reyes *et al.*, 1992). Ce processus serait nécessaire à l'embryon lorsque ses besoins en oxygène dépasseraient les capacités de diffusion de ce gaz à travers les enveloppes de l'œuf (Korwin-Kossakowski, 2012). En effet, au cours du développement embryonnaire, la demande en oxygène de l'embryon augmente. Pour répondre à ce besoin, l'épaisseur du chorion diminue afin d'améliorer la diffusion de l'oxygène dans l'œuf et de permettre à l'embryon d'effectuer de plus grands mouvements participant au processus d'éclosion (Reyes *et al.*, 1992). L'éclosion entraîne de nombreuses modifications pour l'individu d'un point de vue écologique, environnemental et métabolique. En effet, une augmentation du métabolisme impliquant une consommation d'oxygène plus importante (de 2,5 à 10 fois) a été observée lorsque l'embryon sort de son enveloppe (Kamler, 1992). De plus, l'individu doit faire face à un nouvel environnement composé de prédateurs, induisant des réponses comportementales différentes en fonction du stade de développement à l'éclosion (fuir ou se cacher) (Urho, 2002). Enfin, suite à la perte de sa capsule protectrice, l'embryon est plus fortement impacté par certains facteurs environnementaux tels que des composés toxiques (Urho, 2002). Le moment d'éclosion semble très dépendant de internes et abiotiques (Balon, 1990, 1999 ; Geffen, 2002). En effet, la température pourrait avoir un rôle important sur l'activité des glandes d'éclosion, le métabolisme des individus et leurs besoins en oxygène (Korwin-Kossakowski, 2012). La teneur en oxygène dans l'eau, quant à elle, peut impacter la durée de développement de l'embryon à l'intérieur des enveloppes de l'œuf, influencer la sécrétion des enzymes d'éclosion et le taux d'éclosion des individus (Korwin-Kossakowski, 2012). La lumière pourrait avoir un impact sur le moment et la durée d'éclosion. D'autres paramètres, comme la qualité de l'eau – pH, composition chimique – peuvent avoir un effet sur la durée de l'éclosion. D'un point de vue écologique, environnemental et métabolique, l'éclosion est importante chez les poissons puisqu'elle prend en compte les nouvelles interactions dues à un changement brutal d'environnement (Korwin-Kossakowski, 2012) et c'est pourquoi, selon certains auteurs, elle est considérée comme la limite entre la phase embryonnaire et la phase larvaire (Teletchea et Fontaine, 2011 ; Korwin-Kossakowski, 2012). Au contraire, d'un point de vue physiologique et morphologique, cette étape peut-être moins décisive et ne semble pas toujours fixe lors de l'ontogenèse (Kamler, 2002 ; Urho, 2002). Balon définit l'éclosion comme une limite artificielle entre les périodes embryonnaire et larvaire (Balon, 1975b). En effet, au sein d'une même espèce, les embryons vont éclore à différents moments ainsi qu'à différentes tailles et étapes de développement (Balon, 1975b, 1999 ; Hensel, 1999 ; Geffen, 2002 ; Trabelsi *et al.*, 2013). Les embryons éclos précocement seront plus petits et moins développés (d'un point de vue morpho-



anatomique comme l'absence de bouche ouverte ou de mouvement des nageoires pectorales) que les embryons éclos plus tardivement (Geffen, 2002 ; Pinder et Gozlan, 2004 ; Trabelsi *et al.*, 2013). En conséquence, du fait de la variabilité d'apparition de cet évènement, il semblerait que l'éclosion corresponde à un processus non synchrone plus qu'à un seuil de développement définissant la limite entre les périodes embryonnaire et larvaire (Balon, 1990).

Contrairement à l'éclosion, la transition entre nutrition endogène et exogène n'est pas accompagnée d'autant de variations morpho-anatomiques intraspécifiques (Penaz, 2001 ; Teletchea et Fontaine, 2011). Chez les espèces à ontogenèse indirecte (présentant une période larvaire), le besoin de nutriments exogènes est important pour le développement de l'individu, du fait de son faible volume vitellin. L'acquisition de nourriture se fait principalement par ingestion orale et digestion intestinale (Flegler-Balon, 1989). Par conséquent, cette transition nécessite que toutes les structures et tous les organes associés à la prise de nourriture, la digestion et l'assimilation soient différenciés et fonctionnels (système digestif, système visuel, mobilité, comportement de chasse, bouche ouverte ...) pour offrir de nouvelles capacités et répondre aux besoins de l'individu (Pinder et Gozlan, 2004). Cette étape a une grande importance physiologique, écologique et comportementale (Penaz, 2001 ; Urho, 2002 ; Telechea et Fontaine, 2011) : c'est l'un des seuils les plus importants permettant une survie optimale des larves (Balon, 1990).

Même si de nombreux arguments sont en faveur de l'une ou de l'autre école de pensée, il semblerait qu'en pratique, chez les pisciculteurs comme pour les études de biologie du développement, l'éclosion soit plus simple à détecter que la première prise de nourriture exogène (Kováč et Copp, 1999). En effet, le passage à la nutrition exogène est un évènement délicat à déterminer chez certaines espèces (période de nutrition mixte), beaucoup plus difficile à identifier que le moment d'éclosion. De plus, chez d'autres espèces (tarpon, *Albula vulpes*), les larves n'ingèrent pas des proies oralement mais absorbent la matière organique dissoute dans l'environnement, limitant la détermination de la première prise alimentaire exogène (Flegler-Balon, 1989).

## 2. Qu'est ce qu'un embryon ?

Selon les définitions, l'embryon correspond à un individu à nutrition exclusivement endogène (Balon, 1975b, 2004a) que ce soit *via* le vitellus ou des nutriments parentaux ou à un individu entouré d'une enveloppe protectrice. Dans le premier cas, cet embryon est donc dépendant de l'ensemble des molécules accumulées dans l'ovocyte. De plus, les différentes enveloppes qui entourent l'individu vont permettre également la diffusion de certaines molécules du milieu environnant et, par conséquent, la survie de l'embryon (Kunz, 2004). En ce sens, le vitellus comme réserve énergétique de l'embryon ainsi que les enveloppes protégeant ce dernier semblent très importants à détailler.

a) **Les enveloppes**

Les enveloppes entourant l'œuf et l'embryon durant la plupart de sa vie ont un rôle très important d'attraction du sperme, de protection de l'embryon contre les dommages mécaniques, la dessiccation, les changements chimiques rapides de l'environnement, les champignons ou bactéries et enfin, permettent les échanges gazeux, aqueux et l'excrétion (Brooks *et al.*, 1997 ; Kunz, 2004). De petites molécules comme des sels, du glucose ou des acides aminés libres, dont la masse moléculaire est inférieure à 500-700 Da, peuvent traverser la première enveloppe entourant l'embryon en développement, le chorion (Figure 4), nommée *zona radiata* (Kamler, 2008). Chez certaines espèces, une couche externe au chorion est également présente, appelée *zona radiata externa*, pouvant présenter certaines adaptations et étant plus ou moins épaisse selon les espèces (Figure 4). Enfin, une dernière membrane, la plus fine des trois composant les enveloppes de l'embryon et de l'œuf, entoure le vitellus (Kunz, 2004). Elle est appelée le syncytium vitellin (Figure 4).

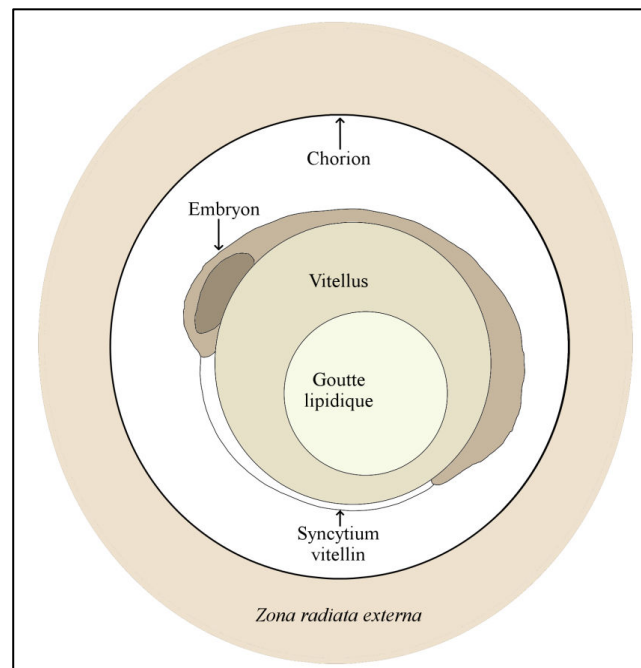


Figure 4 : Schéma des enveloppes d'un embryon en développement.

b) **Le vitellus**

Le vitellus est élaboré lors de la maturation ovocytaire, plus particulièrement durant le processus de vitellogénèse, décrit auparavant, et est composé de différentes molécules essentielles pour le développement de l'embryon (Lubzens *et al.*, 2010). Durant la période de nutrition endogène stricte, le vitellus est la principale source d'énergie de l'embryon. Cette énergie est investie dans la formation de nouveaux tissus ainsi que la respiration (Kamler, 2008). La plupart des protéines du vitellus sont dérivées des précurseurs de haut poids moléculaire de la Vitellogénine et représentent la majeure partie de cette réserve (Kunz, 2004). Ces lipoprotéines peuvent représenter jusqu'à plus de 80

% du poids sec de l'œuf (76% chez le saumon Atlantique, *Salmo salar* et 83% chez le saumon royal, *Oncorhynchus tshawytscha*). D'autres molécules abondamment présentes dans le vitellus sont les lipides vitellins, les triglycérides regroupés dans des gouttelettes lipidiques de tailles variables ou dans une seule et large gouttelette. L'assimilation de ces protéines par l'embryon *via* le syncytium vitellin est nécessaire pour son développement. Pour cela, des enzymes sont présentes dans le vitellus comme la Cathepsine D qui va pouvoir dégrader la Vitellogénine en protéines vitellines dans l'ovocyte, puis ces protéines en acides aminés libres pour l'embryon, durant le développement précoce (Brooks *et al.*, 1997 ; Kamler, 2008). Certaines vitamines accumulées sont également nécessaires pour des activités enzymatiques utilisées, par exemple, lors de l'éclosion (Brooks *et al.*, 1997).

### C. Les anomalies lors de l'embryogenèse

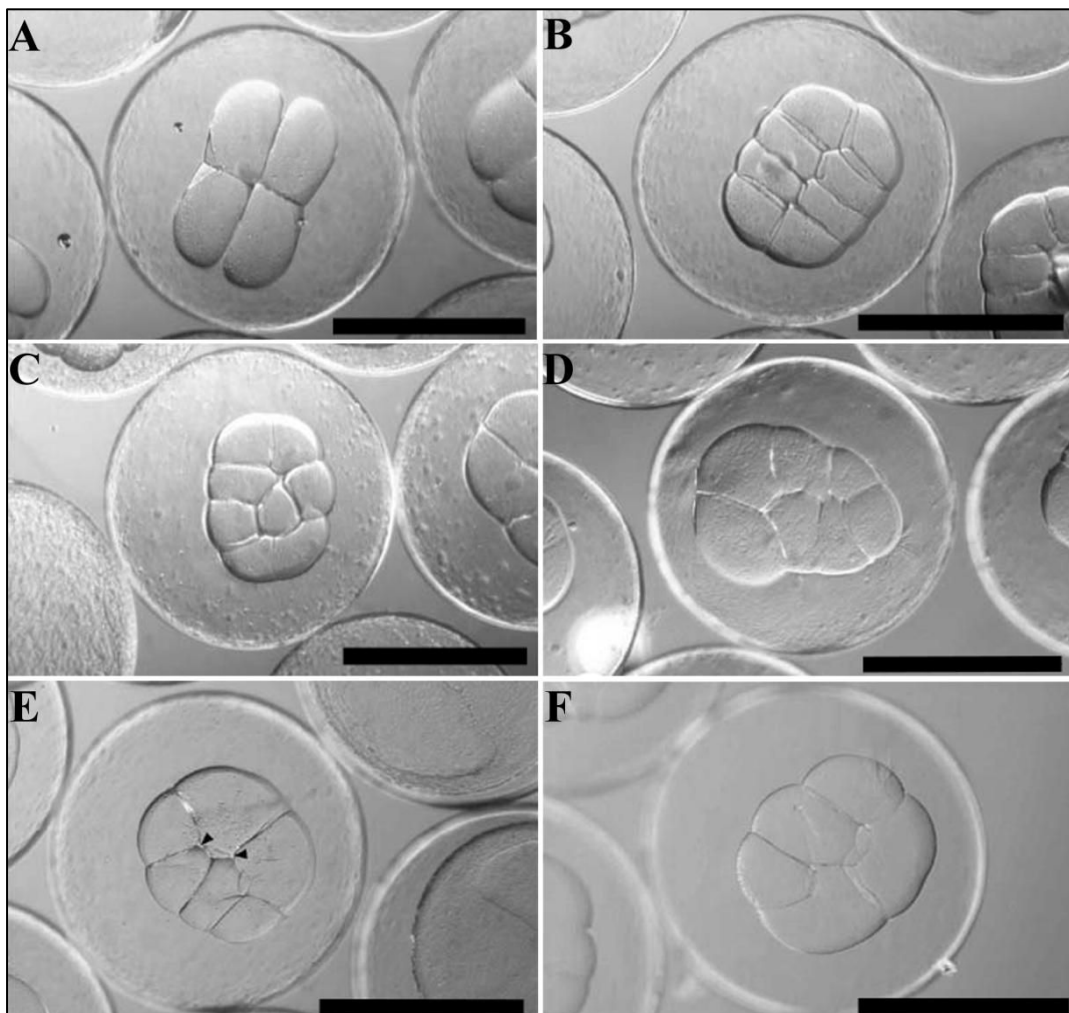
Lors du développement embryonnaire, de nombreuses anomalies peuvent apparaître notamment des mortalités précoces ou des malformations touchant une ou plusieurs fonctions dans des conditions naturelles, d'élevage ou d'expérimentation scientifique. Ces anomalies pourraient être la conséquence d'un problème lors de la maturation des gonades induisant une qualité variable des gamètes, d'une mauvaise utilisation, par l'embryon, des ressources maternelles accumulées durant la gamétogenèse ou encore de nombreux facteurs environnementaux (Divanach *et al.*, 1996 ; Koumoundouros, 2010 ; Boglione *et al.*, 2013b). Un état des lieux de ces différents problèmes pourrait permettre de définir leur origine, la mauvaise qualité des gamètes et de nouveaux indicateurs de celle-ci ainsi que d'identifier les mécanismes impliqués en amont. Dans un but plus appliqué, l'étude de ces défauts serait utile dans le cadre de la gestion des éclosiers et des géniteurs chez les pisciculteurs.

#### 1. Mortalités précoces

Les mortalités précoces durant le développement peuvent apparaître à différents stades. Par exemple, chez le poisson zèbre, des arrêts de développement durant le clivage cellulaire ont été identifiés (Dosch *et al.*, 2004 ; Wagner *et al.*, 2004). Chez les Salmonidés, des taux de mortalité précoce importants ont également été relevés (Depêche et Billard, 1994). Ces stades de mortalité précoce ont généralement diverses origines. Ces mortalités et les taux de survie associés sont utilisés dans de nombreuses études de développement et de qualité des gamètes comme indicateurs du succès et des performances de reproduction. Cependant, peu d'études référencent les taux de survie ou les mortalités précoces pouvant apparaître lors de conditions normales d'incubation, notamment suite à une reproduction artificielle (générant des qualités gamétiques variables). L'identification précise de ces stades dans des conditions contrôlées normales d'élevage pourrait être intéressante à étudier afin de caractériser et comprendre les potentielles origines de ces problèmes.

## 2. Malformations communes

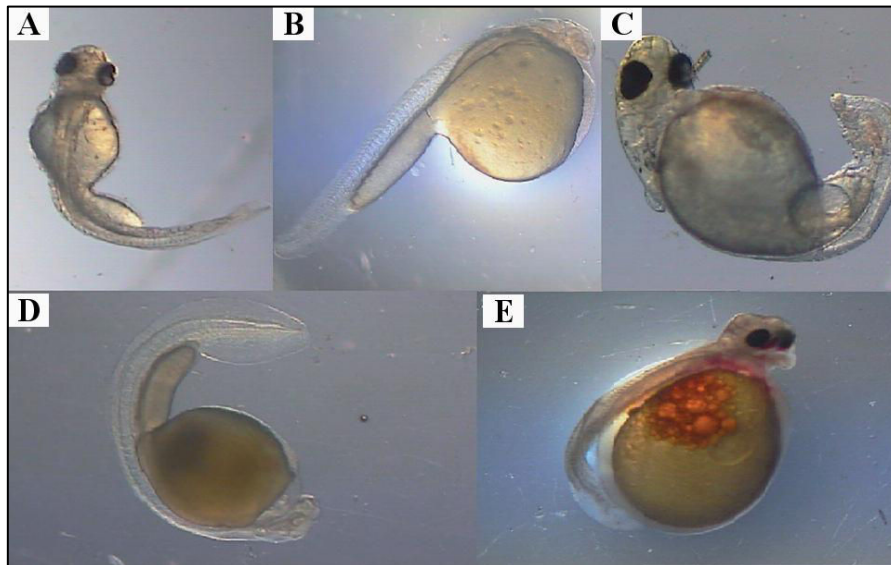
Un autre problème majeur généré lors du développement et pouvant être associé à la qualité ovocytaire est l'apparition de malformations. Malgré une littérature abondante sur les malformations apparaissant au cours du développement, la plupart des études se limitent aux anomalies squelettiques (de l'axe ou de la mâchoire) ou de la vessie gazeuse lors du développement larvaire ou juvénile (Koumoundouros, 2010 ; Boglione *et al.*, 2013a, 2013b). De plus, les origines de ces malformations étant multiples (génétique, nutrition, conditions d'élevage, polluants, température, salinité), les recherches sur ce sujet sont souvent complexes (Divanach *et al.*, 1996 ; Boglione *et al.*, 2013b). Durant le développement embryonnaire précoce, notamment le clivage cellulaire, les principales malformations sont des défauts de clivage cellulaire et d'asymétrie des blastomères comme décrit chez la morue (*Gadus morhua*) ou l'aiglefin (*Melanogrammus aeglefinus*) (Figure 5) (Vallin et Nissling, 1998 ; Hall *et al.*, 2004 ; Rideout *et al.*, 2004).



**Figure 5 : Photographies de clivages cellulaires normaux et anormaux chez l'aiglefin.**

**A** : clivage normal au stade 4 cellules. **B** : clivage normal au stade 8 cellules. **C-F** : types de clivages anormaux. **C** : asymétrie des blastomères. **D** : taille des blastomères inégale. **E** : faible adhésion entre les blastomères. **F** : faible définition des contours des blastomères. Barre d'échelle = 1mm. D'après Rideout *et al.*, 2004.

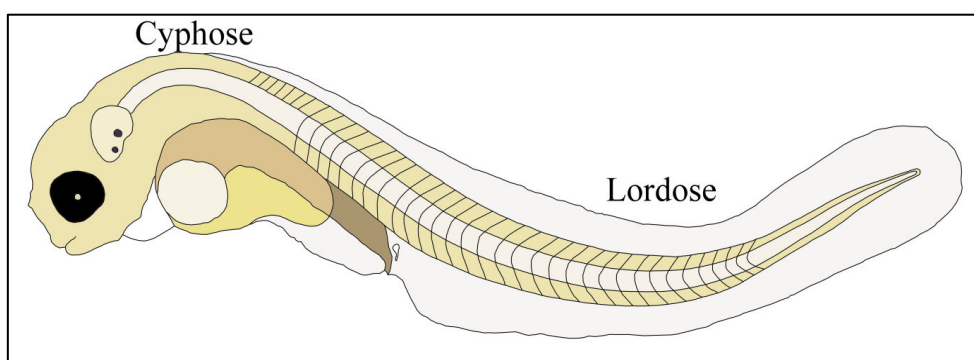
Chez les larves ou les juvéniles, d'autres phénotypes anormaux sont décrits dans la littérature comme des anomalies de la colonne (Figure 6A), de la mâchoire, de la vessie gazeuse (problème d'inflation), du vitellus (Figure 6B) ou du cœur (Figure 6D) (Divanach *et al.*, 1996 ; Koumoundouros, 2010 ; Ługowska et Sarnowski, 2011 ; Boglione *et al.*, 2013a, 2013b).



**Figure 6 : Photographie de différentes malformations embryonnaires chez la carpe, la truite arc-en-ciel et le barbeau (*Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss* et *Barbus barbus*, respectivement).**

**A** : courbure de la colonne chez la carpe, **B** : malformation du vitellus chez le barbeau, **C** : raccourcissement du corps chez la carpe, **D** : œdème cardiaque chez le barbeau, **E** : malformation de la tête chez la truite. D'après Ługowska et Sarnowski, 2011.

Les anomalies de la colonne peuvent être divisées en plusieurs types dont les principaux sont la lordose (courbure dorso-ventrale en forme de V), la scoliose (courbure latérale) et la cyphose (courbure dorso-ventrale en forme de  $\Lambda$ ) (Figure 7).



**Figure 7 : Schéma d'un embryon présentant une lordose et une cyphose.**

Les anomalies du cœur ou du vitellus décrites correspondent souvent à des oedèmes (Figure 6D) et peuvent apparaître simultanément comme cela a été observé chez le flétan (*Hippoglossus hippoglossus*) (Ottesen et Bolla, 1998). D'autres catégories de malformations plus rares et peu caractérisées ont également été répertoriées comme un raccourcissement du corps (Figure 6C), des malformations de la tête (Figure 6E), du crâne et des yeux.



Par exemple, chez la truite arc-en-ciel, différents types de malformations embryonnaires ont été décrits dont une particulière des yeux nommée le type cyclope (Bonnet *et al.*, 2007a). Certaines de ces malformations semblent associées à des facteurs bien spécifiques tels que la surmaturation ovocytaire ou des manipulations photopériodiques (associés à des malformations de type cyclope ou des défauts de résorption vitelline, respectivement) (Bonnet *et al.*, 2007a). Chez le poisson zèbre, d'autres phénotypes ont été décrits : défaut d'activation de l'ovocyte, absence de queue et de tête, de nageoires pectorales ou encore des problèmes du système visuel.

Malgré une littérature abondante sur les malformations, peu d'informations sont disponibles sur la caractérisation et la fréquence d'apparition des malformations, à l'exception des malformations squelettiques. Ces anomalies chez les embryons sont importantes à décrire et à comprendre puisqu'elles peuvent impacter le reste du cycle de vie du poisson et avoir des effets sur les performances biologiques. Ces dernières sont considérées comme pouvant affecter de manière négative le bien-être des animaux, la qualité du produit et les coûts de production dans le cadre de l'aquaculture (Boglione *et al.*, 2013a, 2013b). Les possibles origines des malformations et anomalies précoces lors du développement sont multiples et nécessitent de nouvelles investigations afin d'être caractérisées plus finement. Une description des anomalies de développement lors de cette période embryonnaire, dans des conditions contrôlées et optimales, pourrait servir de référence afin de déterminer les potentiels facteurs responsables de ces problèmes.

#### **D. Etat des lieux des recherches en biologie du développement chez les poissons ?**

Plusieurs théories portant sur différents points de la biologie du développement ont été précédemment citées. Cela entraîne une grande variation des études de l'ontogenèse chez les Téléostéens et de la description de la période embryonnaire. Cependant, cela peut également générer des confusions dans la compréhension de ces études probablement dues aux théories et aux définitions utilisées.

##### **1. L'utilisation des différentes théories de l'ontogenèse : l'exemple de l'embryogenèse**

L'appartenance à l'une ou l'autre des écoles de pensée concernant l'ontogenèse n'est que très peu abordée dans les différentes tables de développement. Cela est peut être due au fait que l'école graduelle est la plus utilisée et enseignée et par conséquent plus légitime que l'école saltatoire, peu utilisée. Cependant, nous pouvons observer différentes manières de décrire l'ontogenèse des poissons, notamment les stades les plus précoces. L'utilisation du modèle de description graduelle de l'ontogenèse permet l'établissement de « stades normaux » de développement comme l'utilisation de l'échelle de temps de la somitogenèse chez le poisson zèbre (Kimmel *et al.*, 1995). Par conséquent, de

nombreux auteurs ont utilisé cette approche afin de décrire l'embryogenèse de leur espèce (Kratochwil *et al.*, 2015). Cette méthode permet d'obtenir des tables de développement opérationnelles pour des espèces dont l'ontogenèse présente peu de variations. Malgré la facilité d'utilisation de cette méthode, l'homogénéisation des résultats à laquelle elle conduit et la possibilité de réaliser des comparaisons avec d'autres taxa (amphibiens, mammifères), ce système de description semble peu adapté chez des espèces non-modèles présentant de larges variations dans le déroulement du développement. De plus, l'ontogenèse graduelle ne semble pas prendre en compte l'ensemble de la biologie des individus. En effet, cette description apparaît relativement artificielle : l'utilisation de la somitogenèse met en avant l'apparition de nouveaux tissus et/ou organes mais pas des fonctions associées à ces derniers. Cela ne prend pas en compte la biologie générale de l'individu. Enfin, l'utilisation de cette approche ne fait pas apparaître les seuils décrits par Balon et induit, de façon indirecte, le lecteur dans un processus graduel de développement sans faire émerger les stades cruciaux de ce dernier (Balon, 1975b, 1979, 1990, 1999).

La théorie saltatoire est, de mon point de vue, une approche plus intégrative, permettant de mettre en évidence des seuils d'une importance biologique, physiologique et comportementale à différents niveaux de l'individu. Ces seuils permettent de réaliser des comparaisons entre les espèces sur leur biologie et non pas sur des états séquentiels. Cela pourrait permettre de comprendre quelles adaptations lors du développement, les espèces vont suivre suite à certains changements environnementaux. De plus, l'identification de ces seuils biologiques, correspondant à des moments d'instabilité dans l'ontogenèse, pourrait aider à caractériser les mortalités et malformations pouvant apparaître lors de ces intervalles.

## **2. Variabilité et limites de la description de la période embryonnaire**

Comme décrit auparavant, il existe une grande variabilité des tables de développement et de la description de la période embryonnaire. L'hétérogénéité de description et de mesure du développement des embryons (somites/âge/degré jour/taille) entraîne des difficultés lors de comparaisons inter-espèces. De plus, ces échelles peuvent varier en fonction des conditions environnementales (notamment avec la température). Les limites de l'embryogenèse étant encore aujourd'hui en discussion, cela rajoute un niveau de complexité aux études inter-espèces.

Le développement des Téléostéens est actuellement caractérisé principalement au travers de tables décrivant l'ontogenèse de chaque organe ou fonction d'intérêt (digestive, visuelle ...) mais sans faire de lien entre l'ensemble des informations du développement obtenu. Peu de comparaison inter-espèces sont alors mises en place (Paine et Balon, 1984a, 1984b ; Cunningham et Balon, 1985 ; Crawford et Balon, 1994) et les connaissances acquises sur l'ensemble de ces travaux se limitent bien souvent au modèle utilisé. De plus, comme précédemment décrit, une grande variabilité des termes utilisés afin de définir les stades ou phases observés comme embryon, embryon libre, larve, pré-larve,

larve avec vitellus, alevin ou encore éleuthéroembryon génère une confusion lors de la compréhension de l'embryogenèse chez diverses espèces.

Afin d'améliorer l'étude, la description et la compréhension de la période embryonnaire chez les poissons, l'homogénéisation des termes ainsi que la définition d'une table de référence comportant les différentes phases, étapes et seuils lors de l'embryogenèse de certains groupes d'espèces devraient être mises en place. Cette table pourrait aider les chercheurs ainsi que les pisciculteurs à identifier des stades clefs limites et susceptibles d'être plus touchés par les mortalités et malformations lors du développement de leur espèce d'intérêt. De plus, cela permettrait d'approfondir les recherches sur ces problèmes et les potentielles origines associées et ainsi améliorer la gestion de l'élevage lors des stades précoces. Cependant, ces études intégrées sont longues et minutieuses, elles nécessitent de nombreuses observations permettant de déterminer les seuils biologiques. Ces études pourraient être étendues à d'autres groupes d'animaux présentant des variations intra-individuelles importantes afin d'identifier des seuils biologiques de développement au-delà du taxon des Téléostéens.

**De nombreuses études sur le développement des Téléostéens existent dans le but de créer des stades « normaux » de développement permettant de comprendre l'ontogenèse de certaines fonctions chez des poissons d'intérêt économique, écologique ou modèle. Ces tables de développement se réfèrent à deux grandes écoles de pensées encore en discussion en biologie du développement : la théorie saltatoire et la théorie graduelle. De plus, les transitions entre les périodes embryonnaire et larvaire ainsi que la métamorphose lors de l'ontogenèse des poissons sont également très controversées. Les conséquences de l'ensemble de ces divergences d'opinions se traduisent par un manque d'homogénéité dans l'utilisation des termes de la biologie du développement, une variation de la caractérisation de certains stades entraînant une complexification des tables de développement. De fait, de nombreuses recherches en biologie du développement existent aujourd'hui mais la compréhension et la comparaison inter-espèces de ces recherches semblent encore limitées. L'amélioration de la description de la biologie du développement par l'homogénéisation des termes ainsi que l'identification de stades clefs lors de l'ontogenèse pourraient permettre de générer des comparaisons inter-espèces et de généraliser certaines méthodes d'élevage à des groupes de poissons présentant les mêmes caractéristiques développementales.**



### **III. Variation des succès et performances de reproduction : des outils d'évaluation aux facteurs impliqués**

Au cours du développement précoce des poissons, des anomalies peuvent apparaître et être issues de divers facteurs impactant le cycle de reproduction. Ces anomalies vont compromettre le succès de la reproduction. Afin d'évaluer la réussite de ce cycle, il est nécessaire, et cela à toutes les étapes, de caractériser le succès de ce dernier en utilisant différents outils. Ainsi, dans le but d'attester de l'entrée dans le cycle de reproduction ainsi que de son bon déroulement, des indicateurs sont utilisés durant la gamétogenèse. Cependant, afin de conserver une cohérence dans notre propos, nous n'aborderons pas les outils d'évaluation durant la gamétogenèse. Dans un second temps, les performances de reproduction comprenant la qualité des gamètes et le succès de développement doivent être également évaluées. La qualité des gamètes, définie comme la capacité à féconder ou être fécondé, puis à se développer en un embryon normal, doit donc être mesurée tant pour les mâles que pour les femelles (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013 ; Bobe, 2015). Enfin, différents outils utilisés durant le développement permettent d'attester du succès de la reproduction chez les poissons par la mesure du succès de développement qui correspond aux taux de fécondation, de survie, d'éclosion, de malformations. Le succès de reproduction est considéré ici comme un ensemble de différentes étapes mises en place (induction de la reproduction, gamétogenèse, qualité des gamètes) et réussies permettant de bons succès de développement.

#### **A. Les outils et indicateurs de qualité de la reproduction**

##### **1. Indicateurs post-fécondation durant le développement précoce**

Lors des périodes précoces du développement, les indicateurs couramment utilisés permettant la détermination du succès de reproduction sont principalement des indicateurs morphologiques comprenant la morphologie des blastomères lors du clivage cellulaire, les taux de fécondation, de survie à différents stades, d'éclosion, de malformation et de survie larvaire (Figure 9). Tous ces indicateurs sont utilisés pour évaluer la qualité des gamètes et le succès de développement.

##### ***a) Morphologie des blastomères et clivage cellulaire***

La morphologie des blastomères lors du clivage cellulaire est utilisée chez plusieurs espèces (morue, *Gadus morhua* ; aiglefin, *Melanogrammus aeglefinus*) comme indicateur de viabilité et de qualité des œufs dans une ponte (Vallin et Nissling, 1998 ; Hall *et al.*, 2004). En effet, différents types d'anomalies ont été répertoriés comme l'asymétrie des cellules (le plus simple à étudier car le plus visuel) mais également l'adhésion intercellulaire incomplète, le contour des cellules ou l'inclusion de vacuoles entre les cellules (Figure 5) (Rideout *et al.*, 2004). Chez l'aiglefin, des effets négatifs d'un clivage cellulaire anormal sur le succès de reproduction ont été démontrés (Rideout *et al.*, 2004). Dans

ce cas, l'asymétrie cellulaire n'a pas d'effet sur l'éclosion. Cependant, cette malformation est hautement corrélée avec l'apparition d'autres anomalies de clivage, qui, elles, peuvent réduire la viabilité embryonnaire à l'éclosion. Cela suggère que des observations d'anomalies de symétrie seraient suffisantes pour indiquer une faible qualité ovocytaire. Toutefois, contrairement aux études précédentes portant sur la morphologie des blastomères, ces indicateurs semblent être utilisés pour la qualité des embryons plutôt que pour la qualité des ovules comme le remarquent les auteurs (Rideout *et al.*, 2004). Au contraire, Vallin et Nissling ont conclu chez la morue que les anomalies durant le clivage cellulaire pouvaient se résorber durant la gastrulation et, dans le cas contraire, conduisaient à la mort de l'embryon en développement (Vallin et Nissling, 1998). Cependant, ces résultats restent controversés en fonction des espèces et des études (Vallin et Nissling, 1998 ; Avery *et al.*, 2009). De plus, l'utilisation de cet outil n'est possible que lorsque l'espèce étudiée possède des œufs transparents (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013). Par conséquent, la prédiction de la qualité embryonnaire par l'incidence des malformations cellulaires précoces est également un outil à utiliser avec précaution.

b) ***Taux de fécondation, de survie et d'éclosion***

Le taux de fécondation est souvent utilisé afin de prédire le taux d'éclosion et le succès de développement de l'embryon dans de nombreuses études ainsi que chez les pisciculteurs. Selon les études et les espèces, ce taux peut être déterminé de quelques heures à quelques jours après la fécondation, selon le stade de développement et la facilité d'observation des embryons (Bobe et Labbé, 2010). Dans ce dernier cas, les taux mesurés correspondent davantage à des taux de survie que de fécondation. Chez les Salmonidés, des taux de fécondation faibles pourraient prédire des taux d'éclosion faibles des œufs fécondés (Rideout *et al.*, 2004). Cependant, d'autres expériences chez l'aiglefin ont montré que même pour un taux de fécondation élevé, les taux d'éclosion pouvaient être très variables (Rideout *et al.*, 2004). Chez d'autres espèces marines, la relation entre ces deux indicateurs est également relativement faible. Le taux de fécondation n'est donc pas représentatif du taux de fécondation et du bon déroulement du développement chez toutes les espèces (Bobe et Labbé, 2010). Une des limites de cet indicateur serait donc le manque de fiabilité et de répétabilité dans les conclusions en fonction des espèces étudiées. De plus, chez des espèces produisant des ovules opaques, l'identification des œufs fécondés ou non est relativement difficile.

Un des indicateurs les plus utilisés afin d'attester du succès de reproduction et de la qualité des gamètes est le succès du développement précoce grâce au suivi des taux de survie à différents moments de l'ontogenèse (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013). Ces stades ou phases spécifiques du développement peuvent varier selon les études, mais il s'agit généralement du stade œillé (pigmentation de l'œil), de l'éclosion ou encore du stade de résorption vitelline (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013). Cependant, ces stades ou phases spécifiques de développement

couramment utilisés sont déjà très tardifs en comparaison du temps total d'incubation des embryons. Une des solutions pourrait être de suivre progressivement le taux de survie des individus à des stades de développement successifs afin de déterminer les phases les plus sensibles lors de l'ontogenèse. Dans ce cas, le suivi de ces taux de survie depuis la fécondation et tout au long de l'embryogenèse pourrait être pertinent afin d'identifier des stades de mortalités précoces dus à diverses origines (par exemple : défauts de clivage cellulaire, gastrulation, transition zygotique). Néanmoins, ce type d'étude pourrait introduire un biais dans le bon déroulement du développement suite à une manipulation trop importante des individus.

### c) *Malformations embryonnaires et larvaires*

Afin de déterminer la compétence des ovocytes à se développer en embryons viables et normaux, de nombreuses recherches étudient l'apparition de malformations chez les embryons ou les larves. Chez le barbeau, *Barbus barbus*, le succès de développement des larves (normales, mortes, malformées) est un indicateur du succès de la reproduction (Lugowska, 2009). Chez la truite arc-en-ciel, la comparaison des embryons malformés et normaux permet également de définir la qualité des ovules (Bonnet *et al.*, 2007a). Néanmoins, il a été démontré que certaines malformations pouvaient être dues à des facteurs environnementaux ou des pratiques d'élevage mais également que d'autres étaient dépendantes des femelles, sans lien précis avec l'histoire de vie des géniteurs (Migaud *et al.*, 2013). Ces taux de malformations embryonnaires et larvaires pourraient donc être biaisés par des paramètres environnementaux d'élevage peu favorables. De plus, ces outils sont rarement utilisés seuls pour caractériser la qualité ou le succès de reproduction, mais couplés à d'autres indicateurs précédemment décrits. En effet, malgré de nombreux indicateurs post-fécondation utilisés pour caractériser la qualité des gamètes, comme ceux décrit précédemment, certains d'entre eux ne sont pas forcément fiables et varient en fonction des espèces. De nouveaux indicateurs devraient donc être explorés. Une des solutions envisagées est d'utiliser des indicateurs prédictifs de la qualité des gamètes (avant fécondation). Cependant, malgré de nombreuses études portant sur ce sujet, il existe peu d'indicateurs génériques permettant d'évaluer ou de prédire le succès de reproduction avant fécondation (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013).

## 2. Indicateurs prédictifs de la qualité des ovules

Afin d'identifier le plus précocement les défauts de qualité pouvant impacter les performances de reproduction, il est nécessaire de caractériser des indicateurs prédictifs pour évaluer la qualité des gamètes de poissons, notamment, la qualité ovocytaire, un des principaux paramètres limitant pour l'obtention de larves de qualité (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013). L'ensemble des expérimentations de ce travail ayant été conçu pour minimiser l'impact des gamètes mâles, leur qualité ne sera pas abordée.

La qualité ovocytaire peut être mesurée à travers de nombreux indicateurs plus ou moins fiables et qui peuvent être classés en deux catégories : morphologiques ou macroscopiques et moléculaires (Figure 9).

a) **Indicateurs morphologiques**

Des études rapportent l'utilisation d'indicateurs morphologiques tels que la taille de l'ovule, sa flottaison ou encore sa transparence, comme chez le turbot (*Scophthalmus maximus*), pour déterminer sa qualité (Migaud *et al.*, 2006 ; Olin *et al.*, 2012). Cependant, ces indicateurs ne sont pas toujours pertinents et les résultats obtenus peuvent varier en fonction des espèces étudiées. Le volume et la densité du vitellus sont également d'importants paramètres de l'histoire de vie des poissons et peuvent affecter leur ontogenèse (Balon, 1999). Ces deux paramètres pourraient nous permettre de prédire la qualité des ovules mais également le type d'ontogenèse chez les poissons – directe ou indirecte, comme décrit auparavant.

Parmi les outils de détermination de la qualité ovocytaire, la fragmentation et la distribution des gouttelettes lipidiques peuvent être utilisées. Par exemple, chez la brème de mer japonaise (*Pagrus major*), les ovocytes qui présentent plusieurs gouttelettes lipidiques induisent des développements anormaux. Néanmoins, chez d'autres espèces comme l'inanga (*Galaxias maculatus*), il n'existe aucune corrélation entre le nombre de gouttelettes lipidiques et la fertilité (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013). Les résultats obtenus après l'étude de ce paramètre semblent être encore dépendants de l'espèce étudiée et limités dans des conditions d'élevage.

Enfin, des résultats intéressants ont été observés chez la brème de mer japonaise proposant une corrélation entre la flottaison des œufs et le développement de ces derniers (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013). En effet, chez certaines espèces, les embryons se développant normalement montreraient une flottabilité des œufs pélagiques souvent meilleure. Cependant, comme les indicateurs décrits précédemment, celui-ci varie également avec l'espèce.

b) **Les indicateurs moléculaires**

D'autres potentiels indicateurs font l'objet de recherches chez des espèces comme le bar (*Dicentrarchus labrax*), la truite arc-en-ciel ou encore la perche commune. Ce sont des outils moléculaires utilisant des approches protéomiques ou transcriptomiques permettant de définir des acteurs de la qualité ovocytaire (Aegerter *et al.*, 2005 ; Crespel *et al.*, 2008 ; Castets *et al.*, 2012 ; Bouleau *et al.*, 2014). Chez la truite arc-en-ciel, les niveaux d'ARNm en nucléoplasmine (*npm2*, gène à effet maternel impliqué dans l'organisation nucléaire et nucléolaire ainsi que le développement embryonnaire) seraient directement liés à la qualité ovocytaire dont la mesure avait été effectuée sur les taux de survie au stade œillé et les malformations morphologiques à la résorption du vitellus. En effet, les ovules de faible qualité présentent des niveaux d'ARNm de *nmp2* faibles comparés aux ovules de bonne ou moyenne qualité. De plus, la surmaturation ovocytaire est associée à une

diminution globale des transcrits *nmp2* (Aegerter *et al.*, 2005). Chez le bar, l'abondance de la protéine Nucléoside Diphosphate kinase dans l'ovocyte serait positivement liée au potentiel de développement de l'embryon (Crespel *et al.*, 2008). Cette protéine pourrait servir d'indicateur de qualité chez le bar et contribuer à l'identification des mécanismes déterminant les défauts de qualité. Chez la perche commune, une étude protéomique préliminaire a identifié 32 protéines potentiellement impliquées dans la qualité ovocytaire (Castets *et al.*, 2012). La confirmation d'une ou plusieurs de ces protéines comme acteur de la qualité des ovules pourrait permettre d'identifier un nouvel indicateur prédictif de la qualité ovocytaire ainsi que du succès de reproduction associé.

Finalelement, afin d'évaluer le succès et les performances de reproduction, de nombreux outils sont disponibles. Cependant, beaucoup de ces indicateurs présentent des faiblesses rendant leur généralisation impossible à une large gamme d'espèces. De plus, malgré l'ensemble de ces informations, le succès de reproduction semble encore difficile à prédire et complexe à évaluer. Le développement de nouveaux indicateurs à tous les niveaux du cycle de reproduction, pourrait nous permettre d'explorer de nouvelles pistes et d'identifier les déterminants de la qualité des ovules, actuellement peu connus. En effet, les potentiels facteurs pouvant influencer le bon déroulement de la gamétogenèse comme la nutrition des géniteurs, la génétique ou les conditions environnementales pourraient être la cause des variations de qualité (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013).

## **B. Les facteurs influençant la reproduction et son succès**

Chez les espèces d'eau tempérée, le cycle de reproduction est généralement annuel car dépendant du rythme saisonnier des facteurs externes. Dans ce cas, les facteurs déterminants du cycle de reproduction, permettant le pilotage de ce cycle, l'initiation et le bon déroulement sont des variations, augmentation ou diminution, de la photopériode et/ou de la température (Wang *et al.*, 2010). De plus, d'autres aspects que les variations de ces deux facteurs sont à prendre en compte comme leurs niveaux initiaux, leur amplitude, leur cinétique et leurs niveaux finaux (Wang *et al.*, 2010). Néanmoins, plusieurs facteurs biotiques et abiotiques, dits modulateurs, vont pouvoir, réguler la qualité de la reproduction, à tout moment du cycle (nutrition, qualité d'eau, stimulation hormonale, stress ou génétique des animaux) (Figure 9). L'identification non exhaustive de ces facteurs et leurs conséquences sur le succès de reproduction sont nécessaires pour la compréhension de la qualité des gamètes ainsi que sa variabilité.

### **1. Pendant la gamétogenèse**

Les Téléostéens en tant que poïkilothermes sont directement impactés par la température de leur milieu qui influence le cycle de reproduction (Bobe, 2015). Une température trop élevée ou l'absence de vernalisation durant l'automne et l'hiver peuvent conduire à des anomalies de développement des gonades, comme des atrésies ou une résorption des ovocytes chez de nombreuses

espèces d'eau douce (Sandström *et al.*, 1997). Une des périodes les plus sensibles lors de la gamétogenèse chez les femelles est la maturation ovocytaire finale (Bobe, 2015). Par exemple, l'exposition de femelles de truite arc-en-ciel à une température de 17°C pendant quelques semaines avant l'ovulation peut entraîner une réduction de la survie embryonnaire et augmenter le taux de malformations (Aegerter et Jalabert, 2004).

Les caractéristiques génétiques des géniteurs ou l'incapacité des mécanismes d'adaptation à compenser des conditions environnementales de stress chez les embryons peuvent réduire les performances de reproduction et provoquer des malformations squelettiques durant le développement précoce. En effet, un stress subi durant la gamétogenèse conduit à différentes réponses, en fonction des stratégies de reproduction des espèces, de la période et du type de stress appliqué (Schreck *et al.*, 2001). Par exemple, durant le début de la période de vitellogenèse, un stress léger à modéré peut conduire à l'absence de ponte chez le tilapia (*Oreochromis niloticus*) alors qu'un tel stress n'a qu'un effet uniquement sur la taille des œufs chez la truite arc-en-ciel (Schreck *et al.*, 2001). En revanche, en période de vitellogenèse tardive, ce même stress engendre une ponte rapide ou plus précoce chez le tilapia et la truite arc-en-ciel, respectivement (Schreck *et al.*, 2001).

Enfin, un des facteurs dont le rôle est très important pour générer des gamètes de qualité est la nutrition des géniteurs. En effet, chez les femelles, des déficiences nutritionnelles affectent la qualité des ovules et causeraient des anomalies de développement ainsi que des mortalités embryonnaires. Par exemple, des carences en acides gras insaturés (n-3) provoquent chez les salmonidés, des mortalités embryonnaires importantes, des malformations ainsi que des modifications de durée de la résorption vitelline (Depêche et Billard, 1994). Chez la perche commune, la qualité de la ponte est directement impactée par la composition en acide gras de la nourriture des géniteurs, notamment les ratios en DHA/EPA/AA (acide docosahexaénoïque, 22:6 n-3; acide eicosapentaénoïque, 20:5 n-3 et acide arachidonique, 20:4 n-6 ; respectivement). Les DHA et AA sont, chez cette espèce, largement conservés dans les ovocytes et participent grandement aux développements embryonnaire et larvaire (Henrotte *et al.*, 2010). Les caroténoïdes ainsi que le contenu en acide ascorbique auraient également un impact sur la qualité ovocytaire donc sur le développement précoce et l'occurrence d'anomalies précédemment citées. De plus, des concentrations faibles en vitamine E pourraient induire une réduction de la survie larvaire ainsi qu'une augmentation des malformations. La vitamine A serait aussi importante pour le développement embryonnaire et larvaire (Bobe et Labbé, 2010).

L'ensemble de ces facteurs, biotiques et abiotiques, pourraient conduire à une mauvaise incorporation de certaines molécules (ARN, protéines, vitamines) dans l'ovule et/ou induire une mauvaise qualité de gamètes et de médiocres performances de reproduction.

## 2. Après l'émission des gamètes

Une mauvaise qualité ovocytaire peut affecter de nombreux événements biologiques comme la morphologie, le nombre, la position et le volume de la gouttelette lipidique ; la fécondité ; la viabilité des embryons/larves et le bon déroulement du développement embryonnaire/larvaire ; le taux d'éclosion ; la résistance des larves (aux manipulations, jeûne, stress osmotique ...) ou encore le bon déroulement de la métamorphose (Mellinger, 2002). Par ailleurs, cette qualité des gamètes est déterminée lors de la gamétogenèse et peut donc être influencée par les facteurs intervenant durant cette période. Néanmoins, lors de la reproduction au sens strict du terme, la qualité des ovules et spermatozoïdes peut être également modifiée par différents facteurs. Par exemple, lors d'une reproduction artificielle, les poissons sont manipulés régulièrement, entraînant un stress pouvant détériorer la qualité des gamètes. Le moment de ponte lors de la saison de reproduction est également très important (Bobe et Labbé, 2010). En effet, des travaux récents chez le turbot rapportent que la qualité des ovules est plus élevée au milieu qu'au début ou à la fin de la saison de ponte (Jia *et al.*, 2015). Enfin, un phénomène de surmaturation ovocytaire ou de vieillissement post-ovulatoire aurait tendance à entraîner des malformations de type « cyclope » chez les embryons et larves de poissons (Aegerter et Jalabert, 2004 ; Bonnet *et al.*, 2007a).

## 3. Facteurs influençant l'embryogenèse

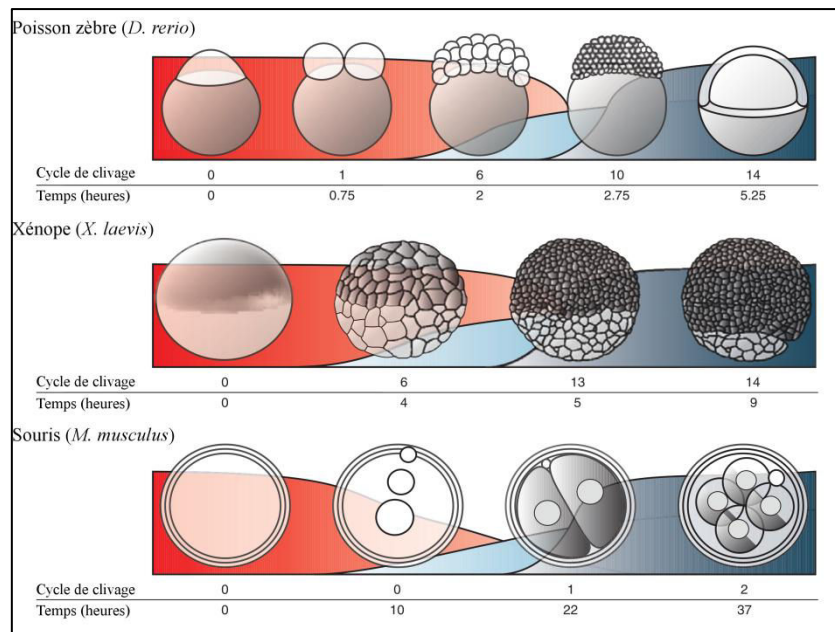
Lors du développement embryonnaire d'un individu, de nombreux facteurs vont également intervenir et pouvoir influencer ce développement (Figure 9). Ces facteurs peuvent être externes (biotiques et abiotiques) ou internes (et souvent liés à la qualité de l'ovule ainsi qu'aux molécules maternelles incorporées dans ce dernier durant l'ovogenèse).

### a) *Les facteurs maternels*

Durant l'ovogenèse, de nombreuses molécules sont incorporées dans l'ovocyte permettant le développement embryonnaire d'un individu (Lubzens *et al.*, 2010). Après la fécondation, les facteurs maternels vont permettre le bon déroulement de toutes les étapes du développement embryonnaire jusqu'à l'activation de la transcription zygotique lors de la transition mi-blastulienne (MBT, *Mid-blastula transition* ou MZT, *Maternal to Zygotic transition*) (Baroux *et al.*, 2008 ; Tadros et Lipshitz, 2009 ; Lubzens *et al.*, 2010). D'un point de vue cellulaire, cette transition entraîne une augmentation des cycles cellulaires, une perte de synchronisation et la mobilité des cellules mais également la suppression d'une partie des ARNm maternels et initie la transcription du génome zygotique. Le résultat de cet événement majeur est le passage du contrôle du développement précoce du génome maternel au génome zygotique. Néanmoins, l'influence maternelle persiste au-delà de la MBT (Wagner *et al.*, 2004). Cette transition ainsi que les gènes maternels et zygotiques ont été étudiés chez de nombreuses espèces, comme l'oursin (*Strongylocentrotus purpuratus*), le nématode



(*Caenorhabditis elegans*), la drosophile (*Drosophila melanogaster*), la souris (*Mus musculus*), le xénope (*Xenopus laevis*) ou encore le poisson zèbre (*Danio rerio*), et apparaît à des stades de clivage variables (Figure 8) (Kane et Kimmel, 1993 ; O'Boyle *et al.*, 2007 ; Baroux *et al.*, 2008 ; Tadros et Lipshitz, 2009 ; Aanes *et al.*, 2011).



**Figure 8 : Etude comparative de la transition maternel à zygotique chez différents organismes modèles.**

La courbe rouge représente les profils de dégradation des transcrits maternels. Les courbes bleues clair et foncé illustrent les vagues mineures et majeures, respectivement, d'activation du génome zygotique. D'après Tadros et Lipshitz, 2009.

Le développement précoce des individus est donc piloté par les facteurs maternels. Des défauts d'incorporations de ces facteurs lors de la gamétogenèse ou des problèmes lors de la transition mi-blastuléenne pourraient avoir des impacts très importants sur le développement embryonnaire et provoquer des anomalies. La mutation de facteurs maternels chez le poisson zèbre, comme certains gènes exprimés lors du clivage cellulaire chez les poissons, serait responsable de mortalités précoces caractérisées par des arrêts de développement autour de la transition mi-blastuléenne (Wagner *et al.*, 2004). D'un point de vue morphologique, ces embryons sont arrêtés au stade mi-blastula alors que des embryons non mutés continuent la gastrulation. Chez cette même espèce, la transcription zygotique ne semble pas nécessaire pour que le clivage cellulaire continue, néanmoins elle semble indispensable pour l'initiation des mouvements cellulaires (Wagner *et al.*, 2004). Un défaut d'initiation de la transcription zygotique pourrait donc entraîner des arrêts de développement au début de la gastrulation et des mortalités précoces importantes. D'autres gènes maternels impliqués dans l'activation des ovules et la ségrégation cytoplasmique blastomères/vitellus seraient responsables des mortalités précoces au stade sphère ou des défauts de taille de l'axe du corps de l'embryon, à des degrés variables (Dosch *et al.*, 2004).



b) *Les facteurs biotiques et abiotiques*

De très nombreux autres facteurs sont impliqués dans la variation des performances de reproduction lors du développement précoce. Comme pour la gamétogenèse, la température joue un rôle extrêmement important lors du développement précoce des poissons (poïkilothermes) et peut impacter la durée de la période de ponte et de l'embryogenèse, la morphologie des embryons ou de l'ovule. Pour chaque espèce de poisson, des limites hautes et basses de température doivent être respectées afin de ne pas induire de mortalités ou de malformations (Sandström *et al.*, 1997). Par exemple, chez la perche commune, les zones les plus chaudes provoquent des saisons de pontes plus longues et des embryons plus petits alors qu'une température élevée entraîne une désintégration des rubans durant les stades précoces de développement (Sandström *et al.*, 1997). Chez le saumon Atlantique, un choc thermique sur les embryons induit de sévères déformations du tronc (entre 27 et 34 %) (Boglione *et al.*, 2013b). Chez la truite commune, une augmentation de température durant l'embryogenèse entraîne une diminution des taux de survie ainsi qu'une augmentation de l'apparition des malformations (Réalis-Doyelle *et al.*, 2016).

D'autres facteurs ont également un fort impact sur le développement. Chez la truite arc-en-ciel, il a été montré qu'une manipulation répétée pouvait générer des taux de malformation et de mortalité importants ainsi que des taux d'éclosion plus faibles qu'en l'absence de manipulation, notamment à des stades spécifiques du développement comme lors de la gastrulation (50% à 70% d'épibolie) (Milla *et al.*, 2011). La qualité d'eau (oxygène dissous, pH, nitrate/nitrite/ammonium) aurait également un impact important sur les premiers stades de vie des poissons (Depêche et Billard, 1994). Un des facteurs importants et limitant durant l'embryogenèse est la disponibilité en oxygène. La durée de l'embryogenèse sera influencée par la concentration en oxygène comme cela a pu être démontré chez la carpe commune, *Cyprinus carpio* (120h de développement à 1,2 mg/L d'oxygène et 68h de développement à 12 mg/L d'oxygène) (Depêche et Billard, 1994). De faibles niveaux d'oxygène, lors des stades précoces de développement, induisent également un retard de celui-ci (Keckeis *et al.*, 1996). Chez cette même espèce, des concentrations chroniques plus ou moins importantes en nitrites (0,7 mg/L à 330 mg/L) sur les périodes embryonnaires et larvaires entraînent des retards de développement, des changements physiologiques, une diminution de la croissance, des taux de malformations plus importants et impactent négativement la mortalité des larves (Kroupova *et al.*, 2010). Par exemple, les nitrites peuvent induire de multiples malformations comme des œdèmes cardiaques et vitellins, des malformations cranio-faciales, des problèmes d'inflation de la vessie gazeuse ou encore l'immobilité des embryons (Simmons *et al.*, 2012). Chez de nombreuses espèces, des études ont décrit que des teneurs élevées en métaux lourds dans l'eau durant le développement précoce pouvaient provoquer la mort des embryons ou des anomalies du clivage cellulaire (Jeziarska *et al.*, 2009). De plus, une contamination des géniteurs et des embryons va également être associée à des malformations des embryons comme des œdèmes cardiaques et vitellins, l'absence de tête ou de

queue, ou encore une pigmentation incomplète des yeux (Jeziarska *et al.*, 2009). Ces anomalies seraient dues à une mauvaise gamétogenèse chez les géniteurs entraînant une faible qualité des gamètes. Dans le milieu naturel, l'apparition de malformations (défauts de clivage cellulaire, de gastrulation, d'axe et de fonctions) et de mortalités précoces pourrait être due à de fortes pollutions des eaux comme cela a été décrit dans l'ouest de la mer Baltique chez des embryons d'espèces de poissons pélagiques (Westernhagen *et al.*, 1988). L'apparition de ces défauts de développement chez les embryons pourrait servir d'indicateur de l'état de l'environnement marin chez ces espèces.

Enfin, le mode d'éclosion des embryons (éclosion par la tête, la queue ou le vitellus) semble également pouvoir engendrer des malformations plus ou moins importantes. En effet, lors de l'éclosion par la queue (la plus fréquente), l'apparition de malformations est observée dans 1 à 5% des cas. Lors d'une éclosion par la tête, une augmentation du taux de malformations est notée en comparaison au premier type d'éclosion. Enfin, chez les embryons de barbeau commun dont l'éclosion a lieu par le vitellus, 100 % des embryons éclos semblent sévèrement malformés contrairement aux deux autres types d'éclosion (Ługowska et Sarnowski, 2011).

**Le bon déroulement du cycle de reproduction des Téléostéens est étroitement lié aux conditions environnementales dans lesquelles ils se trouvent. De nombreux outils et indicateurs ont été développés afin de pouvoir caractériser à chaque étape de ce cycle de potentiels défauts pouvant nuire à son bon déroulement. Cependant, à l'heure actuelle, il semblerait que l'utilisation d'un seul de ces outils ne puisse être possible pour déterminer la qualité de la reproduction mais que l'étude de plusieurs indicateurs lors d'un cycle de reproduction soit nécessaire pour attester de celle-ci. En outre, certains de ces outils présentent des faiblesses non négligeables. De plus, l'utilisation de ces indicateurs non génériques rend l'analyse du succès de la reproduction et de sa qualité complexe. La qualité de la reproduction étant bien souvent variable et issue d'origines multiples, il est nécessaire de caractériser les facteurs pouvant intervenir et influencer la gamétogenèse, la reproduction ainsi que son succès.**

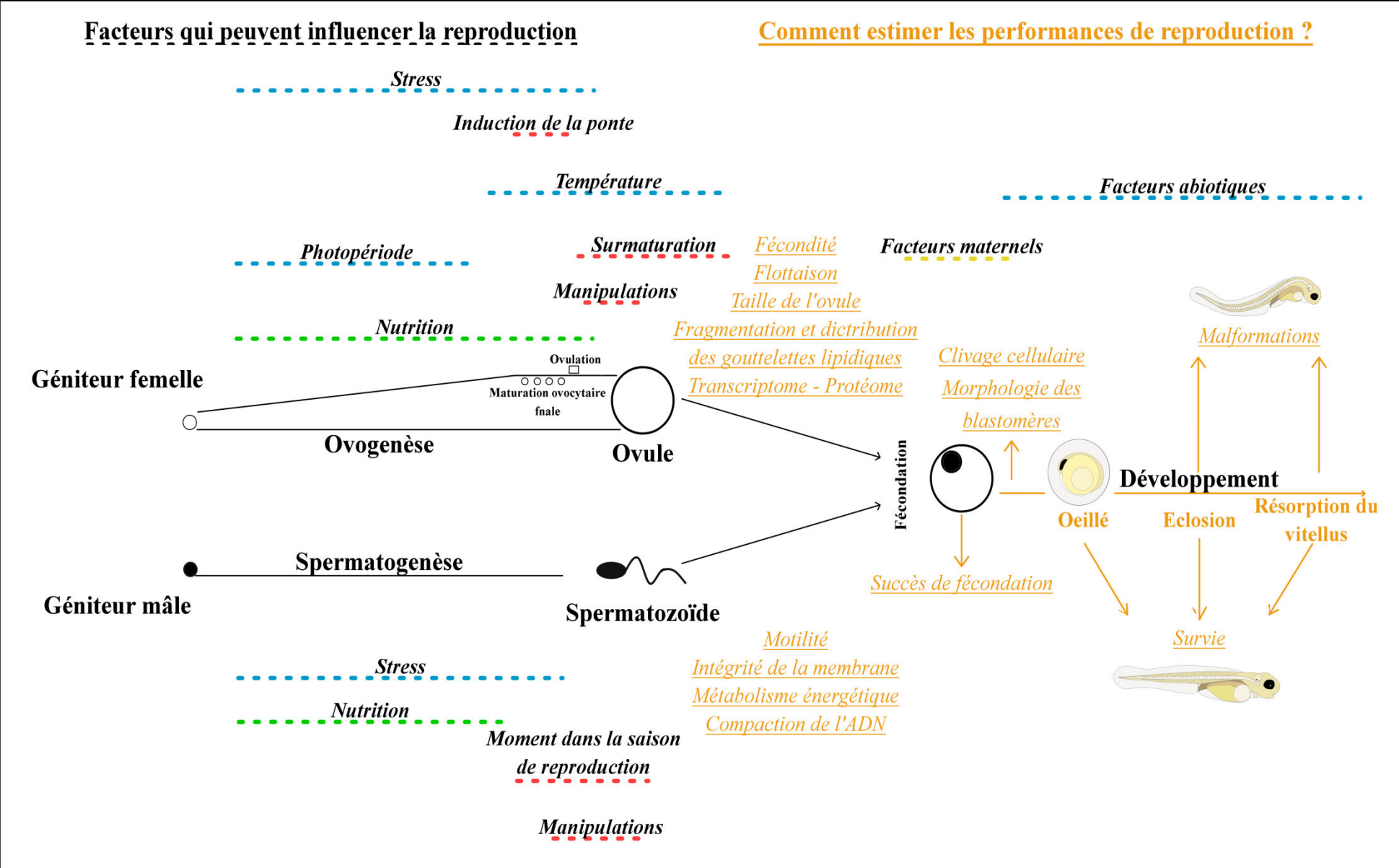


Figure 9 : Facteurs influençant la reproduction chez les Téléostéens et méthodes d'estimation des performances de reproduction. Modifié d'après Bobe et Labbé, 2010. Les lignes en pointillés représentent les facteurs (vert : nutrition, bleu : environnementaux, rouge : pratiques d'élevage, jaune : maternels). Les méthodes d'estimation des performances de reproduction sont en orange.

#### **IV. L'aquaculture : système d'élevage et domestication, leurs impacts sur la biologie des Téléostéens**

Comme décrit auparavant, de nombreux facteurs peuvent être responsables de performances de reproduction variables. Cependant, dans le contexte actuel d'intensification de la production aquacole, différentes méthodes de gestion des individus sont mises en place, pouvant également influencer la biologie des poissons et leur reproduction. En effet, différents systèmes d'élevage ainsi que le processus de domestication sont nécessaires à la production aquacole (Fontaine, 2009). Cependant, l'impact de ces conditions et du niveau de domestication sont, aujourd'hui peu étudiés. De nombreuses définitions caractérisent la domestication. D'après Price (1984), la domestication est « le processus selon lequel une population s'adapte progressivement à l'homme et à son environnement en captivité à travers des changements génétiques apparaissant au cours des générations et des événements développementaux récurrents induits par l'environnement à chaque génération » (Price, 1984). Ce processus long et sans fin va impliquer de nombreux mécanismes génétiques au sein des populations notamment une sélection artificielle induite par l'homme dans le but d'obtenir des individus avec des phénotypes économiquement intéressants (performance de croissance, qualité de la chair, âge de la première reproduction ou encore résistance aux maladies) pour la pisciculture (Doux fils *et al.*, 2015). Lors de ce processus de domestication, un grand nombre de fonctions biologiques vont être impactées. De plus, dans des conditions d'élevage en captivité, le contrôle constant du cycle de reproduction sur des générations successives et des performances liées à ce cycle (qualité des ovules, embryons et larves) est l'un des facteurs clefs (Teletchea et Fontaine, 2014). L'étude des potentiels impacts de la domestication et des différents systèmes d'élevage sur cette fonction apparaît essentielle afin d'identifier les processus sous-jacents et améliorer la gestion des animaux en aquaculture.

##### **A. Les systèmes d'élevage en aquaculture**

Les systèmes d'élevage en aquaculture peuvent être classés en différents niveaux d'intensification en fonction de la densité des poissons, de l'apport de nourriture, du renouvellement d'eau, de l'origine des aliments (proies naturelles ou granulés) et des bassins utilisés (Zouiten *et al.*, 2011). Ces différents systèmes d'élevage sont directement liés à la qualité, la quantité et la température de l'eau utilisée (Conte, 2004). Les variations de ces paramètres de l'eau en dehors des limites peuvent conduire à du stress, la dégradation de la santé des animaux et des taux de mortalités importants.

##### **1. Quels sont les systèmes d'élevage en aquaculture aujourd'hui ?**

En se basant sur la densité de poissons par unité de volume, les systèmes d'élevage peuvent être classés en trois catégories (Lekang, 2013). Le système dit extensif est caractérisé généralement par une faible densité d'individus par unité de volume avec peu d'apport de substances artificielles

ainsi que peu d'intervention humaine. La qualité d'eau de ces systèmes est régulée par différents niveaux d'échange et d'aération (Conte, 2004). L'élevage en étang est souvent considéré comme un exemple typique de ce système extensif. Cependant, la production de poisson en étang peut également être semi-intensive ou intensive en fonction de la densité de poisson par unité de volume. Le système semi-intensif est une combinaison du système intensif et extensif. Par exemple, la production de juvéniles peut s'effectuer en intensif et le grossissement des poissons en extensif (Lekang, 2013). Enfin, les conditions d'élevage intensives permettent une production beaucoup plus élevée d'individus par unité de volume où des apports artificiels sont nécessaires afin de maintenir les poissons en captivité. Le système intensif est caractérisé notamment par l'ajout de nourriture et des méthodes de contrôle des maladies. Au sein de ce type d'élevage, le système de recirculation en aquaculture ou RAS, permet de générer une production en recyclant la quasi-totalité de l'eau par des procédés biologiques, chimiques et physiques (Lekang, 2013). Dans ce cas, l'ensemble des paramètres de l'eau (température oxygène, ammonium ...) sont contrôlés et maintenus à des taux raisonnables afin de limiter le stress des individus (Conte, 2004).

Ces différents types de systèmes peuvent avoir un impact sur la biologie et la physiologie des poissons. En effet, l'élevage extensif en étang va permettre une certaine liberté aux animaux, peu d'effets anthropiques mais également peu de contrôle des pathogènes. De plus, les individus vont être directement impactés par les conditions climatiques extérieures. Au contraire, l'élevage intensif en RAS est totalement géré par l'Homme et les animaux sont maintenus dans des bassins de petite taille avec une densité souvent élevée entraînant une modification des interactions entre les animaux. Dans ce cas, l'environnement physique est généralement très simple avec une distribution de nourriture abondante, l'absence de prédateur et des traitements contre les pathogènes. Cependant, les animaux sont également sujets à un stress permanent dû à l'activité humaine pouvant induire une vulnérabilité face aux maladies (Huntingford, 2004). Néanmoins, le contrôle des individus et de leurs conditions de vie sont gérés plus facilement. Enormément de facteurs environnementaux ou nutritionnels vont être différents en fonction des méthodes et du système d'élevage utilisés. Cependant, peu d'études se sont portées sur l'impact des systèmes d'élevage plus intensifs en aquaculture comparé à des systèmes plus naturels (étang), sur la biologie des poissons, à tout âge et stade de développement. Dans notre contexte, nous nous intéresserons notamment à l'impact de ces systèmes sur la reproduction et le développement des Téléostéens.

## **2. Impact de ces systèmes sur la reproduction et le développement**

La fonction de reproduction peut être impactée de différentes façons par les conditions d'élevage en commençant par l'âge à la puberté. En effet, chez les animaux d'élevage, la puberté apparaît à un âge plus précoce que chez les animaux sauvages pouvant affecter la croissance, la santé, l'utilisation de la nourriture et le bien être des animaux (Taranger *et al.*, 2010). Chez le silure (*Silurus*

*glanis*), les individus élevés en conditions intensives présentent un âge et une taille de maturité sexuelle plus précoces que dans les conditions naturelles (Szabó *et al.*, 2015). Le comportement de reproduction en conditions plus intensives peut également être modifié. En effet, dans ce cadre la compétition est relativement rare (Huntingford, 2004). De plus, la reproduction artificielle nécessaire au contrôle du cycle de vie des poissons induit un stress généré par la manipulation des poissons (Conte, 2004). Par conséquent, des qualités de gamètes et des performances de reproduction variables peuvent être générées suite à ces manipulations et ce stress important (Migaud *et al.*, 2013). Cela est particulièrement vrai pour les espèces au début d'un processus de domestication. Chez le silure cependant, les taux d'ovulation et de fécondation ne diffèrent pas en fonction des conditions d'élevage (intensives ou étang) (Szabó *et al.*, 2015).

Lors du développement précoce, les conditions d'élevage peuvent également impacter la biologie et la survie des individus. En effet, suite à la fécondation, dans des conditions d'élevage en RAS, les œufs morts vont devoir être retirés rapidement des écloséries afin d'éviter la colonisation de l'ensemble des œufs par des champignons ou des bactéries (Brooks *et al.*, 1997). Dans des systèmes extensifs, ces types de problèmes ne semblent pas apparaître du fait de l'espace important accordé aux œufs en développement. Lors d'une comparaison de deux systèmes d'élevage, semi-intensifs (mésocosme) et intensifs, sur la croissance et le développement larvaire chez le bar, les auteurs ont montré que les larves issues d'une même ponte élevées en système semi-intensif avaient une taille, un poids, une maturation des enzymes intestinales et de l'intestin significativement plus importants que les larves élevées en système intensif indiquant l'importance du système d'élevage sur le développement des individus (Zouiten *et al.*, 2011). Les conditions d'élevage peuvent également présenter des perturbations environnementales qui conduisent à des instabilités ou défauts de développement (Pulcini *et al.*, 2015). Par exemple, la présence de malformations lors du développement chez les poissons d'élevage est un problème important et récurrent dans le domaine de l'aquaculture (Divanach *et al.*, 1996 ; Koumoundouros, 2010 ; Boglione *et al.*, 2013b). Dans les écloséries méditerranéennes (chez le bar ou la daurade royale (*Sparus aurata*)), des taux de malformations variant de 7 à 20 % ont été relevés mais fréquemment, cette incidence peut augmenter à 45-100% (Koumoundouros, 2010). Chez le bar, une étude récente a montré que les taux de malformations globaux des larves étaient plus élevés en système intensif qu'en système semi-intensif (Zouiten *et al.*, 2011). En effet, suite à l'intensification de la production, des progrès ont été effectués pour les méthodes d'élevage, de nutrition et de contrôle des maladies des animaux (notamment en RAS) mais très peu en termes de qualité du produit (Koumoundouros, 2010). Malgré l'apparition flagrante de différences entre les systèmes d'élevage, un grand nombre de paramètres fluctuent en fonction des systèmes d'élevage, intensif, semi-intensif et extensif et les causes des variations obtenues dans la littérature ne sont pas toujours déterminées.



## **B. La domestication des poissons ?**

L'intensification de la reproduction est également accompagnée d'un processus de domestication. Cependant, la domestication des poissons est encore une question relativement sensible. En effet, la définition d'un poisson domestiqué était mal déterminée. Par exemple, selon les auteurs, le nombre d'espèces domestiquées pouvait varier de 2 à plus de 430 en fonction des critères et définitions accordés par les auteurs à un animal domestique (Tableau 2) (Price, 1984 ; Clutton-Brock, 1999 ; Balon, 2004b ; Duarte *et al.*, 2007 ; Bilio, 2008 ; Teletchea et Fontaine, 2014). Cela est peut-être dû au fait que la domestication chez les poissons est beaucoup plus récente que chez d'autres animaux d'élevage ou encore certaines plantes (Balon, 2004b) ce qui implique un manque de clarté sur les questions d'espèces « domestiquées » et de processus de domestication (les premières traces d'aquaculture datent de 1000 ans avant JC en Asie, soit 8000 ans après le début de la domestication des mammifères). De fait, les notions de poissons domestiqués, en captivité ou d'élevage ne sont pas toujours bien définies. En effet, de nombreuses études portant sur la domestication comparent les performances d'individus sauvages avec celles d'individus élevés en captivité, acclimatés à ces conditions depuis quelques mois ou avec des individus dits domestiqués (Soares *et al.*, 2015). D'après Balon, une espèce devient domestique lorsqu'elle change de forme, de couleur, de fonction et de comportement impliquant souvent qu'elle ressemble seulement partiellement à ses ancêtres sauvages (Balon, 2004b). Selon d'autres auteurs, pour être considérée comme domestiquée, une espèce de poisson doit pouvoir entièrement effectuer son cycle de vie en captivité, indépendamment d'apport d'individus sauvages tels que des œufs, des larves, des juvéniles ou encore des adultes pour la reproduction (Bilio, 2008). Pour résoudre ce problème, Teletchea et Fontaine ont proposé de classer les espèces selon 5 niveaux de domestication en se basant sur le degré de contrôle du cycle de vie des espèces par l'Homme (Tableau 3) (Teletchea et Fontaine, 2014). Le contrôle du cycle en captivité induit différents changements biologiques sur l'espèce après quelques générations, par rapport aux populations sauvages. Les fonctions biologiques pouvant être impactées positivement ou négativement par un processus de domestication sont nombreuses comme le comportement, la croissance, la reproduction ou encore l'immunité (Lorenzen *et al.*, 2012).

### **1. Impact de la domestication sur la biologie des poissons en général**

Des changements phénotypiques peuvent apparaître principalement suite aux manipulations effectuées par l'homme (comme la sélection artificielle) ou dans des conditions d'élevage. Certaines de ces réponses peuvent être une accélération de la vitesse de développement des animaux comme une métamorphose ou une croissance plus rapides, mais également une apparition plus précoce des caractéristiques de la période de sénescence (Lorenzen *et al.*, 2012). Des traits comportementaux, comme l'agressivité, la défense contre les prédateurs ou du territoire, ainsi que le comportement de reproduction, sont également modifiés en conditions d'élevage. Ces traits ont une tendance à

s'atténuer dans un environnement moins complexe où la nourriture est distribuée de façon régulière, en bonnes proportions et où les animaux se retrouvent à une densité plus élevée, modifiant ainsi les interactions sociales (Lorenzen *et al.*, 2012). La perte d'agressivité dans des conditions d'élevage standardisées chez les poissons va entraîner une accélération de la croissance puisque l'énergie qui ne sera pas allouée à la défense du territoire permettra aux animaux de grandir plus vite (Bégout Anras et Lagardère, 2004). Cependant, cette agressivité pourra être développée dans le cas de paramètres d'élevage hétérogènes (individus de tailles différentes, densité trop importante de poissons).

## 2. Impact de la domestication sur la reproduction

Actuellement, peu d'études ont été conduites sur l'effet du processus de domestication sur la reproduction et son succès. Les résultats de ces études portant sur l'impact de parcours de domestication spécifique chez des espèces de Téléostéens sont souvent contradictoires et variables en fonction de l'espèce (Randák *et al.*, 2006 ; Lund *et al.*, 2008 ; Krejszeff *et al.*, 2009 ; Cieśla *et al.*, 2014).

Une étude chez l'ide, *Leuciscus idus*, a montré que des poissons domestiqués (génération F4) pouvaient pondre plus tôt que les poissons sauvages après un traitement à la GnRHa (Krejszeff *et al.*, 2009). En effet, dans des conditions contrôlées, la souche sauvage de cette espèce nécessite un traitement hormonal afin d'obtenir une ponte. Lors de cette étude, les auteurs ont démontré que les poissons domestiqués depuis plusieurs générations pouvaient également pondre des ovules de bonne qualité avec uniquement une stimulation de la température et de la photopériode dans des conditions contrôlées. Chez cette espèce, le processus de domestication aurait donc un impact positif sur la ponte pour des animaux en conditions contrôlées. Cependant, ce processus aurait des impacts plus mitigés (négatifs ou nuls) sur les taux de survie embryonnaire en fonction des groupes de géniteurs étudiés (Krejszeff *et al.*, 2009). Chez la même espèce, (Cieśla *et al.*, 2014) ont démontré que l'utilisation de ces mêmes traitements à la GnRHa induisait un pourcentage d'ovulation plus faible chez les individus domestiqués (génération F3) que chez les individus sauvages et que le processus de domestication n'avait aucun impact significatif sur les taux de survie embryonnaire (Cieśla *et al.*, 2014). Cependant, deux corrélations intéressantes sont relevées dans cette étude : une corrélation positive entre le niveau de domestication et le temps de latence avant l'ovulation ainsi qu'une corrélation négative entre le niveau de domestication et le nombre d'ovules hydratés dans une unité de volume lors de l'activation (Cieśla *et al.*, 2014). Ces résultats seraient plutôt en faveur d'un impact négatif de la domestication sur la reproduction.



Auteurs	Année	Définition d'une espèce domestiquée
<b>Price</b>	1984	Population adaptée progressivement à l'Homme et à son environnement en captivité à travers des changements génétiques apparaissant au cours des générations et des évènements développementaux répétés induits par l'environnement à chaque génération
<b>Clutton-Brock</b>	1999	Un animal domestique est élevé en captivité dans un intérêt économique, pour la communauté humaine qui maintient un contrôle total sur sa reproduction, l'organisation de son territoire et son alimentation
<b>Balon</b>	2004	Organisme qui (i) présente un intérêt spécifique, (ii) dont l'élevage est contrôlé par l'Homme, (iii) dont le comportement est différent de celui de ces ancêtres sauvages, (iv) présente des variations de morphologie et physiologie qui ne sont pas présentes chez les individus sauvages et (v) dont certains individus ne pourraient pas survivre sans l'Homme
<b>Duarte et al.</b>	2007	L'élevage, les soins et le nourrissage des organismes domestiqués doivent être contrôlés par l'Homme
<b>Bilio</b>	2008	L'espèce doit effectuer son cycle de vie en captivité, indépendamment d'apport de ressources sauvages tels que des œufs, des larves, des juvéniles ou encore des adultes pour la reproduction
<b>Teletchea et Fontaine</b>	2014	Le niveau de domestication d'une espèce est basé sur la capacité de contrôle de l'Homme tout au long du cycle de vie des espèces élevées en captivité et l'indépendance d'apport d'animaux sauvages

Tableau 2 : Définitions d'un espèce/individu/population domestique selon la littérature.

Niveaux de domestication	Description	Nombre d'espèces	Exemples
<b>0</b>	Production basée sur les animaux capturés par la pêche	4671	
<b>1</b>	Premiers essais d'acclimatation à l'environnement captif	39	Brème bordelière ( <i>B. bjoerkna</i> , Cyprinidés)
<b>2</b>	Une <b>partie du cycle</b> est réalisée en captivité, mais plusieurs <b>points de blocage</b> existent encore (reproduction, élevage larvaire, croissance ...)	75	Thon rouge de l'Atlantique ( <i>T. thynnus</i> ), anguille européenne ( <i>A. anguilla</i> )
<b>3</b>	Le <b>cycle complet</b> est réalisé en captivité mais <b>nécessité d'apports sauvages</b> pour obtenir plusieurs générations successives	61	Gardon ( <i>R. rutilus</i> ), sole sénégalaise ( <i>S. senegalensis</i> ), thon rouge du Pacifique ( <i>T. orientalis</i> )
<b>4</b>	Le <b>cycle complet</b> est réalisé en captivité <b>sans apport sauvage pendant plusieurs générations</b> , pas de programme de sélection	45	Poisson à tête de serpent ( <i>C. argus</i> ), sandre ( <i>S. lucioperca</i> ), perche commune ( <i>P. fluviatilis</i> )
<b>5</b>	<b>Programmes de sélection</b> utilisés pour l'amélioration des performances des animaux (qualité de la chair, taux de croissance, rendement des filets ...)	30	Carpe commune ( <i>C. carpio</i> ), truite arc-en-ciel ( <i>O. mykiss</i> ), saumon Atlantique ( <i>S. salar</i> ), loup de mer ( <i>D. labrax</i> )

**Tableau 3 : Description des niveaux de domestication des poissons d'aquaculture.**  
D'après Teletchea et Fontaine, 2014.

Chez d'autres espèces étudiées, les recherches démontrent également qu'un processus de domestication impacte négativement la fonction de reproduction. Chez le bar, les femelles sauvages présentent des taux de fécondation et d'éclosion plus élevés que les femelles domestiquées (génération F3), soit 62,8 % vs 41,4 % et 32,3 % vs 16,1 %, respectivement (Crespel *et al.*, 2008). Des résultats similaires ont été obtenus chez la morue et le saumon Atlantique, avec des taux de fécondation, de symétrie lors du clivage (pour la morue), d'éclosion et de survie larvaire plus faibles chez les individus domestiqués que chez les individus sauvages (Fleming *et al.*, 1996 ; Salze *et al.*, 2005 ; Jonsson et Jonsson, 2006 ; Lanes *et al.*, 2012). Cela pourrait notamment être expliqué par la qualité ovocytaire et la composition des ovules. Cependant, chez la morue, aucune différence dans la composition biochimique (contenu protéique, acides aminés, acides gras) des ovules des deux populations n'a été démontrée (Salze *et al.*, 2005 ; Lanes *et al.*, 2012). Néanmoins, des différences spécifiques ont pu être identifiées entre les deux populations pour certaines de ces molécules telles que l'acide arachidonique (20:4 n-6) dont les niveaux apparaissent plus faibles chez la population d'élevage que la population sauvage (Salze *et al.*, 2005). Chez la truite commune, le succès de reproduction lors d'un processus de domestication ne semble pas impacté par rapport aux populations sauvages. En effet, les conséquences d'un processus de domestication peuvent être positives ou négatives sur la ponte ainsi que le poids des œufs en fonction des années d'études, des variations individuelles des géniteurs et du rang de ponte (Randák *et al.*, 2006). Chez la sole commune, *Solea solea*, la comparaison de génération F1 élevée en aquaculture avec des individus sauvages montre qu'il n'y a pas d'effet de la domestication sur la descendance (Lund *et al.*, 2008). L'ensemble de ces études montrent des résultats divergents concernant l'impact de la domestication sur la reproduction et son succès en fonction des espèces et populations étudiées.

### 3. Limites des études sur la domestication et la reproduction

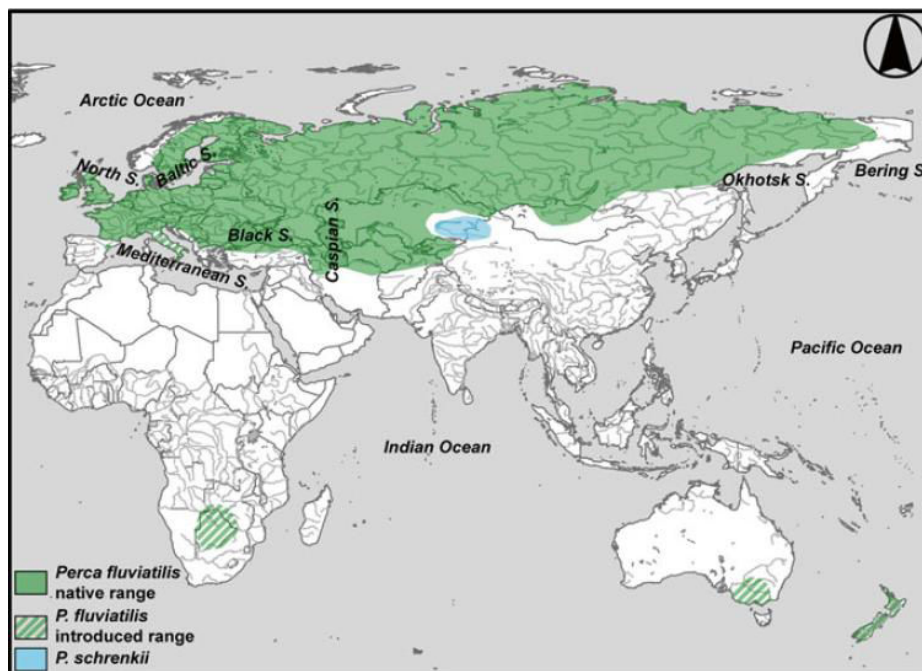
Les études portant sur la domestication et la reproduction des poissons sont actuellement difficiles à appréhender, de par leur faible nombre, la complexité du processus de domestication et notamment le niveau de domestication des espèces. En effet, la plupart du temps, ces animaux sont issus de fermes piscicoles où les connaissances sur leur histoire de vie et de production sont limitées (Teletchea et Fontaine, 2014). L'introduction de populations sauvages dans les stocks domestiqués est fréquente. Les résultats et conclusions obtenus lors des expérimentations peuvent être alors nuancés d'autant plus qu'ils sont souvent contradictoires. De plus, les études sur l'impact de la domestication sur la reproduction présentent des résultats variables : effets positifs, négatifs ou encore sans effet sur les performances de reproduction (comme sur la quantité et la viabilité des larves) et parfois même contradictoires chez une même espèce. D'autre part, le manque d'homogénéité dans les termes utilisés ainsi que l'utilisation de différentes définitions du processus de domestication entraînent une confusion dans l'interprétation des études et de leurs résultats. L'utilisation de termes plus génériques ainsi que des études approfondies portant sur les effets de l'intensification de l'aquaculture (par la

domestication ou les systèmes d'élevage) sur la reproduction et le développement de nouvelles espèces d'intérêt semblent nécessaire afin de comprendre l'impact de ces facteurs et généraliser certains concepts.

**En aquaculture, l'intensification de la production s'accompagne de modifications des méthodes d'élevage. Ainsi, différents systèmes d'élevage sont mis en place (intensif/extensif) et des processus de domestication sont appliqués sur les nouvelles espèces d'intérêt aquacole. Cependant, le concept de domestication chez les poissons est encore aujourd'hui sujet à de nombreux débats, par exemple la notion d'espèce domestiquée reste très discutée. De nombreuses fonctions biologiques peuvent être affectées par les différentes méthodes d'élevage ainsi qu'un processus de domestication. Une des fonctions biologiques clefs permettant de produire et de domestiquer une nouvelle espèce est la reproduction. Néanmoins, peu d'études portent actuellement un intérêt pour le sujet et les résultats de ces dernières sont très souvent contradictoires. Les conclusions issues de ces études apparaissent alors peu fiables et informatives sur l'impact de l'intensification des techniques aquacoles sur la biologie de la reproduction et du développement des poissons. Ce domaine de recherche reste, à l'heure actuelle, important à approfondir dans le but d'éclaircir l'effet de l'intensification des conditions d'élevage et d'un processus de domestication sur cette fonction clef chez les Téléostéens.**

## V. Le modèle biologique : la perche commune

La perche commune, une espèce de Percidés d'eau douce tempérée de l'hémisphère nord, à fort impact économique, est élevée dans un but commercial ou récréatif (pêche sportive) (Stepien et Haponski, 2015). Cette espèce est très appréciée pour la consommation humaine, dans une large gamme de tailles (4 à 25 cm) ainsi que de différentes façons (poisson entier ou filet) (Fontaine, 2004). Sa répartition géographique en milieu naturel est relativement étendue et est principalement due à sa large gamme de tolérance de température et de salinité (Bruslé et Quignard, 2001 ; Kottelat et Freyhof, 2007). Son aire de répartition s'étend du nord de la Scandinavie au centre de l'Italie et des côtes ouest de l'Irlande à l'est de la Sibérie (Figure 10). Quelques populations introduites se retrouvent en Afrique du Sud, en Nouvelle-Zélande, au Sud de l'Italie et en Australie (Pyle et Couture, 2015).



**Figure 10 : Carte de répartition des populations naturelles et introduites des espèces *P. fluviatilis* et *P. schrenkii* dans le monde.**

D'après Stepien et Haponski, 2015.

*Perca fluviatilis* appartient au genre *Perca*, comprenant 3 espèces actuellement connues, *P. fluviatilis*, *Perca schrenkii* et *Perca flavescens* (Stepien et Haponski, 2015). La perche commune, comme *P. schrenkii*, sont originaires de l'Eurasie contrairement à la perchaude, *P. flavescens*, qui est endémique de l'Amérique du Nord. La perche commune est développée actuellement dans plusieurs piscicultures européennes (Allemagne, France, Suisse) dans le but de répondre à la demande des pays scandinaves ainsi que de la Suisse. Cependant, malgré l'intensification des travaux de recherches depuis les années 90, certaines études sont encore nécessaires afin d'approfondir les connaissances sur le cycle de reproduction et les performances associées chez cette espèce ainsi que les étapes précoces de son développement. En effet, chaque période du cycle de vie de la perche reste difficile à maîtriser

en captivité mais la reproduction de cette espèce et son succès restent aujourd'hui des points de blocage majeurs à améliorer, notamment le contrôle de la qualité des ovules (Schaerlinger et Żarski, 2015). La perche commune étant une nouvelle espèce en aquaculture, dont la domestication en condition d'élevage a commencé depuis une vingtaine d'année (niveau 4, (Teletchea et Fontaine, 2014), elle présente une forte hétérogénéité dans ses performances reproductives.

Dans ce contexte, la présentation d'une synthèse bibliographique spécifique de la perche commune, abordant les différents thèmes développés précédemment, semble nécessaire afin de mieux comprendre l'état actuel des connaissances dans ce domaine ainsi que les problématiques liées à cette espèce.

## A. La reproduction

### 1. Maturité et dimorphisme sexuel chez la perche commune

Chez la perche commune, l'âge de la maturité sexuelle est différent en fonction du sexe. Chez des populations d'Europe de l'Ouest, elle est atteinte, pour les mâles, à partir d'un an à une taille de 5 à 12 cm et entre 2 à 4 ans à une taille de 12 à 20 cm, pour les femelles (Craig, 1974 ; Treasurer, 1981 ; Jamet et Desmolles, 1994 ; Fontaine *et al.*, 2015a). Dans des conditions naturelles, elle varie en fonction du sexe, du taux de croissance, de l'habitat et des communautés de poissons (densité de perches, densité des proies, compétition interspécifique ...), mais également en fonction des facteurs environnementaux comme la température de l'eau (Treasurer, 1981 ; Heibo *et al.*, 2005 ; Fontaine *et al.*, 2015a). Dans des conditions d'élevage en circuit fermé, la maturité sexuelle peut être plus précoce (Fontaine *et al.*, 2015a) notamment en maintenant les conditions photo-thermiques constantes et favorables à la croissance de l'espèce. Dans ce cas, la perche commune peut atteindre sa puberté après 11 à 14 mois post-éclosion (Fontaine *et al.*, 2015b). Durant l'ensemble de son cycle de vie, la perche commune ne présente pas de dimorphisme sexuel (aucune différence morphologique) à l'exception de la période de reproduction proprement dite et d'un dimorphisme de croissance (Fontaine *et al.*, 1997, 2015a ; Mooij *et al.*, 1999). En effet, quelques semaines avant la ponte, la perche femelle est caractérisée par un abdomen rond puis lorsque cette dernière est prête à pondre (Figure 11A), la papille uro-génitale devient turgescence, de couleur blanche-rosée (Figure 11B). Les mâles ne présentent pas cette papille uro-génitale et leur morphologie n'est pas modifiée durant la saison de reproduction. Malgré cela, ils sont aisément identifiables après une légère pression au niveau de l'abdomen qui va provoquer une émission de sperme (mâles spermants). En dehors de la saison de reproduction, l'identification des sexes chez *P. fluviatilis* est complexe et nécessite l'autopsie de nombreux poissons afin de déterminer le sexe ratio d'une population ou l'état de la gamétogenèse après analyse des gonades (à l'aide d'outils histologiques par exemple).

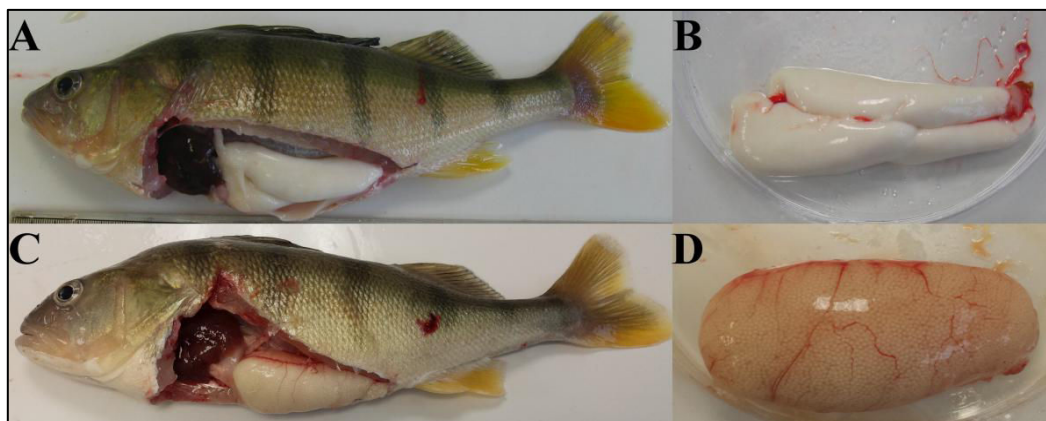




**Figure 11 : Perche commune mature.**

**A** : Perche commune femelle mature ; **B** : femelle prête à pondre, la flèche indique la papille uro-génitale turgescente. D'après Castets, 2011 et Fontaine *et al.*, 2015b.

Au niveau anatomique, les perches communes mâles se caractérisent par deux testicules localisés dans la cavité péritonéale entre l'intestin et la vessie gazeuse (Figure 12A et B) tandis que chez la femelle, un seul ovaire est présent dans la cavité ventrale (Figure 12C et D) (Treasurer et Holliday, 1981 ; Fontaine *et al.*, 2015a). Cette particularité anatomique n'est présente que chez le genre *Perca* chez les Percidés, où les deux ovaires initialement présents fusionnent en une masse ovarienne lors de la gamétogenèse, ce qui les différencie d'autres espèces comme celles du genre *Sander* (Fontaine *et al.*, 2015b).



**Figure 12 : Position, nombre et morphologie des gonades de la perche commune au cours du cycle de reproduction, *P. fluviatilis*.**

**A** : perche mâle ; **B** : testicules ; **C** : perche femelle ; **D** : ovaire. Animaux prélevés 5 mois après l'induction du cycle de reproduction, lors de la vitellogenèse.

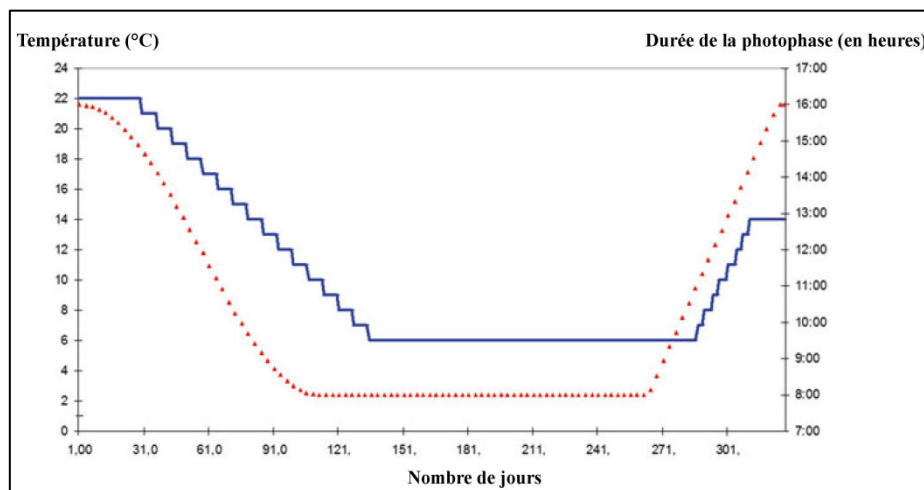
## 2. Le Cycle de reproduction

Le cycle de reproduction de *P. fluviatilis* est annuel avec une période de ponte naturelle qui s'étend de mars à mai selon la localité géographique (début avril en Lorraine) (Craig, 1974). Cette espèce est considérée comme étant un pondeur printanier précoce sans soins parentaux d'après la classification de (Teletchea *et al.*, 2009a). Chez les femelles, ce cycle de reproduction peut être divisé en 3 phases successives préalablement présentées : l'induction, la gamétogenèse et la maturation finale (Sulistyo *et al.*, 1998). Différents facteurs abiotiques vont pouvoir influencer le cycle de reproduction de cette espèce. Premièrement, des facteurs déterminants vont piloter le cycle de reproduction, leurs

variations sont nécessaires au déclenchement et à la synchronisation des différentes phases. Comme décrit auparavant, la qualité et la quantité des gamètes notamment des ovules lors de la reproduction ainsi que les développements embryonnaire et larvaire peuvent être également modulés par des facteurs modulateurs (Wang *et al.*, 2006, 2010).

a) **Facteurs déterminants**

Afin d'induire la gamétogenèse chez la perche commune, une diminution de la température et de la photopériode est nécessaire (Abdulfatah *et al.*, 2011, 2013). Au contraire, pour déclencher la phase finale de maturation ovocytaire et la ponte, il faut appliquer une augmentation de la température. Une phase de vernalisation (hiver) avec de faibles températures, environ 6°C, est également indispensable afin d'obtenir un bon cycle de reproduction ainsi qu'une vitellogenèse ininterrompue (Sandström *et al.*, 1997). En circuit fermé, des programmes d'induction des pontes en dehors de la saison naturelle de reproduction et basés sur la gestion des variations de température et de photopériode sont maintenant utilisés en conditions de production afin d'obtenir 100% des femelles gravides (Figure 13) (Migaud *et al.*, 2002, 2004, 2006 ; Abdulfatah *et al.*, 2011, 2013 ; Fontaine *et al.*, 2015a, 2015b).



**Figure 13 : Programme photo-thermique utilisé chez la perche commune, *P. fluviatilis*.**

La ligne bleue représente les variations de température et la ligne rouge représente les variations de durée de la photophase. D'après Fontaine *et al.*, 2015a.

Cependant, la qualité des pontes obtenues avec ces manipulations environnementales reste toujours variable. Les modalités appliquées de photopériode et de température vont avoir un impact sur la gamétogenèse, la fécondité, la ponte (durée et moment), la qualité des gamètes ainsi que la mortalité des géniteurs. Les variations saisonnières de photopériode ainsi que l'intensité lumineuse sont fortement impliquées dans le contrôle de la gamétogenèse et de la ponte (Migaud *et al.*, 2006). Le cycle de développement des gonades et l'entrée en reproduction des perches peuvent être inhibés par une photopériode continue par exemple. La croissance ovocytaire ainsi que la vitellogenèse peuvent être ralenties par une diminution rapide et de fortes amplitudes de la température (Wang *et al.*, 2010).



**b) Facteurs modulateurs**

Des facteurs modulateurs précédemment décrits chez les Téléostéens peuvent également impacter le succès de la reproduction chez la perche commune tels que (i) des facteurs nutritionnels (quantité et qualité de l'aliment), (ii) populationnels (densité, effet parental, origine géographique et génération de domestication) ou encore (iii) environnementaux (qualité et quantité de lumière, bruit, manipulations, qualité de l'eau). Hormis quelques études ciblant les effets de facteurs nutritionnels, très peu de travaux se sont intéressés à la régulation des performances de reproduction chez la perche commune.

**c) Effets de la domestication sur la biologie de la perche commune**

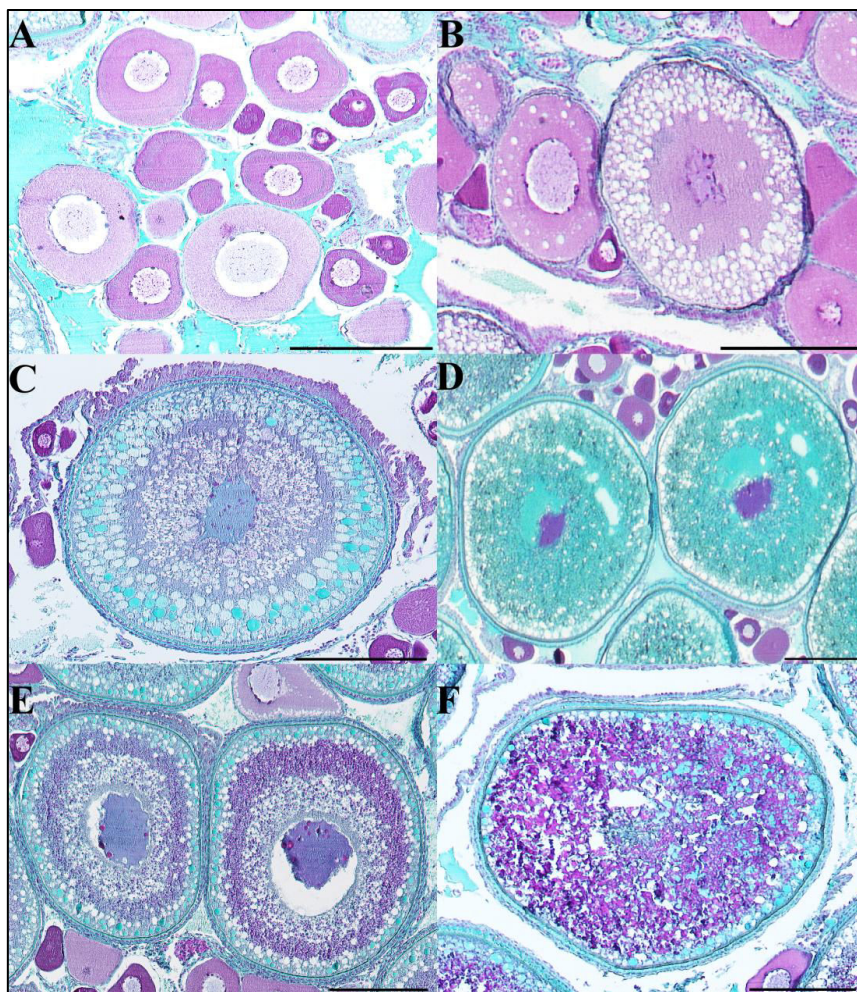
Un des facteurs modulateurs pouvant impacter le succès de reproduction est le niveau de domestication. Selon Teletchea et Fontaine (2014), la perche commune, espèce toujours en cours de domestication, a atteint le niveau 4 de ce processus. Cela signifie que son cycle de vie est totalement maîtrisé en captivité, sans apport de poisson sauvage mais qu'aucun programme de sélection et d'amélioration génétique n'est encore utilisé (Teletchea et Fontaine, 2014). Une étude portant sur le système immunitaire chez des juvéniles de cette espèce a montré qu'un processus de domestication pouvait influencer le statut immunitaire du poisson soumis à un confinement chronique. En effet, les populations F1 montrent une plus faible abondance de protéines d'immunité (molécule du complément, composé C3) que la population de génération F4 (Doux fils *et al.*, 2011). Par conséquent, le processus de domestication pourrait améliorer la résistance des poissons à un stress chronique (Doux fils *et al.*, 2011). Plus récemment, une comparaison des performances de reproduction de perches sauvages (PS) et d'élevage (PE) a été effectuée lors d'un cycle de reproduction (Kristan *et al.*, 2012). Dans cette étude, certains paramètres importants diffèrent entre les deux populations tels que les indices gonado-somatiques (IGS) relevés au début de la saison de reproduction ( $26,9 \pm 4,4\%$  chez les PS vs  $18,5 \pm 2,3 \%$  chez les PE), la fécondité plus faible chez les perches d'élevage ou encore le taux d'éclosion ( $62,0 \pm 9,0\%$  chez les PS vs  $27,9 \pm 9,3 \%$  chez les PE). Néanmoins, dans cette étude, le taux de fécondation reste identique chez les deux populations. A l'exception de cette étude, très peu de travaux ont été réalisés sur les effets de la domestication sur la biologie de cette espèce, et encore moins sur sa reproduction.

**3. Ovogenèse**

Cette espèce a une ovogenèse de type groupe synchrone, c'est-à-dire qu'au cours d'un cycle de reproduction tous les ovocytes d'une femelle, recrutés pour la prochaine période de ponte, vont évoluer de manière synchrone. Cela implique que normalement, seulement deux stades de maturation ovocytaire sont retrouvés simultanément dans la gonade (Fontaine *et al.*, 2015b). Lors de la période de repos sexuel, période post-ponte (printemps-été, sous nos latitudes), les ovaires sont principalement

composés d'ovocytes au stade ovocyte primaire avec un diamètre ovocyttaire (DO) de 100 à 140  $\mu\text{m}$  (Figure 14A). Sous nos latitude, au cours du cycle naturel de reproduction, la croissance des ovocytes va se dérouler en deux périodes : (i) d'août à décembre, croissance et augmentation rapides, puis (ii) de décembre à la ponte, ces deux indicateurs vont croître plus lentement (Sulistyo *et al.*, 1998). La vitellogénèse se déroule sur ces deux périodes, de septembre à fin mars-début avril, au moment de la ponte (Sandström *et al.*, 1997).

A partir de septembre, les ovaires présentent des ovocytes au stade alvéole corticale précoce (début de la vitellogénèse endogène ; Figure 14B et C) avec un diamètre ovocyttaire (DO) de 430  $\mu\text{m}$  environ. A la fin de la première période de croissance, en décembre, le DO atteint 750  $\mu\text{m}$  avec des ovocytes en stade alvéole corticale tardif (Figure 14D). De décembre à mars, la vitellogénèse exogène se met en place, les ovocytes sont en stade vitellogénèse précoce ou avancée (Figure 14E et F) et peuvent atteindre 860  $\mu\text{m}$  de diamètre (Fontaine *et al.*, 2015a). L'ensemble de ces stades sont facilement identifiables en histologie (Figure 14).



**Figure 14 : Caractérisation histologique des différents stades de maturation ovocyttaire chez la perche commune, au cours d'un cycle de reproduction.**

**A** : ovocyte primaire ; **B** : alvéole corticale précoce ; **C** : alvéole corticale précoce ; **D** : alvéole corticale avancé ; **E** : vitellogénèse précoce ; **F** : vitellogénèse avancée. Barre d'échelle = 250  $\mu\text{m}$ .

Au niveau physiologique, durant l'été, les stéroïdes sexuels ainsi que la Vitellogénine présentent des concentrations plasmatiques faibles (0,5 à 0,8 µg/mL pour la Vitellogénine, moins de 1 ng/mL pour l'œstradiol). Une augmentation significative est observée en septembre pour l'œstradiol et la Vitellogénine pouvant atteindre 1,9 ng/mL et  $1,8 \pm 2,4$  µg/mL, respectivement (Sulistyo *et al.*, 1998). Cette augmentation importante de la teneur en œstradiol est suivie de celle de la testostérone, (jusqu'à  $16,3 \pm 3,7$  ng/mL) un mois plus tard au moment de la diminution de température et de photophase. Les concentrations de ces trois molécules restent relativement élevées jusqu'à la période de ponte, indiquant une vitellogenèse active (Sulistyo *et al.*, 1998 ; Fontaine *et al.*, 2015a). Enfin, deux semaines avant la saison de ponte, lors de la phase de maturation ovocytaire finale, les concentrations en DHP restées constantes durant tout le cycle de reproduction (entre  $0,20 \pm 0,08$  ng/mL et  $0,62 \pm 0,17$  ng/mL) vont doubler (Sulistyo *et al.*, 1998).

a) ***Les stades de maturation finale des ovocytes chez la perche commune***

L'observation et la caractérisation de ces différents stades de maturation ovocytaire finale permettent de comprendre et d'identifier les potentiels défauts pouvant avoir des conséquences sur la qualité ovocytaire et les succès de développement. D'un point de vue plus appliqué, cette identification permet de prédire, lors de la reproduction artificielle, le moment de ponte et la qualité de celle-ci grâce à une biopsie. En effet, chez la perche commune, la saison de ponte d'un lot de géniteurs est étendue (5 semaines en moyenne) et les femelles sont souvent décalées ce qui entraîne, lors de l'élevage larvaire, des animaux de différentes tailles augmentant les risques de cannibalisme. Afin de comprendre les défauts de maturation ovocytaire et d'améliorer les conditions d'élevage, Żarski *et al.* (2011a) ont défini une nouvelle classification définissant 6 stades pré-ovulatoires (au lieu de 4 auparavant selon une table définie chez les Cyprinidés d'après Brzuska (1979)) en fonction de la migration de la vésicule germinale et du degré de coalescence des gouttelettes lipidiques (Brzuska, 1979 ; Żarski *et al.*, 2011a). Cette caractérisation précise des stades de maturation ovocytaire finale permet de déterminer les potentielles défaillances pouvant apparaître lors de cette phase ainsi que de synchroniser les pontes par la pratique d'une injection hormonale, de limiter le cannibalisme et d'augmenter les performances de reproduction (Żarski *et al.*, 2011a).

Chez la perche commune, la maturation finale ovocytaire va être plus ou moins impactée par certains facteurs abiotiques entraînant d'importantes variations dans la qualité des ovules. Par exemple, la température a un fort impact sur la MOF et par conséquent sur la ponte. De fortes températures durant cette maturation finale pourraient impacter la formation de la gangue gélatineuse et entraîner une désintégration des rubans d'œufs lors des stades précoces de développement (Sandström *et al.*, 1997). L'enjeu majeur aujourd'hui est de pouvoir maîtriser et déterminer la qualité des ovules.

---

**b) Qualité des ovules**

La qualité des ovules chez la perche commune est hautement variable selon les femelles, les saisons de reproduction ou encore le moment de ponte (Žarski *et al.*, 2011b). Cette qualité est classiquement caractérisée à l'aide d'indicateurs, décrits auparavant chez les poissons de manière générale, comme les taux de fécondation, de survie, d'éclosion et de malformation ou encore la fragmentation de la gouttelette lipidique (Žarski *et al.*, 2011b). La fragmentation de la gouttelette lipidique déterminée par Zarski *et al.* (2011b) est l'un des seuls indicateurs morphologiques prédictifs permettant d'avoir une idée sur la qualité des ovules. En effet, la taille et le nombre de gouttelettes lipidiques dans l'ovule de la perche commune seraient corrélés à un développement embryonnaire anormal ainsi qu'à des niveaux de malformations variables. Plus le nombre de gouttelettes lipidiques augmente, plus la fréquence de développement anormal est grande, contrairement aux ovules contenant une seule gouttelette lipidique (Žarski *et al.*, 2011b). D'autres indicateurs morphologiques spécifiques des espèces *P. fluviatilis* ou *flavescens*, peuvent être utilisés, comme le niveau de fragmentation du ruban : plus le ruban pondu est fragmenté, plus la qualité des ovules serait faible. Cependant, ces indicateurs ne sont pas toujours reproductibles entre les individus et des recherches ont débuté sur des indicateurs protéiques de qualité des ovules (Castets *et al.*, 2012).

Lors d'une étude menée antérieurement au laboratoire (Castets *et al.*, 2012), des groupes de pontes de qualité variable (bonne, intermédiaire ou mauvaise) ont pu être définis en se basant sur des indicateurs post-fécondation tels que le taux de survie larvaire à 7 jours, le taux de malformations, la taille des larves à l'éclosion et leur résistance au jeûne (Castets *et al.*, 2012). L'analyse protéomique des ovules de ces différents groupes indique que des protéines sont différemment exprimées en fonction des groupes de qualité de ponte. Au total, 32 protéines impliquées dans différentes fonctions (comme la réponse au stress, le transport des lipides ou encore le métabolisme énergétique) pourraient être potentiellement responsables de la qualité ovocytaire (Castets *et al.*, 2012). Certaines d'entre elles pourraient servir d'indicateur prédictif de la qualité ovocytaire chez la perche commune.

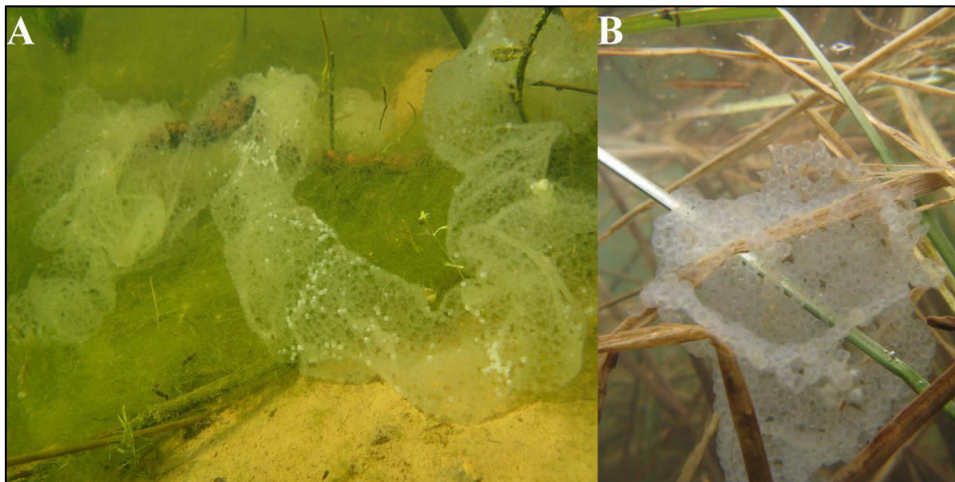
**B. Développement de la perche commune**

Malgré des succès de reproduction élevés dans la nature (forts taux de fécondation et d'éclosion, faible taux de malformation), il semblerait qu'après la pratique d'une reproduction artificielle, les performances de reproduction et le développement de la perche commune soient plus variables (Sandström *et al.*, 1997 ; Žarski *et al.*, 2011b). Une étude de la biologie du développement et de ses dérégulations chez cette espèce semble alors indispensable afin de comprendre l'origine de ces variations et améliorer les conditions d'élevage pour les premiers stades de vie de *P. fluviatilis*.



## 1. Caractéristiques de la ponte et de l'œuf

Le développement embryonnaire de la majorité des Téléostéens se déroule dans un environnement externe à l'organisme maternel (Formicki *et al.*, 2009). Afin de faciliter ce genre de développement, des adaptations évolutives existent dans le but de contrer les effets néfastes de l'environnement et favoriser les facteurs bénéfiques pour le développement de l'embryon (comme la structure de l'œuf). Chez la perche commune, la ponte est caractérisée par un ruban gélatineux pouvant atteindre plusieurs mètres (0,5 m à 5,5 m) qui comporte des replis en zigzag dans lesquels sont groupés entre 200 000 et 300 000 œufs, et permettant de protéger l'embryon en développement (Chevey, 1925 ; Kunz, 2004 ; Formicki *et al.*, 2009). Les œufs sont intégrés dans ce ruban formant un réseau collant qui, au contact de l'eau, se remplit d'eau et gonfle, permettant aux femelles d'accrocher les œufs sur la végétation subaquatique (Figure 15) (Formicki *et al.*, 2009). Il est composé d'une lumière interne, mais se trouve fermé aux deux extrémités. Cependant, sur toute la longueur de ce cylindre gélatineux, il existe des ouvertures permettant la circulation de l'eau, essentielle pour les échanges gazeux des œufs (Kunz, 2004). L'ensemble des œufs pour une saison de reproduction est pondu en une seule fois (Schaerlinger et Żarski, 2015). Il existe une relation entre la taille des femelles et celle des rubans (Schaerlinger et Żarski, 2015) et des œufs ; d'après Craig (1974), les poissons les plus grands seraient susceptibles de pondre des œufs plus gros (Craig, 1974).

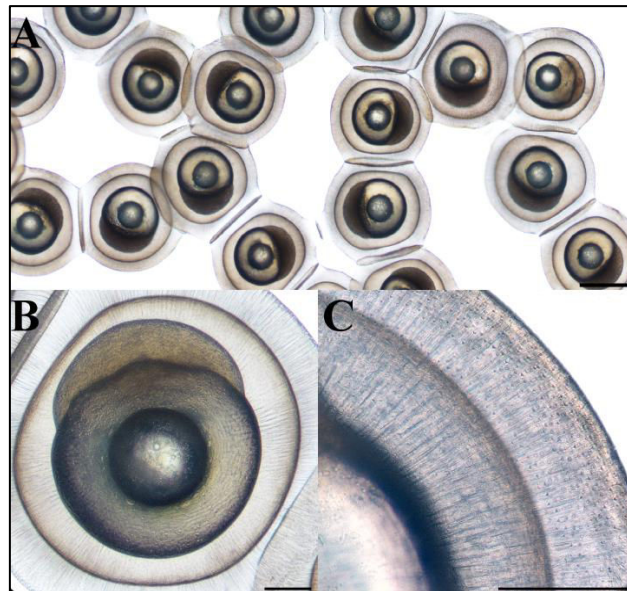


**Figure 15 : Pontes de perche commune.**

**A :** Ponte de perche commune, *Perca fluviatilis*, dans le milieu naturel. **B :** Morceau de ruban de perche commune. Crédit photos : Yannick Ledoré.

Les œufs de perche sont transparents, variant entre 0.86 et 0.91 mm de diamètre et composés de plusieurs enveloppes ainsi que d'une réserve vitelline importante dans laquelle se trouve une gouttelette lipidique (Figure 16) (Sulistyo *et al.*, 1998 ; Schaerlinger et Żarski, 2015). Une première membrane vitelline se situe directement autour du vitellus, puis une seconde membrane appelée chorion ou *zona radiata*, et enfin une large enveloppe gélatineuse (Figure 16), appelée gangue ou *zona radiata externa*, composée d'une quantité importante de glycoprotéines (Kunz, 2004 ; Formicki *et al.*,

2009) permet aux œufs d'adhérer entre eux et de former le ruban. Cette enveloppe contient des structures tubulaires qui constituent un réseau en trois dimensions de tubules et de pores, dont le rôle serait d'assurer une fonction de squelette au ruban, de permettre l'adhésion des œufs entre eux et enfin de conduire l'eau ainsi que l'oxygène au sein de cette structure (Lereboullet, 1854 ; Formicki *et al.*, 2009) afin de préserver le bon développement de la perche. D'après les différentes études effectuées sur les Percidés (McElman et Balon, 1979 ; Schaerlinger et Żarski, 2015) et selon les plusieurs critères biologiques caractérisant la perche commune, cette dernière pourrait être identifiée comme un poisson à ontogenèse indirecte, du fait de son faible volume de vitellus, du nombre important d'ovules pondus lors de la saison de reproduction et de son développement embryonnaire relativement court, comparé aux autres Percidés.



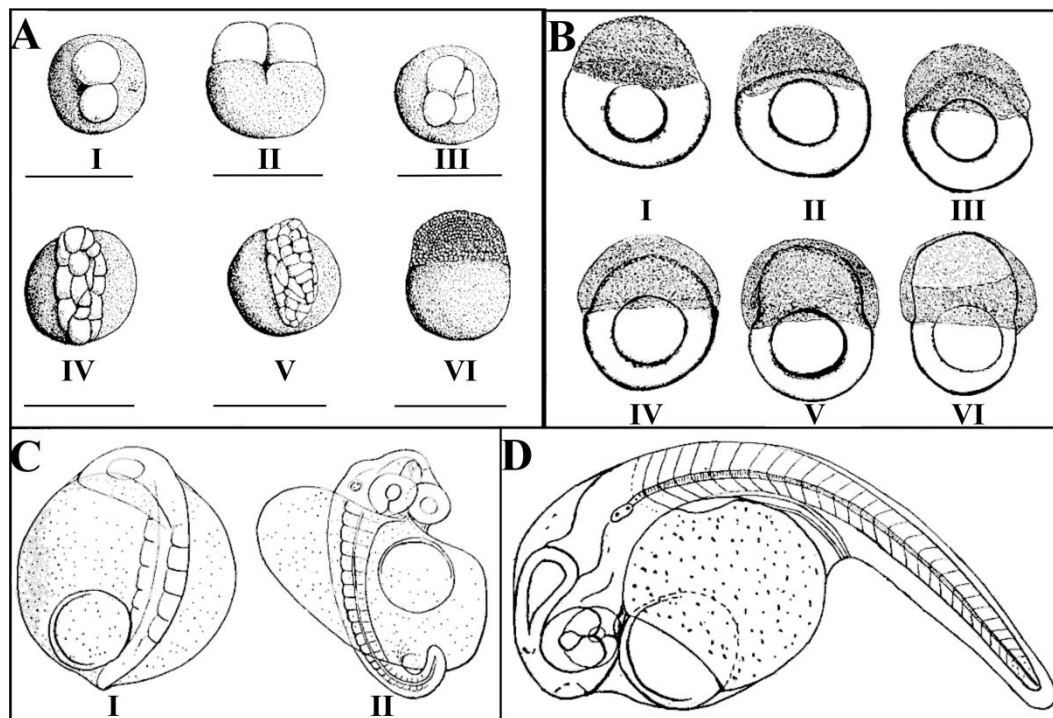
**Figure 16 : Œufs et détails de la gangue de perche commune.**

**A** : Ruban de ponte de perche commune observé au microscope. **B** : œuf de perche au stade une cellule. **C** : détail des enveloppes de l'œuf de perche. Barre d'échelle = 2 mm pour **A** et 250  $\mu\text{m}$  pour **B** et **C**

## 2. Embryogenèse normale

Chez la perche commune, peu de recherches traitent de l'embryogenèse et des différentes phases durant cette période. Actuellement, trois références ont décrit de façon succincte le développement embryonnaire (Lereboullet, 1854 ; Chevey, 1925 ; Vlavonou, 1996). L'ontogenèse de certains systèmes biologiques lors des stades larvaires, comme le système digestif ou le système visuel, a pu être explorée afin d'améliorer les conditions d'élevage (Ahlbert, 1973 ; Cuvier-Péres et Kestemont, 2001). Cependant, afin d'identifier les points de blocage lors du contrôle de la reproduction de cette espèce, l'amélioration des connaissances générales de la biologie du

développement et l'établissement d'un référentiel notamment lors de l'embryogenèse sont essentiels. La période embryonnaire comporte différentes phases, décrites chez de nombreux Téléostéens et répertoriées dans les parties précédemment citées : zygote, clivage cellulaire, gastrulation, organogenèse, éclosion et embryon libre. Cette période dure entre 13 et 15 jours à 12,5 et 13,5 °C soit 165° à 195° jours (Chevey, 1925 ; Teletchea *et al.*, 2009a). Lors des études menées sur le développement de la perche commune, l'attention des auteurs s'est portée principalement sur les phases précoces de l'embryogenèse, le clivage cellulaire et la gastrulation (Figure 17A et B ; (Lereboullet, 1854 ; Chevey, 1925)). Ces recherches descriptives ont mis en évidence les caractéristiques fondamentales de l'embryogenèse, mais ont apporté peu d'éléments sur les stades clefs de développement ou l'ontogenèse de certains systèmes importants comme le système visuel ou digestif. D'après Lereboullet, les durées de la phase zygotique et de clivage cellulaire sont de 2,5h et 24h, respectivement (Lereboullet, 1854). Durant le clivage cellulaire, des irrégularités dans les plans de division ont été décrites par Chevey au stade 32 cellules (Chevey, 1925). A partir de ce moment, le clivage semble asynchrone. D'après la littérature, la transition mi-blastuléenne, précédemment décrite, est caractérisée par une perte de la synchronisation du clivage cellulaire (O'Boyle *et al.*, 2007). L'identification des stades de développement durant lesquels se déroule la transition mi-blastuléenne pourrait permettre de déterminer si le clivage asynchrone décrit chez la perche commune est lié à ce processus. La phase de gastrulation débute lors du 2<sup>ème</sup> jour post-fécondation et semble durer 55 à 60 heures (Chevey, 1925). Durant l'organogenèse, lors du 5<sup>ème</sup> jour post-fécondation, les premiers mouvements de l'embryon sont observés et décrits comme des contractions latérales s'effectuant au niveau du 10<sup>ème</sup> myotome environ. Entre les 11<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jours, les nageoires pectorales semblent bien différenciées et commencent à s'agiter, elles permettent la nage de l'embryon éclos. Juste avant l'éclosion, des glandes d'éclosion matures apparaissent uniquement au niveau de la partie antérieure de la tête de l'embryon. Elles sont distribuées de façon irrégulière et se trouvent dans une seule couche cellulaire de l'épithélium, entre les cellules péridermiques et épidermiques. Ces glandes mesurent entre 14 et 18 µm de diamètre (Reyes *et al.*, 1992) et vont libérer des enzymes pour digérer les enveloppes de l'embryon.



**Figure 17 : Développement normal de l'embryon chez la perche commune, *P. fluviatilis*.**

**A** : phase de clivage cellulaire. **B** : phase de gastrulation. **C** : embryon à 4 et 5 jours. **D** : embryon à 9 jours post-fécondation. Barre d'échelle = 1mm. D'après Chevey, 1925.

A l'éclosion, soit 14 jours post-fécondation, l'embryon présente un encéphale bien différencié, des yeux totalement pigmentés, une alimentation exogène ainsi qu'un important développement de la morphologie interne (Chevey, 1925). Selon Chevey (1925), l'éclosion et la première prise de nourriture exogène seraient concomitantes, 15 jours post-fécondation.

Au cours de l'embryogenèse, le diamètre des œufs va augmenter alors que l'épaisseur du chorion va diminuer (Reyes *et al.*, 1992). Cette diminution d'épaisseur permet à l'embryon plus de liberté de mouvements dans l'œuf mais pourrait également permettre d'améliorer la diffusion de l'oxygène dans l'œuf répondant à la demande croissante en oxygène de l'embryon (Reyes *et al.*, 1992). La température impacte de façon importante le développement embryonnaire des poissons, notamment le temps requis pour passer d'un stade de développement à un autre, entraînant ainsi une diminution de la durée nécessaire pour ce processus (Chevey, 1925 ; Guma'a, 1978). Mais elle affecte également les durées d'incubation et d'éclosion, le pourcentage d'embryons éclos (dans ce cas, de façon indirecte en impactant la survie embryonnaire) ainsi que l'âge moyen ( $A_m$ ) des embryons éclos (à 12°C,  $A_m = 14,6$  jours ; à 10°C,  $A_m = 20,9$  jours) (Swift, 1965 ; Hokanson et Kleiner, 1974). Chez des populations d'Europe de l'Ouest de perche commune, l'optimal de température permettant le bon déroulement de l'embryogenèse est compris entre 10 et 16°C. Au-delà de ces limites, les taux de mortalité durant le développement précoce de cette espèce sont importants (Swift, 1965 ; Guma'a, 1978 ; Reyes *et al.*, 1992). D'autres études ont présentés plusieurs résultats sur le développement de la perche, à des stades plus tardifs (Konstantinov, 1957) ou sur des phénomènes biologiques précis



comme la mise en place des enzymes du système digestif ou des doubles cônes de la rétine (Ahlbert, 1973 ; Cuvier-Péres et Kestemont, 2001).

Malgré l'ensemble de ces informations, des recherches plus approfondies sur le développement embryonnaire de la perche et l'ontogenèse des organes principaux sont nécessaires afin de comprendre la biologie de cette espèce, de comprendre l'apparition d'anomalies de développement durant cette période et d'améliorer l'élevage des stades les plus précoces en milieu contrôlé.

### 3. Dérégulations lors de l'embryogenèse

D'après la littérature (Sandström *et al.*, 1997 ; Żarski *et al.*, 2015), les taux de fécondation des rubans de perche commune sont très élevés dans la nature (supérieurs à 99%) ainsi que les taux de survie à l'éclosion (supérieurs à 95%) avec des taux de malformation faibles (1,78 %). Cependant, face à la variabilité de la qualité des gamètes lors d'une fécondation artificielle, différentes anomalies (mortalités précoces et malformations) peuvent apparaître (Żarski *et al.*, 2015). Malgré cela, peu d'auteurs ont étudié en détails ces différentes dérégulations.

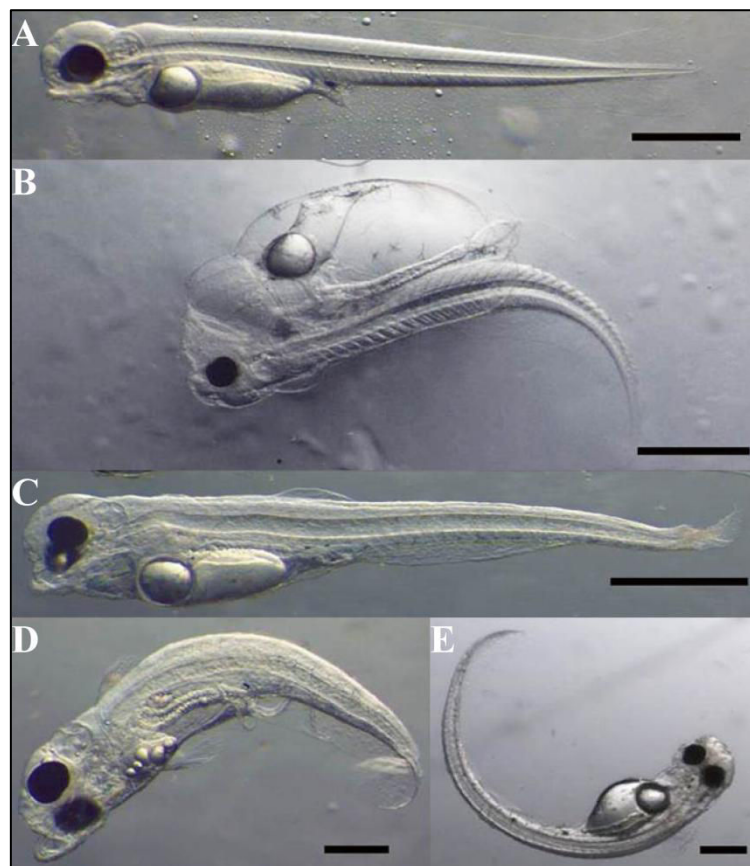
#### a) *Mortalités précoces*

Chez la perche commune, peu d'études rapportent des stades de mortalité spécifiques lors des cycles de reproduction naturels. Suite à une fécondation artificielle et à une qualité variable des rubans, des taux de mortalité élevés peuvent être calculés (Żarski *et al.*, 2015). Une des explications pourrait se trouver dans la manipulation des rubans d'œufs ou à l'agitation due au flux d'eau généré dans les éclosiers (Reyes *et al.*, 1992). De plus, certaines phases ou étapes du développement, comme l'éclosion ou la première prise de nourriture par exemple, pourraient potentiellement être des étapes critiques de mortalité élevée du fait de la présence de malformations.

#### b) *Malformations*

Peu d'études caractérisent les malformations embryonnaires et larvaires chez la perche commune. Toutefois, parmi ces études, différentes malformations ont été observées durant le développement embryonnaire dont les principales étaient des courbures anormales du tronc, des torsions de la queue et des sacs vitellins disproportionnés associés à une atrophie du tronc (Reyes *et al.*, 1992). Dans cette étude, les taux de malformation varient entre 3,38 % et 3,59 %. Ces anomalies apparaissent principalement à des stades tardifs de développement, lorsque l'embryon est bien formé, juste avant l'éclosion. Plus récemment, une étude sur la qualité des ovules (Żarski *et al.*, 2011b) a révélé différents types de malformations en relation avec le degré de fragmentation de la gouttelette lipidique de l'ovocyte : scolioses, lordoses à différents niveaux de la colonne vertébrale, malformations et œdèmes du vitellus, déformations de la mâchoire ou encore œdèmes cardiaques

(Figure 18). Ces taux de malformations varient entre 6,36 % et 86,14 %, pour les meilleures et plus mauvaises qualités de ruban, respectivement (Żarski *et al.*, 2011b). Le degré de fragmentation de la gouttelette lipidique est l'un des seuls indicateurs morphologiques prédictifs permettant d'avoir une idée de la qualité des ovules. L'identification de stades de développement clefs sujets à des anomalies de développement et la caractérisation des mortalités précoces et des malformations durant l'embryogenèse chez la perche commune sont actuellement nécessaires afin de comprendre la qualité des gamètes et ses potentielles origines ainsi que pour améliorer le succès de reproduction et la gestion des conditions d'élevage chez *P. fluviatilis*.



**Figure 18 : Larves de perche commune, *P. fluviatilis*.**

**A** : normale ; **B** : sévères malformations (œdème cardiaque et vitellin, lordose, malformation de la mâchoire) ; **C** : malformation de la mâchoire et détérioration de la queue ; **D** : plusieurs gouttelettes lipidiques dans le vitellus ; **E** : en forme de « c ». La barre d'échelle représente 0,5 mm (photos de D. Zarski). D'après Schaerlinger et Zarski, 2015.

#### **4. La perche commune : une espèce de référence pour les pondeurs printaniers précoces ?**

La diversification de nouvelles espèces d'élevage en aquaculture implique de connaître l'ensemble des données biologiques des espèces d'intérêt, notamment liées à la reproduction. Cependant, un investissement important ne peut pas être effectué sur chacune des nouvelles espèces candidates à la diversification de l'aquaculture. Afin de développer une approche générique de

l'élevage sur plusieurs espèces et utilisable dans le domaine de l'aquaculture, Teletchea *et al.* (2009) ont établi une classification de 65 espèces de poissons d'eau douce, dont la perche commune, portant sur plusieurs traits de reproduction (Figure 19) (Teletchea *et al.*, 2009a).

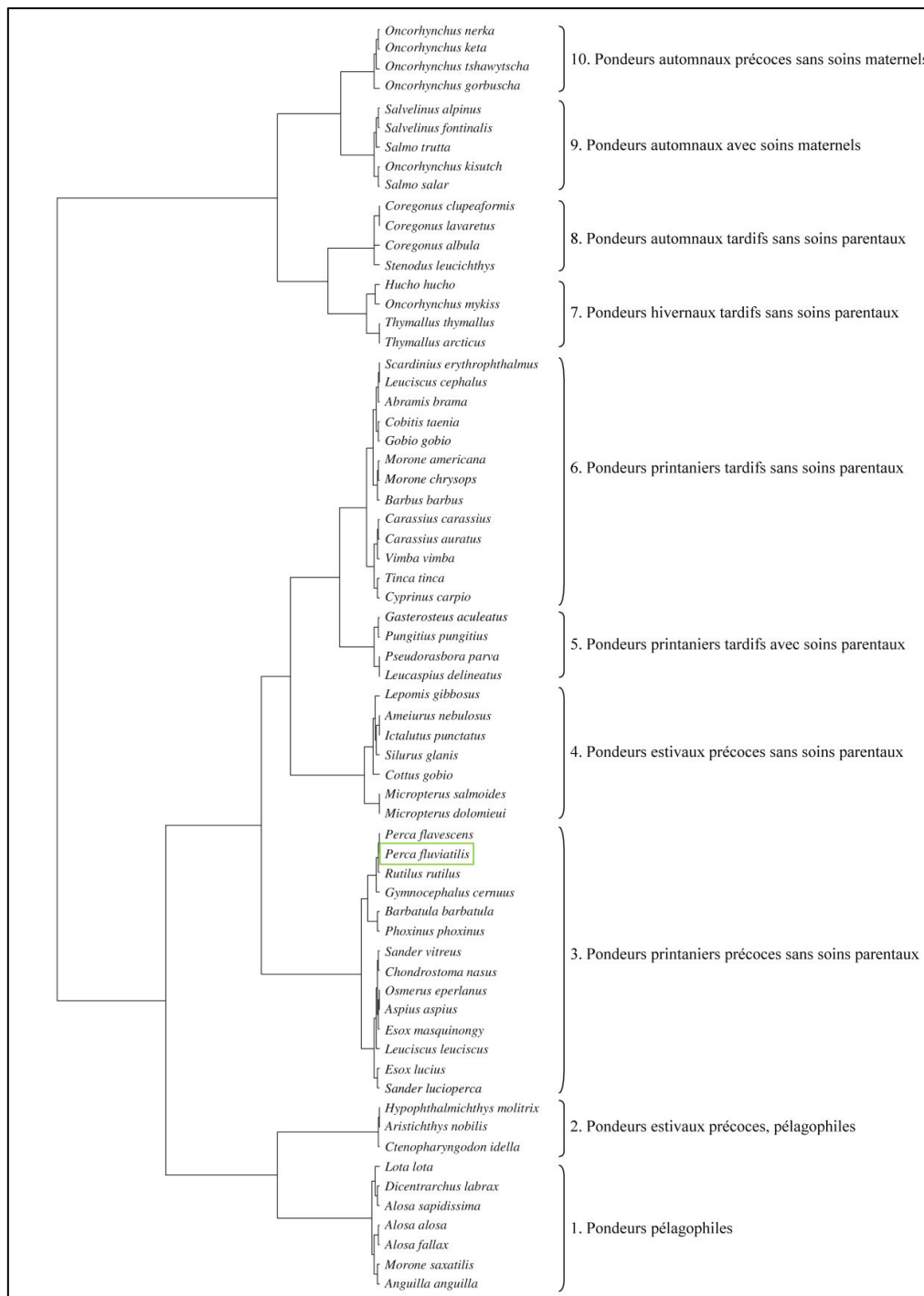


Figure 19 : Classification de 65 espèces d'eau douce selon Teletchea *et al.*, 2009a.

10 groupes de poissons ont été définis en fonction de la température, de la saison de ponte et des soins parentaux.

Cette classification a été construite à partir de 29 traits de reproduction et a permis de définir 10 groupes fonctionnels en fonction principalement de la température, de la saison de ponte et des soins parentaux. Les espèces appartenant au même groupe fonctionnel sont regroupées en fonction de leurs similarités biologiques. En se basant sur cette classification de 65 espèces de poissons d'eau douce, la perche commune semble appartenir au groupe des pondteurs printaniers précoces sans soins parentaux. En effet, la plupart des espèces appartenant à ce groupe sont caractérisées par des pontes simultanées d'ovules adhésifs sur un substrat particulier au début du printemps (principalement en mars-avril). De plus, la plupart de ces espèces ne prodiguent pas de soins parentaux à leur progéniture. Ce groupe est composé de 14 espèces différentes appartenant à 5 familles de Téléostéens : les Cyprinidés (5), les Percidés (5), les Esocidés (2), les Osméridés (1) et enfin les Balitoridés (1) (Figure 19). D'après cette classification, les espèces les plus proches de la perche commune sur des critères de reproduction sont la perchaude et le gardon, *Rutilus rutilus*.

Afin d'étudier la pertinence de la perche comme espèce de référence pour le développement embryo-larvaire, des comparaisons uniquement des traits de l'ontogenèse doivent être effectuées. La littérature actuelle nous apporte déjà quelques réponses et certaines caractéristiques de développement comme les temps d'incubation et de développement larvaire sont très similaires entre *P. fluviatilis* et *P. flavescens* (Thorpe, 1977). De plus, d'après ce qui est décrit dans la littérature, durant le développement embryonnaire, la chronologie des événements chez la perche commune est similaire à celle observée chez d'autres espèces notamment de percidés (Lereboullet, 1854 ; Chevey, 1925 ; Schaerlinger et Żarski, 2015). Par exemple, chez *P. fluviatilis* et *flavescens*, les individus sont de même apparence, présentent le même déroulement séquentiel dans la formation des organes internes ainsi que des tailles larvaires spécifiques identiques lors de la formation des nageoires (Thorpe, 1977). Néanmoins, des variations dans la durée des phases constituant l'embryogenèse sont observées. Le doré jaune (*Sander vitreus*), classé comme pondteur printanier précoce, présente pour la partie précoce de son développement des caractéristiques proches de celles de la perche commune comme les durées du clivage cellulaire, de l'éclosion et de l'organogenèse. La perchaude, quant à elle, possède la même relation que la perche commune entre le temps d'incubation des embryons et la température. Cependant, comparé à d'autres espèces de Téléostéens (bar ou tilapia), le développement embryonnaire de la perche paraît relativement long, même en tenant compte de la différence de température d'eau (Morrison *et al.*, 2001 ; Cucchi *et al.*, 2012). Une classification des poissons basée sur le développement et les traits d'ontogenèse pourrait être intéressante afin de déterminer si les résultats obtenus coïncident avec ceux de la classification de la reproduction (Teletchea *et al.*, 2009a). Des stades clefs communs de développement pourraient être identifiés afin d'améliorer leur gestion en conditions d'élevage. Cela permettrait également de tester d'autres théories des histoires de vie des poissons et de développement (Balon, 1999).

De par ses traits de reproduction, la perche commune semble être relativement proche d'une autre espèce, la perchaude. Toutefois, suite à une comparaison des traits de développement embryonnaire (notamment, durées des phases embryonnaires), *P. fluviatilis* semble proche du doré jaune. La compréhension préalable du développement de cette espèce ainsi que les dérégulations pouvant apparaître lors de ces périodes pourraient permettre d'identifier les traits de développement précoce essentiels ainsi que d'évaluer la place de la perche au sein des pondeurs printaniers précoces et de discuter de la pertinence de l'utilisation de cette espèce comme espèce de référence.

**La perche commune, *Perca fluviatilis*, est un poisson d'eau douce tempérée de la famille des percidés dont la répartition géographique s'étend de l'Europe du nord à l'Asie. Cette espèce est un des potentiels candidats à la diversification de l'aquaculture continentale depuis quelques années pour contenter un marché de niche européen. Aujourd'hui, les cycles de vie et de reproduction de la perche commune sont bien connus et permettent d'obtenir, à l'aide d'un programme photothermique, des pontes hors saison de reproduction (4 à 12 reproductions par an avec des lots de géniteurs différents). Cependant, les performances de reproduction sont encore de qualité hautement variable, ce qui constitue un point de blocage majeur pour cette jeune filière. Le principal objectif aujourd'hui est la maîtrise de la qualité des ovules produits par les femelles dans le but d'obtenir de meilleurs embryons et larves. Toutefois, avant d'investir les liens existant entre la compétence des ovules et la qualité des développements embryonnaire et larvaire, il est indispensable de définir très précisément l'ontogenèse normale des premiers stades de développement chez la perche commune. L'établissement d'une telle table de développement deviendra un référentiel permettant d'aller plus loin dans l'étude des facteurs pouvant impacter la reproduction et son succès chez cette espèce.**

# PROBLEMATIQUE

Les objectifs de ce travail s'inscrivent dans le contexte global de diversification de l'aquaculture mondiale à travers la domestication de nouvelles espèces d'intérêt aquacole dont une en particulier : la perche commune, *Perca fluviatilis*. Malgré des connaissances solides acquises sur la biologie et le contrôle du cycle de reproduction chez cette espèce, peu d'informations sont actuellement disponibles sur la régulation de la qualité des gamètes, notamment des ovules, et les liens entre la qualité des ovules et les modalités du développement post-fécondation (embryon, larve). Aussi, ma thèse vise à étudier les liens existant entre les succès et défauts de développement embryonnaire et la qualité des gamètes, dans ce contexte global d'intensification et de diversification de l'aquaculture.

Ainsi différents axes de recherche seront abordés dans ce travail :

- **Axe 1** : Etudier le développement précoce de la perche commune et définir une table de référence pour cette espèce non-modèle.
- **Axe 2** : Caractériser les défauts de développement par l'identification de malformations lors de l'embryogenèse afin d'identifier l'impact des conditions d'élevage variées, liées au mode de production en aquaculture, sur le développement embryonnaire.
- **Axe 3** : Définir de nouveaux paramètres de développement permettant d'attester du succès de développement.

Afin de faciliter la lecture ainsi que la compréhension de ce manuscrit, un récapitulatif des populations utilisées durant ces quatre années de travaux est détaillé dans le **Matériel biologique**. Les techniques et analyses statistiques spécifiques utilisées sont décrites à chaque chapitre.

Le **Chapitre I** présente l'étude de l'embryogenèse normale de la perche commune dans un contexte généralisé de biologie du développement.

Le **Chapitre II** aborde l'identification de mauvaises performances de reproduction par la caractérisation des défauts de développement embryonnaire ainsi que l'impact des deux modes d'élevage sur l'apparition de ces défauts.

Le **Chapitre III** traite de l'utilisation de nouveaux paramètres de développement qui pourraient potentiellement permettre de caractériser le succès de développement chez la perche commune. Ces paramètres seront notamment utilisés pour créer des groupes de pontes et identifier, grâce à ces derniers, des stades de mortalités précoces.

Enfin, dans la partie **Discussion et perspectives**, l'ensemble des résultats obtenus seront intégrés dans le contexte scientifique actuel. L'impact d'un processus de domestication sur le succès de développement sera notamment abordé avec des résultats préliminaires pour la perche, espèce en cours de domestication.

**MATERIEL  
BIOLOGIQUE**



Afin de répondre à l'ensemble des problématiques de cette thèse, 8 populations de diverses origines ont été utilisées lors de 3 saisons de pontes (2013, 2014 et 2015). Ces populations étaient issues d'élevage intensif en circuit fermé (*Recirculating aquaculture system* ou RAS) ou d'étangs lorrains. De fait, de nombreux paramètres diffèrent entre ces deux types de populations comme la nourriture (granulés ou naturelle), les conditions environnementales d'induction du cycle de reproduction (artificielles/contrôlées ou naturelles) mais également l'origine et les histoires de vie des géniteurs. Cependant, les protocoles de fécondation artificielle ainsi que les conditions d'incubation et la manipulation des pontes obtenues ont été identiques tout au long de ce travail. Les caractéristiques de chaque population, le nombre de pontes étudiées ainsi que leur utilisation dans chaque chapitre sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

Dans le but de caractériser le développement embryonnaire normal de la perche commune (Chapitre I), 6 populations ont été utilisées (population 1 à 6). Une partie de ces populations ont également permis d'identifier les grandes catégories de malformations chez les embryons nouvellement éclos et l'effet de deux conditions d'élevage des géniteurs sur leur apparition (Chapitre II, population 1-4, 7-8). L'intégration de l'ensemble de ces résultats et d'autres paramètres de développement (survie, éclosion, malformations) ont permis de définir des groupes de pontes aux succès de développement variables en utilisant 6 populations de perches (Chapitre III, populations 1-4, 7-8). Enfin, les populations 7 et 8 présentant deux niveaux de domestication différents (F1 et FX) ont été utilisées afin de déterminer l'impact d'un processus de domestication sur la reproduction et le développement embryonnaire de la perche. Les résultats préliminaires de cette étude seront seulement discutés dans les perspectives de cette thèse.

Dans le chapitre I, 74 pontes ont été utilisées afin de déterminer de façon précise **la table de développement embryonnaire de la perche commune**. Les embryons issus de ces pontes présentant un développement normal ont été suivis vivants mais ont également été fixés afin de réaliser des analyses histologiques de l'ontogenèse de différents organes. Le protocole précis suivi pour effectuer ces analyses histologiques est détaillé en Annexe, à la fin de ce document.

Dans le chapitre II, les embryons nouvellement éclos de 42 pontes différentes ont été observés pour identifier des **phénotypes divergents par rapport au développement normal** identifié précédemment. La caractérisation de ces catégories de malformations a été effectuée sur des embryons vivants observés et triés chaque jour de la phase d'éclosion. L'identification de ces malformations au niveau cellulaire et tissulaire a été également réalisée à l'aide d'analyses histologiques. Les pontes utilisées étant issues de deux systèmes d'élevage différents (intensif vs. extensif), **l'impact des conditions d'élevage des géniteurs sur l'apparition des malformations** a pu également être caractérisé.

Enfin, dans la dernière partie de cette thèse, chapitre III, l'ensemble des données de développement acquises durant les trois saisons de reproduction consécutives ont été analysées sur 73 pontes afin d'identifier des **groupes de pontes de succès de développement variables** en lien avec la qualité ovocytaire.

L'ensemble des techniques spécifiques aux différents chapitres sont répertoriées dans le matériel et méthode de chaque article. Les analyses statistiques réalisées sont également précisées dans les méthodes de chaque partie.

Nom de la population	Origine géographique	Pisciculteurs	Contrôle environnemental du cycle de reproduction	Nourriture	Période de ponte	Nombre de pontes étudiées	Chapitre de thèse
Population 1	Lac Léman	Lucas Perches	Artificiel RAS	Granulés	Avril 2013	20	I (13), II (7), III (20)
Population 2	Etangs Lorrains	GAEC Piscicole du Saulnois, France	Naturel étang	Proies naturelles	Avril 2013	7	I (4), II (1), III (7)
Population 3	Etangs Lorrains	GAEC Piscicole du Saulnois, France	Naturel étang	Proies naturelles	Mars 2014	6	I (6), II (5), III (6)
Population 4	Etangs Lorrains	GFA du Kuhweg, France	Naturel étang	Proies naturelles	Mars 2014	7	I (6), II (6), III (7)
Population 5	Lac Léman	Lucas Perches	Artificiel RAS	Granulés	Mars 2014	30	I (20)
Population 6	Lac Léman	ASIALOR	Artificiel RAS	Granulés et aliments congelés	Octobre 2015	4	I (4)
Population 7	Lac Léman	Lucas Perches	Artificiel RAS	Granulés et aliments congelés	Juin 2015	20	II (15), III (20)
Population 8	Lac Léman	Lucas Perches	Artificiel RAS	Granulés et aliments congelés	Juin 2015	13	II (8), III (13)

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes populations utilisées lors de ce travail de thèse.

**CHAPITRE I :  
DEVELOPPEMENT  
EMBRYONNAIRE DE LA  
PERCHE COMMUNE**

## Contexte

La biologie du développement est particulièrement importante car elle permet de définir des stades dits « normaux » de développement afin de standardiser les différentes étapes de l'ontogenèse (Hopwood, 2007). Chez les Téléostéens, un des groupes les plus diversifiés au sein des vertébrés vivant dans des environnements très variables, il existe de nombreuses stratégies de vie, de reproduction et de développement. Malgré le fait que la séquence des événements de l'ontogenèse soit peu variable, la durée des différentes phases et étapes de développement peut fluctuer en fonction de l'espèce. La mise en place d'une table de référence pour ces espèces permet alors de comprendre les histoires de vie des individus ainsi que d'identifier les mécanismes impliqués dans l'ontogenèse normale.

La période de développement embryonnaire est cruciale puisque c'est celle durant laquelle le phénotype définitif des individus est construit (Balon, 1990). Cependant, les limites de cette période, l'éclosion ou la première prise alimentaire, sont encore largement discutées dans la communauté scientifique (Kováč et Copp, 1999 ; Penaz, 2001 ; Urho, 2002 ; Teletchea et Fontaine, 2011). L'étude de ces deux processus, éclosion comme nutrition exogène sur le déroulement du développement pourrait permettre de définir les limites précises de l'embryogenèse.

Actuellement, deux écoles de pensées permettent de décrire le développement. La première, l'école graduelle, décrit le développement de façon continue et est utilisée chez de nombreuses espèces notamment modèles chez qui les variations de séquence de l'ontogenèse sont minimales (poisson zèbre, médaka ...) (Kamler, 2002). En effet, ces espèces ont été choisies pour leur facilité d'utilisation, le contrôle et la répétabilité de leur cycle. La seconde, l'école saltatoire, définit le développement comme de longs états de stabilité entrecoupés de seuils de développement plus rapide (Balon, 1986). Ce courant de pensée permet notamment d'intégrer plus de variations dans le développement et de le caractériser avec plus de souplesse. De plus, l'identification de ces seuils et étapes conduit à une comparaison plus aisée du développement inter-espèce.

Depuis plusieurs années, la perche commune est considérée comme une espèce prometteuse pour la diversification de l'aquaculture européenne. Malgré un contrôle de son cycle de reproduction en captivité, la qualité des gamètes obtenues et par conséquent les performances de reproduction sont encore variables selon les saisons et le moment de ponte (Żarski *et al.*, 2011b). Afin d'identifier les seuils de développement importants durant l'ontogenèse potentiellement sensibles et sujets aux défauts et de comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents, l'établissement d'une table de développement embryonnaire normale est nécessaire. Cette table de développement permettrait également d'établir une référence permettant l'étude de l'impact de différents facteurs sur l'ontogenèse précoce de cette espèce. De plus, en tant qu'espèce de référence des pondeurs printaniers

## CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA PERCHE COMMUNE

---

précoces, la caractérisation du développement de la perche commune parait importante afin de pouvoir potentiellement la comparer à d'autres espèces du même groupe (perchaude ou gardon, par exemple).

Les principaux objectifs de ce chapitre sont donc :

- 1) Définir une table de développement embryonnaire de la perche commune, *Perca fluviatilis* pouvant servir de référence pour d'autres espèces non-modèles;
- 2) Déterminer les principaux seuils, étapes et phases de l'embryogenèse ;
- 3) Etudier le développement des embryons en fonction du moment d'éclosion ;
- 4) Et caractériser la transition embryo-larvaire chez cette espèce.

Afin de réaliser cette étude, six populations de perche commune d'origines diverses (populations 1 à 6 issues d'étangs lorrains ou du lac Léman) et 74 pontes obtenues ont été utilisées durant 3 années consécutives de reproduction ; 2013, 2014 et 2015 (Tableau 4). Le développement embryonnaire normal de la perche a été soigneusement suivi à l'aide d'outils microscopiques (*time-lapse video*, microscopie optique) et histologiques de la fécondation à la première prise de nourriture (15 jours post-fécondation à 13°C). Les protocoles des différentes techniques utilisées ainsi que la gestion des animaux sont détaillés dans la partie *Methods* du chapitre ci-après.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique intitulé « *An alternative developmental table to describe non-model fish species embryogenesis : application to the description of the Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L. 1758) development* » et publié en décembre 2015 dans la revue « *EvoDevo* » (Alix *et al.*, 2015).

## ARTICLE 1:

### AN ALTERNATIVE DEVELOPMENTAL TABLE TO DESCRIBE NON-MODEL FISH SPECIES EMBRYOGENESIS: APPLICATION TO THE DESCRIPTION OF THE EURASIAN PERCH (*PERCA FLUVIATILIS* L. 1758) DEVELOPMENT

---

Maud Alix, Dominique Chardard, Yannick Ledoré, Pascal Fontaine and Bérénice Schaerlinger

UR AFPA, Université de Lorraine - INRA, 2 Avenue de la Forêt de Haye, BP 172, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Article publié dans la revue *Evo-Devo* (2015) – 6 : 39

#### I. Abstract

**Background:** Fish correspond to the most diversified phylum among vertebrates with a large variety of species. Even if general features are distinguishable during the embryogenesis, several differences in term of timing, organ implementation or step progression always occur between species. Moreover, the developmental timing of wild non-model fish often presents variability within a species. In that context, it is necessary to define a model of developmental table flexible enough to describe fish development by integrating this variability and allow intra- and inter-specific comparisons. The elaboration of a model passes by the definition of new stages that could be easily observable on individuals. The present study aims at proposing such a model and describing accurately the Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) embryogenesis using microscopic techniques among which time-lapse video and histological studies. The Eurasian perch belongs to the *Percidae* family that includes 235 species classified in 11 genera. It is a member of the *Perca* gender and inhabits the Northern part of Europe and Asia.

**Results:** At 13°C, *P. fluviatilis* development elapses for 15 days from the fertilization to the first oral feeding. The staging division first took into account the cellular status to define periods, then the acquisition of new abilities by the embryo to further define stages. It allowed distinguishing 2 main stages during the cell cleavage period depending on the synchronization of the cell divisions, 2 stages during the gastrulation period depending on the cell speed migration and 5 stages during the organogenesis according to the acquisition of key abilities as proposed in the saltatory theory. During each stage, organs implementation was carefully followed with a particular attention for the visual and digestive systems. In addition, our study shows that embryos hatch at various developmental stages while they all begin to feed at a fixed date, 15 days after the fertilization whatever the spawn and the hatching date. This data give arguments to propose the first oral feeding as the best definition of the embryonic-to-larval transition.

## CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA PERCHE COMMUNE

---

**Conclusions:** The present model of developmental table combines flexibility and accuracy allowing detailed description of non-model fish species and intra- and inter-specific comparisons.

**Keywords:** *Perca fluviatilis*, Developmental table, Histology, Embryogenesis description, Digestive system ontogeny, Visual system ontogeny.



## II. Background

Fish species have colonized numerous ecological niches allowing them to evolve and be adapted to various environments. As a consequence, fish represent the most diversified vertebrates regarding their lifestyle, shape, physiology, reproduction or development to quote only them. In that context, numerous developmental tables of various fish species have been published (e.g. the following recent studies (Iwamatsu, 2004 ; Hinaux *et al.*, 2011 ; Cucchi *et al.*, 2012 ; Ott *et al.*, 2012 ; Tsai *et al.*, 2013). Besides common features, numerous differences emerge between fish species making difficult the standardization of embryogenesis staging. Two main description ways of the fish embryonic development co-exist. The first way mainly follows continuous morphological modifications of the embryos as for zebrafish, medaka or goldfish for example (Kimmel *et al.*, 1995 ; Iwamatsu, 2004 ; Tsai *et al.*, 2013). Each step is accurately identified and some precise morphological criteria as the somites differentiation are used as the time scale of the organogenesis period (e.g. (Kimmel *et al.*, 1995). These fish are model species and represent teleosts fish in the developmental biology field. The description of their development needs to follow some accurate standards for comparative biology. However, these fish were mainly chosen as model for practical reasons as their ease of rearing in laboratory conditions, their short developmental period, their size or access to genetic tools compared to other fish species. Furthermore, they are well adapted to their rearing conditions and their development is very regular, allowing an acute repeatability in term of timing in controlled conditions. Nevertheless, the embryogenesis progress of non model species is often less repeatable at a specific temperature (Schaerlinger et Żarski, 2015). For example, during the cell cleavage of the walleye, authors mentioned from the beginning that they observed individual variations leading to different number of blastomere whatever the time (McElman et Balon, 1979). In addition, the mechanisms regulating somitogenesis and other organs ontogeny may not be synchronous in all individuals, rendering such model of developmental table is quite difficult to apply.

Another way to describe fish development takes into account these variations allowing more flexibility. Balon (2002) observed that fish embryogenesis progress by fits and starts (Balon, 2002). He thus proposed that ontogeny can be divided into two kinds of stages named thresholds and steps (Balon, 1979, 2002). Thresholds allow describing the sudden acquisition of a new ability. Their sequence highlights key stages allowing individuals to reach a new developmental level. During steps, slow and continuous development of several organs is observed before that sudden acquisition of a new ability and thus a new threshold. This approach permits a better description of the common features observed in various fish species while taking into account potential intra and inter-specific variations. However, in the studies performed with this model, fish development is often less accurately described.

Instead of opposing these two schools, it would thus be more profitable for scientists to take into account advantages of each model and improve accuracy while facilitating intra and inter-specific comparisons of fish development. To do so, it would be interesting to trace the accurate description of organs ontology performed in the first model on a time scale different from somitogenesis. In this condition, the definition of steps and thresholds as a new time scale would be more flexible. The present work aims at describing organs ontogeny in order to define precisely steps and thresholds and make an accurate timing of perch early development.

Another definition opposing scientists is the question of the embryonic-to-larval transition (Kováč et Copp, 1999). Indeed, while it is commonly admitted that the starting point of the embryogenesis corresponds to the egg activation occurring at the ova releasing in the water (Penaz, 2001 ; Balon, 2002), the end of the embryogenesis is defined either by the hatching or the first oral feeding depending on the authors (for review (Penaz, 2001 ; Balon, 2002 ; Urho, 2002)). From a general point of view, the first definition of an embryo corresponds to a specific period of the development during which individuals are protected by an envelope (Penaz, 2001 ; Urho, 2002) or a gelatinous layer surrounding the embryo that is called gangue (Formicki *et al.*, 2009). In the meantime, larva mainly defines the developmental period elapsing from the hatching to the juvenile stage often characterized by the metamorphosis. These definitions are used for several animal taxa (e.g. insects, molluscs, amphibians...). In addition, several authors argue that hatching corresponds to an important stage because individuals are suddenly subjected to a new environment defined by physico-chemical parameters (e.g. pH, oxygen...) different from those they got used. These sudden modifications force embryos to change their behavior and physiology (Penaz, 2001 ; Urho, 2002). On the other hand, other scientists argue that embryos are only dependent upon reserves accumulated in the egg during oogenesis while the larval period corresponds to a step during which animal development needs external supply of energy, nutrients and material to continue. The embryonic period, then, allows the animals to acquire full abilities to chase their preys or protect themselves from predators at larval stages. In that context, the embryonic-to-larval transition rather takes place during the first oral feeding (Balon, 2002). In comparison, hatching mostly corresponds to a long period within a spawn, while the first food intake occurs during a narrower timing for a numerous number of fish species although this statement is not common for every fish species because some of them display synchronous hatching (Urho, 2002 ; Korwin-Kossakowski, 2012). However, defining the first oral feeding as the embryonic-to-larval transition implies to make a difference between the development before and after hatching. In these conditions, individuals developing outside the protective chorion are defined as “free embryos” (Balon, 2002).

The present study aims at describing Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) embryogenesis. It is a temperate freshwater fish species that inhabits from Northern countries of Europe to the North-East Asia, with some introduced populations in Southern countries of Europe and some countries of the

South hemisphere (Bruslé et Quignard, 2001 ; Kottelat et Freyhof, 2007). Its flesh is appreciated and the Eurasian perch belongs among the most promising fish species to promote freshwater fish diversification (Sulistyo *et al.*, 1998 ; Fontaine, 2009 ; Źarski *et al.*, 2012a). Perch domestication is still under process and its reproduction has already been investigated allowing a good knowledge of its reproduction cycle (Gillet *et al.*, 1995 ; Sandström *et al.*, 1997 ; Sulistyo *et al.*, 1998 ; Migaud *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2006, 2010 ; Źarski *et al.*, 2012a, 2012b ; Targońska *et al.*, 2014), egg quality (Źarski *et al.*, 2011b ; Castets *et al.*, 2012) and larval development (Konstantinov, 1957). However, only few studies investigated perch embryonic development (Lereboullet, 1854 ; Chevey, 1925 ; Alix *et al.*, 2013). In 1854, Lereboullet performed the first description that was quite precise from the fertilization to the disappearance of the yolk. The author divided perch embryogenesis into 4 phases: (i) cell cleavage and gastrulation, (ii) from the beginning of the organogenesis to the first heart beatings, (iii) from heart beatings to hatching and (iv) from hatching to the yolk disappearance (Lereboullet, 1854). He focused his description on the circulatory and intestinal systems. Later, in 1925, Chevey mainly focused his attention on the cell cleavage and the gastrulation but poorly described organs differentiations until hatching (Chevey, 1925). In the lab, a preliminary study allowed us to determine large periods of perch development (Alix *et al.*, 2013). Eurasian perch belongs to the percidae family that is divided into 11 genders: *Amnocypta*, *Crystallaria*, *Etheostoma*, *Gymnocephalus*, *Perca*, *Percarina*, *Percina*, *Nothonotus*, *Romanichthys*, *Sander* and *Zingel*. With the American yellow perch (*Perca flavescens*) and the Balkhash perch (*Perca schrenkii*), they compose the *Perca* gender. Its reproduction cycle lasts for about 9-10 months and its natural spawning season begins when the water temperature reaches around 12°C (Gillet *et al.*, 1995) and elapses from mid-March to June depending on the geographical localization. Perch are group-synchronous fish meaning that their gonadogenesis is synchronous and that one female spawns at one time all its eggs (Wang *et al.*, 2010). Its gonadogenesis is under the control of the water temperature and the photoperiod. Recent studies aimed at developing a photothermal program allowing obtaining spawn in artificial controlled conditions (indoor) and even out-of-season reproduction (Fontaine *et al.*, 2015b). However, it appears that the reproduction success is highly variable with important developmental impairments during early embryogenesis (personal observations). To better understand the reasons and the consequences of these developmental defects, it is essential to better characterize *Perca fluviatilis* early development and define a developmental table as a reference.

In order to describe accurately the Eurasian perch embryogenesis, time-lapse video and histological techniques were used. Data show that while hatching can elapse for 5 days and that individuals hatch at different developmental stages, all embryos first feed 15 days after the fertilization whatever their hatching dates. These data suggest that the first oral feeding rather represents a threshold as defined by Balon and thus is more accurate to define the embryonic-to-larval transition (Balon, 2002). In these conditions, the total duration of *P. fluviatilis* embryonic development elapses

## **CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA PERCHE COMMUNE**

---

for 15 days at 13°C, from the fertilization to the first oral feeding. The first main division of the development was performed according to the cellular state (cell division, migration or differentiation) to separate zygote, cell cleavage, gastrulation and organogenesis periods. Those periods were then further cut into intervals separated by well defined thresholds. In addition, we focused a particular attention to the digestive and visual systems ontogeny throughout embryogenesis because they play an important role, later, during larval stages.

### III. Methods

#### A. Origin of fish, broodstock

Fish were handled in accordance with national and international guidelines for protection of animal welfare (*Directive 2010/63/EU*). The natural spawning season of *P. fluviatilis* elapses from mid-March to the end of May in the East part of France (Lorraine). In order to have an accurate timing of the Eurasian perch development's progress, three independent experiments have been conducted on fish with diverse origins in 2013, 2014 and 2015. During the first season (April-May 2013), the experiment was performed on two groups of breeders: (i) fish (Geneva Lake origin) provided by fish-farm "Lucas Perches" (Hampont, France) that were induced in tanks using the photo-thermal (Fontaine *et al.*, 2015b) (Population 1) and (ii) perch caught in ponds (provided by the GAEC Piscicole du Saulnois, France) (Population 2). During the second season (March-April 2014), three groups of breeders were used. Two populations were caught in ponds and provided by the GAEC Piscicole du Saulnois and the GFA du Kuhweg (Lorraine, France) (Populations 3 and 4). The third one (Geneva Lake origin) was provided by the intensive fish-farm "Lucas Perches" (Hampont, France) (Population 5). Their reproduction cycle was induced in our indoor facilities in 500 L according to Fontaine *et al.*, (Fontaine *et al.*, 2015b). During the third season (October 2015), one group of breeders originating from the Geneva Lake and provided by the fish-farm "ASIALOR" (Pierreviller, France) was used (Population 6). They were induced in tanks using the photo-thermal program (Fontaine *et al.*, 2015b). Breeders from the first population were kept in indoor tanks and submitted to artificial conditions all along the reproduction cycle and the spawning season. Breeders caught in ponds (Populations 2, 3 and 4) were transferred, one month before the natural spawning season, in our outdoor facilities consisting of a recirculating system (tanks of 3000 L, Laneuvelotte, Lorraine, France). Breeders from the fifth population were also transferred from indoor tanks into our outdoor facilities before the spawning season. Breeders from the sixth population staid in the fishfarm and eggs ribbons from 4 females were collected and transferred in our indoor facilities 6 days after the fertilization.

#### B. Hatcheries management and water quality

Each incubator consists on a water recirculating system of 1400 liters with a flow rate of 18 m<sup>3</sup>/hour. They were under municipal water system and air and water's thermoregulation was maintained with air-conditioning and refrigerating unit (2200 W). In the first incubator, used for the daily following of the embryonic development, egg ribbons (17000 to 84000 eggs) were transferred in large crates allowing aeration thanks to a continuous vertical water current in each crate. For large spawn several crates were used per spawn. In the second incubator, 3 samples of ribbons (around 100 eggs/sample) for each spawn were kept in baskets until hatching in order to determine hatching time and duration. Baskets were aerated thanks to the water flow. So, for every spawn, some embryos were

incubated in each of the incubators. This division was done to optimize the space in hatcheries and facilitate our organization. No difference of hatching timing and duration was observed between samples of one spawn in the different incubators. The optimal water temperature for perch development has been defined as 13°C (Saat et Veersatu, 1996). In the present work the mean temperature was kept at 13.0°C ± 0.5°C in all hatcheries during each season. A constant dark/light photoperiod (8:16) was applied with two neon lamps at a light intensity of 200 lx at the water surface. Water levels of pH (8.19 ± 0.09), dissolved oxygen (9.84 ± 0.16 mg/L), nitrite (0.16 ± 0.16 mg/L) and ammonium (0.17 ± 0.17 mg/L and 1.08 ± 0.95 mg/L, in 2013 and 2014, respectively) were monitored twice a week in breeders' tanks (indoor and outdoor) and in the hatcheries. In order to prevent bacterial or fungal infections, experimenter used footbath, antibacterial solution for hand and the water was sterilized with UV.

### C. Gametes collection and fertilization

*Perca fluviatilis* has a group-synchronous oogenesis but within a population all females don't spawn exactly at the same time and thus the spawning period can elapse from 3 to 5 weeks within a broodstock. The beginning of the spawning season was considered as triggered once the first ribbon was observed in a tank. From that time, each perch was caught daily in order to check specifically its reproductive status. Once a female was mature (apparition of a blister at the genital orifice), it was stripped to collect ova in dry glass beakers. Their activation was done for 15 seconds by the addition of water from breeders tanks (Żarski *et al.*, 2012a). Subsequently, *in vitro* fertilizations were performed by adding to the ova a mixture of sperm of three different males in order to optimize the fertilization success.

### D. Study of the developmental progress by microscopy and time lapse microscopy

Fish early embryogenesis was followed by time lapse microscopy on embryos originating from 13 spawn (total number of records= 54) from the first cell cleavage (2.5 hpf) to the beginning of the organogenesis (99.5 hpf) when the muscle contractions prevented to perform properly the time lapse experiment. The increase of water temperature under the microscope can modify the developmental speed of the embryos observed in comparison to those from the same spawn staying in incubators. In order to avoid bad recording of the developmental timing, embryos were removed after one hour of development. Then, new embryos from the hatchery were transferred into a Petri dish filled with fresh water and placed under the microscope. In this condition, the developmental timing recorded, was respecting the one observed in the incubator. The time lapse microscopy was performed using a light upright optical microscope (Nikon Eclipse Ni-U) associated with a DS-Fi2 digital camera and the software NIS BR (Nikon France, Champigny-sur-Marne, France). A picture was taken every

40 seconds or every minute depending on the process velocity. Pictures were taken at low magnification (x2).

From day 3 post-fertilization, embryos from 36 spawn have been observed to describe organogenesis. Among these spawn, 13 were submitted to a careful daily following ( $n > 3$  embryos/spawn/day). Embryos were sampled once or twice a day for microscopic observations. The jelly coat was removed using micro-dissecting forceps under a binocular microscope. In order to create all-in-focus pictures for some samples, we used the “Extended Depth of Focus” (EDF) option of the software. Moreover, large images were taken thanks to “Grab a large image” option of the software. Pictures were taken at low magnification (x2). The embryonic total length was measured daily on fixed embryos (3 spawn, 15 embryos/spawn/day) using the Nikon BR software. Data are presented as a mean value  $\pm$  standard deviation.

### **E. Fixation and histology**

Embryos were sampled once a day from 1 dpf to 15 dpf and fixed in Bouin’s solution for 48 hours before being washed and conserved in 70% alcohol. In order to facilitate their cutting orientation, embryos were first placed in 1.5% agarose blocks. These blocks were then dehydrated in ascending series of ethanol (70-100%) before being embedded in paraffin. Four micrometer sections were performed with a Leitz Wetzlar microtome and collected on glass slides. Hematoxylin and Eosin staining were performed according to a protocol adapted from Gabe (Gabe, 1968) as follows: Eosin Y (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was diluted in water at 1% and used from 30 seconds to 1 minute; Hematoxylin solution modified according to Gill III (Merck, Darmstadt, Germany) was used from 5 to 10 minutes. Stained sections were examined using a light upright optical microscope (Nikon Eclipse Ni-U) at x10 and x40 magnifications (Nikon France, Champigny-sur-Marne, France). In total, 45 embryos from 11 spawn have been used for the histological study. Three embryos were transversally cut per day from 4 to 15 dpf. In addition, three embryos were longitudinally cut at 5, 10 and 15 dpf.

### **F. Determination of the first oral feeding period**

Two independent experiments were used to determine the first oral feeding (one in 2014 and the other one in 2015). In the first one, fifty embryos randomly chosen from 6 spawn were used and in the second one 4 spawn ( $n=4$  to 10 for each condition). The hatching period was checked daily until the first hatching. Each day of hatching all embryos were taken and put in a new crate. Hatching dates elapsed from 8 dpf to 14 dpf depending on the spawn for the first experiment and from 9-14 dpf for the second one (e.g. for the second experiment, spawn 1 hatched between 11 and 13 dpf; spawn 2 between 9 and 12 dpf; spawn 3 and 4 between 9 and 14 dpf). All spawn were kept and studied in the same conditions within one experiment. Embryos were taken at their date of hatching and kept in 1-2L beakers in the first experiment or in 50 mL tubes in the second experiment. This difference of



methodology is due to technical reasons in our hatcheries. In every case, containers were filled with the water of the hatchery and plunged in the hatchery to maintain the water temperature around 13°C. Each container corresponds to one group of embryos coming from the same spawn and that hatched at the same dates. So for one spawn, there was as much container as hatching dates and each spawn was independently studied in both experiments. In the beakers, the volume of water was large enough to allow oxygenation for several hours. The 50 mL tubes contained 40 mL of water. No lethality was observed while embryos were in the tubes suggesting that there was no problem of oxygenation. Rinsed alive *Artemia* nauplii (Catvis, Size: EG) were supplied as food to embryos daily from hatching (20 mL ; density = 10 to 14/mL). After two hours with *Artemia*, the digestive system of alive free embryos was observed using binocular Olympus (SZX7) at low magnification (x2). As embryos are transparent, the presence of artemia was easily detectable in the digestive tract. If the embryos didn't eat, the water was changed in the beakers to perform another time the experiment in the experiment one. In the experiment two, new embryos taken from the same crate were used to continue the experiment. Once embryos ate, they were submitted to an overdose of Tricaine methanesulfonate (200-300 mg/L; Sigma-Aldrich) until they die according to the European Ethical guidelines (Directive 2010/63/UE).

### **G. Comparison of the developmental process between free and embedded embryos.**

The goal of this experiment was to clarify whether embryos that hatch early developed with the same speed than those of the same spawn that still remained in the envelope. The experiment was performed on 4 spawn from the population 6. The developmental process was assessed thanks to the apparition of 12 easily observable criteria as followed from the earliest to the latest: the presence of melanophores on the body, the eyes pigmentation, the circulation in the yolk and later on the ventral part of the embryos, their straightening, the apparition of the urinary bladder, the bile, the beginning of the peristaltic undulations, the observation of coordinated fins movements and later the jaw quivering, the mouth opening and finally the first oral feeding. In addition the size of naturally hatched embryos was measured at low magnification (x2) from their hatching to the first oral feeding (n=3 spawn). Data were treated according to (Trabelsi *et al.*, 2013) using the Nikon BR software and are presented as a mean value  $\pm$  standard deviation. During the hatching period, embryos were monitored daily to determine their hatching dates. Three newly hatched embryos per spawn were sampled everyday and isolated in small cages kept in the hatchery until their first oral feeding. In this manner, it was possible to follow the progression of their development of every individual from their hatching date. Every day, from the first hatching, a sample of 3 embryos per spawn that were still embedded, were removed from the gangue with forceps. Once they were observed, these embryos were removed from the experiment and a new batch of not yet hatch embryo was freed to be used the next day. Three categories of embryos were distinguished: NHE for newly hatched embryos corresponding to their



state when the naturally hatched. Later, they became FE (free embryos) that corresponds to the same embryos but from the day after their hatching. Finally, UE correspond to unhatched embryos that were removed from the envelope with forceps. All embryos were observed under a light upright optical microscope (Nikon Eclipse Ni-U) at x2, x4, x10 and x40 magnifications (Nikon France, Champigny-sur-Marne, France). The apparition of each criterion was recorded daily for each embryo until they first feed. The comparison between the new hatched embryos and their not yet hatched counterparts was done to determine whether there were differences of developmental rate once the embryo leave its envelope.

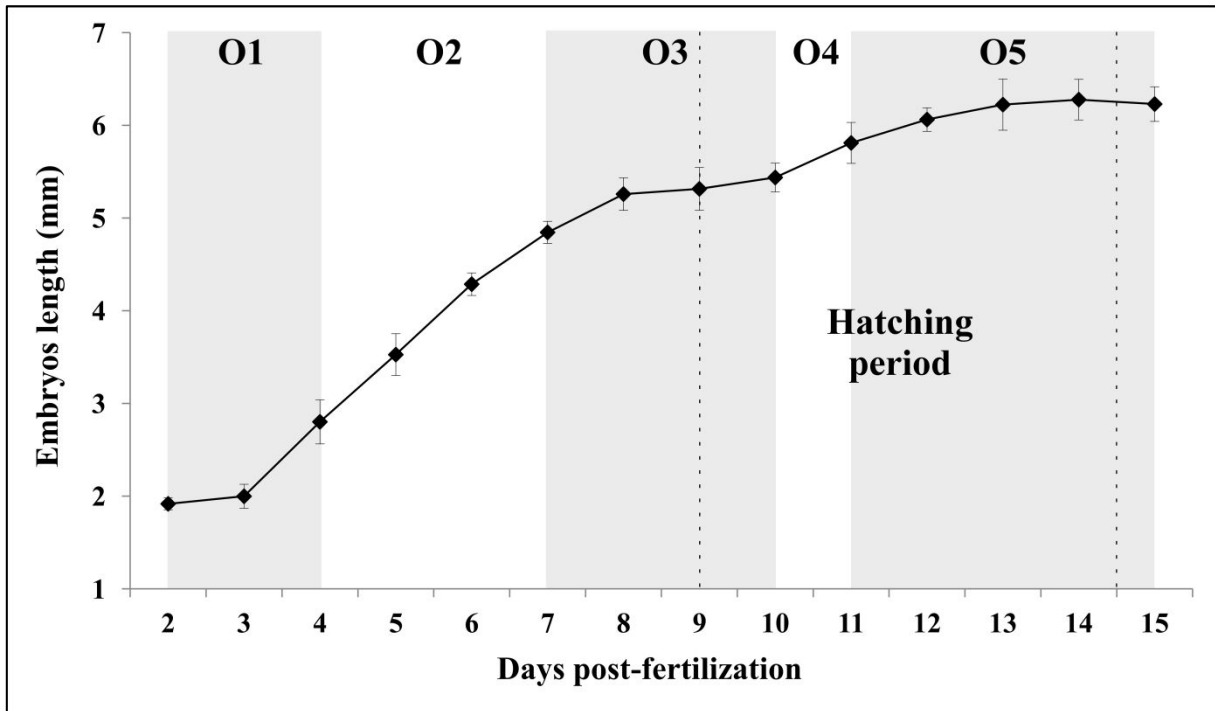
### **H. Statistical analysis**

The water quality parameter data are presented as mean  $\pm$ SD. The normality and homogeneity of variances were tested using a Levene test. A one-way analysis of variances (ANOVA) was performed with one factor (year of experiment). The minimum level of significance was set at  $p < 0.05$ . When data didn't respect the assumptions of normality, a Kruskal-Wallis test followed by a non-parametric Mann-Whitney test were performed.

For the morphometric measurement performed to determine the size difference between free and embedded embryos, data are presented as mean  $\pm$  SD. The normality and homogeneity of variances were tested using a Levene test. A two-way analysis of variances (ANOVA) was performed with two independent factors (factor 1=groups NHE, UE, FE and factor 2=time) followed by Bonferroni's post-hoc tests to determine significant differences. The minimum level of significance was set at  $p < 0.05$ . When data didn't respect the assumptions of normality, a Kruskal-Wallis test followed by a non-parametric Mann-Whitney test were performed. All the statistical analyses were performed using STATISTICA 12.0 program (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, US).

IV. Results

Fish embryogenesis begins when the ova is activated, allowing the fertilization and ends at the first oral feeding. It lasts for 15 days at a constant temperature of  $13 \pm 0.5$  °C (195 degree days). The mean embryonic total length increases from 0.98 mm (zygote diameter) to 6.23 mm at the time of the first exogenous feeding (Figure 20). The embryonic growth is fast during the first steps of the organogenesis period and slows down before the hatching period until the end of the study. In the present work, the starting time corresponds to the fertilization.



**Figure 20: Embryonic total length during the organogenesis period.**

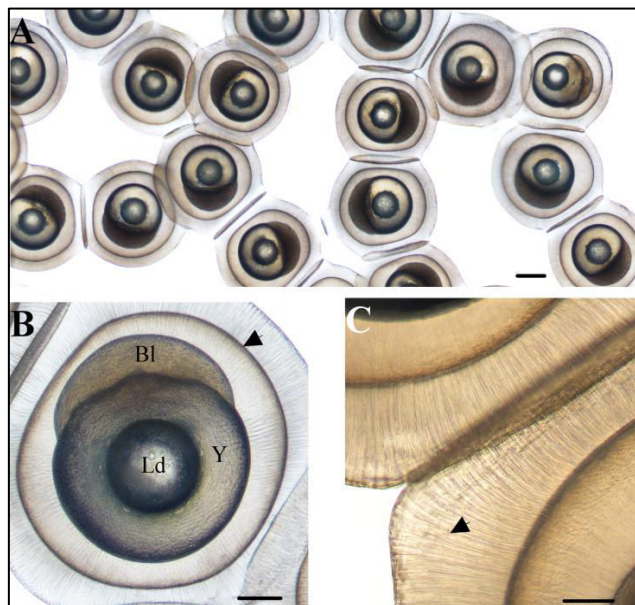
Every day 15 embryos/spawn were measured (3 spawns). Data correspond to the mean value of the 3 different spawns  $\pm$  SD. The five organogenesis periods are given for information (O1 to O5) and the peak of the hatching period is presented between the dotted lines.

**A. The zygote period (0-2.5 hpf)**

The zygote is surrounded by a thin chorion (Figure 21B, arrowhead) and a large gelatinous envelope (or jelly coat) organized with tubular structures (Figure 21C) called *zona radiata externa* as previously described by Formicki et al. (Formicki *et al.*, 2009). It allows maintaining the eggs together and forming a ribbon (Figure 21A). After the fertilization, the mean zygote diameter is  $0.98 \pm 0.065$  mm, without the jelly coat. A lipid droplet is present on the vitelline reserve (Figure 21B) that is most of the time unique but can sometimes be divided into several smaller droplets. At the animal pole, the cytoplasm separates from the yolk to form the blastodisc.

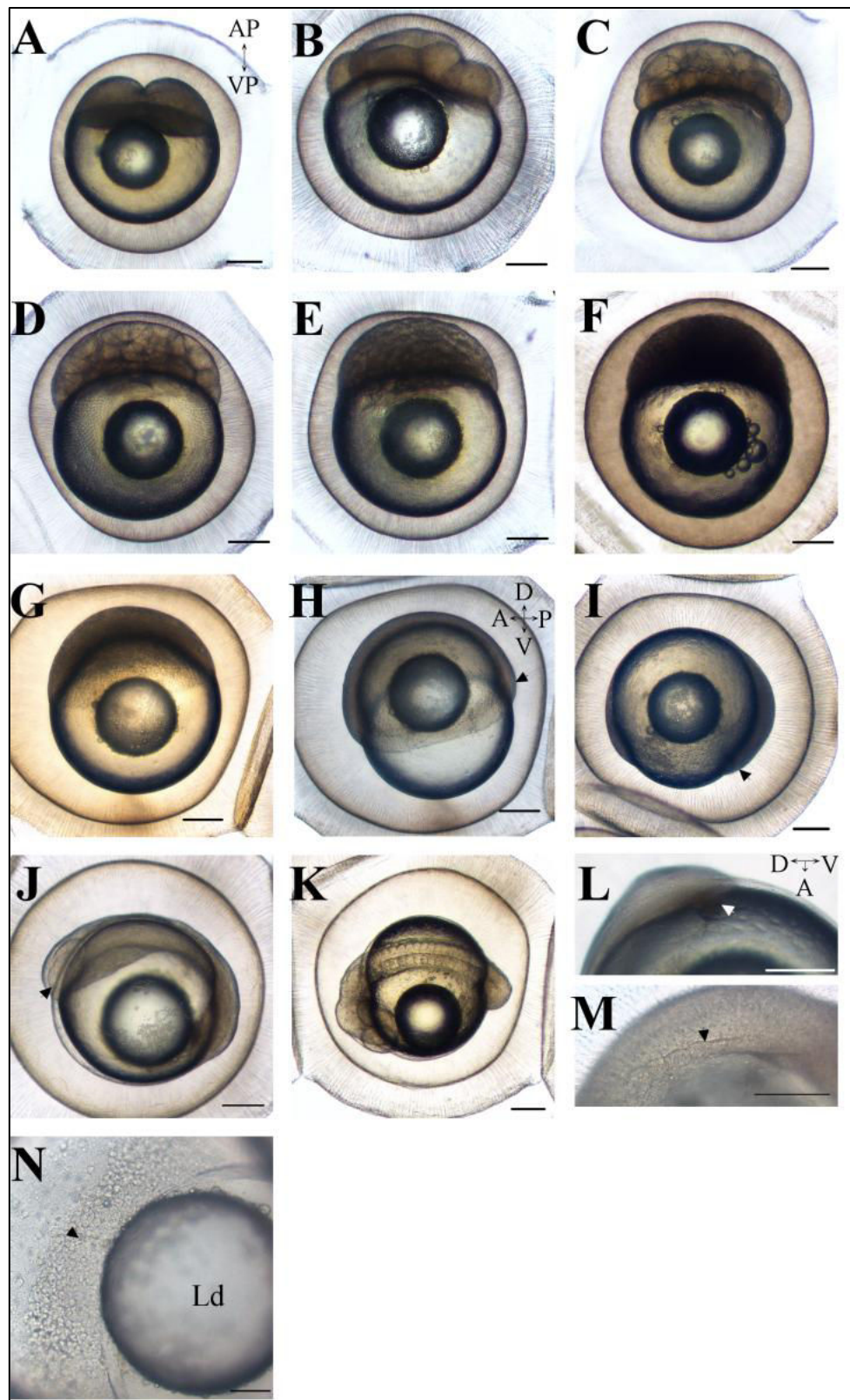
### B. The cell cleavage period (2.5-24 hpf)

The first cleavage (2.5-4 hpf) follows the animal to vegetative poles axis and results in two large cells of equivalent size (Figure 22A). Between 4 and 5 hpf, the second cleavage occurs perpendicularly to the first division but still in the animal to vegetative poles axis generating four blastomeres. The eight-cell stage occurs between 5 and 6 hpf by cutting the blastoderm perpendicularly from the animal to the vegetative pole in order to obtain two rows of 4 cells (Figure 22B). The next cleavages cut the embryo either along the animal to vegetative axis or perpendicular to it (Figure 22D-F). Surprisingly, divisions are accompanied by waving movements coming from the yolk to the animal pole that is strong during the first cell divisions (Additional file 1) but become less important later in the process (Additional file 2). This loss of yolk contractions is accompanied by an asynchrony of cell divisions appearing between 64 and 128 cells stage and later a slowing down of the cell division from the stage 512 cells (Table 5). These differences allow us to separate the cell cleavage period into two steps “Cell cleavage 1” (CC1) and “Cell cleavage 2” (CC2) for the synchronous and asynchronous steps, respectively. However, the cell division doesn't have the same rate for every embryo and within a spawn this period is not synchronous between neighbor embryos or between spawn, rendering difficult an accurate timing of this period. In spite of this heterogeneity, the end of the cleavage period is always at 24 hpf.



**Figure 21: Morphological characterization of *P. fluviatilis* spawn and zygote.**

(A) Perch embryos embedded in the jelly coat allowing forming a ribbon of eggs. The scale bar represents 500  $\mu\text{m}$  (B) Face view of zygote stage. (Bl) blastoderm (Y) yolk (Ld) lipid droplet. The chorion (arrowhead) surrounds the zygote. The scale bar represents 250  $\mu\text{m}$ . (C) Detail of jelly coat presenting tubular structures (arrowhead). The scale bar represents 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 22: Cell cleavage and gastrulation periods.**

A-J, Face view of (A) Two-cell stage (3.25 hpf) at the animal pole of the embryo ((AP) animal pole, (VP) vegetative pole) (B) Height-cell stage (5.5 hpf) (C) 32 cells stage (8 hpf) (D) 128 cells stage (9.5 hpf) (E) 512 cells stage (11.5 hpf) (F) High blastula (14.25 hpf) (G) 30%-epiboly stage (25.75 hpf) (H) 50 %-epiboly stage (31.25 hpf) The antero-posterior AP and dorso-ventral DV axes can be determined for the first time. The arrowhead highlights the posterior part of the germring (I) 90%-epiboly stage (40.25 hpf). The arrowhead highlights the posterior part of the germring (J) Embryo at the beginning of the somitogenesis (4-6 somites, 64 hpf). Embryonic axes are well defined, the arrowhead shows optic capsules (K) Embryo during the O1 period (81 hpf) (L) Detail of kupffer's vesicle (arrowhead), (52.75 hpf) (M) Detail of the somites (arrowhead) (64 hpf) (N) The yolk syncytial layer with numerous nuclei (arrowhead) ((Ld) lipid droplet). The scale bar represents 250  $\mu\text{m}$  (A-M) and 100  $\mu\text{m}$  for N.

Stage	Mean Duration (h)
2 cells	1.5
4 cells	1
8 cells	1
16 cells	1.5
32 cells	1
64 cells	1.25
<i>128 cells</i>	<i>1</i>
<i>256 cells</i>	<i>1.5</i>
<i>512 cells</i>	<i>3</i>
<i>1024 cells</i>	<i>2</i>

**Table 5: Durations of cell cleavages from 2 cells to the high blastula stage.**

From 128 cells stage, the cell cleavage becomes asynchronous (italic).

### C. The gastrulation period (24-50 hpf)

The gastrulation is defined as the period during which cellular movements (involution, convergence and extension) of the blastoderm tend to form the embryonic axis and the organization of the germcell layers: the epiblast that will give rise to a part of the ectoderm, the hypoblast that corresponds to the future mesoderm and endoderm (Kimmel *et al.*, 1995). First, epiboly movements begin at 24 hpf and the cellular front reaches 30% of epiboly at 25.75 hpf (Figure 22G, Table 6) and 50% of yolk surface at 29.50 hpf (Figure 22H, Table 6). At that stage, asymmetric thickening of opposite extremities of the embryos corresponding to the embryonic shield stage is observed, allowing the first visualization of the antero-posterior axis (Additional file 3). Until 70% of epiboly, the cell progression along the yolk is regular and fast. It corresponds to the step gastrulation 1 (G1). During the second step (G2), from 70%-epiboly stage, the cellular front progresses more slowly. The germ ring compresses the yolk (31.25 hpf) and the posterior end of the embryo can be distinguished (Additional file 3). Later both extremities of the embryo continue to thicken even if the posterior part always remains thicker until the 90%-epiboly stage (Figure 22I, 40.25 hpf). The yolk syncytial layer (YSL) corresponding to a multinucleated cell layer between the yolk and the blastomeres is visible (Figure 22N). This structure is observed later during embryogenesis. In contrast to the walleye (McElman et Balon, 1979), except for some rare cases, no embryonic rotation has been observed during perch gastrulation.

### D. The organogenesis period (50 hpf to 15 dpf)

During this period, cells begin to differentiate in order to achieve organs implementation. Only key steps of the development of several organs from 3 dpf to 15 dpf are described: organogenesis has thus been divided into 5 steps separated by well-defined thresholds. Then, the description of the digestive and visual systems developments is presented.



## CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA PERCHE COMMUNE

Stage	Apparition
30 % epiboly	25.75 hpf
50 % epiboly	29.50 hpf
70 % epiboly	31.25 hpf
80 % epiboly	36.25 hpf
90 % epiboly	40.25 hpf
Tailbud	51.75 hpf
3 somites	58.25 hpf
4-5 somites	64 hpf
12 somites	76.75 hpf
15 somites	77.25-81 hpf
17 somites	83.25 hpf
35-40 somites	8-15 dpf

**Table 6: Timing of the gastrulation and the somitogenesis.**

Numbers correspond to the time by which the developmental process occurs.

### **1. Organogenesis 1 (O1) stage from the first cell differentiation to the first heart beatings (2-4 dpf).**

One recurrent cell differentiation stage is the somitogenesis that occurs sequentially from the trunk to the most posterior side of the embryo. At the beginning of this stage, embryos measure  $1.92 \text{ mm} \pm 0.06$  (Figure 20). The optic capsule (Figure 22J, arrowhead) appears at 50 hpf, before the tailbud closure (51.75 hpf) suggesting that the cell differentiation begins before the end of the gastrulation movements. The three first somites can be observed at 58.25 hpf on living embryos. At 64 hpf, 4 or 5 pairs of somites are visible (Figure 22M, arrowhead, Table 6). Twelve pairs of somites are developed at 76.75 hpf. Between 77.25 and 81 hpf, depending on the spawn, 15 pairs of somites can be seen (Figure 22K). Other organs progressively appear as the Kupffer's vesicle that is observable from 52.75 hpf (Figure 22L, arrowhead) to 84 hpf. As for the walleye (McElman et Balon, 1979) a translocation movement allowing decreasing the distance between embryo's head and the lipid droplet occurs the third day of development. The notochord is first visible at 55.75 hpf on living embryos and begins to be vacuolated from the 4<sup>th</sup> dpf. At this stage, embryo's length attains  $2.80 \pm 0.20 \text{ mm}$  (Figure 20) and the auditory vesicles begin to develop. The epithelium of the embryo appears and is composed by various cell types such as the mucous and the club cells and later in the organogenesis, by the keratinocytes. During the same day, at 99.5 hpf, the first heart beating and spontaneous muscle contractions were recorded. The heart is already composed of two separate cavities corresponding to the future ventricle and atrium. The tail begins to separate from the yolk.

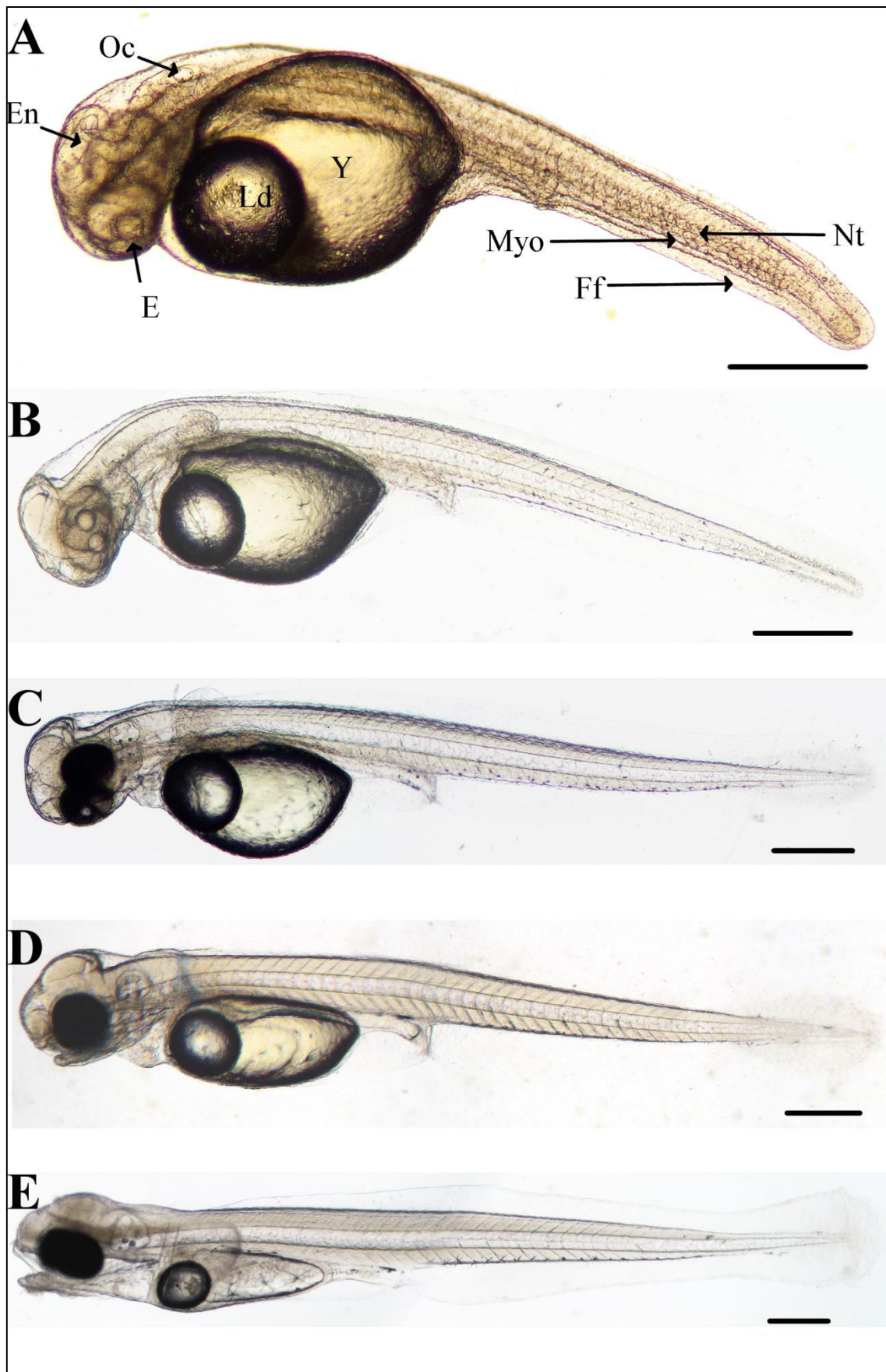
### **2. Organogenesis 2 (O2) stage from the first heart beatings to the differentiation of the organs associated to the digestive system (4-7 dpf).**

At day 5 post-fertilization the brain is subdivided into 3 parts: (i) the forebrain (future telencephalon and diencephalon), (ii) the midbrain (future mesencephalon and metencephalon) and (iii) the hindbrain (future myelencephalon) (Figure 23A, Figure 24A). In addition, the olfactory bulb

## CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA PERCHE COMMUNE

---

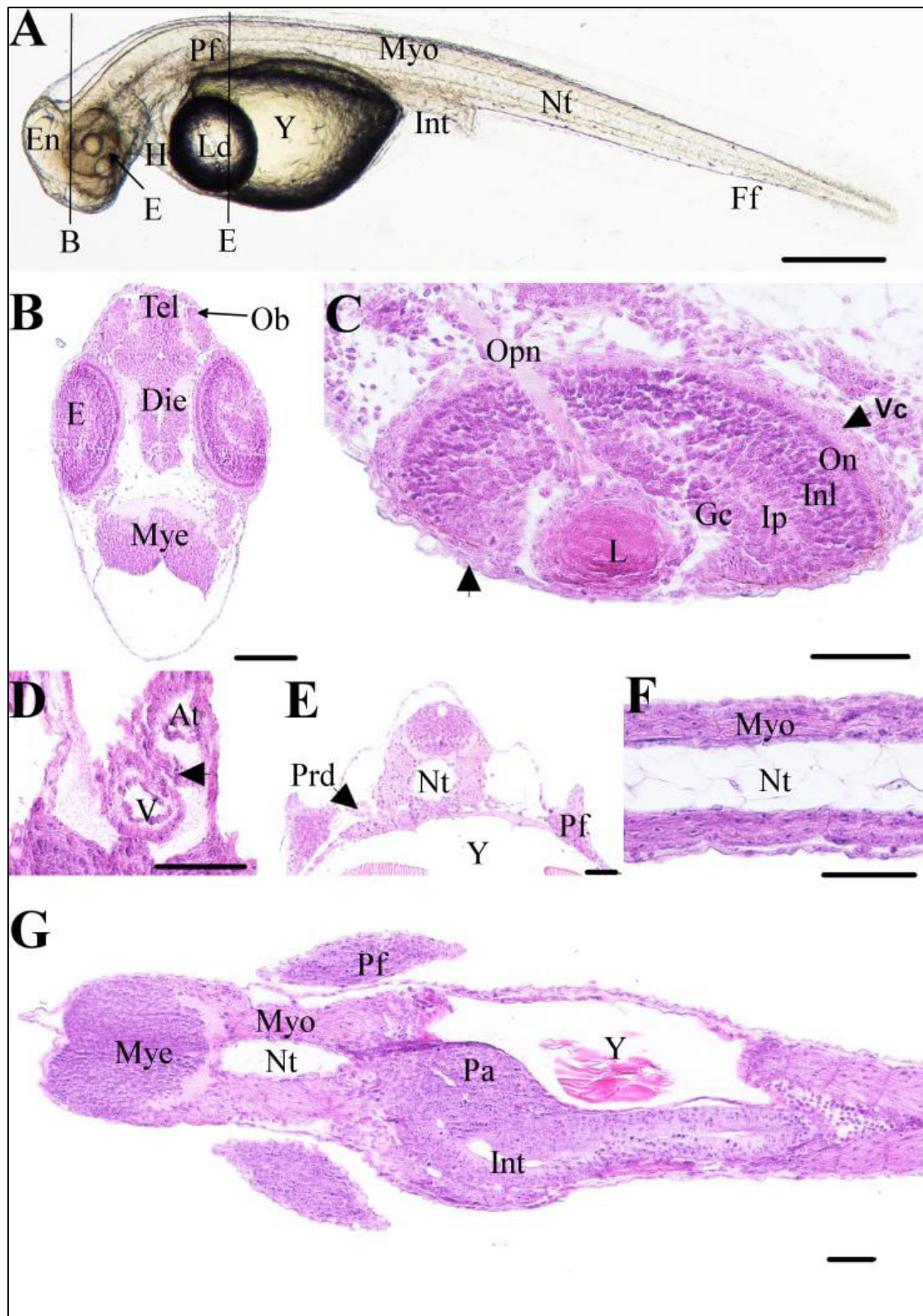
located in the most anterior part of brain (Figure 24B) and the *medulla oblongata* in the myelencephalon are observed. The *medulla oblongata* forms a *continuum* with the spinal chord that follows dorsally the notochord all along the embryo. At 5 dpf, a pair of otoliths is clearly visible in the otic vesicles (Figure 23A, Figure 24A) and the first small patches of melanophores appear on the yolk. Pectoral fin buds are present behind the heart cavity, just above the vitelline mass. The cardiac cavity's enlarging is observed at 6 dpf, in the same time than the onset of circulation on the ventral-posterior side of the yolk, behind the lipid droplet in the subintestinal vitelline vein (McElman et Balon, 1979 ; Isogai *et al.*, 2001). However, the first circulating cells are detected the 7<sup>th</sup> dpf. The ventricle and the atrium are separated by thicker walls and the atrio-ventricular valve localized between them (Figure 24D). In the meantime, pectoral buds have evolved into pectoral fins and are clearly visible on living embryo (Figure 24A, E and G). The tegument of the fins contains club and mucous cells. Moreover, the renal system is composed of pronephric ducts and urinary bladder after the end of intestine. The pronephric ducts are localized at each side of the myotomes (Figure 24E) and organized in one layer of cuboidal cells forming a tube. The myotome and the chord are already well differentiated (Figure 24F). From 7 dpf, first organs associated to the digestive system begin to differentiate as described below. In the same manner the eyes begin to be well formed (Figure 24C). Few embryos begin to hatch from 6 dpf in the crates of the hatchery. No hatching gland and thus hatching enzyme releasing was observed in this study.



**Figure 23: Comparison of the embryonic morphology during *P. fluviatilis* organogenesis.**

(A) 5 dpf living embryo representative of the O2 period. Several organs are already visible as the encephalon (En), eyes (E), lipid droplet (Ld), yolk (Y), myotome (Myo), notochord (Nt) and the otic capsule (Oc) (B) 7 dpf representative to the beginning of the O3 period (C) 9 dpf representative to the end of O3 period (D) 11 dpf, representative of the O4 period (E) 15 dpf representative of the O5 period. Scale bars represent 500  $\mu$ m.





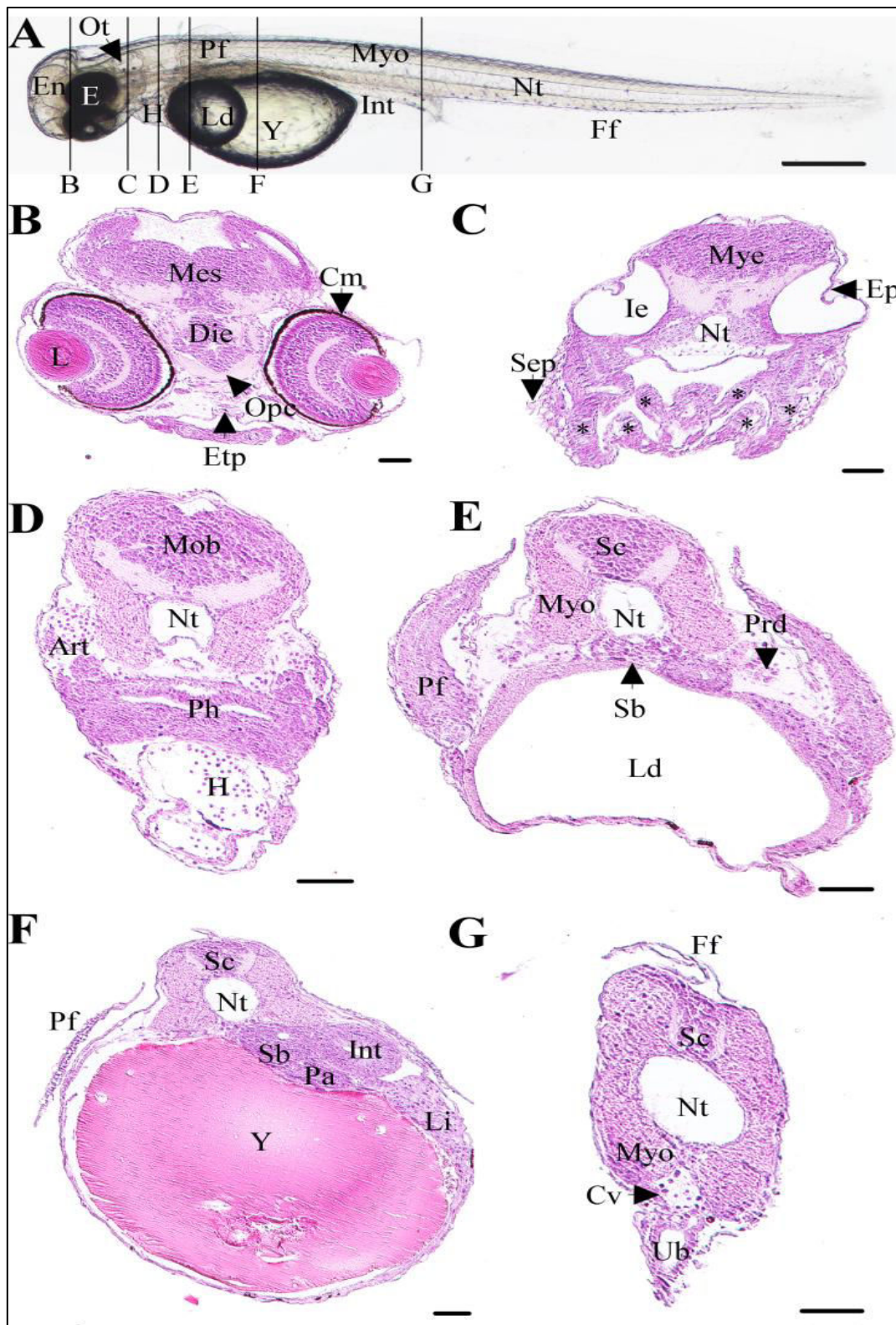
**Figure 24: Detailed description of an embryo 7 dpf representative to the beginning of the O3 period.**

(A) Whole embryo. Black lines represent the location of transverse sections shown in B, E. (B, C, E) Transverse sections and (D, F, G) Coronal sections (B) Section of the head (C) Detail of an eye. The arrowhead shows pigmented cells (D) Detail of the heart. The arrowhead shows the atrioventricular valve (E) Section of the trunk. (F) Vacuolated notochord surrounded by myotomes (G) Coronal section of the head and the trunk. (At) atrium, (Dien) diencephalon, (E) eyes, (En) encephalon, (Ff) finfold, (Gc) ganglion cells, (H) heart, (Inl) inner nuclear layer, (Int) intestine, (Ip) inner plexiform, (L) lens, (Ld) lipid droplet, (Mye) myelencephalon, (Myo) myotome, (Nt) notochord, (Ob) olfactory bulb, (On) outer nuclear layer, (Opn) optic nerve, (Pa) pancreas, (Pf) pectoral fins, (Prd) pronephric ducts, (Tel) Telencephalon, (V) ventricle, (Vc) visual cells, (Y) yolk., Scale bars represent 500  $\mu$ m for A and 50  $\mu$ m for B-G.

### **3. Organogenesis 3 (O3) stage from the differentiation of the organs associated to the digestive system to the mouth opening (7-10 dpf).**

Concerning the circulation system, large arteries are visible from the 8<sup>th</sup> dpf. They are located on each side of the somites, above the pharynx and more prominent at 9 dpf (Figure 25D). The heart is composed of three well developed chambers among which the *bulbus arteriosus* that appears at that time. The blood circulation makes sinuses in the yolk (Additional file 4) and leaves it toward the ventral part of the embryos. The heart beating is slow with a mean of  $78 \pm 0$  beats per minute recorded (n=3). The pigmentation appears in the ventral side of the embryos and spreads along the antero-posterior axis. In addition, at 9 dpf, one of the important events is the apparition of the cartilages (Figure 25C). The first one to differentiate is the chondrocranium (cranial skeletal element) composed of the ethmoid plate (Figure 25B) and the parachordal which is paired on each side of the notochord. The second part of the cartilages structure is the pharyngeal cartilages which are divided into several elements: basihyal, basibranchial, hyosymplectic and palatoquadrate cartilages (Figure 25C, black stars). Chondrocytes are also observed into pectoral fins (Figure 25E). In the same time, in the inner ear, epithelial projections are visible (Figure 25C). On histological sections, under the caudal vein, at the end of the rectum, the urinary bladder is apparent (Figure 25G). The finfold surrounding living embryos (Figure 25A) is also present above the spinal chord in a transverse section (Figure 25G). The last stage of cartilage development is carried out the 10<sup>th</sup> dpf, with the formation of ceratobranchial arch and Meckel's cartilage. The circulation system is developing with a visible cell circulation between the somites and toward gill arches on living embryos. At the end of the stage, the first peristaltic undulations occur. At the same time the mouth of the embryo opens. The main hatching period begins from 9.5 dpf but most of this period lasts over O4 and O5 stages. As a whole, we observed that hatching doesn't correspond to a specific stage because it lasts for 5 days on average (from the first embryo's hatching to the last one within one spawn). Moreover, the onset of this phase is different between spawns (6-14.5 dpf) with high rates of hatching between 9 and 14.5 dpf. Interestingly, the developmental timing is the same if the embryo is still in the chorion or in the free form (Figure 29A, B).





**Figure 25: Detailed description of an embryo at 9 dpf representative of the end of the O3 period.**

(A) Whole embryo. Black lines represent the location of transverse sections shown in the following images. (B-G) Transverse sections (B-C) Sections of the head (D-F) Section of the trunk (G) Section of the tail. (Art) artery, (C and stars in C) cartilage, (Cm) Choroidal melanocytes, (Cv) caudal vein, (Dien) diencephalon, (E) eyes, (En) Encephalon, (Ep) epithelial projection, (Etp) ethmoid plate, (Ff) finfold, (H) heart, (Ie) inner ear, (Int) intestine, (Ld) lipid droplet, (Li) liver, (Mes) mesencephalon, (Mob) *medulla oblongata*, (Mye) myelencephalon, (Myo) myotome, (Nt) notochord, (Opc) optic nerve chiasma, (Ot) otoliths, (Pa) pancreas, (Pf) pectoral fins, (Ph) pharynx, (Prd) pronephric duct, (Sb) swim bladder, (Sc) spinal chord, (Sep) squamous epithelium, (Ub) urinary bladder, (Y) yolk. Scale bars represent 500 µm for A 50 µm for B-G.

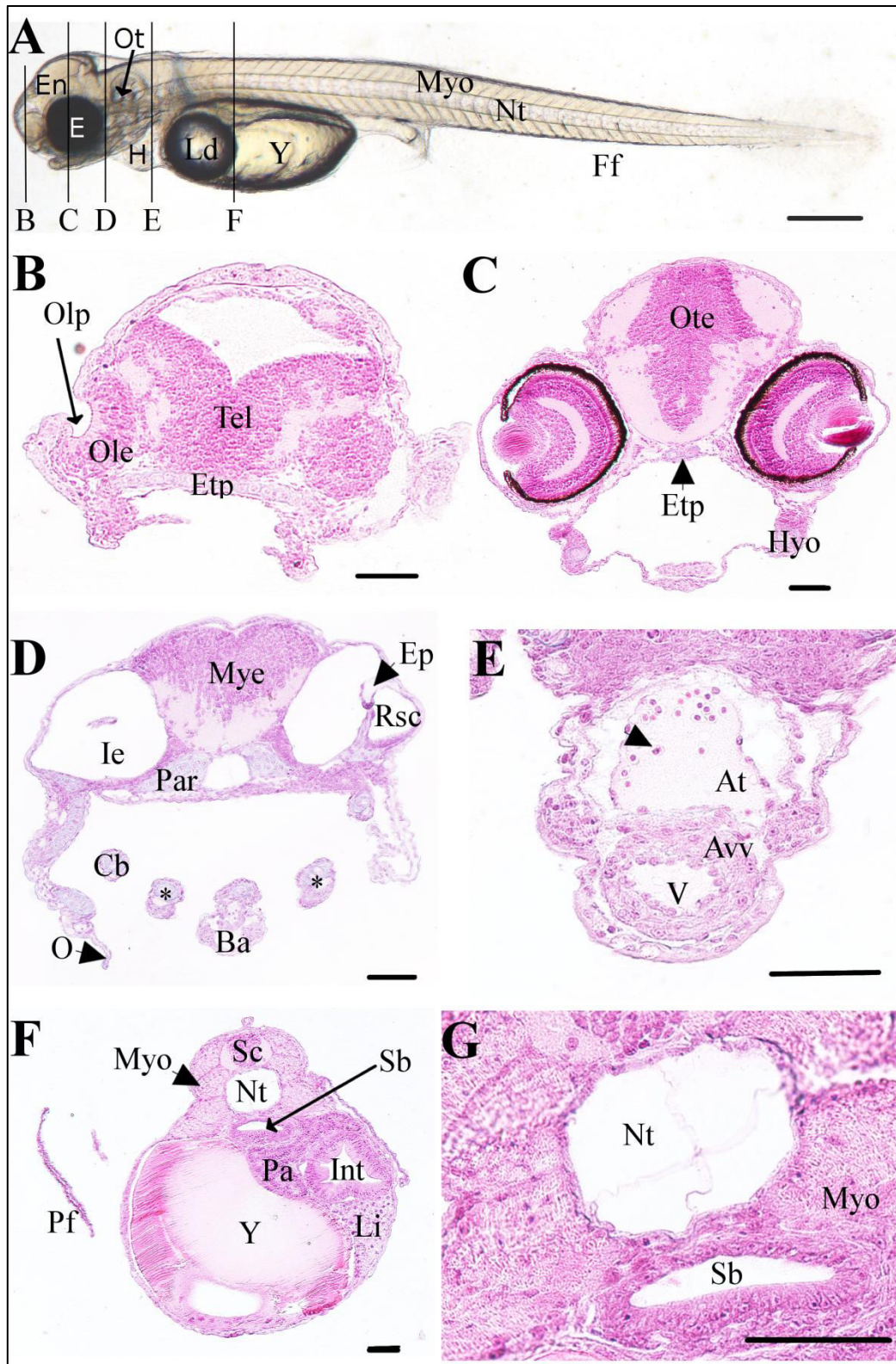
### **4. Organogenesis 4 (O4) stage from the mouth opening to the first coordinated movements (10-11 dpf).**

During this period, the peak of hatching begins and free embryos cannot swim continuously but move toward the surface with short times of uncontrolled movements of fins and times of passive sinking. Except for the gills differentiation, no evident morphological modifications occur during that period.

### **5. Organogenesis 5 (O5) stage from the first coordinated movements to the first food intake (11-15 dpf).**

After the 11<sup>th</sup> dpf, the movements of the pectoral fins are more coordinated, allowing embryos to go toward the water surface. At the same moment, the gills anlage can be noted on living embryos. Below the hyosymplectic cartilage, opercula are developed and clearly observable. In the inner ear, epithelial projection forms the rostral semicircular canal of the vestibular system (Figure 26D). At 11 dpf, embryos possess differentiated chambers that compose the heart (Figure 26E), separated by the atrio-ventricular valve. The wall of the ventricle appears thicker than in the atrium. Blood cells (Figure 26E, arrowhead) could be seen in the atrium. The heart beating is between 136 and 142 beats per minute (at 12 and 14 dpf, respectively). Melanophores line the ventral part of the embryos and a sporadic pigmentation is present toward the somites (Figure 26A). On living embryos, first movements of the jaw are observed during the 12<sup>th</sup> dpf.





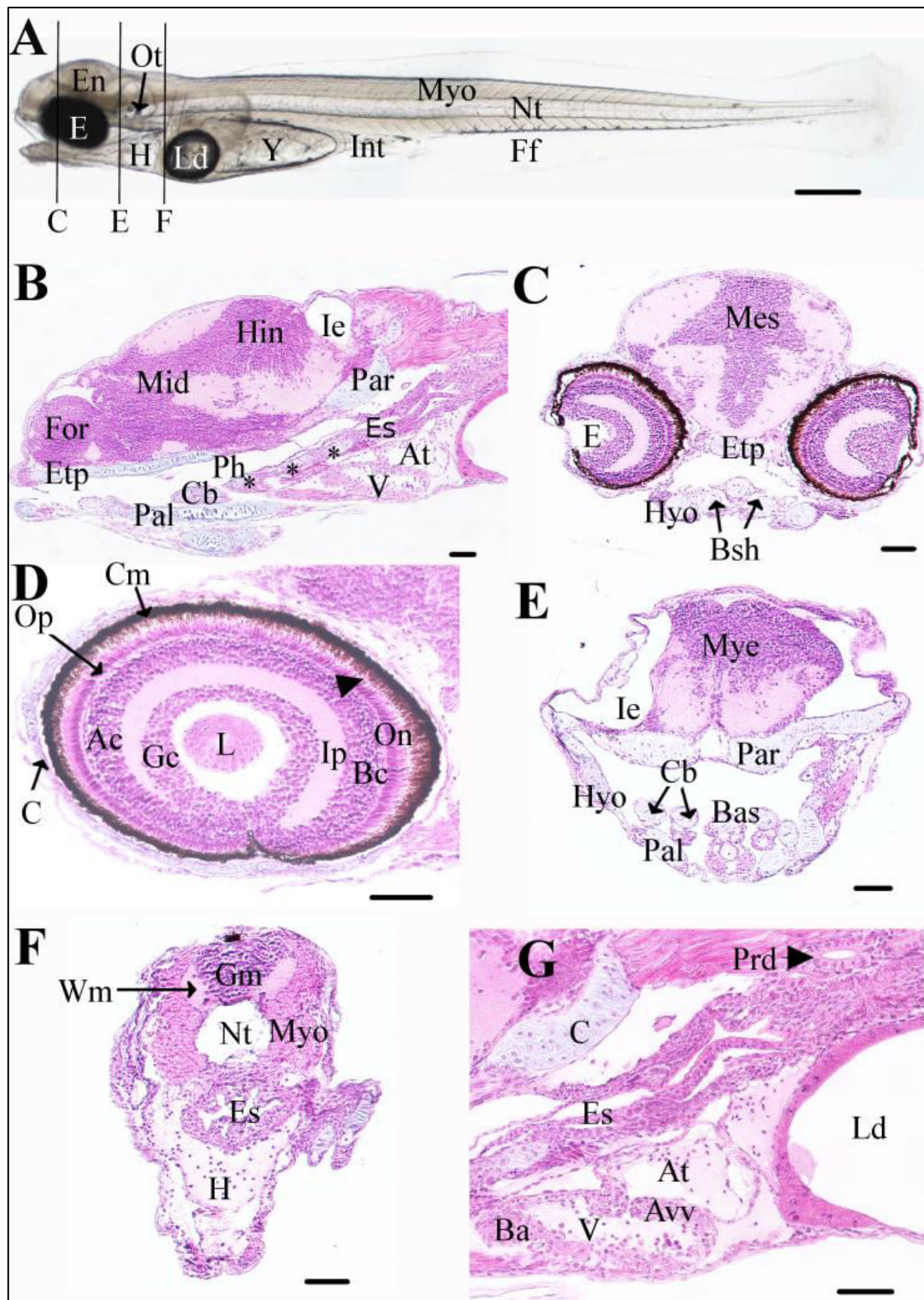
**Figure 26: Detailed description of an embryo at 11 dpf representative of the O4 period.**

(A) Whole embryo. Black lines represent the location of transverse sections shown in B to F. (B-G) Transverse sections (B-D) Sections of the head (E) Section of the heart the arrowhead shows an erythrocyte (F) Section of the trunk (G) Detail of the section F showing the vacuolated notochord and the difference of epithelium thickness between the ventral and the dorsal sides of the swim bladder. (At) atrium, (Avv) atrioventricular valve, (Ba) *bulbus arteriosus*, (Cb and stars) ceratobranchial arch, (E) eyes, (En) Encephalon, (Ep) epithelial projection, (Etp) ethmoid plate, (Ff) finfold, (H) heart, (Hyo) hyosymplectic, (Ie) inner ear, (Int) intestine, (Ld) lipid droplet, (Li) liver, (Myo) myotome, (Nt) notochord, (Ole) olfactory epithelium, (O) operculum, (Olp) olfactory pit, (Ot) otoliths, (Ote) optic tectum, (Pa) pancreas, (Par) parachordal, (Pf) pectoral fins, (Rsc) rostral semicircular canal, (Sb) Swim bladder, (Tel) telencephalon, (V) ventricle, (Y) yolk. Scale bar = 500  $\mu$ m for A scale bars = 50  $\mu$ m for B-G.

### E. First oral feeding (15 dpf)

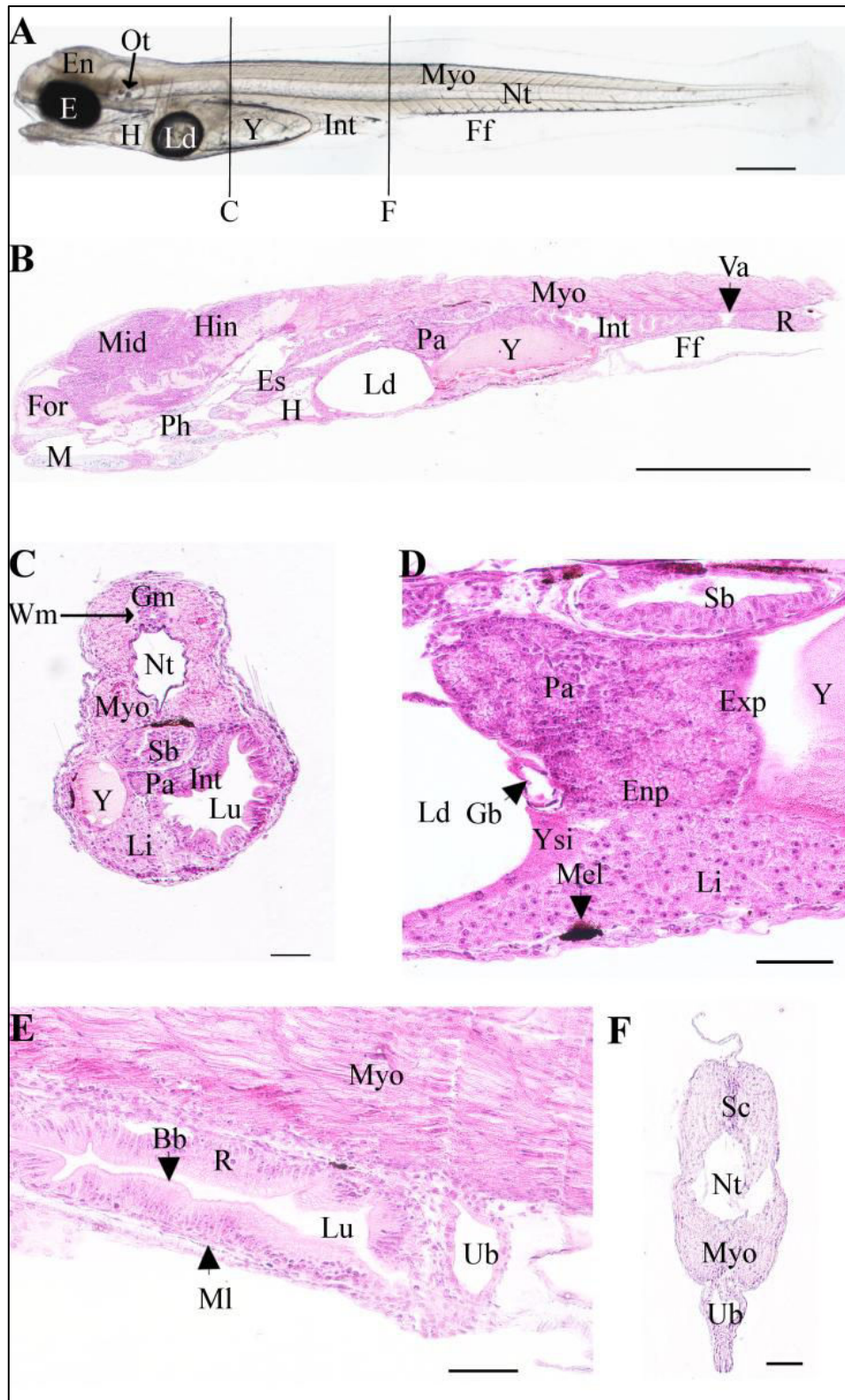
Two independent experiments were conducted to determine the time of the first oral feeding. For each spawn (total number of spawn= 10), embryos were isolated from their hatching dates and alive *Artemia* nauplii was proposed as food daily. In every case, the moment of the first oral feeding appeared at 15<sup>th</sup> dpf in free embryo, independently of their hatching date. As this phenomenon always appears at a very specific moment, it corresponds to an important threshold for the embryo. Larvae still have a small yolk and a lipid droplet (Figure 23E) indicating that they mainly entered a mixed feeding period. The anatomy of the young larva shows that cartilages are composed of chondrocytes and appear clearly differentiated from the other tissues and colored in blue on histological sections (Figure 27B and C). These cartilages are divided in two main parts: the chondrocranium comprising the cranial skeletal elements, and the pharyngeal cartilages (Figure 27C and E). It forms the musculoskeletal system with the myotomes (mainly future striated muscles), the notochord (supporting axis of the embryo) and the pectoral fins (Figure 27A). A part of the circulation system is illustrated in the Figure 27G with the heart composed by the *bulbus arteriosus*, the ventricle, the atrio-ventricular valve and the atrium. The blood flow will pass through the atrium, the ventricle pumping it into the *bulbus arteriosus*. On living embryos, melanophores line in the ventral side of the embryo, along the myotomes and on the yolk (Figure 28A and D). The pigmentation is also present over the swim bladder (Figure 28C) and on the rectum (Figure 28E). The finfold starts to differentiate, forming lobes at the localization of the future caudal fin.





**Figure 27: Detailed description of an embryo at 15 dpf at the end of the O5 period.**

(A) Whole embryo. Black lines represent the location of transverse sections shown in C, E and F. (B) Sagittal sections of the head (C) Section of the head (D) Sagittal section of the eye. The arrowhead shows the visual cells (E) Section of basis of the head (F) Section of the trunk (G) Sagittal section of heart. (Ac) amacrine cells, (At) atrium, (Avv) atrioventricular valve, (Ba) *bulbus arteriosus*, (Bas) basihyal (Cb and stars) ceratobranchial arch, (Bc) bipolar cells, (C) cartilages, (Cm) choroidal melanocytes (E) eyes, (En) encephalon, (Es) esophagus, (Etp) ethmoid plate, (Ff) finfold, (For) forebrain, (Gc) ganglion cells, (Gm) grey matter, (H) heart, (Hin) hindbrain, (Hyo) hyosymplectic, (Ie) inner ear, (Int) intestine, (Ip) inner plexiform, (L) lens, (Ld) lipid droplet, (Mes) Mesencephalon, (Mid) midbrain, (Myo) myotome, (Nt) notochord, (On) outer nuclear layer, (Op) outer plexiform, (Ot) otoliths, (Pal) palatoquadrates, (Par) parachordal, (Ph) pharynx, (Prd) pronephric duct, (V) ventricle, (Wm) white matter, (Y) yolk. Scale bars represent 500  $\mu$ m for A and 50  $\mu$ m for B-G.



**Figure 28: Detailed description of an embryo at 15 dpf at the end of the O5 period.**

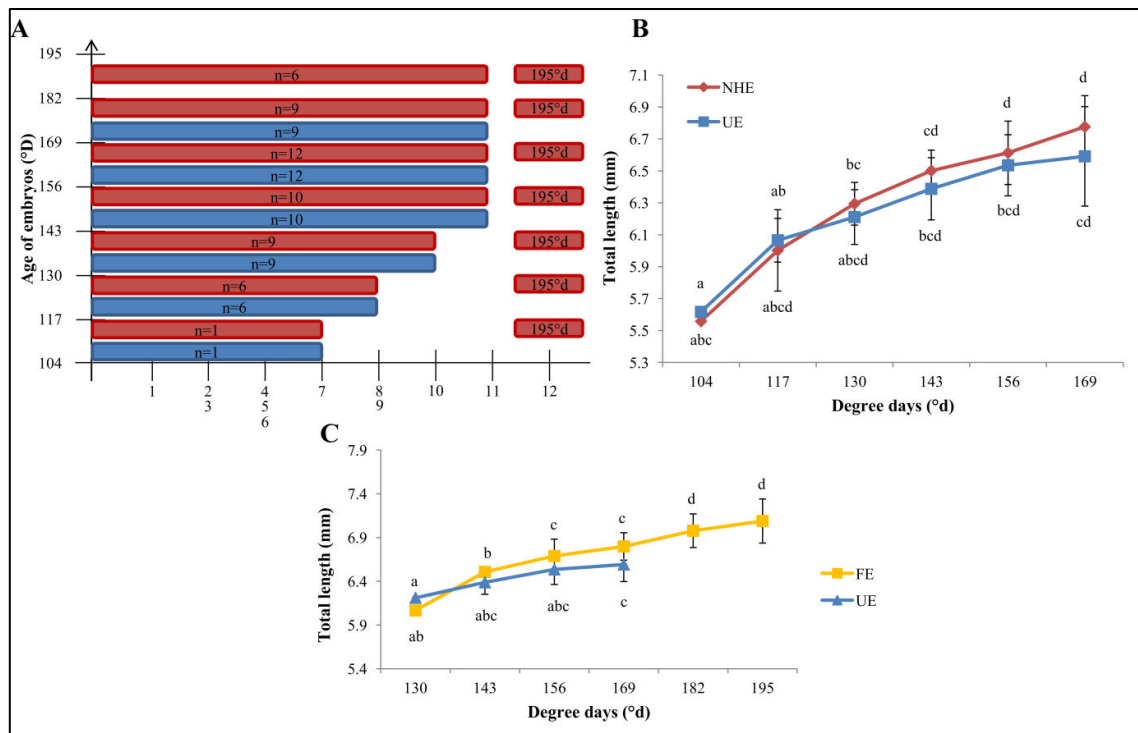
(A) Whole embryo. Black lines represent the location of transverse sections shown in C and F. (B) Sagittal section of the anterior part of the embryo (C) Section of the trunk (D) Glands belonging to the digestive system. (E) Sagittal section of rectum (F) Transverse section of the tail. (Bb) brush border, (E) eyes, (En) Encephalon, (Enp) endocrine part of the pancreas, (Exp) exocrine part of the pancreas, (Ff) finfold, (For) forebrain, (Gb) gall bladder, (Gm) grey matter, (H) heart, (Hin) hindbrain, (Int) intestine, (Ld) lipid droplet, (Li) liver, (Lu) lumen, (M) mouth, (Mel) Melanophores, (Mid) midbrain, (MI) muscle layer, (Myo) myotome, (Nt) notochord, (Ot) otoliths, (Pa) pancreas, (R) rectum, (Sb) swim bladder, (Sc) spinal chord, (Ub) urinary bladder, (Va) valve, (Wm) white matter, (Y) yolk, (YSL) yolk syncytium layer. Scale bars represent 500  $\mu$ m for A and 50  $\mu$ m for B-



### **F. Comparison of the developmental process between hatched embryos and their unhatched counterparts.**

In the present study, we observed that the hatching period elapses for several days while the first oral feeding took place at one particular moment (15 dpf) in every spawn. In order, to determine whether there was a difference of development between newly hatched embryos and their not yet hatched counterparts we performed a comparison on four independent spawn. The hatching period lasts for 5 days (65°d) for each spawn. Each day of hatching, embryos that newly hatched (NHE) were sampled and observed to determine their stage of development. This stage was compared to the unhatched embryos (UE) of the same spawn (Figure 29A). It appeared that embryos that hatched naturally didn't present any difference in term of progression in the embryogenesis compared to their unhatched counterparts at the same age. Moreover, their mean size was not significantly different from unhatched embryos (Figure 29B). Interestingly, this experiment shows that at the spawn level, the hatching period can last for several days and that embryos can hatch with various abilities. This data strongly supports that embryos can reach various stages before their moment of hatching. In addition, in this experiment again, all embryos begun to eat at 15 dpf (195°d), whatever their hatching date. In these conditions, the first oral feeding may rather represents the embryonic-to-larval transition because they always occur at the same developmental stage.

To go further, we measured the size of each naturally free embryo (FE) from their hatching to the first oral feeding. We compared these sizes to those of embryos of the same age and the same spawn that were removed from gangue with forceps (UE) (Figure 29C). Data show no significant differences between FE and UE embryos at a particular date. The only significant difference was obtained between sizes of embryos at various ages, showing a similar growth whatever if they hatched or remained in the gangue. This data suggests that there is no difference in the growth rate depending on living environment (still in the egg or free in the water).



**Figure 29: Comparison of the developmental process between free and embedded embryos.**

(A) Comparison of the developmental progress of newly hatched embryos (NHE) and unhatched embryos that still remain in the envelope (UE) at the same age. Twelve criteria were evaluated at the date of hatching. Observations have been done on embryos from 4 spawn, n correspond to the total number of embryos that hatched at a particular date and were used for this study. One embryo from one spawn begun to hatch at 8 dpf, while the others begun at 9 or at 11 dpf. Numbers correspond to the criteria as follows: 1 circulation in the yolk, 2 embryo straightening, 3 urinary bladder, 4 eye pigmentation, 5 ventral circulation, 6 bile, 7 melanophores on the body, 8 peristaltic undulations, 9 mouth open, 10 coordinated pectoral fins movement, 11 jaw movements and 12 first oral feeding. (B) The total length of newly hatched embryos (NHE) were measured and compared to the ones of embryos of the same age that remained in the envelope (UE) (n=3 group UE or NHE/date of hatching/spawn, 3 spawn were used). Data correspond to the mean value of the 3 different spawns  $\pm$  SD. Significant differences were observed according to the hatching date (different letters) but not the status hatched or unhatched embryos  $p < 0.05$ . (C) From the day after hatching, embryos were considered as free embryos (FE) their total length was measured daily and compared to unhatched embryos (UE) of the same age. (n=3 group UE or FE/date of hatching/spawn, 3 spawn were used). Data correspond to the mean value of the 3 different spawns  $\pm$  SD. Significant differences were observed according to the hatching date (different letters) but not the status hatched or unhatched embryos  $p < 0.05$ .

### G. Description of the eyes development

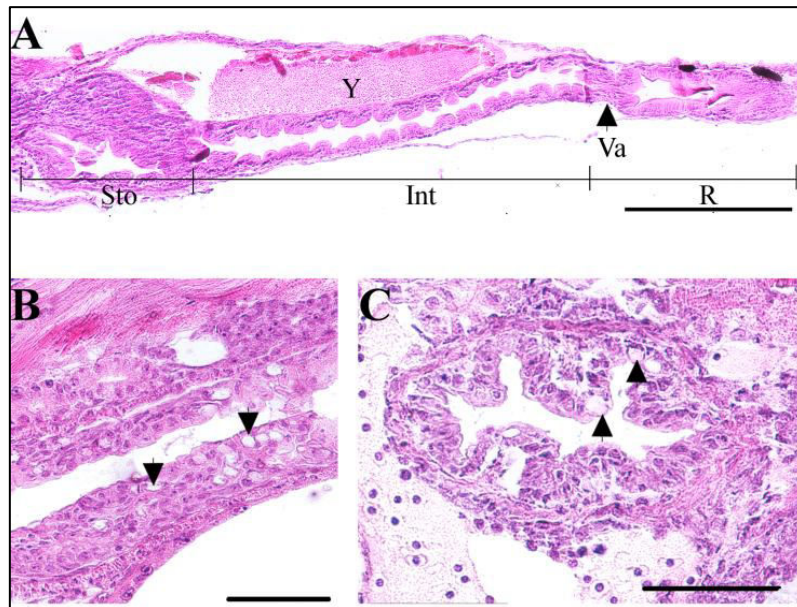
The eyes are the first visible sign of cellular differentiation and develop from O1 to O3 stages. First, the optic capsules develop symmetrically on the embryo's head (Figure 22J) and soon after, the crystalline lenses appear from the 4<sup>th</sup> dpf (Figure 23A) in the same time than the marginal zone. From 5 dpf, the outer nuclear layer appears in the optic capsule. Five different cell layers are observed from day 6 post-fertilization as illustrated on histological section of 7 dpf embryos (Figure 24C). From this stage, the ganglion cells layer is the most inner layer of the eyes and the inner plexiform contains several rounded cells sibling amacrine and ganglion cells. The two cell types of the inner nuclear layer, amacrine and bipolar cells, are not yet differentiated while the visual cell layer is a light staining

and composed of photoreceptor precursors. The outer nuclear layer consists of a row of dark-staining columnar cells (Figure 24C). The 7<sup>th</sup> dpf, the eye's pigmentation begins with a thin layer of black cells on the outer of optic cups (Figure 24C, arrowhead). This pigmentation isn't clearly visible on all histological sections or in living embryos. The optic nerves are developed at the same stage (Figure 24C) and form a chiasm between the optic cups, under the hypothalamic, part of the diencephalon and more visible at 9 dpf (Figure 25B). From 8 dpf, the eyes diameter measures around  $312 \pm 16 \mu\text{m}$  (n=16) and a new external layer of cells appears definitively in the eyes: the retinal pigmented epithelium with choroïdal melanocytes that lend a black pigmentation to the eyes (Figure 25B). This dark pigmentation is visible on living embryos macroscopically (Figure 23C) and marks the beginning of the eyed stage. Moreover, the outer plexiform layer forms a thin cover between the outer nuclear layer and the bipolar cells. At high magnification, on 11 dpf histological sections, cones and outer segment of cones are observed in visual cell layer of eyes. From 15 dpf, the structure of the retina is clearly discernible (Figure 27D). In addition, a layer of chondrocytes forms a ring around each eye (Figure 27D).

### **H. Description of the digestive system ontogeny**

The digestive tube is first visible from 4 dpf. It takes place dorsally to the yolk with a simple digestive tube composed of an undifferentiated epithelium. This intestine anlage already exhibits a lumen. From the 7<sup>th</sup> dpf, several organs associated with the digestive system begin to appear as the liver and the pancreas, which are close to the intestine (Figure 24G). This differentiation marks the O2 to O3 transition. In the meantime, the esophagus also differentiates. The digestive tract is now a long tube localized in the left side of embryo. Its epithelium is composed of a monolayer of tall and aligned thin enterocytes with brush border at the apex (Figure 28E). The pharynx and the gall bladder appear at the 8<sup>th</sup> dpf even if the gall bladder becomes more obvious at the end of embryonic period, between the lipid droplet and the pancreas, with a very thin wall (Figure 28D). In the meantime, a yellow substance begins to be secreted and leaks in the posterior intestine until 11 dpf. At 9 dpf, the swim bladder can be observed on histological sections, just below the notochord (Figure 25E and F) and near the intestine. It is isolated from the yolk and consists of an oval structure composed of cuboids cells lining a central lumen. At the same stage, the diameter of the digestive tract varies along the antero-posterior axis and is thinner in the anterior and posterior regions than in the median region. First peristaltic movements are visible at 10 dpf in the posterior part of the intestine whereas the same phenomenon is observed in the anterior part of the intestine at 14 dpf. In the same time, the mouth opens (Figure 23D). It marks the transition from O3 to O4 stages. At 11 dpf, the liver is composed of hepatocytes with large central nuclei and the intestine mucosa appears folded, in order to increase its surface area (Figure 26F). All the organs involved in the digestive function take place on the left side of embryo. For the first time in the embryogenesis, a new organization appears in esophagus with many epithelial folds and the differentiation of goblet cells (Figure 30B). The swim bladder presents

various cells types: on the dorsal side, small cells forming the wall of the oval structure and on the ventral side, tall cells that confer a large aspect of the wall (Figure 26G). It is surrounded by mesenchymal cells forming a fibrous lining (also described by Chevey (Chevey, 1925)). At that stage, the anus opens.



**Figure 30: Detailed description of the digestive at 15 dpf.**

(A) Coronal section of the trunk presenting all the gut. (Sto) stomach, (Int) intestine, (R) rectum, (Va) ileorectal valve, (Y) yolk. (B) Detail of the esophagus with goblet cells (arrowheads). (C) Transverse section of esophagus with goblet cells (arrowhead) and folds. Scale bars represent 50 μm.

A dark pigmentation begins to develop on the dorsal part of the swim bladder at 12 dpf, and is easily observable at 15<sup>th</sup> dpf on living embryos (Figure 28A) and histological sections (Figure 28C and D). The esophagus is situated above the heart and contains many folds in the mucosa and the goblet cells (Figure 27F, Figure 29B and C). On coronal or sagittal sections, the intestine appears divided in three main parts: the future stomach followed by a sphincter, the anterior intestine and the posterior intestine or rectum (Figure 30A). These anterior and posterior segments have different lengths (the first part is longer than the second one,  $596.1 \pm 20.2 \mu\text{m}$  and  $244.7 \pm 14.2 \mu\text{m}$ , respectively) and are separated by a constriction called ileorectal valve (Figure 28B). Anterior and posterior intestines have different morphological organizations which could be explained by folds in the wall (Figure 30A). Indeed, in several teleost species, the anterior region of gastrointestinal tract possesses primary and secondary folds (Figure 28C) whereas the rectum presents a change on mucosal folding pattern. The epithelial layer of the gut is composed of thin and elongated enterocytes with an absorptive function, surrounded by a muscular layer and, in the center of the tract, the lumen (Figure 28E). The brush border of the enterocytes increases again the intestinal absorption surface. At 15 dpf, the digestive glands are fully differentiated. The pancreas (Figure 28D) includes two distinct glandular systems (endocrine and exocrine), and the liver is positioned ventrally to the pancreas and closely linked to the yolk. Between these two glands, the gall bladder is observed (Figure 28D).

## V. Discussion

### A. Establishment of the developmental table of the Eurasian perch.

The present work first aims at describing accurately the Eurasian perch development. Data show that its timing can present variations preventing to follow a strict developmental table as those proposed for fish model species (Kimmel *et al.*, 1995 ; Iwamatsu, 2004 ; Tsai *et al.*, 2013). Moreover, the hatching period elapsed for several days and individuals didn't hatch at the same developmental stage while the first oral feeding occurred at the same time for every embryo. In that context, we choose to determine an alternative method to describe perch development that is flexible enough to take into account this variability while being rather precise to describe accurately the development. Descriptions of intervals and thresholds as defined by Balon allow high flexibility but lack sometimes accuracy, especially during the early stages (Balon, 2002). We thus decided to use this model to describe perch development while defining more accurate stages in the beginning of the embryogenesis. First periods have been defined according to the cellular status (division, migration or differentiation). In a second time, thresholds were established thanks to the acquisition of new abilities, defining in the mean time steps that were carefully described. Some thresholds were established according to previous work on other percids (Cooper, 1978 ; McElman et Balon, 1979 ; Paine et Balon, 1984a, 1984b ; Kováč, 1992, 1993a, 1993b, 1994, 2000), while others were defined to improve the developmental table and thus add accuracy to the description. Such developmental table not only allows an easier comparison between individuals within a species, but also, between fish species by translating the time scale into a degree day scale. The main description of perch embryogenesis with the definition of steps and an accurate description of the first observation of each organ is summarized in the Figure 31. As a whole, the total embryogenesis duration elapses for 15 days at 13°C (195°d) from the fertilization to the first oral feeding. It is comparable to the yellow perch (185.6°d (Mansueti, 1964a)). Other percids exhibit shorter or longer development from activation to the first oral feeding (Table 7).

#### 1. The zygote period

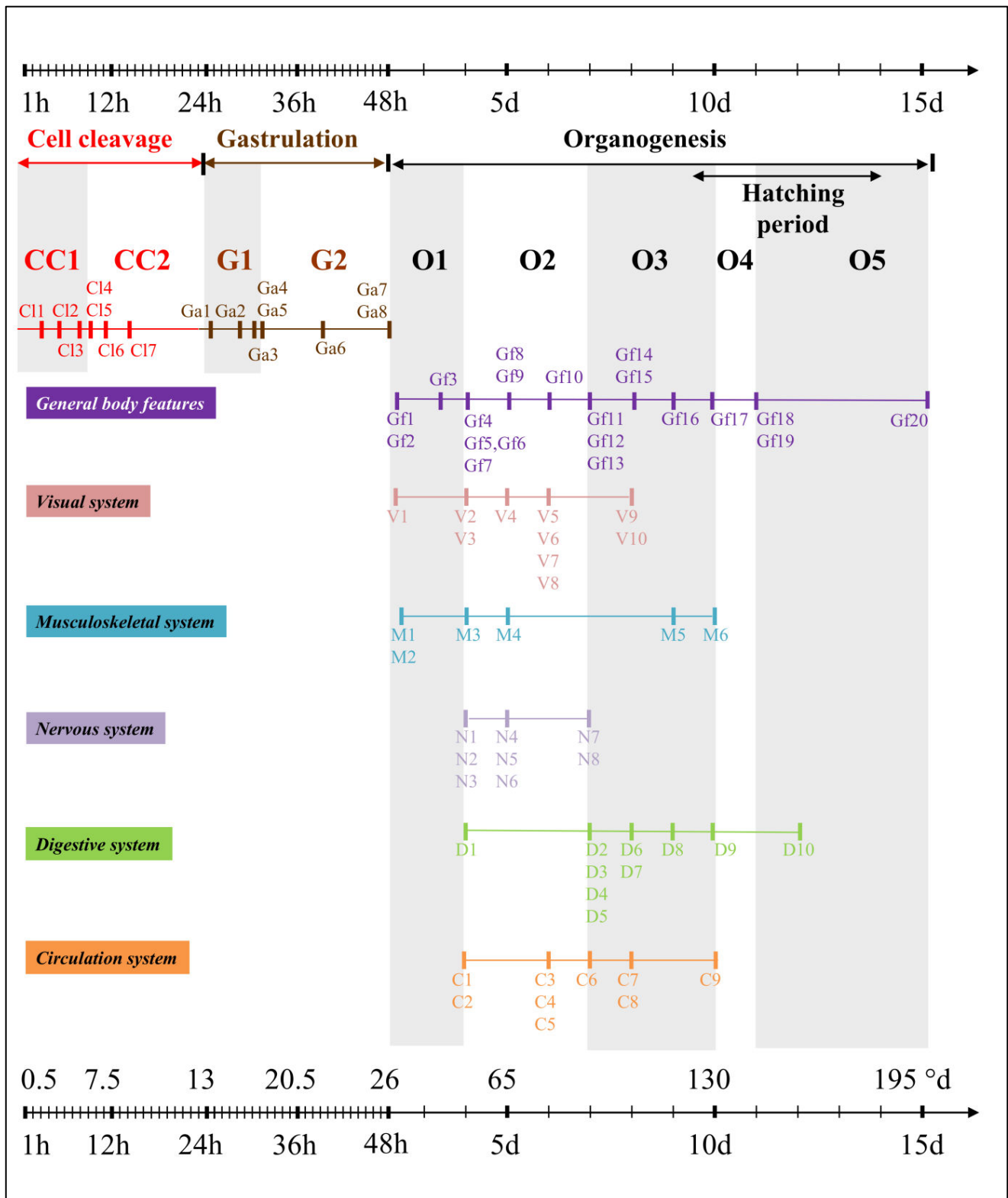
The zygote step corresponds to the egg hardening and the formation of the perivitelline space and the blastodisc. The lipid reserves are separated into two independent parts, the yolk and the lipid droplet also called oil globule as described for all percid species and some other non percid fish. But the presence of this droplet is not general for every fish species. It has been shown in the walleye that both compartments are composed of different lipids. Indeed the yolk is mainly composed of lipoproteins and polar lipids (e.g. phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine), the oil globule is composed by neutral lipids, mainly triacylglycerols (TAG) (Moodie *et al.*, 1989). Moreover, Wiegand *et al.* noticed that the yolk is used predominantly during early embryogenesis while the lipid reserves in the droplet are used later during the embryogenesis (Wiegand, 1996).

### 2. The cell cleavage period

After 2.5 h (1.4°d), the cell cleavage period begins. This step never occurs when ova were not incubated with sperm and thus not fertilized (data not shown) on the contrary to other species as the herring or the stickleback for which unfertilized eggs can undergo cell cleavage (Kunz, 2004). The total duration of both zygote and cell cleavage periods are comparable to the rainbow darter and the walleye (McElman et Balon, 1979 ; Paine et Balon, 1984b) (Table 7) and last for about 24h (13°d) for the perch. The control of the cell cleavage doesn't seem to be only dependent upon the water temperature as the *Zingel streber* cell cleavage lasts for 12h at a mean temperature of 15°C (7.7 °d) (Kováč, 2000) which is in the same range of temperature than the one of the Eurasian perch. In every case, the cleavage is meroblastic due to a large yolk quantity, which remains uncleaved (Collazo *et al.*, 1994) and begins with a bilateral arrangement of the blastomeres with a regular cleavage pattern, as in other fish species (Kimmel *et al.*, 1995 ; Iwamatsu, 2004 ; Hinaux *et al.*, 2011 ; Cucchi *et al.*, 2012). Nevertheless, after several divisions irregularities always occur in the division planes but the onset of this phenomenon was different for every species. In the present study, we noticed it at the 32 cells stage as for the sea bass and the medaka (Iwamatsu, 2004 ; Cucchi *et al.*, 2012). In contrast, Chevey (Chevey, 1925) reported it from 16 cells stage in *P. fluviatilis* as it is the case for the walleye (McElman et Balon, 1979) and it was even earlier for the logperch (8 cells) (Paine et Balon, 1984a). These irregularities could be precede defects in the synchronization of the cell divisions as reported in zebrafish, for which both process appears from 128 cells stage (Kimmel *et al.*, 1995). The transition between synchronous and asynchronous cell divisions could correspond to the mid-blastula transition (MBT) which is characterized by the loss of synchronous cell division, cell motility, lengthening of cell cycles and the onset of zygotic transcription (Kane et Kimmel, 1993 ; O'Boyle *et al.*, 2007). In the present study, the cell division asynchrony also begins from 128 blastomeres stage. We propose to subdivide the cleavage cell period into two steps, (CC1 synchronous cell division and CC2 asynchronous cell divisions). This subdivision couldn't be properly established in other percids developmental tables because the description of cell cleavage was not accurate enough (Table 7).



# CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA PERCHE COMMUNE



	<b>Organogenesis:</b>	<b>Circulation system</b>	<b>Digestive system</b>
<b>Cell cleavage</b>	<b>General body features</b>	<b>C1 Heart visible</b>	<b>D1 Intestinal anlage</b>
<b>C11 Two cells</b>	<b>Gf1 Optic capsule</b>	<b>C2 First heart beating</b>	<b>D2 Liver anlage</b>
<b>C12 8 cells</b>	<b>Gf2 Kupffer's vesicle</b>	<b>C3 Circulation on the yolk</b>	<b>D3 Pancreas anlage</b>
<b>C13 32 cells</b>	<b>Gf3 Translocation</b>	<b>C4 Vitelline vessel formation</b>	<b>D4 Esophagus anlage</b>
<b>C14 128 cells</b>	<b>Gf4 Otic vesicle</b>	<b>C5 Cardiac cavity enlarging</b>	<b>D5 Brush Border</b>
<b>C15 Asynchronous cell divisions</b>	<b>Gf5 Body contraction</b>	<b>C6 Erythrocytes circulation</b>	<b>D6 Pharynx</b>
<b>C16 512 cells</b>	<b>Gf6 Squamous epithelium</b>	<b>C7 Ventral circulation</b>	<b>D7 Gall bladder + bile</b>
<b>C17 High Blastula</b>	<b>Gf7 Tail free</b>	<b>C8 Circulation toward gills</b>	<b>D8 Swim Bladder</b>
	<b>Gf8 Otoliths apparition</b>	<b>C9 Circulation toward somite</b>	<b>D9 Peristaltis undulations</b>
	<b>Gf9 Melanophores on the yolk</b>	<b>Musculoskeletal system</b>	<b>D10 Jaw movements</b>
<b>Gastrulation</b>	<b>Gf10 Eye pigmentation onset</b>	<b>M1 Notochord formation</b>	
<b>Ga1 30% epiboly</b>	<b>Gf11 Embryo straightening</b>	<b>M2 Somitic muscles</b>	<b>Visual system</b>
<b>Ga2 50% epiboly</b>	<b>Gf12 Pronephric duct</b>	<b>M3 Notochord vacuolated</b>	<b>V1 Optic vesicle</b>
<b>Ga3 Embryonic shield</b>	<b>Gf13 Urinary bladder</b>	<b>M4 Pectoral bud</b>	<b>V2 Lens</b>
<b>Ga4 70% epiboly</b>	<b>Gf14 Eye pigmentation</b>	<b>M5 Cartilage apparent</b>	<b>V3 Marginal zone</b>
<b>Ga5 Cell migration slowing down</b>	<b>Gf15 Olfactory pits</b>	<b>M6 Last pharyngeal cartilages</b>	<b>V4 Outer nuclear layer</b>
<b>Ga6 Bud stage</b>	<b>Gf16 Melanophores on the body</b>	<b>Nervous system</b>	<b>V5 Ganglion cell</b>
<b>Ga7 A/P axis</b>	<b>Gf17 Mouth open</b>	<b>N1 Spinal cord</b>	<b>V6 Inner plexiform</b>
<b>Ga8 Tail bud closure</b>	<b>Gf18 Coordinated Pectoral fins movement</b>	<b>N2 Telencephalon</b>	<b>V7 Inner nuclear layer</b>
	<b>Gf19 Gills formation</b>	<b>N3 Myelencephalon</b>	<b>V8 Visual cell layer</b>
	<b>Gf20 First oral feeding</b>	<b>N4 Diencephalon</b>	<b>V9 Outer plexiform</b>
		<b>N5 Mesencephalon</b>	<b>V10 Choroïdal melanocytes</b>
		<b>N6 Metencephalon</b>	
		<b>N7 Optic chiasm</b>	
		<b>N8 Optic nerve</b>	

Figure 31: Developmental table of the Eurasian Perch (*P. fluviatilis*).

The time scale is given in hours (h) and degree days (°d). First a general table of embryonic stages as described in the present papers. Then, the first observation of an organ implementation or a new ability was highlighted on living embryos or histological studies. Observations were classified according to their involvement in the visual, musculoskeletal, nervous, digestive and circulation systems. The general body features characterize observation performed in living embryos and that could be easily noticed to distinguish developmental stages.



## CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA PERCHE COMMUNE

Scientific name	Common name	Adult Size (cm)	Spawning substratum	Incubation temperature (°C)	Reproductive season	Egg size (mm)	Total embryonic duration	CC1 onset	CC2 onset	G1 onset	G2 onset	O1 onset	O2 onset	O3 onset	O4 onset	O5 onset	Size at hatching (mm)	Hatching duration	Larval size (first feeding) (mm)	Ref
<i>Etheostoma</i>																				
<i>Etheostoma caeruleum</i>	Rainbow darter	5.3	burried in the substrat	20	spring	1.9-2.2	243.9	1.4	nd	17.4	nd	25.1	43.4	85	120	180	8	20	9.6	(Paine et Balon, 1984b)
<i>Gymnocephalus</i>																				
<i>Gymnocephalus cernuus</i>	Ruffe	12	demersal	16-23	early summer	1	154.1	3.4	nd	nd	nd	18.7	35.7	80.9	134.6	nd	3.5-3.8	42.7	4.4-4.9	(Kováč, 1993a)
<i>Perca</i>																				
<i>Perca fluviatilis</i>	Eurasian perch	2	fixed on plants or stones	13	early spring	1.75	195	1.4	3.9	13	16.9	27.1	52	91	130	143	5	65	6	This work
<i>Percina</i>																				
<i>Percina caprodes</i>	Logperch	12.5	burried in the substrat	20	late spring	1.23	164.4	1.3	nd	nd	nd	19.9	41.5	51.5	156	nd	6.2	10.6	6.2	(Cooper, 1978 ; Paine et Balon, 1984a)
<i>Sander</i>																				
<i>Stizostedion vitreum</i>	Walleye	54	demersal	15	early spring	1.85	236.3	1.6	nd	16.4	nd	28.9	52	nd	153.6	nd	6.8-7.3	67.5	9-9.7	(McElman et Balon, 1979)
<i>Zingel</i>																				
<i>Zingel streber</i>	Danube streber	12	burried in the substrat	déc-17	early spring	1.94	360	2.2	nd	7.7	nd	22.5	82.5	128.5	210	240	6.4-7.6	75	9.2	(Kováč, 2000)

**Table 7: Comparison of the development of the Eurasian perch with other percid fish.**

Each fish species represent each genus of percid. They were chosen because the description of their development is currently the most accurate among their genus. Intervals onsets or durations are given in degree days (number of days x temperature).

### 3. The gastrulation period

The gastrulation period starts the second day post-fertilization with the first cell movements along the yolk, and lasts for about 26 hours at  $13 \pm 0.5$  °C unlike to Chevey who described the gastrulation duration of 55-60 hours (Chevey, 1925). This huge difference is surprising and we don't have any plausible explanation. Nevertheless, our data were reproducible in every spawn whatever the spawning season and the origin of breeders and are related to those obtained with other percids (Table 7) suggesting that we may probably be closer to the reality. After the cell cleavage, several cell layers could be seen among which the yolk syncytial layer (YSL) situated between the yolk and blastomeres and characterized by a multinucleate layer, continuous with the yolk cytoplasmic layer. We observed it until 15 dpf indicating that it may have a role in the nutrient absorption all along the embryonic development. In addition, the YSL plays an active role during gastrulation as it gives most of the contractile force during the epiboly (Collazo *et al.*, 1994). The embryonic shield is visible from 50% epiboly as described in medaka and zebrafish (Kimmel *et al.*, 1995 ; Iwamatsu, 2004). In *Etheostoma* species belonging to the percids, the germ ring and the embryonic shield formation occurs early at 25% of epiboly (Mendelson *et al.*, 2006). Moreover, this timing seems to be crucial because premature or delayed involution may lead to embryonic lethality (Mendelson *et al.*, 2006). Kimmel *et al.* noticed a pause during the zebrafish development (Kimmel *et al.*, 1995). In our study, this arrest is not observed but a change in the velocity of the cellular front advancement can be observed from 70% epiboly with deceleration of the blastoderm margin progression. This delay could be linked to the oil droplet covering by the embryo. Mc Elmann and Balon have described in the walleye a progressive rotation of the embryos while the cellular layer was covering the oil droplet (McElman *et al.*, 1979). This phenomenon occurs potentially because of a variation of the cell velocity between the ventral and the dorsal part of the embryo as observed in the zebrafish (Kimmel *et al.*, 1995). This rotation was described not only for the walleye but also in the northern logperch (Paine *et al.*, 1984a) but not in darters (Paine *et al.*, 1984b ; Mendelson *et al.*, 2006) or in the *Gymnocephalus* species (Kováč, 1994). In the present study, in most cases we didn't observe such rotation (only once among the embryos we observed). We rather observed a very fast covering of the oil droplet as if tensions were accumulated before this covering and released quickly (Additional file 2). This tension may be due to the deceleration previously described. We propose to subdivide the gastrulation thanks to cell velocity (G1 as the rapid cell movements and G2 from the deceleration).

### 4. The organogenesis period

The boundaries between the gastrulation and the organogenesis are not always clear because organogenesis can be triggered before the tailbud closure as it is the case for *Perca fluviatilis* (Figure 31) or other percid fish species as *E. caeruleum* (Paine *et al.*, 1984b). In addition, it is clear that organogenesis will continue at least until the juvenile stage. We nevertheless choose to name the next period organogenesis in order to make the occasion to describe the beginning of the cell

differentiation. The definition of thresholds took into account the acquisition of abilities for several functions/systems as the locomotion system (including fins, muscles and skeleton), the nervous system (central and peripheral including sensory organs), the circulation system (heart and vessels), the feeding/excreting system (including all organs associated to the digestive function and the kidneys), the respiratory system (mainly gills). Naturally, other systems as for example, the reproductive or the immune systems are important for the individuals but either their development will occur later (reproduction) or we didn't identify any specific organs (e.g. spleen) with the techniques used in this work. As a whole, the organogenesis begins with the optic vesicle apparition 2 dpf (27.1°d). During this phase, the embryonic size varies from 5.32 mm ± 0.23 to 6.28 mm ± 0.22 as previously observed in *Perca fluviatilis* and *Perca flavescens* (Chevey, 1925 ; Mansueti, 1964a).

One of the first organs to be visible is the transient Kupffer's vesicle. It was described in 1868, and appears as a conserved structure among teleost fishes. This spherical and ciliated organ is localized in the posterior part of the embryo ventrally to the notochord. It plays a role in left-right development of the brain, heart and gut in Zebrafish embryo (Essner *et al.*, 2005). In addition, Kimmel *et al.*, suggest that cells lining the Kupffer's vesicle may be responsible of formation of tail mesodermal derivatives as the notochord and muscles (Kimmel *et al.*, 1995). Other tissues as somites, the central nervous system or the notochord then progressively appear (Figure 31). During the process it has been reported in the walleye, (McElman *et Balon*, 1979), that the embryonic body rotate around the yolk in order to move the head closer to the oil droplet. They called this movement the translocation. In the present study we also observed a translocation of the embryo. Up to now it corresponds to the second observation among percids. At 4 dpf, the heart is visible and begins to beat. However, no liquid was already circulating. Burggren suggested that the heart begins to beat to improve its morphogenesis, for convective blood flow and angiogenesis whereas nutrients and respiratory gases could be delivered by passive diffusion during the early life of the embryos (Burggren, 2004). In addition, these first beatings are concomitant with the first spontaneous skeletal muscle contractions. It suggests that the smooth muscle cells of the heart and striated muscle cells of the somites undergo parallel development even if the heart differentiation is not distinguishable before. We propose that this step corresponds to a threshold according the saltatory theory. We then call this first step from the eye differentiation and first muscle contraction (body and heart) O1 for organogenesis 1.

A new step that we called O2 then begins until 7 dpf when organs associated to the digestive system appear. During that stage, the eyes are almost fully developed and several layers are distinguishable. A cartilage and an epithelium form the cornea and give a mechanical protection to the eyes. Just behind this cell layer the visual cells composed by photoreceptors take place. These cells are involved in the light perception and transmission. It exists two categories of photoreceptors, the cones enabling the fish to improve their perception of the preys and the rods, appearing later, and rather

involved in light sensitivity of the fish (e.g. perception of a shadow coming from the surface) (Kvenseth *et al.*, 1996). The full development of these cells usually allows the embryo to obtain their full visual acuity (Kvenseth *et al.*, 1996). They form synapses with interneurons in the outer plexiform and their nuclei compose the outer nuclear layer. However, in the perch the outer plexiform layer is not yet visible suggesting that the neuronal connections are not yet possible and that the embryo is still blind. Interneurons are bipolar cells that make the link between photoreceptors and the ganglion cells. Their nuclei take place in the inner nuclear layer and they form synapses with the ganglion cells in the inner plexiform (Takashima et Hibiya, 1995). Amacrine cells appear in the same layers and participate to the signal processing of the visual stimuli at the level of the bipolar/ganglion cells synapses. The ganglion cells allow the connection between retina and optic tectum belonging to the mesencephalon (Takashima et Hibiya, 1995). The retina corresponds to the whole cell layers from the melanocytes to the ganglion cells. From 7 dpf, the optic nerve forms a chiasm between the optic cups and continue into the opposite brain hemisphere (Takashima et Hibiya, 1995). Other organs further develop during the O2 step as the circulation system with the liquid circulation that begins in the vessels 2 days later (6 dpf). Several sinuses progressively appear on the yolk (Additional file 3), suggesting that this liquid mainly transport nutrients in the embryonic body.

The O3 period begins 7 dpf until the first peristaltic undulations are visible and mouth opens at 10 dpf. Most of the organs involved in the digestion function (pancreas, liver), in the excretion system (kidney, urinary bladder) and the intestine differentiation present a synchronous development during that interval. The digestive tract of teleosts isn't open on the yolk (Kunz, 2004). Instead, the yolk nutrients absorption is rather mediated through the blood circulation. The liver seems to play a particular role as it takes place close to the yolk. Chevey observed that it develops a particular hepatovitelline connection that may have a role in yolk sac resorption (Chevey, 1925). Indeed, blood vessels coming from the yolk pass through the liver and by this way, deliver to the embryo the vitelline reserves absorbed by this gland. This close association between the liver and the yolk is described in several teleosts but not in *Danio rerio* (Kimmel *et al.*, 1995). From 8 dpf, the bile seems to escape from the digestive tract until 11 dpf. Similar descriptions have been made in the walleye and the salmon (Pelluet, 1944 ; McElman et Balon, 1979). The swim bladder differentiates from the digestive system during that step. No swim bladder inflation was observed the present study. This phenomenon may probably occur later during larval stages. At 10 dpf, the mouth opens and first peristaltic undulations occur suggesting that the digestive system is morphologically ready. In the meantime, the gills fully develop allowing the embryos to breathe and thus acquire higher oxygen supply. The eye is fully pigmented at 8 dpf just before the peak of the hatching period. In the meantime, the outer plexiform is observed and thus animals probably begin to see. They mainly go toward the water surface to take air bubbles, required for swim bladder's inflation or just by positive phototaxis of free embryos.

### **B. Definition of the embryonic-to-larval transition**

The question of the embryonic-to-larval transition is continuously discussed in the fish scientific community. Some authors argue that hatching corresponds to this transition because fishes develop new behaviour at that stage while others prefer the first oral feeding (Kováč et Copp, 1999 ; Penaz, 2001 ; Urho, 2002). Our study reveals that the hatching period onset occurred mainly from 9 to 14 dpf depending on the spawn, despite of parallel rearing in the same hatchery. Some spawn begun to hatch earlier (6 dpf) for no obvious reasons (breeders population, water quality...) because other spawn of breeders of the same population and incubated in the meantime in the same hatchery hatched between 9 and 14 days. It could be due to intrinsic genetic background of the breeders that was not tested. Interestingly, the hatching period elapses for 5 days (65°d) in average within a spawn. This is different from a previous study (Castets *et al.*, 2012), describing hatching between the 14<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> dpf at 13.5°C. Concerning other percid fish species, except the rainbow darter, the yellow pope and the logperch that hatch for few hours (Cooper, 1978 ; Paine et Balon, 1984a ; Kováč, 1992 ; Schaerlinger et Žarski, 2015), most of percid species exhibit a longer hatching period (Table 7). This long hatching period opened the question of whether embryos that hatch the first and the last day have reached the same developmental stage but with different speed or whether they hatch at several developmental stages. A first study described several hatching stages in *P. fluviatilis* depending on the embryonic length (Castets *et al.*, 2012). In the present study, we determined that embryos hatched at various developmental stages. Indeed, the following of 12 criteria allowed us to show that embryos that hatched one day reached a more advanced developmental stage than the ones that hatched the day before. This observation was not only done within a spawn but also between the 4 spawn that were used for this experiment. Moreover, as previously described by Trabelsi *et al.*, embryos that hatched at different dates had significantly different sizes (Trabelsi *et al.*, 2013). However, their size was not significantly different from their unhatched counterparts. As a consequence we can conclude that at the embryo level, hatching corresponds to an important threshold because they will need to adapt to a new environment. However, at the spawn level, hatching rather corresponds to a period during which embryos can free themselves from the eggs at various developmental stages. In addition, our data don't show any compensatory growth for the free embryos compared to their unhatched counterparts. Kestemont *et al.* showed that *P. fluviatilis* embryos hatching earlier have more chances to survive than those that hatch later (Kestemont *et al.*, 2003). This diversity of hatching dates may thus improve the survival success of the species in the wild. Such issue has not been addressed in the present paper. An inter-species comparison from the literature shows that *Gymnocephalus* sp., *S. vitreus* and *P. flavescens* hatch at different developmental stages (Mansueti, 1964a ; McElman et Balon, 1979 ; Kováč, 1994). Indeed, for *Gymnocephalus* sp. and *S. vitreus* young free embryos, the mouth is not yet well developed and not opened. This is not the case for *P. flavescens*. In addition, the eye pigmentation is absent for *Gymnocephalus* while they are well coloured in *P. flavescens* and *S. vitreus*.

These observations suggest that every species don't need to reach the same level of abilities before leaving their envelope and survive in their environment. In addition, the hatching duration can be variable depending on the species (Table 7). No detailed study has been performed on other percid fish species to determine hatching stages. However our data strongly suggest that it rather represents an interval the limits of which vary between spawn within a species. In the meantime, the definition of a free embryo period also corresponds to a floating interval the limit of which depends upon those of hatching. It would be interesting to perform such experiments in other fish species in order to better understand this important statement. In contrast to the hatching period, all embryos began to feed 15 days post-fertilization whatever their hatching dates. These data were observed in all tested spawn suggesting that they all reached a specific stage allowing them to feed. This narrow timing was quite surprising but it appears that for several fish species, the variation of developmental stage at the first food intake is weak compared to hatching that is more susceptible to external parameters (Urho, 2002). One explanation could be that the most anterior part of the intestine doesn't undergo peristaltic movements before 14 dpf. So the food would stay blocked in the embryos and could lead to the individual death. A second explanation could be that the amplitude of mouth opening is enough important to catch the prey before 15 dpf (Vlavinou, 1996). Finally, the last explanation could be that the digestive enzymes are not fully activated. Indeed, even if the digestive enzymes (trypsin, amylase, brush border alkaline phosphatase) are present in the pancreas before the mouth opening and present specific activities at hatching or few days later; their enzyme activity increases during the following days and reach a maximum at first oral feeding period (at least for trypsin) (Cuvier-Péres et Kestemont, 2001). This increase of trypsin and amylase specific activity was also observed in the sea bass and appears directly linked to substrate's concentration of ingested food (Cahu et Zambonino, 2007). All these data suggest that the first oral feeding rather corresponds to a threshold according to the saltatory theory and thus better define the embryonic-to-larval transition.

### VI. Conclusion

Among the different lines of thoughts and definitions available to describe fish embryogenesis, we clearly believe that the saltatory theory proposed by Balon is more convenient although perfectible to describe fish development that presents timing variations. Indeed, taking into account the parallel development of several systems to acquire new abilities that are triggered promptly is wise. In addition, defining the first food intake also appears more precise to define the embryonic-to-larval transition than hatching that elapses for a long period within a spawn. However, a specific study of hatching should be performed to better understand the reasons of this huge difference of hatching dates not only within a spawn but also between spawns. On the contrary to Balon, and for the same reason (long hatching period), we didn't take into account any free embryo period. We consider this "free embryo" period such as the hatching period as floating periods the limit of which can be flexible depending on intrinsic and extrinsic factors. We thus propose to describe perch



development according to steps corresponding to cellular status and the acquisition of new abilities. This proposition could thus be used as canvas to describe the development of other non-model fish species and then allow intra-species and inter-species comparisons.

### VII. Acknowledgement

We thank the French Ministry of Research for M. Alix fellowship and INRA for their financial support of the project.

### VIII. Additional files

#### [Additional file 1: Time lapse video of the cell cleavage.](#)

Waving in the yolk are easily observable at each cell cleavages. These waves were most important during the first cleavages. Four different sequences have been recorded. Cool water was added between each sequence to keep the water temperature at around 13°C. For the first sequence (from the beginning to 15 sec on the movie) 1 image was recorded every 2 minutes while for the 3 last sequences 1 image was recorded every 30 seconds. As a consequence, the first part of the movie has a speed of 6 images/sec and the last one 24 images/sec.

#### [Additional file 2: Time lapse video of the gastrulation.](#)

At 50% epiboly, the cell margin slows down before surrendering suddenly the lipid droplet. Right after, the yolk rotates inside the embryo. Five sequences were recorded all at 1 image per minute. As a consequence the movie speed is 10 images/sec.

#### [Additional file 3: Real time record of the circulation on the yolk.](#)

Several sinuses are dug in the yolk at provide nutrients to the embryo. The speed corresponds to the real time and the movie speed is 15 images/seconds.

#### [Additional file 4: Real time record of the peristaltic undulations in the rectum.](#)

Smooth muscle contractions provoke the undulations of the posterior intestine. The speed corresponds to the real time and the movie speed is 14 images/seconds.

# Table alternative du développement embryonnaire normal de la perche commune, *Perca fluviatilis*

## Contexte

Les **Téléostéens** sont un des groupes les plus **diversifiés** des vertébrés vivant dans des environnements variables et présentant diverses **stratégies de reproduction** et de **développement**. Même si les caractéristiques générales de ce développement sont peu variables, la durée des différentes étapes peut fluctuer notamment chez les **espèces non modèles** souvent sauvages comme la **perche commune**. Durant le développement, la période **embryonnaire** est **cruciale**, permettant la **construction du phénotype définitif** des individus. C'est également durant cette période que des défauts peuvent apparaître. Afin de les caractériser, il est nécessaire de connaître le **déroulement normal de l'embryogenèse**. De plus, malgré son importance, les **limites** de cette période, **éclosion** ou **1ère prise de nourriture exogène** sont encore discutées.

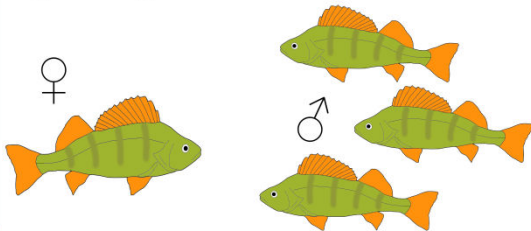
## Objectifs

**Définir** une table de référence alternative et flexible de l'**embryogenèse normale** de la perche commune  
 Déterminer les principaux **seuils, étapes** et **phases** de l'embryogenèse  
 Caractériser la **transition embryo-larvaire**  
 Etudier l'**impact du moment d'éclosion** sur le développement des embryons

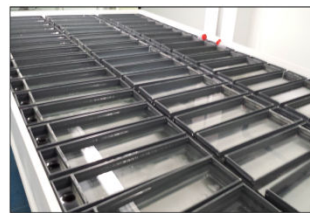
## Matériel et méthodes

### Fécondation artificielle

Saisons de pontes 2013, 2014, 2015  
 6 populations étudiées : 1 à 6  
 Origine : étangs Lorrains et Lac Léman

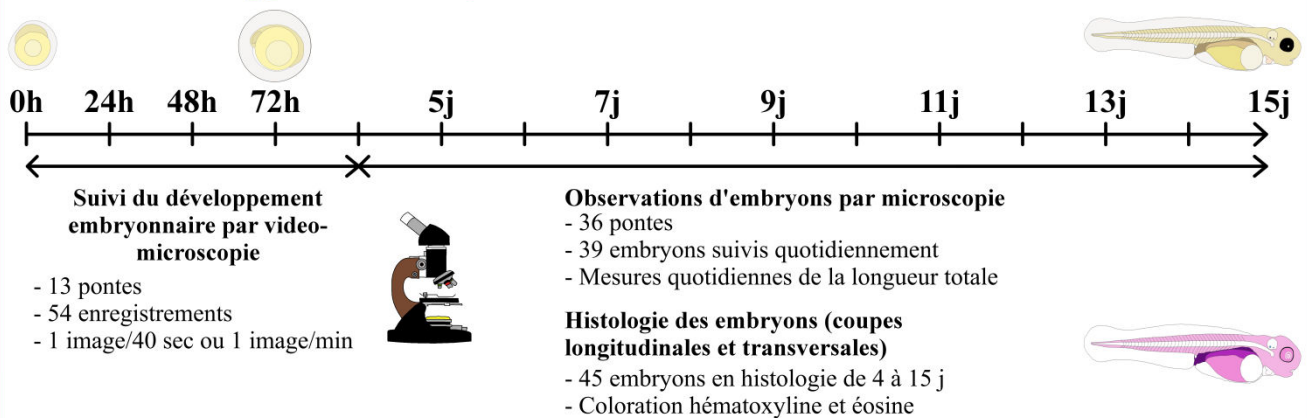


### Incubation



- 13°C ± 0,5°C  
 - 200 lux, 8:16 (obscurité:lumière)  
 - 53 pontes  
 Pour la **détermination de l'éclosion**  
 - 3 échantillons/ponte  
 - 100 oeufs/échantillon

## Etude du développement embryonnaire



## Comparaison des processus de développement entre embryons éclos et non éclos

Est-ce que les **embryons** qui éclosent **précocément** se développent à la **même vitesse** que ceux **non éclos** ?

- Critères **morphométriques** et **anatomiques**  
 - 4 pontes de la population 6  
 - 3 embryons/ponte/jour

### Détermination des processus de développement :

- Caractérisation du moment d'**apparition de 12 critères morpho-anatomiques** sur de nouveaux embryons éclos et comparaison avec des embryons non éclos  
 - Mesure de la **longueur totale (LT)** des nouveaux embryons éclos  
 - Suivi de la LT des ces embryons de l'éclosion à la première prise de nourriture  
 - Comparaison de ces mesures de LT avec celle d'embryons non éclos

## Détermination du début de la nutrition exogène

2 expériences de première prise de nourriture exogène (2014 et 2015) :

- En 2014, **50 embryons** de **6 pontes** différentes  
 - Embryons transférés dans des béciers de 1-2 L  
 Addition de **20 mL d'Artemia** vivantes (10-14/mL)

- En 2015, **4 à 10 embryons** de **4 pontes** différentes  
 - Embryons transférés dans des tubes de 50 mL

Artemia + embryons  
 pendant 2 heures

Observations du système digestif des embryons à la loupe





## Résultats

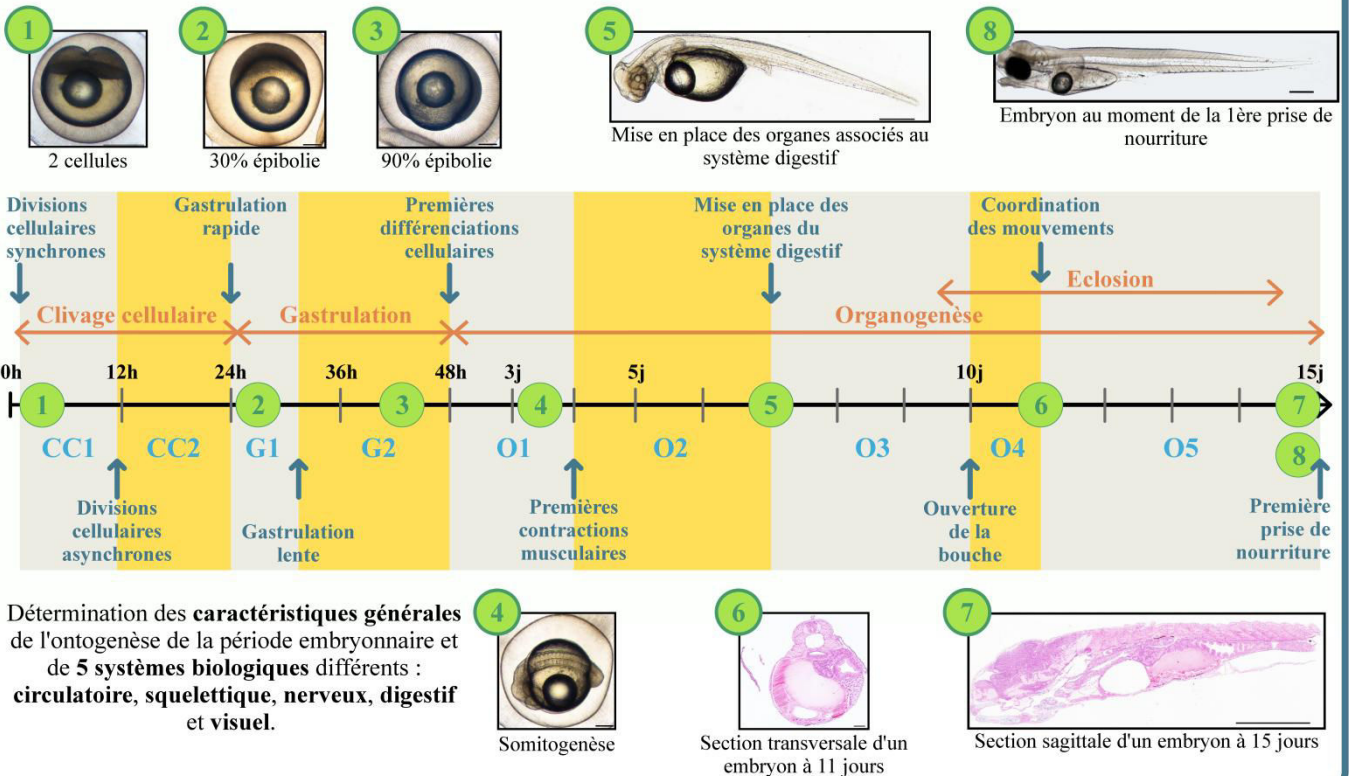
### Table de référence de l'embryogenèse normale

La durée de l'embryogenèse est de **15 jours**, de l'**activation** à la **première prise de nourriture exogène**.

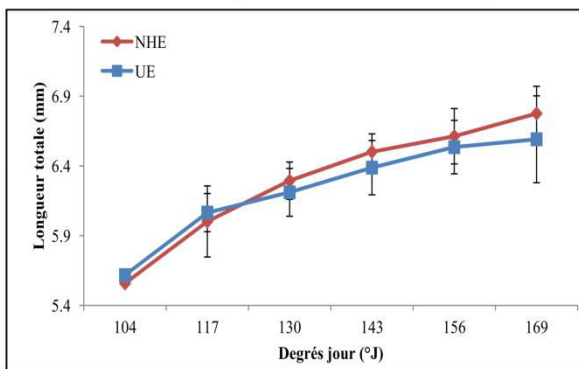
Le **statut cellulaire** (clivage, migration, différenciation) ainsi que l'**acquisition de nouvelles capacités** permettent de définir la séquence du développement.

Définition de **3 types d'intervalles** :

- **Phases** : caractérisé par un **statut cellulaire particulier**.
- **Étapes** : **intervalle lent** pendant lequel le **développement** de **plusieurs tissus** conduit à un seuil.
- **Seuils** : **événement rapide** pendant laquelle l'embryon **change de rythme de développement** ou **acquiert une nouvelle aptitude**.



### Transition embryo-larvaire et impact de l'éclosion sur l'ontogenèse



Les **nouveaux embryons éclos (NHE)** ne présentent **aucune différence** en termes de **caractéristiques morpho-anatomiques** par rapport aux **embryons non-éclos (UE)**.

**Pas de différence de croissance** entre les **embryons libre** (éclos depuis plusieurs jours) et les **embryons non-éclos**.

La **phase d'éclosion** se déroule sur **plusieurs jours** et les embryons éclosent à **différentes étapes** du développement. Au contraire, la **prise de nourriture exogène** est **fixe** dans le développement (15 jours).

### Discussion et conclusions

Contrairement aux organismes modèles, les **durées de chaque étapes** de l'embryogenèse de la perche commune ne sont **pas toujours régulières**.

Nous proposons une **table de développement alternative, précise et flexible**, permettant de tenir compte de ces variations.

L'**éclosion** ne **correspond pas à un stade** ou une étape de développement fixe, c'est plutôt un **intervalle**. Les embryons éclos ou non éclos ne présentent aucune différence morpho-anatomique à un moment précis.

La **première prise de nourriture exogène** correspond à un **seuil important fixe**, limite entre la période embryonnaire et larvaire.

### Perspectives

Les **seuils** identifiés dans cette table pourraient être la base de l'**apparition de défauts de l'embryogenèse** comme les **malformations**. La détermination de ces catégories de malformations et leur caractérisation pourraient permettre de définir plus précisément la **variabilité du développement embryonnaire**.

**CHAPITRE II  
MALFORMATIONS  
EMBRYONNAIRES CHEZ  
LA PERCHE COMMUNE**

### Contexte

Au cours de l'ontogenèse précoce des Téléostéens, de nombreuses anomalies peuvent apparaître comme les mortalités précoces ou les malformations. Malgré une littérature abondante sur les malformations, les études décrivent principalement les catégories apparaissant avec une fréquence élevée comme les anomalies du squelette (axe squelettique et mâchoire), de la vessie natatoire et dans de moindres proportions, du système cardiaque et du vitellus (Divanach *et al.*, 1996 ; Boglione *et al.*, 2013b). Cependant, d'autres malformations à plus faible incidence et impactant divers systèmes ou organes peuvent être observées (visuel, digestif, urinaire ...). Ces malformations pourraient avoir de nombreux impacts sur la biologie générale des individus comme la chasse de proies, la locomotion, la fuite face à des prédateurs ou le succès de reproduction dans des conditions d'élevage. Malheureusement, à ce jour, très peu d'informations sont disponibles sur ces autres catégories de malformations limitant la compréhension des conséquences de ces problèmes.

Les facteurs déterminants ainsi que les mécanismes induisant ces malformations peuvent être multiples et sont encore peu connus. La plupart des recherches se focalisent sur l'effet de certains facteurs intrinsèques ou extrinsèques pouvant potentiellement impacter le bon déroulement du développement des poissons comme la nutrition, les facteurs environnementaux ou encore les méthodes d'élevage. Cependant, les connaissances restent encore éparpillées. De plus, chez les espèces d'élevage, l'apparition de malformations est un problème récurrent et important (Koumoundouros, 2010 ; Boglione *et al.*, 2013b). En effet, cela peut entraîner des pertes financières et de matière première considérables dans ce domaine et ne contribue pas à une meilleure image de l'aquaculture auprès des consommateurs. Même si l'apparition des malformations ne semble pas être spécifique à l'élevage des poissons, l'incidence de ces défauts de développement observés dans la nature est plus faible (Koumoundouros, 2010). L'ensemble de ces faits suggère que les conditions d'élevage et potentiellement le maintien des géniteurs en captivité pourraient avoir un impact sur différentes fonctions biologiques, notamment la reproduction induisant l'apparition de malformations aux générations suivantes. A ma connaissance, aucune information n'est actuellement disponible sur l'effet des méthodes d'élevage des géniteurs (intensives ou extensives) sur l'apparition de défauts d'ontogenèse chez leur descendance.

Dans le contexte d'intensification de la production aquacole de la perche commune, espèce prometteuse pour l'aquaculture européenne et en cours de domestication (Teletchea et Fontaine, 2014 ; Toner, 2015), ces anomalies de développement pourraient également diminuer ses performances de reproduction et sa production. Aujourd'hui, cette espèce est élevée dans différents environnements, plus ou moins intensifs, comme les étangs ou les systèmes de recirculation aquacoles (RAS) et son cycle de vie en système clos, notamment la reproduction, est maîtrisé (Fontaine *et al.*, 2015b ; Policar *et al.*, 2015). Cependant, les qualités variables de gamètes obtenues et les défauts apparaissant au

## CHAPITRE II : MALFORMATIONS EMBRYONNAIRES CHEZ LA PERCHE

---

cours du développement sont encore des problèmes majeurs répertoriés chez cette espèce et très peu de connaissances sont disponibles à ce sujet à ce jour (Schaerlinger et Żarski, 2015).

Suite à l'établissement d'une table de référence de l'embryogenèse normale de la perche commune, la caractérisation des problèmes pouvant apparaître lors de l'ontogenèse chez cette espèce paraît indispensable afin de comprendre les potentiels mécanismes sous-jacents et améliorer la gestion des poissons. Les principaux objectifs de ce chapitre sont donc :

- 1) Répertoire et analyser la plus large gamme possible de phénotypes malformés chez des embryons nouvellement éclos ;
- 2) Identifier les potentielles relations entre ces différentes catégories de malformations ;
- 3) Déterminer l'impact de deux systèmes d'élevage en comparant les taux de malformations globaux et spécifiques chez des embryons nouvellement éclos issus de lots de géniteurs élevés en étang et RAS (extensif vs. intensif).

Pour réaliser cette étude, six populations de perche commune (population 1 à 4 et 7, 8) ont été utilisées dans le but d'obtenir le maximum de phénotypes malformés et les embryons de 42 pontes ont été étudiés (Tableau 4). Afin de déterminer l'impact de deux systèmes d'élevage sur l'apparition des malformations, les populations utilisées étaient issues d'étangs lorrains (population 2, 3 et 4) ou de RAS (population 1, 7 et 8). Pour faciliter la compréhension de cette étude, les populations 7 et 8 toutes deux issues d'élevage en RAS et utilisées lors de la même année de reproduction ont été regroupées sous un seul et même groupe de poissons. Les catégories de malformations ont été caractérisées à l'aide d'outils microscopiques (loupe binoculaire et microscope optique) et histologiques sur des embryons nouvellement éclos en comparaison avec l'embryogenèse normale caractérisée dans le chapitre précédent (Alix *et al.*, 2015). Les protocoles des différentes techniques utilisées ainsi que la gestion des animaux sont détaillés dans la partie *Methods* du chapitre ci-après.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique intitulé « *Deformities in newly hatched embryos of Eurasian perch populations originating from two different rearing systems* » (Alix *et al.*, 2017) et publié dans la revue « *Journal of zoology* » en février 2017.



### ARTICLE 2:

#### DEFORMITIES IN NEWLY HATCHED EMBRYOS OF EURASIAN PERCH POPULATIONS ORIGINATING FROM TWO DIFFERENT REARING SYSTEMS

---

Maud Alix<sup>1</sup>, Daniel Zarski<sup>1,2</sup>, Dominique Chardard<sup>1</sup>, Pascal Fontaine<sup>1</sup> and Bérénice Schaerlinger<sup>1</sup>

1 UR AFPA, Université de Lorraine - INRA, 2 Avenue de la Forêt de Haye, BP 172, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

2 Department of Lake and River Fisheries, University of Warmia and Mazury, ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztin, Poland

Article publié dans la revue *Journal of zoology* (2017)

#### I. Abstract

During the Teleost ontogenesis, biotic and abiotic factors influence organs deformations. Despite of an important literature, the potential causes of deformities in fish are still poorly understood. Cultured fish in artificial conditions exhibit higher incidence of developmental impairments compared to wild ones. The present study aims at describing exhaustively the deformities categories of newly hatched embryos of Eurasian perch and investigating at once all biotic and abiotic factors of two extremely different rearing systems (RAS vs. ponds) on their occurrence. The description and clustering of deformities according to the organs involved allowed not only to show that skeletal, cardiac and yolk anomalies are the most common ones, but also to highlight new functions undergoing developmental failure (locomotive, digestive and excretory systems). In total 10 categories of abnormalities have described. In addition, our data show a relationship between the cardiac and yolk deformities suggesting common causes. In a second part, we compared the incidence of deformities in the progeny of two distinct populations of fish, reared under extremely various conditions (RAS vs. pond). The total deformity rates did not differ between the groups but the nature of deformities was surprisingly different as the RAS reared fish (RRF) originating from fisheries presented a higher variety of deformity categories than the fish originating from Lorraine ponds (LPRF). Indeed, cardiac, yolk and skeletal deformities were more frequent in RRF embryos, whereas jaw abnormalities were preferentially represented in LPRF embryos. These findings may help understanding the potential causes of these developmental impairments in cultured animals and may lead to the improvement of husbandry conditions.

**Keywords:** Embryonic deformities, categorization, recirculating aquaculture system, pond, *Perca fluviatilis*, histology.

### II. Introduction

During animals life cycle, several morphological, anatomical, physiological or behavioral deviations from a standard phenotypes may occur (Divanach *et al.*, 1996). Therefore, it derives from various intrinsic and/or extrinsic factors contributing to the decrease of the developmental success, especially for the early life stages during which the definitive phenotype is built (Balon, 1990). In that context, the occurrence of divergent phenotypes during the early development can increase the susceptibility of animals to predation and could lead to the decline and the extinction of a population (Westernhagen *et al.*, 1988).

The complex issue of understanding the potential causes of developmental impairments needs detailed investigations to reveal new processes potentially disturbed during the breeders life history and the offspring development (Divanach *et al.*, 1996 ; Bonnet *et al.*, 2007a ; Pulcini *et al.*, 2015). This is important in farming animals where the production is particularly affected by these problems and in wild populations submitted to environmental changes (Divanach *et al.*, 1996 ; Réalis-Doyelle *et al.*, 2016).

Most of studies aimed at determining the effect of some specific abiotic or biotic factors on the developmental impairments, especially in species with external development as most of the finfish that are sensitive to the external factors. In that context, the effects of specific environmental factors (Westernhagen *et al.*, 1988 ; Jezierska *et al.*, 2009 ; Villamizar *et al.*, 2011 ; Bondarenko *et al.*, 2015 ; Réalis-Doyelle *et al.*, 2016), nutritional factors (Fernández *et al.*, 2008 ; Boglione *et al.*, 2013b) and husbandry practices (Aegerter et Jalabert, 2004) on the occurrence of deformities have already been reported for several species. However, these studies focused on the global deformity rates and several categories of deformities as the blastomeres cleavage, the skeletal axis, jaw, swim bladder or yolk deformities (Johnson et Katavic, 1984 ; Andrades *et al.*, 1996 ; Divanach *et al.*, 1996 ; Koumoundouros *et al.*, 1997 ; Avery *et al.*, 2009 ; Boglione *et al.*, 2013b). These deformities may compromise either the survival of the individuals or their growth rate.

As a whole, a high prevalence of deformed fish in captive conditions have been reported (Koumoundouros, 2010 ; Boglione *et al.*, 2013b). Considering the extreme, freshwater fish can be reared in ponds, close to the wild conditions, or in recirculating aquaculture system (RAS) in which all conditions are controlled to optimize fish growing and reproduction. As a consequence, cultured fish can confront various types of environments depending of the rearing system including the lack of predators, food, high density of fish and sometimes inappropriate captive conditions influencing several biological functions among which the reproduction (Andrades *et al.*, 1996 ; Pulcini *et al.*, 2015). In addition, fish maintained in one specific rearing condition are usually adapted to it. In other words, comparing fish reared in pond or RAS conditions involves to take into account not only all environmental modifications but also intrinsic factors of the breeders. Up to now, no study aimed at

investigating the global effect of all these extrinsic and intrinsic parameters at once on the deformities occurrence in the progeny.

The Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., is a promising and valuable species for the diversification of freshwater aquaculture in Europe. It is reared in RAS and pond systems and are considered at a level 4 of the domestication process according to Teletchea & Fontaine (2014). Despite of the control of its reproduction cycle, the incidence of developmental impairments is still variable (Schaerlinger et Żarski, 2015). The Eurasian perch is an interesting species to study due to its high fecundity, a detailed description of its normal embryonic development (Alix *et al.*, 2015), and the easiness to observe early developmental impairments thanks to the egg envelope transparency. Moreover, the perch spawn can easily be found from various origins (Żarski *et al.*, 2016).

The present study aims at (i) investigating the morphological deformities in newly hatched embryos and (ii) identifying the potential relationships between these abnormalities to (iii) determine the global effect of all extrinsic and intrinsic factors of populations reared in two extreme rearing conditions (pond vs. RAS) on the occurrence of deformities in Eurasian perch.

### III. Methods

#### A. Broodstock and eggs management

Fish were handled in accordance with national and international guidelines for the protection of the animal welfare (*Directive 2010/63/EU*). The study was conducted during consecutive years (2013, 2014 and 2015). Fish originated either from Lorraine ponds (LPRF, 3 batches of spawn) or a fishfarmer broodstock reared in RAS conditions (RRF, 2 batches) (Table 8).

Fish group	Origin	Environmental control of the reproductive cycle	Fish farm	Period of spawning	Number of spawn studied	Total embryos	Deformed embryos
RRF	RAS fish farm	Artificial	Lucas Perches	April 2013	7	9133	382
				June 2015	23		
LPRF	Lorraine ponds	Natural	GAEC Piscicole du Saulnois	April 2013	1	3515	203
				March 2014	5		
				March 2014	6		

**Table 8: Characteristics of fish groups.**

The names, their rearing conditions and number of samples used in the present study are detailed.

#### 1. Rearing protocol of LPRF

LPRF were caught one month before the spawning season and transferred to outdoor facilities (tanks of 3000 L, Lorraine, France) to facilitate their manipulation. At that time, females were about to ovulate and males were slightly spermiating. During the spawning season, males and females were kept together in tanks, the photo-thermal conditions were natural to promote spontaneous oocytes maturation and water temperature records varied between 8 and 16 °C. Once the first female spawned, each of them was checked daily to determine the ovulation time. The day of their ovulation, females were hand-stripped into a dry container prior to the *in vitro* fertilization.

#### 2. Rearing protocol of RRF

RRF provided by a fish-farm (Lucas Perches, Lorraine, France), were reared in an intensive system and fed with commercial pellets (Sturgeon Grower, Le Gouessant) since the early juvenile stage and transferred to our experimental facilities until the beginning of the experiments. Males and females were kept together in 500 L (2013) or 2000 L (2015) tanks connected to a RAS, with an automatic system controlling the temperature and photoperiod (Fontaine, Wang & Hermelink, 2015).

## CHAPITRE II : MALFORMATIONS EMBRYONNAIRES CHEZ LA PERCHE

Following the induction of the gonadal cycle, fish were led to mature and spawn without any additional treatment but environmental stimulation (increment of the temperature up to 12°C and dark/light photoperiod up to 8:16). Once a female was recognized to be ready to spawn, the eggs were stripped manually as described above.

### 3. In vitro fertilization and incubation of the embryos

For each fish group, the same spawning protocol was applied. The fertilization was performed according to the 'wet method' (Żarski *et al.* 2012). A mix of sperm from 3 males was added to each spawn (0.10 ml sperm/g dry eggs). During the embryogenesis, each spawn was incubated uninterruptedly until hatching at 13.0°C ± 0.5°C in a hatchery with automatic thermoregulation and UV sterilization. A constant dark/light photoperiod (8:16) was applied at a light intensity of 200 lx at the water surface. For each spawn, three samples (about 100 eggs/sample) were incubated separately to perform the experiment the same way on each sampling. The water quality of breeder's tanks and incubator are summarized in Table 9.

Fish group	pH	Dissolved oxygen (mg/L)	Nitrite (mg/L)	Ammonium (mg/L)
LPRF	8.14 ± 0.04	8.82 ± 0.23	0.09 ± 0.02	1.15 ± 0.32
RRF	7.51 ± 0.03	9.63 ± 0.06	0.19 ± 0.06	0.47 ± 0.11
Hatchery	8.08 ± 0.04	9.57 ± 0.13	0.17 ± 0.03	0.73 ± 0.24

**Table 9: Water quality of breeder's tanks and hatchery incubators.**

The water levels of pH, dissolved oxygen, concentration of nitrite and ammonium were assessed twice a week in breeder's tanks and incubators.

### B. Characterization and occurrence of deformities

The embryonic period was considered from the fertilization to the onset of exogenous feeding according to (Alix *et al.*, 2015).

#### 1. Observations of living embryos

Each spawn was monitored daily during the hatching period to collect embryos as soon as the hatch. Embryos captured the day of their hatching were observed immediately using a stereoscopic microscope (Olympus, SZX7) at low magnification (x2) to evaluate the presence of deformities. They were called newly hatched embryos (NHE). We checked several organs as the skeleton axis, the jaw, the eyes, the yolk, the fins related-structure (pectoral fins anlagen and finfold), the digestive and the cardiac system that are easily visible with this technique. To investigate more accurately which organs present an abnormality and describe the impairments, each abnormal individual was photographed the same day using a light upright optical microscope (Nikon Eclipse Ni-U) associated with a DS-Fi2 digital camera and the software NIS BR (Nikon France, France) at low magnification (x20). Abnormalities occurrence was certified after a careful comparison with normal NHE morphology at the same age (Alix *et al.*, 2015). Each NHE was assigned to one of 10 categories according to the

organs involved (axis (Ad), cardiac (Cd), yolk-sac (Yd), mouth (Md), eyes (Ed), digestive system (Dd), fins related-structure (Fd), urinary system (Ud), head (Hd) or multivariable deformed (MVd)). Some embryos exhibited several deformations in various organs. They were taken into account in each category (except embryos exhibiting MVd).

### 2. Histological study

Deformed embryos were fixed the same day in Bouin's solution for 48 hours, prepared, cut and stained as described in Alix *et al.* (2015). Stained sections were examined using a light upright optical microscope (Nikon Eclipse Ni-U) at x100 magnifications (Nikon France, Champigny-sur-Marne, France). To better characterize deformities involving the cardiac system, yolk, jaw and skeletal axis (abnormalities more often observed), 5 embryos per organ coming from 15 different spawn were longitudinally cut. In addition, 5 embryos were transversally cut for the cardiac and yolk deformities.

### C. Data analyses

In total 42 spawn were examined (30 from RRF and 12 from LPRF) among which 585 NHE exhibit macroscopic deformities (Table 8). For each spawn, the total number of NHE were taken into account to calculate the total deformity rate ( $Dr = \text{number of deformed embryos} / \text{number of hatched embryos} \times 100$ , in %). The mean deformity rate has been obtained for each of the fish group  $\pm$  standard error (RRF and LPRF). In addition, specific deformity rates were calculated as the number of hatched embryos exhibiting a particular deformity in relation to the total number of abnormal embryos (in %). The assumption of normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Levene test) were tested for all the deformities variables. The specific deformities rates were represented with box plots in RRF or LPRF. When data did not respect the assumption of normality, a non-parametric Mann Whitney test was used to determine a significant difference between the total deformities or specific deformities rates according to the global effect of abiotic and biotic factors linked to the rearing conditions. Statistical analyses were performed on the mean of deformity or specific deformities rates.

In order to determine potential relationships between categories of deformities, a Principal Component Analysis (PCA) was performed using the specific deformities rates and represented on a correlation circle. Moreover, a Pearson's correlation table was generated. Data analyses were performed with "R" software (version 3.2.5).



### IV. Results

Investigating the deformities in newly hatched embryos (NHE) allows not only characterizing deformities commonly described in other species and in various environmental conditions, but also less described categories.

#### A. Macroscopic and histological description of embryonic deformities

##### 1. Axis deformities

Ad were found to be the most frequent category of impairment ( $61.1\% \pm 4.9\%$ ). Among them, one distinguishes lordosis (V-shaped dorsal-ventral curvature), kyphosis ( $\Lambda$ -shaped dorsal-ventral curvature) and scoliosis (lateral curvature) (Figure 32B). The histological analysis did not reveal any cellular defect in the notochord or the tissues surrounding the deformed parts of the body (e.g. muscle).

##### 2. Mouth deformities

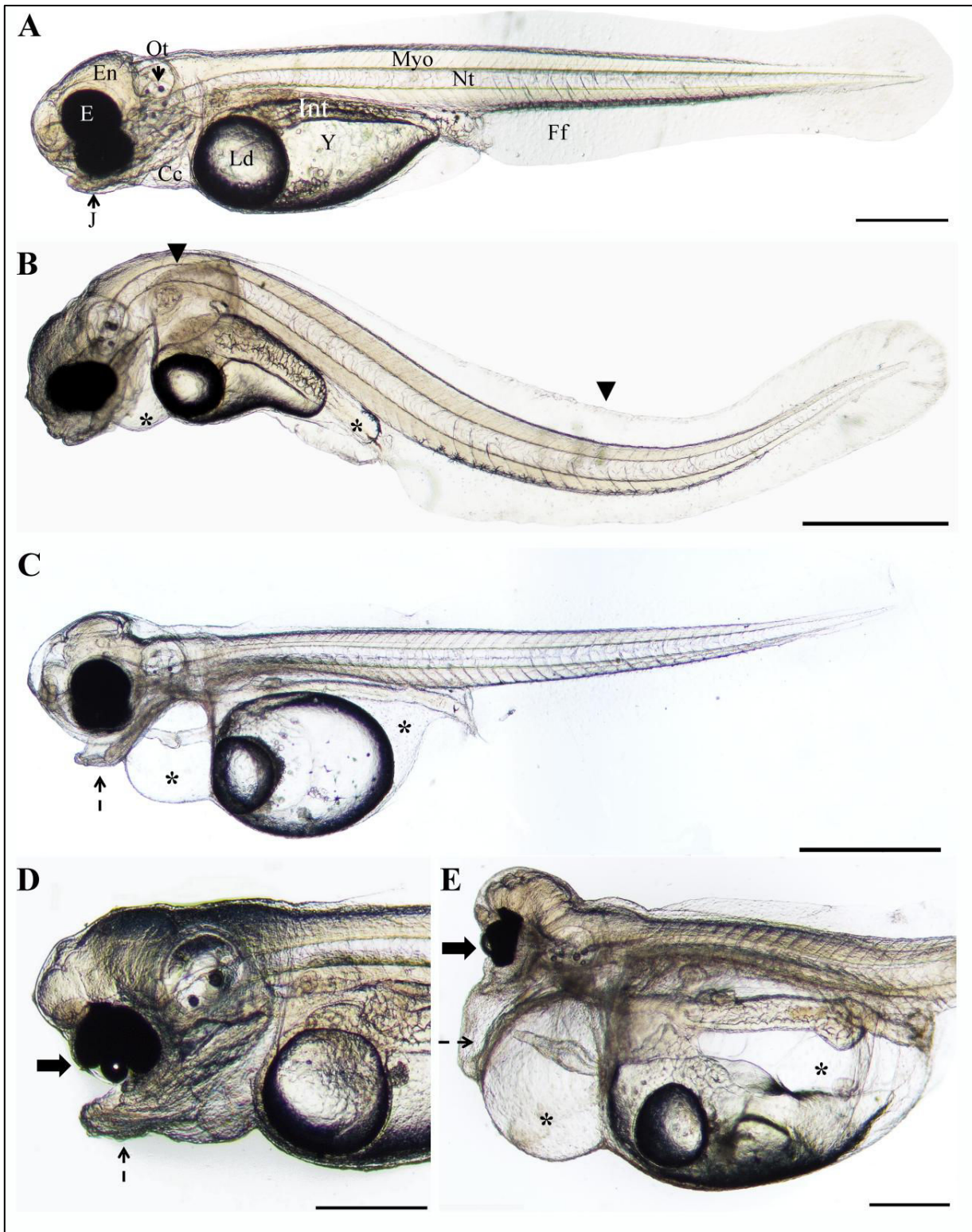
Md were the second most frequent deformity category recorded ( $33.6\% \pm 4.8\%$ ). They were primarily observed on the lower jaw, with shortening (Figure 32C and D), elongation or a gaping mouth phenotype (Figure 32E). No difference between normal and abnormal tissues was found at the histological level.

##### 3. Yolk deformities

Yd represents  $27.8\% \pm 4.5\%$  of the deformed embryos. NHE exhibit mainly yolk sac edema, pear-shape yolk or yolk detachment (Figure 32B, C and E). This yolk detachment is accompanied by an abnormal morphology of the liver which is drawn out between the intestine and the yolk. In comparison with normal specimens (Figure 33A, C and E), the histological study reveals that NHE with yolk edemas exhibit generalized edema in the body as described more accurately below (Figure 33B and F).

##### 4. Cardiac deformities

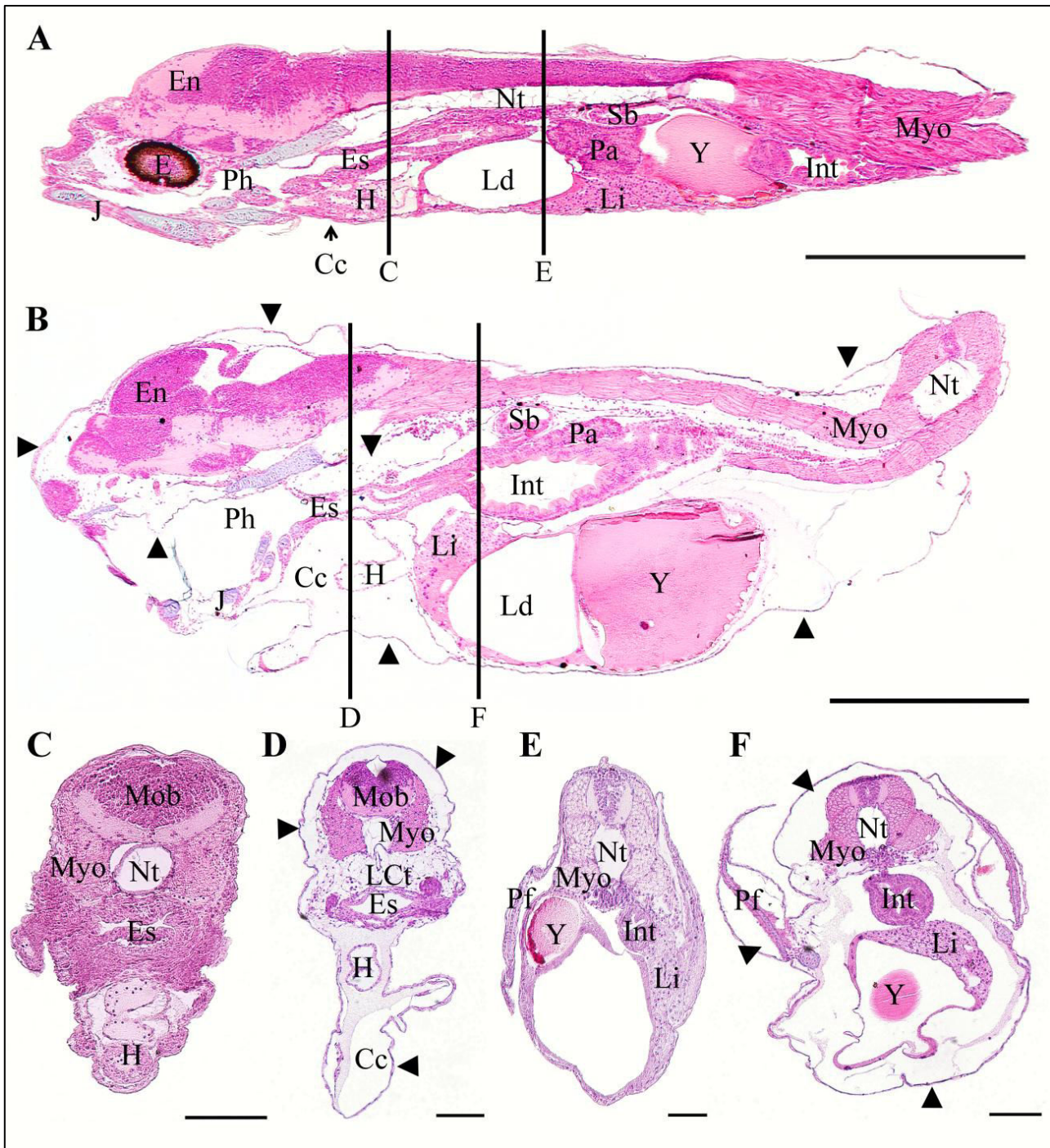
Two main types of deformities have been observed. Firstly, cardiac cavity edema (Figure 32B, C and E), secondly, a modification of the heart shape which is elongated has been observed and to a less extent heart atrophy (Figure 32C and E). Cd were found in  $27.3\% \pm 4.7\%$  of deformed embryos. As previously mentioned, cardiac and yolk edemas often occurred simultaneously (85% of embryos exhibiting an edema).



**Figure 32: Description of the most frequent deformities in NHE.**

(A) Normal NHE. (B) NHE with a skeletal axis deformity, kyphosis in the anterior part and lordosis in the posterior part of the body, (black arrowhead) and edema in cardiac cavity and around the posterior intestine (stars) leading to the deformation of the yolk (pear-shape yolk). (C) NHE with jaw deformity with a shortening of the lower jaw (dotted arrow) and a yolk and cardiac edema (stars). (D) Detail of a NHE's head with eyes (large arrow) and jaw deformities (dotted arrow). (E) Anterior part of an abnormal NHE with eyes deformity (large arrow), gaping jaw deformity (dotted arrow, the anterior cartilage bent down and the mouth could not be closed) and multiple edemas (stars). (Cc) cardiac cavity, (E) eyes, (En) encephalon, (Ff) finfold, (Int) intestine, (J) jaws, (Ld) lipid droplet, (Myo) myotome, (Nt) notochord, (Y) yolk. Scale bars represent 1000  $\mu\text{m}$  for A-C and 500  $\mu\text{m}$  for D-E.





**Figure 33: Histological description of NHE presenting cardiac and yolk edema.**

(A) Sagittal section of the head and the trunk of a normal NHE. Vertical black lines represent the location of transverse sections of other embryos shown in C and E. (B) Sagittal section of the head and the trunk of a NHE presenting a generalized edema. The epithelium is detached from the connective tissue or the underlying myotome in the head and the upper jaw. This edema is also visible in the ventral part of the esophagus, in the cardiac cavity, around the yolk sac and in the ventral part of the tail (black arrowheads). Vertical black lines represent the location of transverse sections of similar other embryos shown in D and F. (C-D) Transverse section presenting the region of the cardiac cavity of (C) a normal NHE and (D) a NHE presenting a generalized edema (black arrowheads) with an epithelial detachment as well as loose connective tissues between the notochord, the esophagus and the mass of the myotomes. The cardiac cavity is elongated because of this edema. (E-F) Transverse section at the level of the trunk of (E) a normal NHE and (F) a NHE presenting a generalized edema (black arrowheads) with an epithelial detachment around all the tissues. (Cc) cardiac cavity, (E) eyes, (En) encephalon, (Es) esophagus, (H) heart, (Int) intestine, (J) jaw, (Lct) loose connective tissue, (Ld) lipid droplet, (Li) liver, (Mob) medulla oblongata, (Myo) myotome, (Nt) notochord, (Pa) pancreas, (Pf) pectoral fin, (Ph) pharynx, (Sb) swim bladder, (Y) yolk. Scale bars represent 500  $\mu\text{m}$  for A-B and 100  $\mu\text{m}$  for C-F.

The histological study revealed also edemas in the head, upper jaw, around the eyes, under the esophagus and between organs of these NHE (Figure 33B, D and F). In addition, it corresponds to the presence of loose connective tissue (Figure 33D) and empty spaces observable around the pectoral fins anlagen (Figure 33F).

### 5. Eyes deformities

Ed were found in  $8.7\% \pm 2.9\%$  of the deformed embryos and could be subdivided into two main types. First, a total or partial fusion of the optic cup (cyclops) and second a pigmentation-deficient eyes (Figure 32D and E). Moreover, the histological analyses showed that Ed could be observed on transversal or sagittal sections of embryos that didn't present any macroscopic eyes deformities (Figure 34). Nevertheless, it may coincide with other categories of deformities as generalized edemas. In these conditions, slight or total disorganization of the cellular layers (Figure 34B, C, D and F) could be seen compared to the normal eyes structure (Figure 34A). Actually, bipolar, ganglion and amacrine cells blended in the same cellular layer instead of three distinct ones (Figure 34B and C). Moreover, the choroidal melanocytes layer was damaged at various levels and detached from the other ones (Figure 34C). In more severe cases, a total disorganization of all cell layers especially for the choroidal melanocytes was observed (Figure 34D and F). In some cases, a fusion of the optics cups with the merge of several layers was observed (Figure 34E), even in embryos without any macroscopically visible eyes impairments. Finally, the NHE presenting a partial fusion of the eyes macroscopically, showed a merged optic cups with a complete disorganization of cellular structure (Figure 34F).

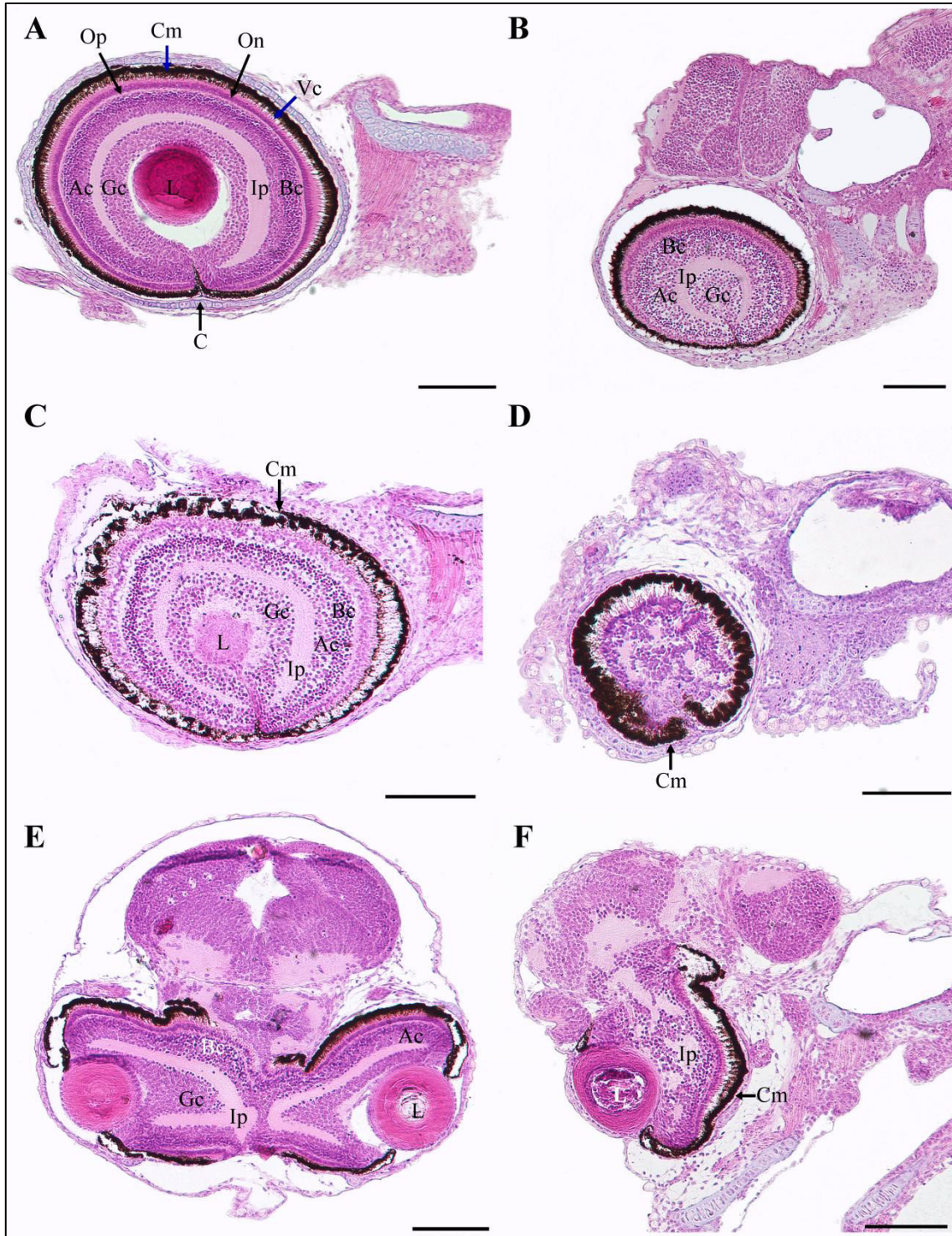
### 6. Digestive system deformities

Dd were found in  $3.5\% \pm 1.3\%$  of the deformed embryos. Various types of abnormalities have been observed among which the digestive tract hypertrophy (Figure 35B, C, D and G), clearly visible in the intestine with different scales of severity (Figure 35B, C and D) and could be observed in the rectum (Figure 35C, D and G). Digestive hypertrophy was often associated with the presence of other edemas (Figure 35B, C, G and H). The second kind of deformities corresponds to an absence of folded intestinal villi (Figure 35E) potentially leading to a decrease of the absorption surface. In spite of this, the mucosal folding pattern was visible in the rectum.

### 7. Fins related-structure deformities

Fd correspond to  $2.0\% \pm 0.7\%$  of the deformed embryos. They were either associated to the anal orifice absence and then mainly correspond to a continuous veil in the ventral part of the NHE (Figure 35B, C, F and G). Another type of fins deformities is a lack of development of the pectoral fins anlagen (data not shown).

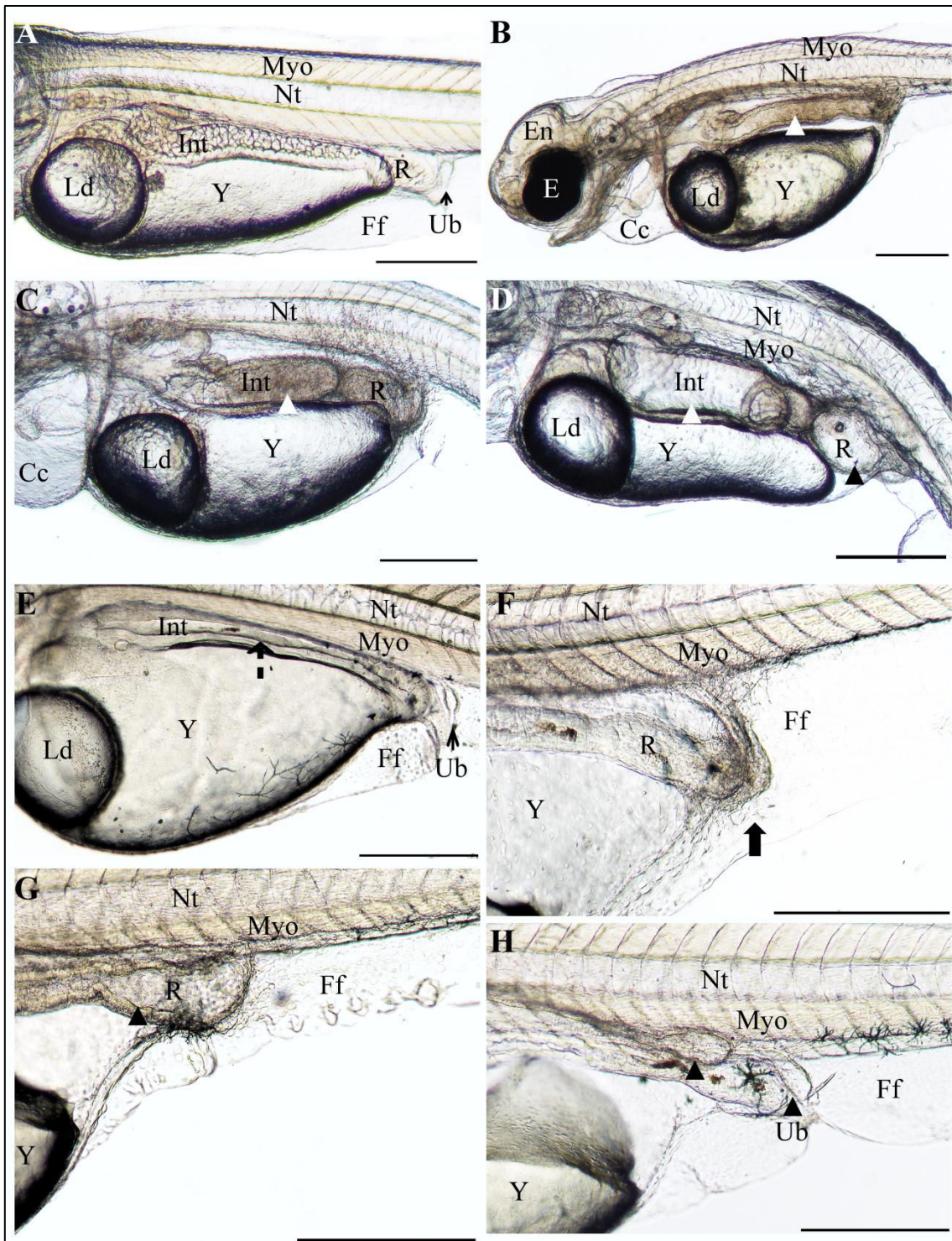




**Figure 34: Histological description of several kinds of eyes deformities in NHE.**

(A) Sagittal section of a normal eye in NHE. (B-C) Sagittal section of abnormal eyes with a blending between several cellular layers as interneuron bipolar (Bc), ganglion (Gc) and amacrine cells (Ac). (B) Slight disorganization with a blending between the amacrine, ganglion, and bipolar cells layers. Bipolar cells are visible in the amacrine and ganglion cells layers. (C) Severe disorganization in the amacrine, ganglion, bipolar cells, and choroidal melanocytes layers. Bipolar cells are visible in the amacrine and ganglion cells layers. Moreover, the choroidal melanocytes layer is detached from the other ones. (D) Sagittal section of an abnormal eye with a total disorganization of all cellular layers. (E) Transversal section of NHE's head with merged eyes combined with edema inducing epithelial detachment all around the head. (F) Sagittal section of merged eye with total disorganization of cellular layers except Op, On and Vc layers and potential encephalon deformity. Some cellular layers are not visible in this case. (Ac) amacrine cells, (Bc) bipolar cells, (C) cartilage, (Cm) choroidal melanocytes, (Gc) ganglion cells, (Ip) inner plexiform, (L) lens, (On) outer nuclear layer, (Op) outer plexiform, (Vc) visual cells. Scale bars represent 100  $\mu$ m.





**Figure 35: Description of the digestive, urinary and fins-related-structures deformities in NHE.**

(A) Normal digestive and urinary system in a NHE. (B-D) Different levels of hypertrophy of the digestive system. (B) NHE with a slight hypertrophy of the intestine (white arrowhead) combined to cardiac edema. (C) Hypertrophy of the intestine (white arrowhead) and the rectum combined to cardiac edema. (D) Severe hypertrophy of the intestine (white arrowhead) and the rectum (black arrowhead) with a skeletal deformity. (E) Absence of primary folds in the intestinal mucosa (dotted arrow). (F) Absence of the urinary and anal orifice (large arrow). (G) Hypertrophy of the rectum (black arrowhead) and absence of a visible urinary bladder combined with yolk edema. (H) Hypertrophy of urinary ducts and bladder (black arrowhead) combined with yolk edema. (Cc) cardiac cavity, (E) eyes, (En) encephalon, (Ff) finfold, (Int) intestine, (Ld) lipid droplet, (Myo) myotome, (Nt) notochord, (R) rectum, (Ub) urinary bladder, (Y) yolk. Scale bars represent 500  $\mu$ m.



### 8. Urinary system deformities

Ud correspond to  $1.6\% \pm 0.9\%$  of the deformed embryos. These abnormalities correspond mainly to the absence of the urinary bladder (Figure 35B, C, D, F and G). Rarely, hypertrophies of the posterior part of pronephric ducts and urinary bladder were noticed (Figure 35H). As for the digestive system, the hypertrophy was often associated with the presence of edemas (Figure 35H). Finally, an absence of urinary or anal orifice was observed after the rectum and the urinary bladder (Figure 35F).

### 9. Head deformities

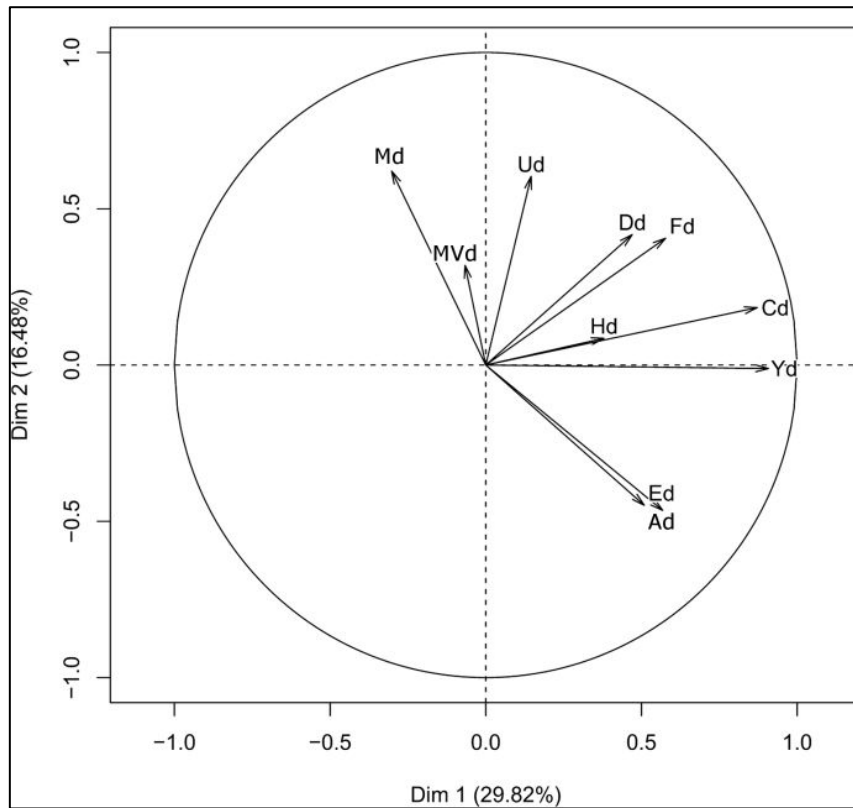
This designation mainly groups abnormalities involving defects of central nervous system or the sensitive organs placed on the head. For example, a displacement of the olfactory organs was observed (data not shown). They correspond to  $1.1\% \pm 0.7\%$  of the deformed embryos.

### 10. Multivariable deformities

Finally, this category involves NHE lacking a large part of the normal body. For example, when the anterior or the posterior parts of the embryos are lacking, it will lead to individuals without the head or the tail (data not shown). These abnormalities are rare with  $1.1\% \pm 0.6\%$  of the deformed embryos.

### B. Potential relationships between the categories of deformities

In every spawn, most of the NHE exhibit multiple deformities. The next question was thus to determine whether some of them always occur in the meantime, suggesting some common causes and/or mechanisms impaired. To do so, correlations were performed between the specific deformities rates of each category (Figure 36 and Table 10). Firstly, three defined axes explained 61.9% of the variance (29.8%, 16.5% and 15.6% for the axis 1, 2 and 3, respectively) (Figure 36). The first axis was strongly associated to the Yd and Cd ( $r=0.91$  and  $r=0.87$ , respectively). The second axis was mainly described by the Md ( $r=0.62$ ) whereas the third axis was correlated with the MVd and Ud ( $r=0.83$  and  $r=0.65$ ). As these data suggest that predominant relationships could exist between deformities categories linked to the same axis, Pearson's correlation coefficient values were generated, indicating that only the Yd and Cd were highly and significantly correlated ( $r=0.84$ , Table 10).



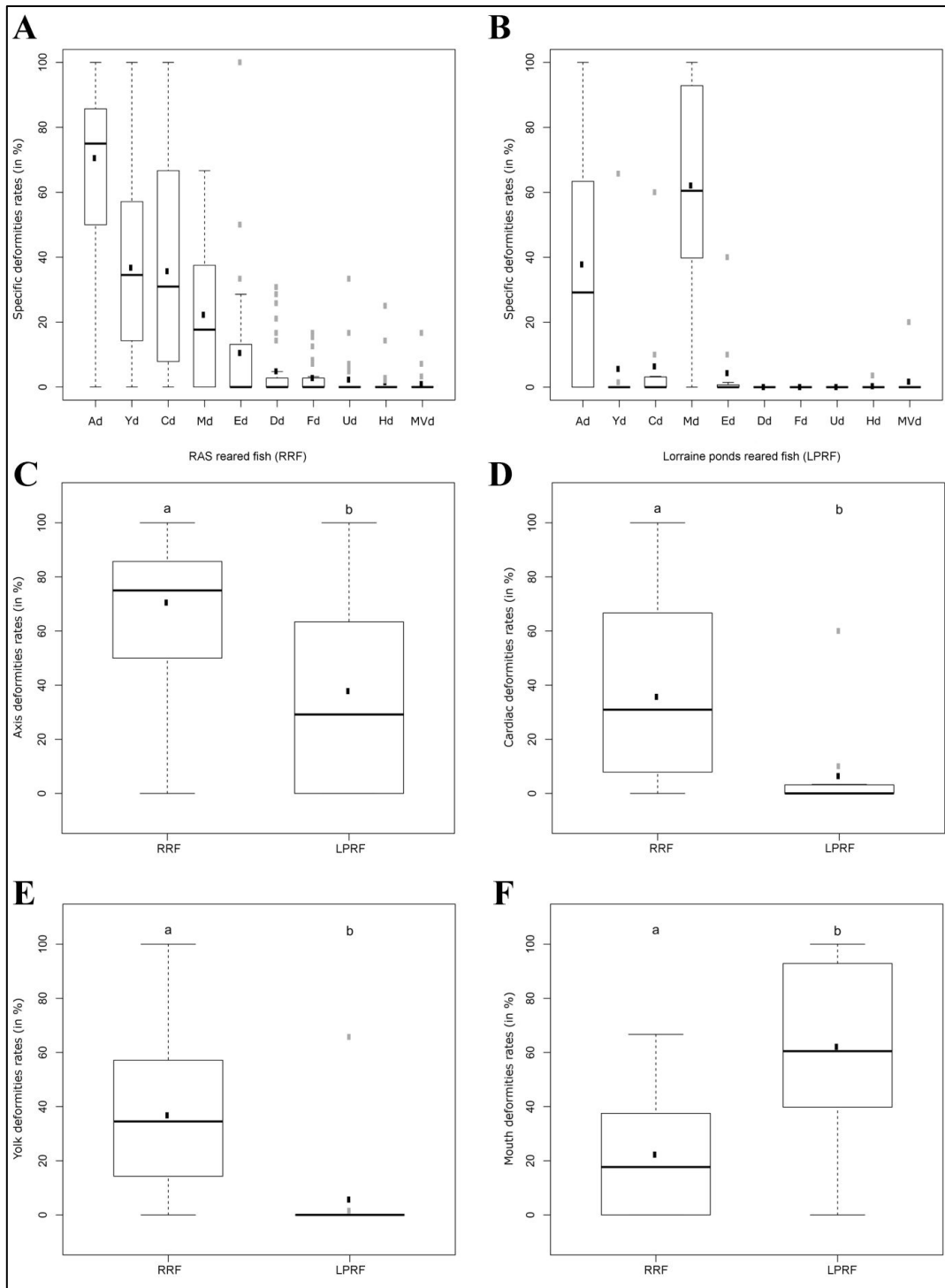
**Figure 36: Study of the potential correlations between the types of deformities.**

Correlation circle of the Principal Component Analysis (PCA) presenting the potential relationships between the types of deformities observed in all NHE.

	<b>Ad</b>	<b>Ed</b>	<b>Yd</b>	<b>Cd</b>	<b>Md</b>	<b>Ud</b>	<b>Dd</b>	<b>Fd</b>	<b>Hd</b>	<b>MVd</b>
<b>Ad</b>		0.23	0.40	0.3	-0.58	-0.08	0.09	0.17	0.22	0.09
<b>Ed</b>			0.53	0.45	-0.25	-0.06	-0.05	-0.04	-0.03	-0.10
<b>Yd</b>				<b>0.84</b>	-0.17	0.13	0.34	0.37	0.30	-0.10
<b>Cd</b>					-0.03	0.25	0.36	0.43	0.26	-0.04
<b>Md</b>						0.07	0.04	-0.04	0.06	-0.07
<b>Ud</b>							0.04	0.14	-0.06	0.54
<b>Dd</b>								0.47	0.03	-0.06
<b>Fd</b>									0.26	-0.10
<b>Hd</b>										-0.07

**Table 10: Pearson’s correlations table on the deformities rates in all newly hatched embryos.**

The italic and bold number corresponds to the highly correlated variables ( $r > 0.80$ ). (Cd) cardiac deformities, (Dd) digestive deformities, (Ed) eyes deformities, (Fd) fins deformities, (Hd) head deformities, (Md) mouth deformities, (MVd) multivariable deformities, (Ad) axis deformities, (Ud) urinary deformities, (Yd) yolk deformities.



**Figure 37: Incidence of the deformities according to the organs and the rearing conditions of breeders (RAS vs. pond).**

(A-B) Box plots representing the percentage of deformities occurring in each organ in relation to the total number of deformed NHE from (A) RAS reared fish (n=382) and (B) pond reared fish (n=203). (C-F) Box plots representing the percentage of four types of deformities according to the rearing conditions of the breeders. (C) Skeletal deformities rates (in %). (D) Yolk deformities rates (in %). (E) Cardiac deformities rates (in %). (F) Jaws deformities rates (in %). Some NHE present multiple deformities and are thus included in the counting for several organs. The bold black line represents the median deformities rates, the small black rectangles are the mean specific deformities rates and the small grey rectangles represent atypical spawns with specific deformities rates (outliers or observations considered as abnormal in the population). Different letters indicate significant differences between rearing conditions of reproductive cycle at  $p < 0.05$  using a non-parametric Mann Whitney test. (LPRF) pond reared fish, (RAS) recirculating aquaculture system, (RRF) RAS reared fish.

### **C. Incidence of deformities categories according to the global effect of biotic and abiotic factors linked to the rearing system**

The present work shows that the RRF and LPRF present various developmental impairments. Within a spawn, several categories of abnormalities were observed and numerous embryos presented several deformities. The total deformity rate (Dr) ranged from 0.8% to 20.8%, depending on the spawn. No significant difference was observed in the Dr according to the broodstock groups and mean values amounted to  $6.2\% \pm 0.99\%$  and  $5.8\% \pm 1.66\%$  for the RRF and LPRF, respectively. In addition, the deformity categories with an occurrence lower than 3.5% (Dd, Fd, Ud, Hd and MVd), varied between 0 and 30% according to the spawn. The deformities with occurrences higher than 8.5% (Ad, Cd, Yd, Md) varied between 0 and 100%. A detailed statistical analysis revealed that the Md and Ad correspond to the main deformities found in LPRF fish, while the RRF present a higher variety of organs deformed (Figure 37A and B). Moreover, Ad, Cd and Yd were significantly higher in RRF than in LPRF ( $p < 0.05$ ) (Figure 37C, D and E). Interestingly, the Md was more often frequent in LPRF than RRF (Figure 37F). No significant difference was found between the LPRF and RRF for other categories of deformities.

### V. Discussion

Enhancing the knowledge of embryonic deformities helps to improve the rearing conditions. Current works mainly focused on the effect of some specific intrinsic/extrinsic factors on some specific deformities. These studies didn't take into account the potential interactions between all factors that could lead to deformities occurrence. As a starting point, we thus compared two populations of fish adapted to extremely variable environments. We thus took into account all abiotic and biotic factors varying in the two conditions as a whole. As a consequence, several hypotheses could explain differences between the two populations as the feeding regime, the genetic, especially family structure or consanguinity levels (Afonso *et al.*, 2000; Izquierdo, Fernandez-Palacios & Tacon, 2001; Boglione *et al.*, 2013) as well as other factors. Our exhaustive approach allowed highlighting various developmental impairments depending on the rearing conditions.

So far, it was generally accepted that artificial rearing conditions may have a significant impact on the occurrence of developmental impairments in several species and that the deformities incidence appears to be significantly lower in wild populations (Koumoundouros, 2010; Boglione *et al.*, 2013). Nevertheless, here, we did not find any significant differences for the Dr between the RRF and LPRF even though a large number of parameters were different between these populations. This may stem from the fact that deformities can appear throughout the fish's life and the difference of deformity occurrence related to rearing conditions could emphasize later. Even if the mean Dr appear low; huge variations occur between the spawn even within a group of fish depending on the organs or systems involved. This extreme variation has huge consequences on the offspring survival or health. Among the several types of deformity studied in the literature, those involving the skeleton (body axis and mouth), the yolk and the swim bladder are more often described and now well defined for several species (Boglione *et al.*, 2013). Here, we show that in perch also, the main deformities categories observed correspond to the skeletal axis and the mouth deformities as well as the cardiac and yolk deformities. Nevertheless, these last categories were more significantly frequent in the RRF than in LPRF.

Concerning the yolk and cardiac anomalies, we found that they were usually associated together and, to a larger extent, to global edemas. It was already observed in the Atlantic halibut (*H. hippoglossus*) larvae where it was probably related to unfavorable temperatures without any clear link to the broodstock origin (Ottesen & Bolla, 1998). Relationships between broodstock rearing conditions and yolk abnormalities was reported in Atlantic salmon (*S. salar*), because of an excessive stress during the pre-spawning period (Eriksen *et al.*, 2006). It can thus be suggested that higher incidence of yolk deformities observed in this study in the case of RRF could be related to the stress level experienced by the breeders.

Conversely to the deformity categories previously mentioned (e.g. Ad, Cd, Yd), the incidence of Md was significantly higher in NHE originating from LPRF than from RRF. Little information is

available about the potential determinants of this type of deformity, except the nutrition and the genetics (Boglione *et al.*, 2013). Here, the significantly high mouth deformity frequency in LPRF compared to RRF NHE may be explained by pollutants potentially present in the pond system (Gaillard, 2014). Indeed, the accumulation of environmental contaminant in fish oocytes may affect the developmental success and provoke mouth deformities (Jeziarska *et al.*, 2009).

Ed were observed in some species but have poorly been studied. It has been shown that they can result from several factors (e.g. ultraviolet light exposure, post-ovulatory ageing, nutrition and rearing conditions) and can impact fish health, behavior, survival and growth (Bonnet *et al.*, 2007; McElwain *et al.*, 2013). Our histological studies reveal various level of cellular layers disorganization. Interestingly, some macroscopically normal eyes exhibit abnormalities in the cellular structure. They may lead to individuals with huge visual impairments, potentially compromising their survival as the Eurasian perch is a visual predator (Vlavanou, 1996). In order to further investigate these deformities, it would be interesting to couple more detailed cellular structure of the eyes study with behavioral experimentations. It would allow understanding the consequences of these structural anomalies on the visual and biological responses of the larvae and potentially explain some lethalties observed in hatcheries by the time of first exogenous feeding.

Other categories of deformities (digestive, fins, urinary, head and multivariable deformities) have never or very poorly been described in the literature. It may be due to their little frequency and difficulties in observation compared to other anomalies. However, they may explain, at least partly, some survival troubles at some specific stages. These anomalies may alter some important biological functions such as the digestion, excretion and fish locomotion. The results observed in this study indicate that the fin related-structures deformity, widely observed in the perch hatcheries, may stem from the impairments determined already at the embryonic stages. According to the normal perch developmental table (Alix *et al.*, 2015), the anus closure or urinary bladder development always occur at the same time (7 dpf for the urinary bladder and 10 dpf for the anus opening). In the present study, embryos were collected at their hatching date (6-15 dpf) and compared to normal embryos of the same age. As a consequence, in our case, these variations rather reflect developmental defects than normal variations in the chronology as it could happen in other fish species. Further works are needed to better characterize all these developmental abnormalities.

As a conclusion, this study is the first one characterizing various deformities categories according to the rearing conditions of breeders. For the freshwater fishes, the pond and RAS correspond to the extreme opposite rearing conditions in term of human control of the fish environment. In addition, fish populations adapted to these conditions present phenotypic and genetic divergences that could also influence the deformities occurrence. In the literature, most of studies tented to understand the effect of individual factors on the deformities occurrence. However, the combination of several parameters may have additive or antagonist effects. Taking into account in the meantime all factors allows making a state of place of the differences occurring between the two



rearing systems. Even if some of the abnormalities may be related to some specific factors, further studies are needed to improve our knowledge and the fish rearing conditions in fishfarms.

### VI. Acknowledgment

We thank the French Ministry of Research for M. Alix fellowship and INRA for their financial support of the project. We also thank Yannick Ledoré and Alain Iurétig for take care of the fish. Finally, we thank LUCAS PERCHES, the GAEC Piscicole du Saulnois and the GFA du Kuhweg for the fish.

# Etude des malformations embryonnaires chez des populations d'élevages extensif et intensif de perche commune

## Contexte

Au cours de l'**embryogenèse des Téléostéens**, certains facteurs biotiques et abiotiques peuvent influencer la formation des organes et induire des phénotypes divergents appelés **malformations**. Malgré une littérature abondante, peu d'informations sont connues sur les **catégories de malformations** et les **potentielles causes** dont elles sont issues. Cependant, la fréquence d'apparition des malformations est plus importante chez les individus d'élevage que chez les sauvages. Dans le contexte d'**identification de la production aquacole** de la perche commune, différentes conditions d'élevage sont utilisées : extensive, semi-intensive ou intensive.

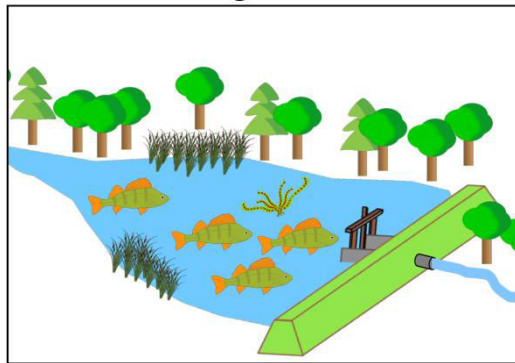
Quelles sont les catégories de malformations observées dans ces conditions ?

## Objectifs

Répertorier et catégoriser les **malformations** chez les nouveaux embryons éclos (NHE) de perche commune ;  
Identifier de **potentielles relations** entre les catégories de malformations ;  
Déterminer l'**impact des différentes conditions d'élevage** sur l'apparition de ces malformations.

## Matériel et méthodes

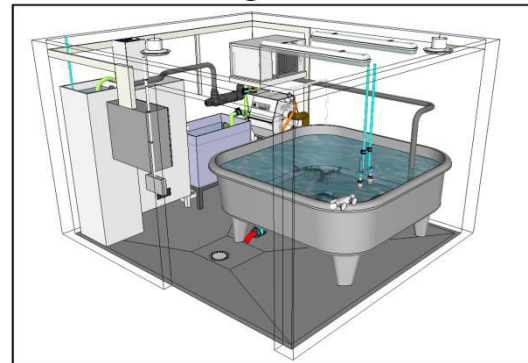
### Elevage extensif



#### Population PRF (2, 3, 4)

- Origine : étangs Lorrains
- Contrôle du cycle de reproduction naturel
- 12 pontes utilisées

### Elevage intensif

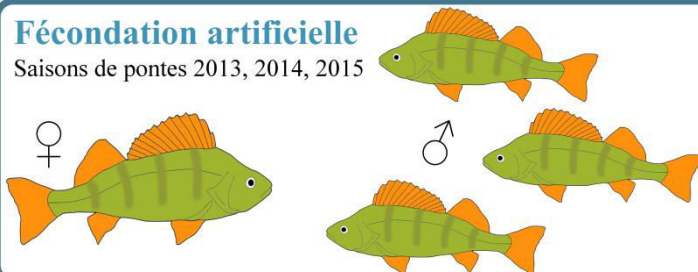


#### Populations RRF (1, 7, 8)

- Origine : système de recirculation en aquaculture (RAS)
- Contrôle du cycle de reproduction artificiel
- 30 pontes utilisées

## Fécondation artificielle

Saisons de pontes 2013, 2014, 2015

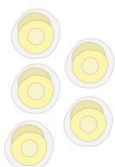
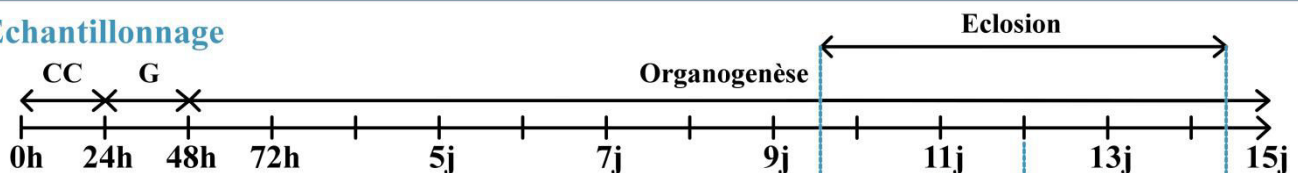


## Incubation



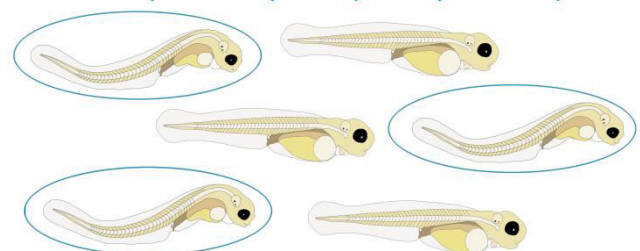
- 13°C ± 0,5°C
- 200 lux, 8:16 (obscurité:lumière)
- 42 pontes
- 3 échantillons/ponte
- 100 oeufs/échantillon

## Echantillonnage



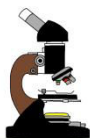
### Tri des embryons libres

- Captures quotidiennes des embryons nouvellement éclos
- Observation à la loupe binoculaire
- Sélection des phénotypes divergents



### Observations macroscopiques

- Identification des organes malformés
- Détermination des catégories
- Photographie des malformés au microscope



### Analyses histologiques

- Catégories : squelette, mâchoire, cardiaque et vitellus
- 5 embryons/catégorie
- Coloration hématoxyline et éosine



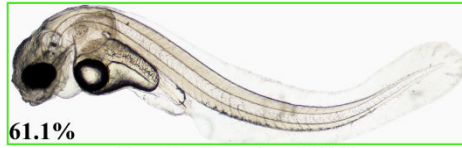
## Résultats

### Caractérisation des malformations et potentielles relations entre les catégories

#### 10 catégories de malformations identifiées

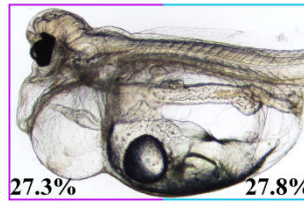
5 catégories plus fréquentes > 8.5% : Sd, Yd, Cd, Jd, Ed

5 catégories moins fréquentes < 3.5% : Dd, Fd, Ud, Hd, Md



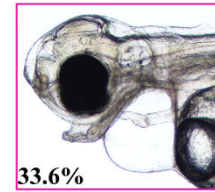
61.1%

Squelettique (axe) (Sd)



27.3%

Cardiaque (Cd)



27.8%

Vitellus (Yd)

33.6%

Mâchoire (Jd)



1.1%

Multivariable (Md)

La plupart de **embryons** présentent **plusieurs catégories de malformations**.  
Des **relations prédominantes** existent entre les catégories Cd et Yd.

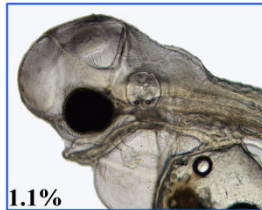
Les **analyses histologiques** révèlent que les catégories Cd et Yd sont principalement composées d'**oedèmes** qui sont **généralisés** à l'ensemble de l'embryon.

De plus, ces analyses ont mis en évidence des **malformations des yeux** qui n'étaient **pas visibles macroscopiquement** chez les embryons.



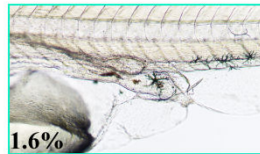
8.7%

Yeux (Ed)



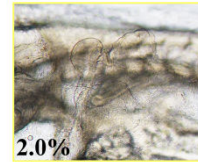
1.1%

Tête (Hd)



1.6%

Système urinaire (Ud)



2.0%

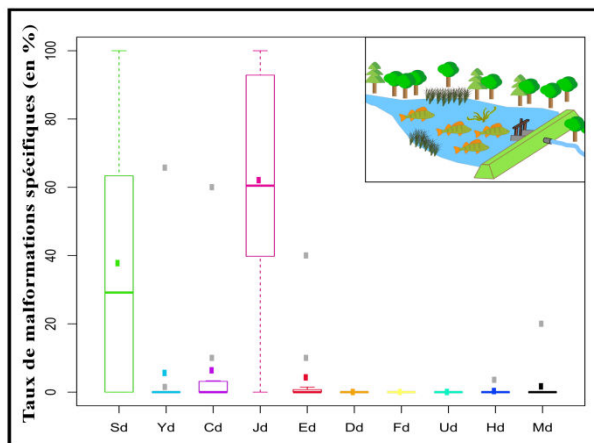
Nageoires (Fd)



3.5%

Système digestif (Dd)

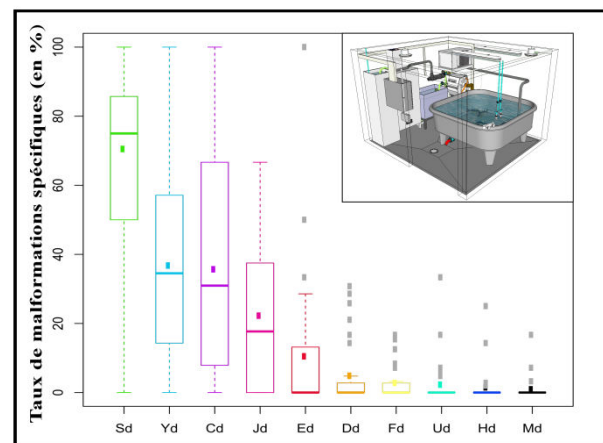
### Impact de différentes conditions d'élevage sur l'apparition des malformations



Population PRF

Taux global de malformation = **5.8%**

Sd et Jd sont les principales catégories de malformations



Population RRF

Taux global de malformation = **6.2%**

Sd, Jd, Cd, Yd, Ed, Dd, Fd sont les catégories de malformations les plus représentées.

**Pas de différence** entre les **taux globaux** de malformation RRF et PRF  
Sd, Cd, Yd sont significativement **plus fréquents** chez les **embryons RRF** que chez les PRF.  
Jd est significativement **plus fréquent** chez les **embryons PRF** que chez RRF.

### Discussion et Conclusions

Parmi les malformations les plus observées et étudiées dans la littérature, **Sd, Jd et Yd** sont les plus décrites. Chez la perche commune, ce sont également les plus fréquentes avec **Cd**. Cependant, d'autres catégories ont pu être identifiées.

Globalement, **10 catégories de malformations** ont été décrites dont certaines sont **fortement corrélées** (Yd et Cd). Cela pourrait être dû à des **mécanismes communs**. La **fréquence d'apparition** de certaines **catégories de malformations** (Cd, Yd, Sd, Jd) est **différente** en fonction des **conditions d'élevage des géniteurs**. Cependant, les **facteurs extrinsèques** étant très **différents** entre les deux conditions, les **origines** de ces malformations sont encore **difficiles à déterminer**.

### Perspectives

La caractérisation des différentes **catégories de malformations** pourrait permettre d'identifier les **origines** de ces défauts contribuant à la **variabilité du succès de développement**. La **détermination de ces succès** pourrait aider dans la compréhension des **mécanismes** impliqués dans ces défauts de l'embryogenèse.

**CHAPITRE III  
VARIABILITE DES  
SUCCES DE  
DEVELOPPEMENT**

### Contexte

Comme cela a pu être décrit dans les chapitres précédents, le développement embryonnaire peut se dérouler normalement ou dans certaines conditions conduire à des défauts comme l'apparition de malformations pouvant induire des performances de reproduction et donc des succès de développement variables. L'étude du succès de développement est particulièrement importante et ce, chez de nombreuses espèces comme l'Homme ou les espèces d'élevage. En effet, afin de pallier à de potentiels problèmes de reproduction et d'infertilité, la production d'embryons viables et normaux est une étape clef qui peut être perturbée par de nombreux facteurs induisant des défauts de l'ontogenèse (Bobe et Labbé, 2010 ; Gupta et Nandi, 2012). Ces facteurs peuvent être multiples comme les conditions environnementales, l'histoire de vie des individus, la nutrition, le stress ou encore l'âge (Ashworth *et al.*, 2009 ; Valdebenito *et al.*, 2015 ; Zhang et Smith, 2015). Malgré une littérature abondante à ce sujet, les facteurs déterminants permettant le bon déroulement de l'ontogenèse sont encore peu connus. Par conséquent, dans le but de comprendre les origines de ces défauts et améliorer la production d'embryons chez ces espèces, la caractérisation du succès de développement est une étape indispensable.

Chez l'ensemble des animaux, la qualité des ovules est un facteur particulièrement important pour le succès de développement (Zhang et Smith, 2015). Par conséquent, de nombreuses études portent sur la qualité ovocytaire et la définissent pour les poissons comme la capacité d'un ovule à être fécondé et à se développer en un embryon normal (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013 ; Bobe, 2015). Malgré cette définition claire de la qualité des ovules, aucune étude ne mentionne de définition précise pour le succès de développement pourtant lié à cette qualité et grâce auquel elle peut être caractérisée.

Dans ce contexte, le succès de développement des Téléostéens pourrait donc être défini comme la capacité d'un œuf fécondé, ou zygote, à survivre, éclore et se développer normalement afin de participer à la génération suivante. Actuellement, la caractérisation du succès de développement et de la qualité de la reproduction s'effectue principalement par la mesure de la morphologie des blastomères durant le clivage cellulaire, de taux de survie à différents stades, de taux d'éclosion et de malformation embryonnaire et larvaire, en relation avec la qualité des gamètes (Bobe et Labbé, 2010). Cependant, ces indicateurs différents sont très nombreux et leur utilisation n'est pas forcément pertinente chez toutes les espèces (Vallin et Nissling, 1998 ; Rideout *et al.*, 2004 ; Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013). En effet, certains de ces indicateurs ne peuvent pas être mesurés chez toutes les espèces ou peuvent mener à des conclusions opposées, empêchant leur généralisation. De fait, la caractérisation du succès de développement, y compris chez des espèces modèles comme le poisson zèbre, n'est pas entièrement documentée (Lawrence, 2007). Cela est d'autant plus vrai chez les nouvelles espèces d'élevage dont les connaissances biologiques sont souvent en cours d'acquisition et les performances de reproduction variables comme chez la perche commune (Schaerlinger et Żarski,

### CHAPITRE III : VARIABILITE DES SUCCES DE DEVELOPPEMENT

---

2015). L'identification d'indicateurs pertinents et faciles d'utilisation permettant l'étude des succès de développement en laboratoire ou sur le terrain pourrait aider à la compréhension des acteurs impliqués dans la qualité du développement et améliorer la gestion de la reproduction chez cette espèce.

Par conséquent, suite à la caractérisation du développement normal de la perche ainsi que des principales catégories de malformations pouvant apparaître au cours de l'embryogenèse (Chapitre I et II), l'ensemble des données de développement obtenues durant ces 3 années d'échantillonnage ont été intégrées dans ce dernier chapitre dans le but de :

- 1) Caractériser les liens entre différentes variables de développement (survie, éclosion et malformations) ;
- 2) Déterminer les paramètres les plus pertinents permettant de définir des succès de développement ;
- 3) Identifier des groupes de pontes au succès de développement variables en intégrant les paramètres les plus pertinents dans une analyse de données ;
- 4) Analyser et décrire ces groupes de pontes afin de caractériser les stades embryonnaires sensibles sujets aux mortalités précoces.

Pour réaliser cette étude, six populations de perche commune d'origines diverses (population 1 à 4 et 7, 8) ont été utilisées dans le but d'obtenir des succès de développement variables au cours de 3 années de reproduction ; 2013, 2014 et 2015 (Tableau 4). Au total, 73 pontes et 16 paramètres ont été suivis. Ces paramètres intègrent les données récoltées lors des deux précédents chapitres et peuvent être divisés en 3 groupes : survie embryonnaire, éclosion et malformations. Ces variables ont été caractérisées à l'aide d'outils microscopiques (loupe binoculaire et microscope optique) et histologiques à différents temps du développement embryonnaire. Afin de traiter l'ensemble de ces résultats, des analyses de données et statistiques ont été réalisées. Les détails de ces analyses ainsi que la gestion des animaux sont détaillés dans la partie *Methods* du chapitre ci-après.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique intitulé « *An original approach to assess the developmental success of freshwater Teleost* » (Alix et al., *In process*) actuellement en préparation.



### ARTICLE 3:

#### AN ORIGINAL APPROACH TO ASSESS THE DEVELOPMENTAL SUCCES OF FRESHWATER TELEOST APPLIED TO THE EURASIAN PERCH

---

Maud Alix<sup>1</sup>, Daniel Zarski<sup>1,2</sup>, Yves Le Roux<sup>1</sup>, Dominique Chardard<sup>1</sup>, Bérénice Schaerlinger<sup>1</sup> and  
Pascal Fontaine<sup>1</sup>

1 UR AFPA, Université de Lorraine - INRA, 2 Avenue de la Forêt de Haye, BP 172, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

2 Department of Lake and River Fisheries, University of Warmia and Mazury, ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztin, Poland

Article en préparation

#### **I. Abstract**

The developmental success assessment is essential to understand mechanisms underlying developmental impairments occurring during embryogenesis and leading to the decrease of normal progeny. Therefore, it is crucial element of research on reproduction-related issues in variety of scientific contexts. Currently, developmental success is assessed using numerous parameters easily observed but for which the biological relevance has sometimes been poorly demonstrated. Moreover, they are usually assessed alone, ignoring parts of the developmental failure. From this perspective, high fecundity in some fish species is of high importance, allowing performing multivariate studies to analyze on the embryos obtained from the same specimen several parameters in the meantime. Using the Eurasian perch as model we studied 16 parameters characterizing the embryonic survival, deformities, hatching and their potential relationships. By performing principal component and hierarchical clustering analyses, we were able to define four clusters characterizing spawns with different developmental success by using only three parameters: embryonic survival 72 hours post fertilization, hatching and deformity rates. In addition, our work highlighted massive lethality stages. This multivariate approach may be easily standardized to assess animals' developmental success in various species in basic and applied research. It could facilitate and increase studies accuracy in various scientific contexts.

**Keywords:** embryogenesis, developmental success, Eurasian perch, clustering, survival, hatching, deformities.

### II. Background

Embryogenesis is one of the most important period of the animal's life during which its definitive phenotype is built (Balon, 1990). Consequently, developmental impairments leading to massive lethalties or deformities occurrence have huge repercussions on individuals and the population as a whole. It is especially true for farmed animals species (Zhang et Smith, 2015) for which the production of normal and viable embryos correspond to a key point (Bobe et Labbé, 2010 ; Gupta et Nandi, 2012). In humans also, the question of assessing the developmental success is of first importance in the context of increasing appeal to the medically assisted procreation, rendering pregnancies particularly precious. In addition, the evaluation of the developmental success represent a valuable tool to determine potential mechanisms involved in these processes for wild animal populations in the context of the global environmental changes and the impact of the pollutions in ecosystems (Pankhurst et Munday, 2011).

The developmental success could be defined as the ability of a zygote to survive, develop and grow into a normal individual. Consequently, it takes into account two main parameters: lethalties and deformities. It can be affected by various parameters all along the reproductive cycle and could be linked to the gametes quality, the fertilization success, and the environmental conditions for animals with external development or the intrinsic factors of the mother for mammals, or combination of all these causes. However, in the literature, the gamete quality appears to be the major cause as it is constructed throughout the reproduction cycle, and can be affected by the nutrition, age, environment, stress, genetic and life history of the breeders (Brooks *et al.*, 1997 ; Valdebenito *et al.*, 2015). However, the impact of the environmental conditions during the embryogenesis on the developmental success of the offspring cannot be ruled out (Valdebenito *et al.*, 2015 ; Zhang et Smith, 2015), especially in species with external development which are directly dependant of the environmental conditions. Identifying and understanding the causes of developmental impairments remains a difficult question to assess as it can be taken in various ways. Consequently, despite the important literature investigating this topic in human and animal species, a precise definition and characterization of the developmental success and impairments and their causes is still poorly understood (Brooks *et al.*, 1997 ; Trounson *et al.*, 2001 ; Bobe et Labbé, 2010 ; Valdebenito *et al.*, 2015). To simplify it, numerous studies define criteria to assess the developmental success arbitrarily (e.g. 50% of fertilization) (Corporeau *et al.*, 2012). Indeed, in the gamete quality studies, the developmental success usually concerns only a few numbers of parameters such as the fertilization rate, survival rates at early developmental stages, deformity and hatching rates (Trounson *et al.*, 2001 ; Bobe et Labbé, 2010). Even if this approach gives some results, this approach often ignores many aspects of the developmental success as well as the complex question and thus gives incomplete answers. This is particularly worrying for precise studies aiming at deciphering the molecular mechanisms involved in the developmental success. Interpretation given to these analyses could be biased. Moreover, the

efficiency of reproductive process, developmental success and their indicators are still unclear even in fish model species as the zebrafish (Lawrence, 2007). In these conditions, an original scientific strategy could be first to characterize accurately developmental impairments and determine the potential relationships between them in order to define an accurate portrait of the embryos. Related defects could thus come from the same causes. In the next step, investigating the origin of the developmental issue could be greatly facilitated and more accurate.

Working with animals with external development present several advantages compared to mammals (e.g. easy access to the offspring, high number of embryos (amphibians and fish) for one female). In these species, the developmental success is usually assessed using parameters as the fertilization rate, survival rates at early developmental stages, deformity and hatching rates depending of the species studied (Trounson *et al.*, 2001 ; Bobe et Labbé, 2010). These parameters were probably chosen due to the easiness of measurements what creates the need for determination of reliable indicators characterizing the developmental success in various species. Especially, that only by employment of standardized methods in scientific research the understanding of potential mechanisms affecting developmental success will be possible.

The Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., is an abundant freshwater fish in lakes and rivers all over Eurasia and represents a promising species for the diversification of aquaculture. The most recently, control over the reproductive cycle in captive conditions, by modifying the temperature and photoperiod has been successfully achieved (Fontaine *et al.*, 2015a). It is a group synchronous species as all oocytes develop synchronously and are spawned at once, rendering this species particularly interesting to assess the gametes quality and developmental success at various stages on the same spawn and at the same time. The good knowledge of its gonadogenesis and embryonic development still increase the interest of this fish species in studying the developmental success (Alix *et al.*, 2015 ; Fontaine *et al.*, 2015a).

The present study aims at identifying the relationships between various developmental parameters in *Perca fluviatilis* in order to determine (i) whether some of them are linked and (ii) whether it is possible to define developmental success profiles suitable to be considered as an independent groups characterized by a specific common traits.

### III. Methods

#### A. Broodstock and spawns management

Fish were handled in accordance with national and international guidelines for the protection of the animal welfare (*Directive 2010/63/EU*). Fish of various origins (Geneva Lake or Lorraine ponds) and rearing conditions during the reproduction cycle (ponds or recirculating-aquaculture systems (RAS)) were used (6 populations from 2013 to 2015). The details are given in the Additional file 5. Females were monitored daily and once they were ready to spawn, ova were collected in dry glass beakers and fertilized according to (Żarski *et al.*, 2012a) with a mixture of sperm of three different males was added to the ova (100 µl sperm/g dry eggs).

##### 1. Broodstock management

In order to have the opportunity to study a naturally wide panel of potential developmental impairments, we choose to work with six populations of perch reared either in ponds or in recirculating aquaculture systems (RAS) from 2013 to 2015. Wild breeders (populations B, C and D) were kept in Lorraine ponds (East of France) all along the gonadogenesis and were submitted to the natural environmental conditions and fed with natural preys. They were caught one month before the spawning season and transferred to our outdoor facilities (3000 L tanks sharing a RAS system, Laneuvelotte, Lorraine, France) for practical reasons. Indeed, it allowed facilitating fish manipulations during the spawning season and performing the fertilization and developmental analyses in the same conditions than captive populations from the beginning. In these conditions, they remained submitted to natural photoperiod and water temperature variations between 8°C and 16°C ( $12.18 \text{ °C} \pm 1.77 \text{ °C}$ ). Breeders were not fed in order to avoid water quality degradation.

Captive populations (A, E and F), originated from an artificial reproduction of captive breeders in November 2011 and reared in RAS systems in the fish-farm Lucas Perches (Hampont, France) for 3 months until juvenile stages (mean size of  $3.78 \pm 1.07 \text{ g}$ ). Then, they have been transferred to our indoor facilities since February 2012 to grow up until they attained a mean weight of  $106.09 \pm 2.72 \text{ g}$  (population A) and  $287.56 \pm 89.28 \text{ g}$  (populations E and F). To induce the gonadogenesis, breeders were kept in 500L tanks (population A) or 2000 L tanks (population E and F) submitted to a photo-thermal program allowing an effective induction of the reproduction cycle in Eurasian perch (Fontaine *et al.*, 2015). Fish were hand-fed twice a day *ad libitum* with commercial pellets (Sturgeon Grower N°5, Le Gouessant) supplemented with frozen squids or shrimps every two days. During the weekends, breeders were fed *ad libitum* only once a day with pellets. The following Additional file 5 summarizes the populations' characteristics.

## CHAPITRE III : VARIABILITE DES SUCCES DE DEVELOPPEMENT

Year of experiment	Geographical Origin	Providers	Type of gonadogenesis induction	Feeding	Number of the population	Number of spawn
2013	Geneva Lake	Lucas Perches, France	RAS	Pellets	A	20
	Lorraine ponds	GAEC Piscicole du Saulnois, France	Pond	Wild preys	B	7
2014	Lorraine ponds	GAEC Piscicole du Saulnois, France	Pond	Wild preys	C	6
	Lorraine ponds	GFA du Kuhweg, France	Pond	Wild preys	D	7
2015	Geneva Lake	Lucas Perches, France	RAS	Pellets and frozen preys	E	20
	Geneva Lake	Lucas Perches, France	RAS	Pellets and frozen preys	F	13

### Additional file 5: Origins, gonadogenesis induction and broodstock management

#### 2. Hatchery management

Spawns were incubated at  $13^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  in recirculating system with automatic thermoregulation and UV sterilization. A constant dark/light photoperiod (8:16) was applied with two neon lamps at a light intensity of 200 lx at the water surface. For each spawn, six independent fragments of around 100 eggs have been isolated. Three of them were used to determine the survival rates, while the others were used to study hatching and deformities parameters. Fragments were spread between the two incubators, three per incubator. No difference in term of developmental timing has been observed.

#### 3. Water quality

Each year, pH levels ( $7.93 \pm 0.22$  and  $8.08 \pm 0.11$ ), dissolved oxygen ( $9.45 \pm 0.53$  mg/L and  $9.57 \pm 0.40$  mg/L), nitrite ( $0.09 \pm 0.11$  mg/L and  $0.17 \pm 0.15$  mg/L) and ammonium ( $0.617 \pm 0.54$  mg/L and  $0.73 \pm 1.03$  mg/L) were monitored twice a week in first and second incubator, respectively. In breeders' tanks (indoor and outdoor), pH levels ( $9.17 \pm 0.14$ ), dissolved oxygen ( $7.67 \pm 0.08$  mg/L), nitrite ( $0.97 \pm 0.22$  mg/L) and ammonium ( $0.12 \pm 0.02$  mg/L) were also monitored twice a week.

#### B. Estimation of the survival rates

Survival rates were estimated at 24 hours post-fertilization (hpf) (Sr<sub>24</sub>, end of the cell cleavage), 48h (Sr<sub>48</sub>, end of the gastrulation) and 72h (Sr<sub>72</sub>, beginning of the organogenesis) (Additional file 6). Three independent fragments were taken from different parts of each egg ribbons (around 100 embryos/sample). The number of survivors was assessed daily in the same fragments using a stereoscopic microscope (Olympus, SZX7, magnification 20x). Preliminary experiments did not reveal any effect of handling on the embryogenesis process.

### CHAPITRE III : VARIABILITE DES SUCCES DE DEVELOPPEMENT

Parameters	Abbreviations	Calculation formulas	Scientific relevance	Types
Survival rate at 24 hpf (%)	Sr_24	(Number of alive embryos at 24 hpf/total number of embryos in the fragment) x 100	Direct evaluation of embryonic viability at the end of the cell cleavage phase	Survival
<i>Survival rate at 48 hpf (%)</i>	<i>Sr_48</i>	<i>(Number of alive embryos at 48 hpf/total number of embryos in the fragment) x 100</i>	<i>Direct evaluation of embryonic viability at the end of the cell gastrulation phase</i>	<i>Survival</i>
Survival rate at 72 hpf (%)	Sr_72	(Number of alive embryos at 72 hpf/total number of embryos in the fragment) x 100	Direct evaluation of embryonic viability at the beginning of organogenesis phase	Survival
Hatching rate (%)	Hr	(Total number of hatched embryos/total number of embryos in the fragment) x 100	Evaluation of the embryonic ability to leave the chorion	Hatching
<i>Incubation duration (days)</i>	<i>Id</i>	<i>Number of days elapsed from the fertilization and the first hatching</i>	<i>Evaluation of the age of the first hatched embryo</i>	<i>Hatching</i>
Corrected Hatching duration (days)	CHd	Number of days during which 90 % of embryos hatched	Evaluation hatching duration	Hatching
Hatching peak date (days)	Hpd	Number of days elapsing since the first hatching to the peak of hatching (maximum of embryos that hatched in a day)	Evaluation of the of the synchronization of the hatching	Hatching
Hatching peak age (days)	Hpa	Number of days elapsing since the fertilization to the peak of hatching (maximum of embryos that hatched in a day)	Evaluation of the of the synchronization of the hatching	Hatching
<i>Mean hatching age (days)</i>	<i>Mha</i>	<i>Mean of the number of days elapsing since the fertilization to each hatched embryos</i>	<i>Evaluation of the mean age of the hatched embryo from the fertilization</i>	<i>Hatching</i>
Deformities rate at hatching (%)	Dr	(Total number of deformed embryos/total number of hatched embryos in the fragment) x 100	Evaluation of developmental competence of the fertilized eggs	Deformities
Skeletal deformities rate (%)	Sd	(Total number of embryos with skeletal deformities/total number of deformed embryos) x 100	Evaluation of the proportion of the skeletal abnormalities occurring during embryonic development	Deformities
Eyes deformities rate (%)	Ed	(Total number of embryos with eyes deformities/total number of deformed embryos) x 100	Evaluation of the proportion of the eyes abnormalities occurring during embryonic development	Deformities
<i>Yolk deformities rate (%)</i>	<i>Yd</i>	<i>(Total number of embryos with yolk deformities/total number of deformed embryos) x 100</i>	<i>Evaluation of the proportion of the yolk abnormalities occurring during embryonic development</i>	<i>Deformities</i>
Cardiac deformities rate (%)	Cd	(Total number of embryos with cardiac deformities/total number of deformed embryos) x 100	Evaluation of the proportion of the cardiac abnormalities occurring during embryonic development	Deformities
Jaw deformities rate (%)	Jd	(Total number of embryos with jaw deformities/total number of deformed embryos) x 100	Evaluation of the proportion of the jaw abnormalities occurring during embryonic development	Deformities
Other deformities rate (%)	Od	(Total number of embryos with low rates deformities/total number of deformed embryos) x 100	Evaluation of the proportion of the fins, digestive, urinary, head and multivariable abnormalities occurring during embryonic development	Deformities

#### Additional file 6 : Description of the biological parameters studied.

These 16 parameters are associated to the embryonic development and were monitored on each spawn. Parameters are arranged into 3 categories: survival, hatching and deformities. Parameters in italic were removed from the study as described in the manuscript.



### C. Examination of hatching parameters

The hatching rate (Hr) was calculated on three spawn fragments (around 100 eggs/sample) different from those used above. Newly hatched embryos (NHE) were removed daily from each basket, counted and fixed in Bouin's solution. Hr was estimated at the end of the hatching period (Additional file 6). Several other parameters were measured to describe hatching characteristics. The incubation (Id) and the corrected hatching (CHd) durations correspond to the time elapsing from the fertilization and the first NHE and the hatching duration during which 90% of embryos hatched (extreme individuals are removed), respectively. The hatching peak age (Hpa) and date (Hpd) correspond to the date with the maximum of hatching. Hpa was measured from the fertilization and include the incubation while Hpd was measured from the date of first hatching. The mean hatching age (Mha) corresponds to the mean age of NHE. Details of calculation are given in the Additional file 6.

### D. Determination of deformities occurrence

After having been fixed, NHE were evaluated for deformities rate (Dr) using a stereoscopic microscope (Olympus, SZX7, 2x). Later, each deformed NHE was photographed using a light upright optical microscope (Nikon Eclipse Ni-U) associated with a DS-Fi2 digital camera and the software NIS BR (Nikon France, 20x). Organs were compared to their normal morphology (Alix *et al.*, 2015) to determine specific categories of deformities (skeletal (Sd), cardiac (Cd), yolk (Yd), jaw (Jd), eyes (Ed), other deformities (Od, including low specific deformities rates (digestive, fins, urinary system, head and multivariable with embryos lacking a large part of the body) as described in the Additional file 6.

### E. Statistical analyses

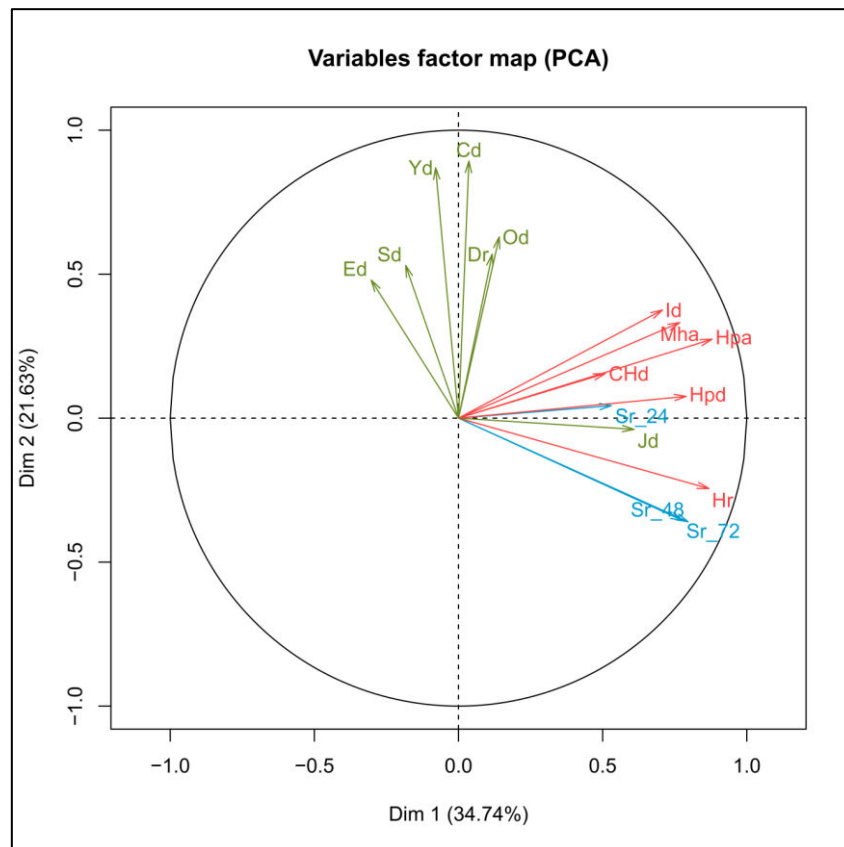
Among the seventy-three spawn used, 45 led to embryos developing until hatching, allowing the study of all parameters which have been divided into 3 categories according to the information they provide: (i) survival, (ii) hatching and (iii) deformities. A Pearson's correlation and principal component analysis (PCA) were first performed using all 16 parameters to determine their relationships. Highly correlated variables ( $r > 0.85$ ) were removed to avoid the biological redundancy. Then, only 12 remained for further analyses. PCA were followed by a non supervised and agglomerative hierarchical clustering analysis (HCA) using the Ward's method. In addition, several PCA/HCA were performed using a combination of different variables including Sr\_72, Hr, Dr as representative parameters of the survival, hatching and deformities groups, respectively.

For statistical analysis of the clusters, a non-parametric for repeated measures with a Tukey test were used to determine which variables differed in different clusters and times, when necessary. For all parameters, data are expressed as mean values  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed with "R" software (version 3.2.5). The minimum level of significance was set at  $p < 0.05$ .

IV. Results

A. Identification of the relationships existing between parameters characterizing the survival rates, hatching phase and deformities occurrence

Among the 73 spawn, 28 displayed a hatching rate lower than 5% for which it was impossible to study all parameters. These spawn were removed from the rest of the analyses. For the 45 remaining spawn, the 16 parameters were studied. The first PCA was performed to determine the potential relationships between the 16 parameters and allowed explaining 56.2% of the variance (Figure 38). The first axis was highly associated with hatching parameters, Sr\_48 and Sr\_72 related to the survival and to a less extent to Jd. The deformities parameters were principally linked to the second axis with high coefficients for the Cd and the Yd and to a less extent to Od, Dr, Sd and Ed (Figure 38).



**Figure 38: Identification of potential relationships between parameters used to describe the developmental success.**

Correlation circle of the PCA on hatched spawn (n=45) represented on first and second axes. Parameters informing on embryonic survival, hatching and deformities are represented in blue, red and green, respectively.

To better characterize relationships between parameters linked to the same axis, a Pearson's correlation table was generated (Additional file 7). Parameters with high coefficients of correlation ( $\geq 85\%$ ) showed a strong relationship and could sometimes be agglomerated.

	Sr 24	Sr 48	Sr 72	Hr	Id	Hpd	Hpa	Mha	CHd	Dr	Sd	Ed	Yd	Cd	Jd	Od
Sr 24	<b>1</b>	<i>0.54</i>	<i>0.56</i>	<i>0.53</i>	0.17	<i>0.42</i>	<i>0.34</i>	0.16	0.19	0.06	0.03	0.15	0.14	0.06	0.26	0.11
Sr 48		<b>1</b>	<i>0.96</i>	<i>0.90</i>	0.28	<i>0.57</i>	<i>0.49</i>	<i>0.34</i>	0.17	-0.11	-0.16	-0.32	-0.27	-0.22	<i>0.42</i>	-0.04
Sr 72			<b>1</b>	<i>0.86</i>	0.24	<i>0.56</i>	<i>0.47</i>	<i>0.32</i>	0.19	-0.16	-0.21	-0.29	-0.22	-0.20	<i>0.40</i>	-0.03
Hr				<b>1</b>	<i>0.40</i>	<i>0.64</i>	<i>0.61</i>	<i>0.50</i>	<i>0.30</i>	-0.03	-0.10	-0.33	-0.22	-0.15	<i>0.50</i>	-0.01
Id					<b>1</b>	<i>0.44</i>	<i>0.86</i>	<i>0.93</i>	<i>0.35</i>	0.22	-0.06	-0.11	0.17	0.29	<i>0.45</i>	0.22
Hpd						<b>1</b>	<i>0.83</i>	<i>0.50</i>	<i>0.49</i>	0.09	-0.05	-0.06	-0.02	0.10	<i>0.32</i>	0.08
Hpa							<b>1</b>	<i>0.86</i>	<i>0.49</i>	0.18	-0.07	-0.10	0.09	0.24	<i>0.46</i>	0.18
Mha								<b>1</b>	<i>0.53</i>	0.23	-0.03	-0.25	0.14	0.25	<i>0.41</i>	0.21
CHd									<b>1</b>	0.16	-0.11	-0.19	0.03	0.07	0.15	0.12
Dr										<b>1</b>	<i>0.33</i>	0.04	<i>0.32</i>	<i>0.40</i>	0.23	<i>0.41</i>
Sd											<b>1</b>	0.25	<i>0.46</i>	<i>0.37</i>	-0.39	0.28
Ed												<b>1</b>	<i>0.54</i>	<i>0.46</i>	-0.21	0.04
Yd													<b>1</b>	<i>0.85</i>	-0.09	<i>0.50</i>
Cd														<b>1</b>	0.03	<i>0.56</i>
Jd															<b>1</b>	0.11

**Additional file 7: Pearson's correlations table on the 16 variables of the reproductive performances**

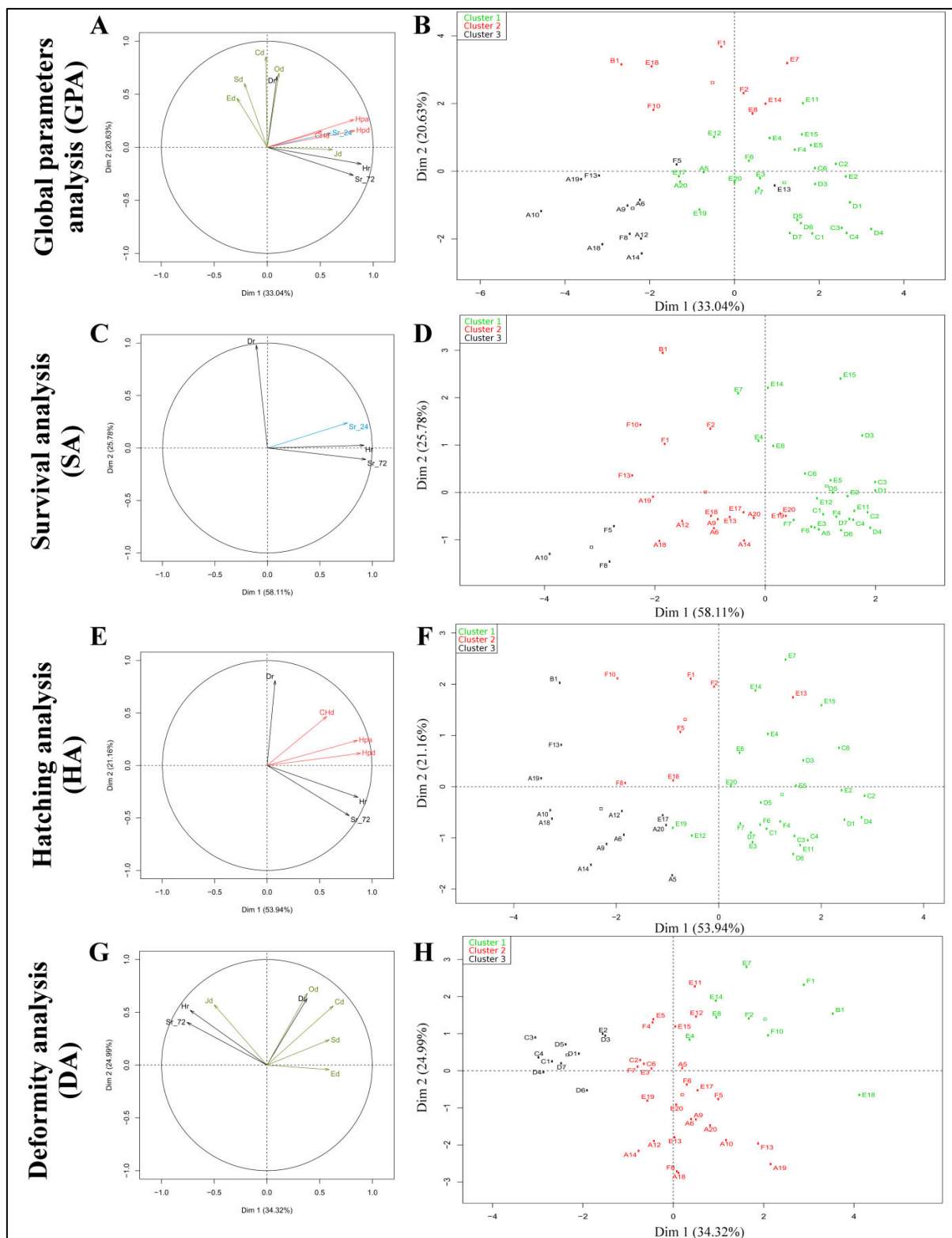
The numbers grey-colored correspond to the highly correlated variables ( $r > 0.85$ ). For  $n=45$ , the significant threshold is 0.2875 at  $p \leq 0.05$ . Significant relations are represented in italic numbers. (Cd) cardiac deformities, (Dr) deformities rate, (Ed) eyes deformities, (CHd) corrected hatching duration, (Hpa) hatching peak age, (Hpd) hatching peak date, (Hr) hatching rate, (Id) incubation duration, (Jd) jaws deformities, (Mha) mean hatching age, (Od) other deformities, (Sd) skeletal deformities, (Sr\_24) survival rates at 24 hpf, (Sr\_48) survival rates at 48 hpf, (Sr\_72) survival rates at 72 hpf, (Yd) yolk deformities.

Data show that the parameters linked to the first axis could further be subdivided into 2 groups. First, those informing on the survival (Sr\_48 and Sr\_72) are strongly correlated together and with Hr. Second, those allowing a description of the incubation and hatching duration processes had strong relationships as the Mha, Hpa and Id were correlated. In relation to the second axis, Cd was highly correlated to Yd. Parameters linked between them potentially share common causes and/or cellular mechanisms.

As these relationships comprised parameters involved in the same category and thus increase the impact of the common cause and/or mechanism on the definition of spawn clusters, we chose, when possible, to agglomerate these variables and use only one or two parameters representative of their correlated counterparts. Selected parameters representing their category were chosen according to their biological relevance and their use in the bibliography: Sr\_72 represented by Sr\_48 that has been removed, the Hr although highly correlated to Sr\_48 and Sr\_72 remained an essential parameter used in most of studies in every species and we choose to keep it. The Hpa represented Id and Mha and Cd also counted for Yd. At the end, 12 variables remained for further analysis (Sr\_24, Sr\_72, Hr, Dr, CHd, Hpd, Hpa, Sd, Cd, Ed, Jd and Od).

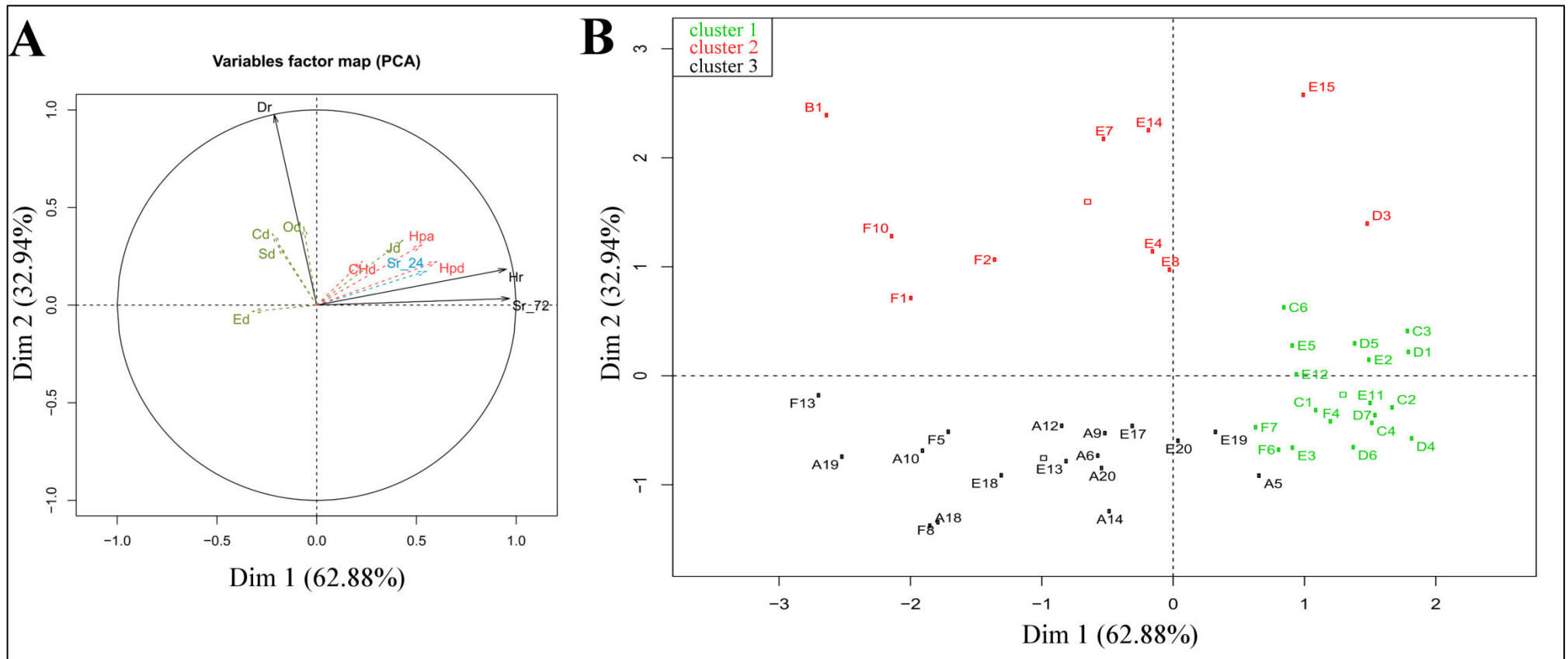
#### **B. Definition of spawn clusters according to their developmental success**

The next goal was to define spawn clusters with the same developmental characteristics using PCA/HCA analyses. To be significantly relevant these clusters should comprise at least 10 spawn and be homogenous for most of parameters. First, we used the 12 parameters (Global parameters analysis (GPA)) to define these clusters. Three clusters were defined but one of them contained 8 spawn (Additional file 8). To determine the weight of each category of parameters on the spawn clustering with various developmental success and find reliable parameters easily usable to define them, we performed three analyses using Sr\_72, Hr, Dr as active variables with various additional variables. They were chosen because they are classically used in every works aiming at studying perch reproductive performance and because they are easy to measure. Each of them will represent the survival, hatching or deformities categories of parameters in the following analyses. The first PCA/HCA (Survival analysis (SA)) allowed determining the weight of Sr\_24 remaining from the survival parameters category. One of the clusters defined above spread and most of spawn joined another cluster. Indeed, cluster 3 comprised only 3 spawn. It suggests that Sr\_24 may strongly influence spawn clusters. In the same manner, parameters linked to the deformities (deformities analysis (DA)) disorganised more clusters of spawn compared to GPA ones. On the contrary, the hatching analysis (HA) allowed obtaining clusters similar to those of the GPA except some marginal spawn that change of cluster (Additional file 8). It suggests that the weight of the hatching parameters is important for the definition of spawn clusters. However, none of these analyses allowed defining homogenous clusters of at least 10 spawn.



**Additional file 8: Influence of survival, hatching or deformities parameters on the spawn clustering.**

(A, C, E, G) Correlation circle of the PCA. Sr\_72, Hr, Dr are used as representative members of the survival (blue), hatching (red) and deformities (green) parameters, respectively. (B, D, F, H) Spawn clustering thanks to a HCA performed using the PCA analyses presented in a, c, e and g, respectively. Points represent spawn (numbering is done according to the explanations in the additional file 1, n=45 spawn) and the empty squares correspond to groups barycenter. (A-B) Influence of the 12 parameters remaining after the determination of the relationships between them. (C-D) Influence of the survival parameters on the spawn clustering design. (E-F) Influence of the hatching parameters on the spawn clustering design. (G-H) Influence of the deformities parameters on the spawn clustering design.



**Figure 39: The survival rate at 72h, the hatching and deformities rates are sufficient to make a reliable spawn clustering according to their developmental success.**

(A) Correlation circle of the PCA showing the relationships between classical indicators in black (Sr\_72, Hr, Dr) as active variables (full lines) and other parameters as illustrative variables (dotted lines). Parameters illustrating the survival, hatching and deformities are represented in blue, red and green, respectively. The PCA is represented on the first and second axes (n=45 spawn). (B) Definition of three spawn clusters based on and HCA according to relationships between active variables. Cluster 1 in green (n=18), cluster 2 in red (n=10) and cluster 3 in black (n=17). Each point represents one spawn according to the numbering explained in the additional file 1 and the empty squares correspond to group's barycenter.



The last analysis was obtained using the three classical parameters only (Sr<sub>72</sub>, Hr and Dr) (classical analysis (CA)) (Figure 39). This analysis explained 95.8% of the variance. The first axis was strongly associated with Sr<sub>72</sub> and Hr ( $r=0.97$  and  $0.95$ , respectively) whereas the second axis described deformities rates ( $r=0.98$ ). Illustrative variables were poorly associated to these axes ( $r$  between  $-0.32$  and  $0.60$  for the Ed and Hpd, respectively, with first axis). Three clusters of spawn could be defined including the statistical constraints and minimizing the modifications of these clusters compared to the GPA, suggesting that using these three parameters are sufficient to define relevant spawn clustering according to the developmental success.

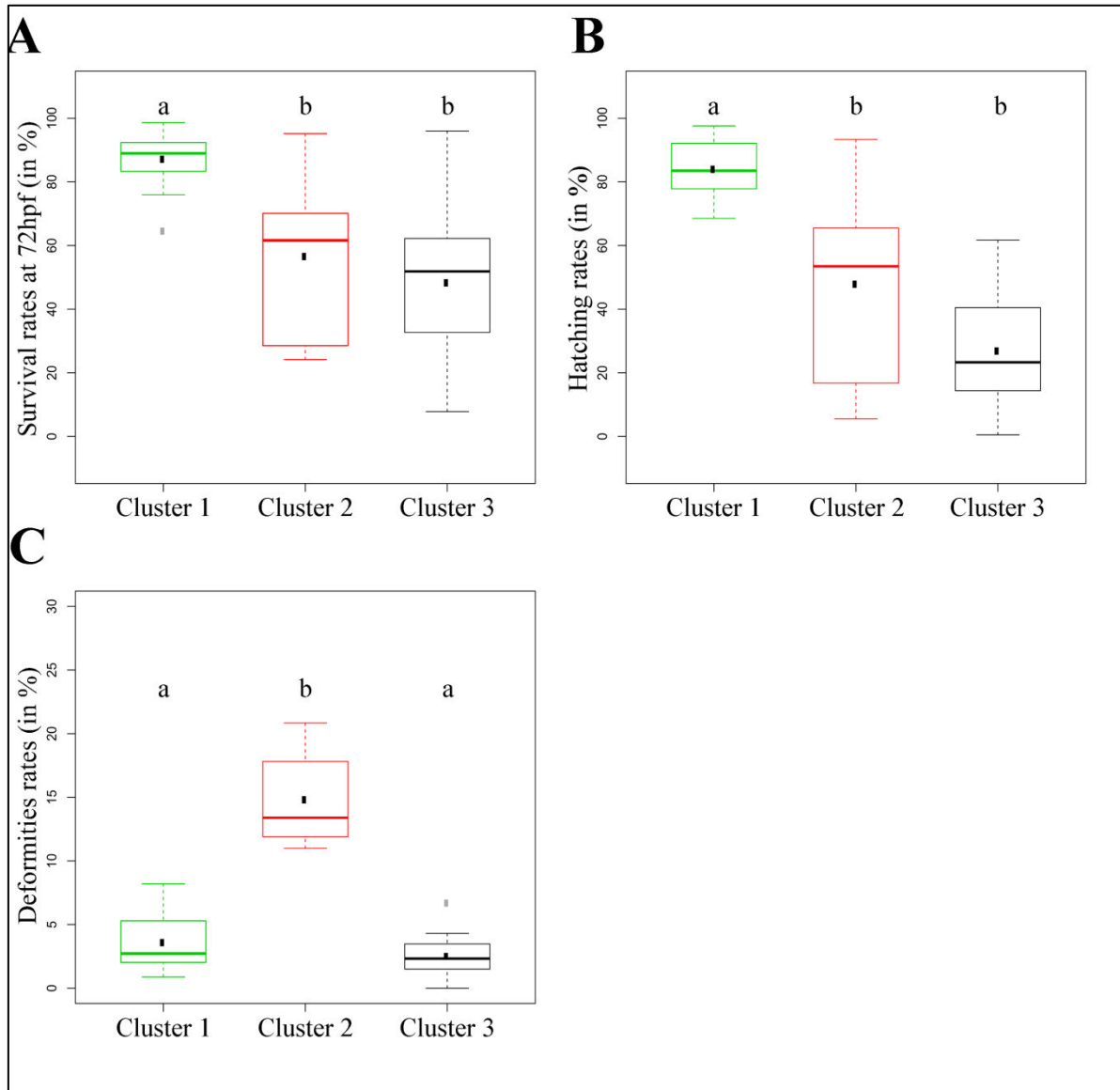
#### **C. Characterization of the spawn clusters**

Mean data of every parameter was compared between the spawn clusters (Figure 40, Additional file 9, Additional file 10). In total, four main spawn clusters have been defined. The first one, with the best developmental success, presented a significantly higher Sr<sub>72</sub> and Hr compared to other clusters and a significantly lower Dr in relation to the cluster 2 (Figure 40). In addition to the lower Sr<sub>72</sub> and Hr compared to the cluster 1, the second and third clusters presented a high variability for these parameters. The main difference between these two clusters was the higher Dr in cluster 2, among the categories of deformities, Cd, Jd and Od were higher in cluster 2 compared to cluster 3 (Figure 40, Additional file 9).

The cluster 3 could be characterized by lower Hpd and a significantly low Hpa compared to other clusters (Additional file 9), suggesting that the embryos of these spawn hatched earlier displayed fewer developmental success.

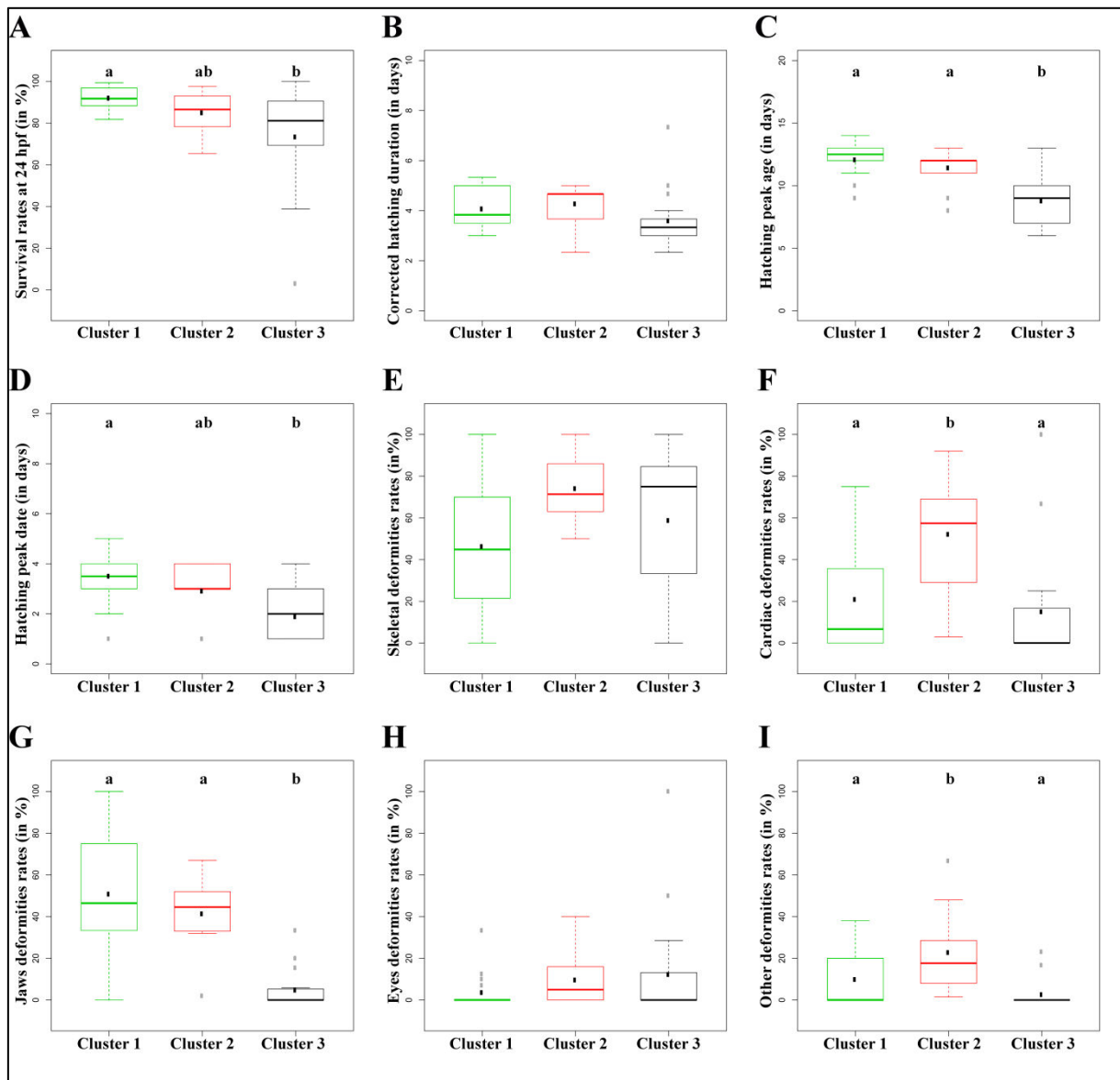
#### **D. Identification of different pattern of development during embryogenesis**

The statistical comparison of the survival rates at various times between the four clusters of spawn revealed several phases of massive lethality or issues (Figure 41). The first sensitive step was visible at 24 hpf as the cluster 4 as mentioned above could be due to lack of fertilization or massive lethality during the cleavage phase. Later, at the end of the gastrulation (48 hpf), a second sensitive steps occurred and was visible for the clusters 2 and 3 (Figure 41). Finally, between 72 hpf and hatching some embryos continued to die as observed for the cluster 3 (Figure 41).



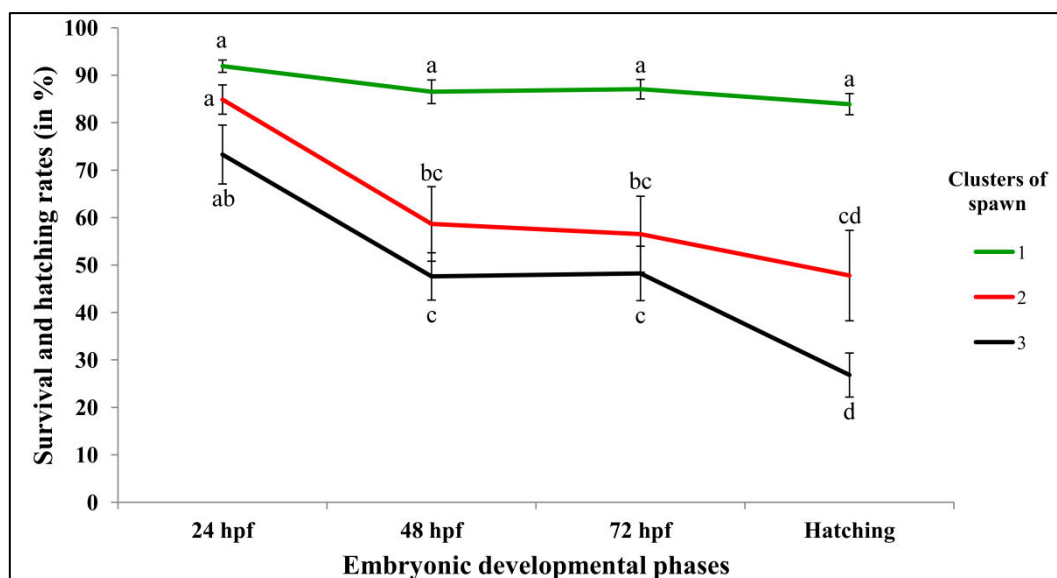
**Figure 40: Box plot representation indicating the differences of the survival rate at 72h, hatching and deformities rates between the 3 spawn clusters.**

(A) Sr<sub>72</sub> (in %). (B) Hr (in %). (C) Dr (in %). Spawn cluster 1 in green (n=18), cluster 2 in red (n=10) and cluster 3 in black (n=17). Bold lines represent the median, the small black rectangles are the means and the small grey rectangles represent the atypical spawn. Different letters indicate significant differences between groups.



**Additional file 9: Box plot representation of the studied parameters in the three spawn clusters defined.**

(A) Survival rates at 24 hpf (in %). (B) Corrected hatching duration (in days). (C) Hatching peak age (in days). (D) Hatching peak date (in days). (E) Skeletal deformities rates (in %). (F) Cardiac deformities rates (in %). (G) Jaws deformities rates (in %). (H) Eyes deformities rates (in %). (I) Other deformities rates (in %). Each spawn cluster is represented in different colors: cluster 1 in green (n=18), cluster 2 in red (n=10) and cluster 3 in black (n=17). The bold line in each box plot represents the median, the small black rectangles are the mean and the small grey rectangles represent the atypical spawn. Different letters indicate significant differences between groups at  $p < 0.05$  using a non-parametric Mann Whitney test after a Kruskal-Wallis test.



**Figure 41: Identification of the steps with massive lethality during perch embryogenesis.**

All four spawn clusters were used (cluster 1 in green (n=18), cluster 2 in red (n=10), cluster 3 in black (n=17)). Each point corresponds to the mean value  $\pm$  SEM for one cluster at one step. Significant differences were observed according to the clusters of spawn and the times (different letters).

Parameters	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
Sr_24 (%)	91.91 $\pm$ 1.30	84.87 $\pm$ 3.09	73.29 $\pm$ 6.20	9.07 $\pm$ 3.34
Sr_72 (%)	87.06 $\pm$ 2.06	56.50 $\pm$ 8.00	48.23 $\pm$ 5.74	1.27 $\pm$ 0.64
Hr (%)	83.91 $\pm$ 2.24	47.78 $\pm$ 9.53	26.81 $\pm$ 4.64	0.00
CHd (in days)	4.07 $\pm$ 0.19	4.27 $\pm$ 0.26	3.59 $\pm$ 0.29	0.00
Hpa (in days)	12.06 $\pm$ 0.34	11.4 $\pm$ 0.52	8.76 $\pm$ 0.50	0.00
Hpd (in days)	3.5 $\pm$ 0.27	2.9 $\pm$ 0.35	1.88 $\pm$ 0.24	0.00
Dr (%)	3.57 $\pm$ 0.52	14.78 $\pm$ 1.15	2.49 $\pm$ 0.42	0.00
Sd (%)	46.19 $\pm$ 8.33	73.95 $\pm$ 5.26	58.69 $\pm$ 9.28	0.00
Cd (%)	20.83 $\pm$ 6.12	52.01 $\pm$ 9.07	14.92 $\pm$ 6.74	0.00
Jd (%)	50.74 $\pm$ 7.69	41.27 $\pm$ 5.59	4.70 $\pm$ 2.30	0.00
Ed (%)	3.49 $\pm$ 1.98	9.51 $\pm$ 3.97	12.18 $\pm$ 6.42	0.00
Od (%)	9.77 $\pm$ 3.49	22.69 $\pm$ 6.54	2.49 $\pm$ 1.62	0.00

**Additional file 10: Comparison of the mean values of parameters the four spawn clusters.**

Values are means  $\pm$  SEM (cluster 1, n=18 spawn; cluster 2, n=10 spawn; cluster 3, n=17 spawn and cluster 4, n=28 spawn).

### V. Discussion

Characterizing and understanding developmental success and impairments are an important issue not only for farmed species but also for wild populations and humans (Bobe et Labbé, 2010 ; Gupta et Nandi, 2012 ; Zhang et Smith, 2015). These impairments imply the decrease of normal and viable offspring, essential for the reproduction success and survival of the species (Bobe et Labbé, 2010 ; Gupta et Nandi, 2012). In order to propose a standardized method to assess the developmental success, we investigated the relationships between numerous criteria and their biological relevance. The variety of criteria mainly allowed splitting the impact of the two large aspects of the developmental success which are the survival and deformities. Moreover, hatching appears to be a crucial phase during fish development.

Among identified relationships, the first one involves deformities. Indeed, except for Jd, all deformities categories and Dr are linked to the same axis because Dr results from the addition of each specific deformities rates and thus appears legitimate to represent all of them. However, coefficients of correlation between each parameter are too low to conclude that all deformities come from the same mechanism. The only exception is Cd and Yd that are strongly correlated and thus may have common causes and/or cellular mechanisms. It appeared that both types of deformities results from generalized edemas (personal observations) as already described in the Atlantic halibut (*H. hippoglossus*) (Ottesen et Bolla, 1998). Secondly, hatching and survival parameters were associated to the same axis and, surprisingly, with Jd. These parameters could then be further subdivided with a first group mainly characterized by survival parameters (Sr\_24, Sr\_72 and Hr) which is in accordance with data obtained in a previous study where Sr\_72 and Hr were correlated (Castets *et al.*, 2012). In the second group, Id is correlated to Mha and Hpa principally because they originate from the fertilization and characterize various aspects of the hatching. In total, twelve of the sixteen parameters remained to define groups of spawn with similar developmental characteristics by HCA. Taking into account all twelve parameters failed to answer the statistical conditions, probably because they were too numerous and diverse. We thus choose to decrease the number of parameters to obtain relevant and homogenous clusters. To keep the weight of each part of the developmental success (survival, deformities and hatching) we selected criteria representing each of them. According to our data, Sr\_72 and Dr were actually the most relevant ones to define the two first parts. Concerning, Sr\_72 it is commonly used for perch (Castets *et al.*, 2012 ; Schaerlinger et Żarski, 2015) because it is easily recognizable in laboratories or fishfarms using stereoscopic microscope. It actually takes into account potential lethalties occurring during early embryogenesis or fertilization issues corresponding to various mechanisms for biologists. Among hatching parameters, we choose Hr which is easy to assess and currently for numerous species (Bobe et Labbé, 2010). This study shows that these parameters are actually sufficient to assess the developmental success in Eurasian perch allowing the definition of three relevant clusters of spawn. They were never used in combination to define spawn clusters. This approach could be easily used in

fishfarms or in scientific studies aiming at determining the developmental success for other fish species. It allows spawn clustering with similar characteristics and thus facilitates studies aiming at better understanding underlying mechanisms.

An accurate description of the four clusters highlights not only high or very low developmental success but also intermediate clusters presenting medium Sr<sub>72</sub> or Hr but with various Dr. It allows a better characterization of the nature of the developmental success. Our data show that assessing Sr<sub>24</sub> is important to study as its addition to the study disorganises one spawn cluster. Another aspect relies on the fact that embryos of the cluster 3 statistically begins to hatch earlier compared to the more successful spawn (cluster 1) while the CHd remain equivalent. As embryos hatch at various developmental stages (Alix *et al.*, 2015), it suggests that even if some embryos that hatch especially early (6 days) may survive, the majority actually die or could not hatch. These data thus suggest that in addition to the classical Sr<sub>72</sub>, Hr and Dr that are sufficient to make a reliable classification, it is interesting to add Sr<sub>24</sub> and Hpa to better understand the underlying mechanisms.

In Teleost, massive lethality stages have poorly been investigated even if it participates largely to the decrease of the reproduction performances, in the aquaculture or in the nature (Schaerlinger et Żarski, 2015). In the Eurasian perch as in other Percid species, no work is available in the literature. Nevertheless, the identification of developmental stages associated to massive mortality is necessary to highlight and understand impaired mechanisms. Our data show that the first lethality peak potentially appears between the fertilization and the end of cell cleavage (24hpf). Nevertheless, among this cluster, some spawn lacked fertilization while the others underwent fertilization and rather can be due to a cell cleavage failure leading to blastomeres anomalies as described in (Rideout *et al.*, 2004). On the contrary to other fish species as the herring (Kunz, 2004), perch cell cleavage cannot be triggered without fertilization (Alix *et al.*, 2015). Differentiating both mechanisms is important. The second lethality stage appears between 24 and 48hpf corresponding to the gastrulation (Alix *et al.*, 2015). At the beginning of embryogenesis, the control of the early ontogenesis is maintained by the maternal genome and progressively transferred to the zygote genome during a process named mid-blastula transition (MBT) (Tadros et Lipshitz, 2009). Any impairment during this process could lead to embryonic lethality. Finally, the cluster 3 shows a decreasing between Sr<sub>72</sub> and Hr probably due to lethalties or severe deformities leading to the inability to hatch for the embryo. These potentials impairments could occurred during developmental thresholds, which correspond to the acquisition of a new ability (Alix *et al.*, 2015). We can hypothesize also a problem of hatching gland formation or enzyme secretion necessary for the hatching process (Korwin-Kossakowski, 2012).

These data obtained in the present study are important and could be generalized in various species both in basic and applied research. In addition to prove that Sr<sub>72</sub>, Hr and Dr are reliable parameters, we show that taking into account the three parameters in the meantime are sufficient to



characterize spawn according to their developmental success. Although simple, this original approach has never been proposed to characterize developmental success. Defining statistically spawn clusters may allow refining studies in this field. It may help to find new ways of research and highlight mechanisms involved in the reproduction process. These mechanisms may be conserved in various fish species and to a large extent other phyla.

#### VI. Acknowledgment

We thank Yannick Ledoré and Alain Iurétig for take care of the fish. We also thank LUCAS PERCHES, the GAEC Piscicole du Saulnois and the GFA du Kuhweg for the fish.

# Une approche originale de mesure du succès de développement chez les Téléostéens d'eau douce

## Contexte

Lors du **développement embryonnaire**, de nombreux défauts peuvent apparaître comme des **malformations** ou des **mortalités** qui conduisent à une **variabilité du succès de développement** chez de nombreuses espèces, qu'elles soient sauvages ou d'élevage. La **caractérisation de ce succès** est essentielle afin de comprendre les mécanismes impliqués dans ces anomalies. Actuellement, de **nombreux paramètres facilement observables** sont utilisés afin de mesurer le succès de développement mais leur pertinence biologique n'a pas forcément été démontré. Ceci est d'autant plus vrai chez les **nouvelles espèces d'élevage**, comme la perche commune, dont les connaissances biologiques sont en cours d'acquisition et les performances de reproduction encore variables.

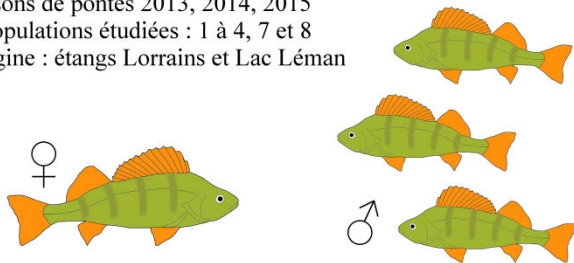
## Objectifs

**Caractériser les potentiels liens** entre des **paramètres de développement variés**  
 Déterminer les **paramètres les plus pertinents** afin de mesurer des succès de développement ;  
**Identifier** des groupes de pontes avec des **profils de développement variables** ;  
 Analyser ces groupes afin de mettre en évidence de nouveaux défauts de développement tels que des **stades de mortalités**

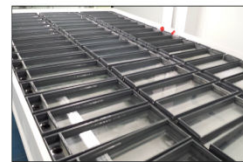
## Matériel et méthodes

### Fécondation artificielle

Saisons de pontes 2013, 2014, 2015  
 6 populations étudiées : 1 à 4, 7 et 8  
 Origine : étangs Lorrains et Lac Léman



### Incubation

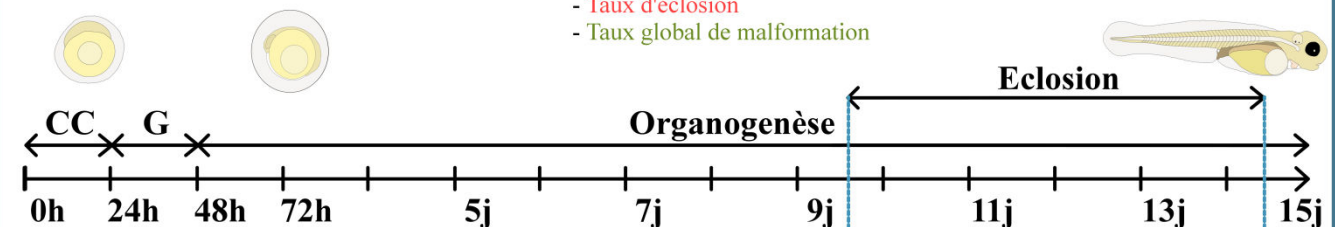


- 13°C ± 0,5°C
- 200 lux, 8:16 (obscurité:lumière)
- 73 pontes
- 45 pontes utilisées pour l'ensemble des paramètres
- 3 échantillons/ponte
- 100 oeufs/échantillon

## Etude des paramètres de développement

Mesure de **16 paramètres de développement embryonnaire** dont les **paramètres classiquement utilisés** chez la perche commune. Ces paramètres représentent chaque groupe de variables :

- **Taux de survie à 72h**
- **Taux d'éclosion**
- **Taux global de malformation**



### Survie

- Taux de survie à des stades variables :
- 24h (fin du clivage cellulaire), **Sr\_24**
  - 48h (fin de la gastrulation), **Sr\_48**
  - 72h (début de l'organogenèse), **Sr\_72**

### Eclosion

- Taux d'éclosion, **Hr**
- Durée d'incubation, **Id**
- Durée d'éclosion corrigée, **CHd**
- Date du pic d'éclosion, **Hpd**
- Age des embryons au pic d'éclosion, **Hpa**
- Age moyen d'éclosion, **Mha**

### Malformations

- Taux global de malformation, **Dr**
- Taux de malformation pour chaque catégorie (squelette **Sd**, mâchoire **Jd**, yeux **Ed**, vitellus **Yd**, cardiaque **Cd**, autres **Od**)

## Analyses de données

- 1 Identifier les potentielles relations entre les 16 paramètres :
  - Analyse en Composante Principale (ACP)
  - Table de corrélations de Pearson ( $r > 0,85$ )**Suppression des paramètres les plus corrélés**

**Analyse globale** des paramètres avec **12 paramètres restants** (GPA)

- 2 Déterminer les **paramètres les plus pertinents** pour définir les profils de succès de développement sur 45 pontes :
  - Analyse en Composante Principale (ACP)
  - Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

### Analyse de survie (SA) :

- Paramètres classiques
- Sr\_24

### Analyse de l'éclosion (HA) :

- Paramètres classiques
- Hr, CHd, Hpd, Hpa

### Analyse des malformations (DA) :

- Paramètres classiques
- Dr, Sd, Ed, Od, Jd, Cd

### Analyse classique (CA) :

- Paramètres classiques

## Résultats

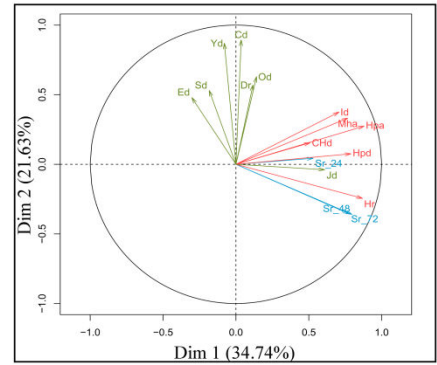
Parmi 73 pontes étudiées, 28 présentent Sr\_72 et Hr < 5%. Elles ont été supprimées en amont de toutes analyses de données et constituent le **groupe 4**.

### Caractérisation des potentielles relations entre des paramètres de développement

- **Axe 1** associé aux paramètres d'**éclosion**, de **survie** (Sr\_48 et 72) ainsi que **Jd**.
- **Axe 2** associé aux paramètres de **malformations**

**Suppression des variables redondantes** (fortes corrélations > 0.85) :

- Sr\_48 corrélé à Sr\_72 et Hr (r=0.96 et 0.90)
- Id et Mha corrélé à Hpa (r=0.86 et 0.93)
- Yd corrélé à Cd (r=0.85, déjà observé dans le chapitre II)

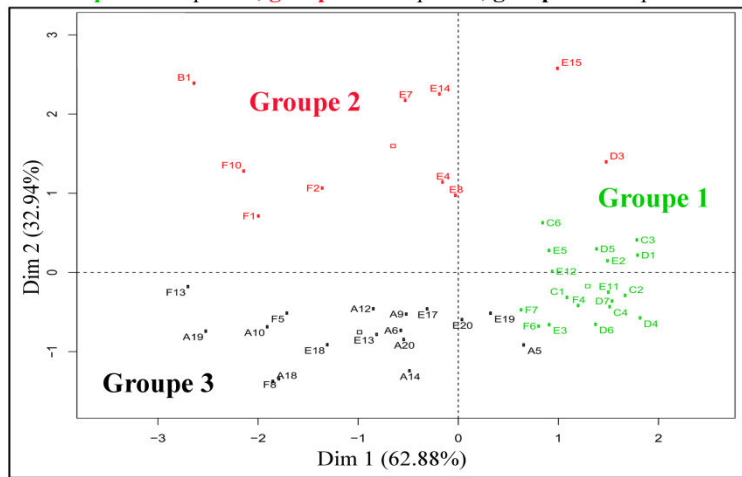
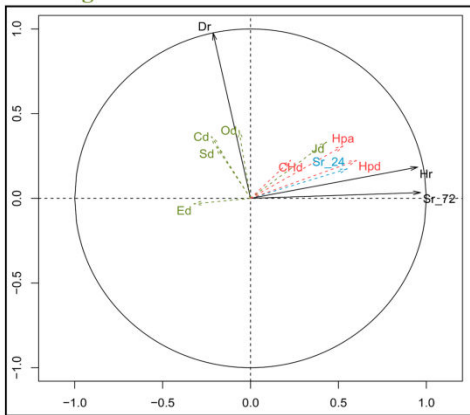


## Définition de groupes de pontes en fonction de leur succès de développement

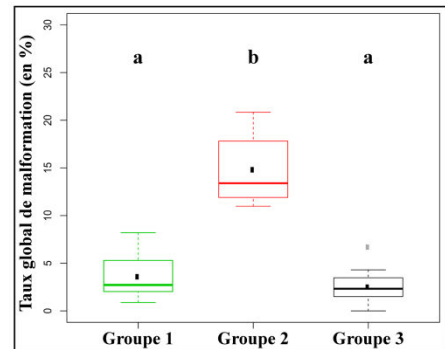
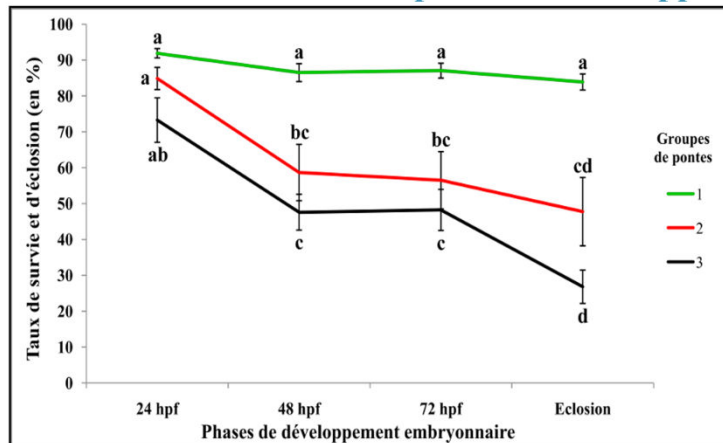
Analyse classique la plus pertinente pour expliquer la variabilité entre les individus et définir 3 groupes homogènes de minimum 10 pontes :

- **Taux de survie à 72 heures**
- **Taux d'éclosion**
- **Taux global de malformations**

**Groupe 1** = 18 pontes, **groupe 2** = 10 pontes, **groupe 3** = 17 pontes.



## Identification de différents profils de développement



Identification de stades ou phases de mortalités :

- Entre 24 et 48 heures post-fécondation pour les groupes 2 et 3
- Entre 72 heures post-fécondation et l'éclosion pour le groupe 3

**Groupe 1** : Sr\_72 et Hr significativement plus élevés que pour les autres groupes. **Dr faible**.  
**Groupe 2** : Sr\_72 et Hr plus faibles que le groupe 1 et plus variables. **Dr** significativement plus élevé que groupe 1 et 3.  
**Groupe 3** : Sr\_72 et Hr plus faibles que le groupe 1 et plus variables. **Dr faible**.  
**Groupe 4** : Sr\_72 et Hr < 5%

## Discussion et conclusions

Parmi les paramètres de développement étudiés, les analyses de données ont montrées que Sr\_72, Hr et Dr étaient suffisants pour générer 3 groupes homogènes de pontes aux profils de développement différents. De plus, un 4ème groupe caractérisé par un très mauvais succès de l'embryogenèse a été identifié. Chez le Téléostéens, les mortalités précoces ont été peu étudiées. Dans cette étude, deux phases de mortalités ont été identifiées : la première apparaît durant la gastrulation et pourrait être due à un problème lors de la transition maternelle à zygotique. Le second pic de mortalité apparaît entre l'organogenèse et l'éclosion et est potentiellement issu de malformations sévères empêchant les embryons d'éclore. Ces malformations auraient pu apparaître à divers seuils de l'embryogenèse.

## Perspectives

Cette approche quantitative, simple et multiparamétrique pourrait être généralisée à diverses espèces en recherche fondamentale ou appliquée. Définir mathématiquement des groupes de pontes pourrait permettre de mettre en évidence de nouveaux mécanismes impliqués dans le succès de reproduction par l'étude des profils de développement variables.

**DISCUSSION GENERALE**



## A. Approche alternative du développement embryonnaire

### 1. Démarche scientifique dans la construction de la table de développement

#### a) *L'utilisation des théories du développement : graduelle ou saltatoire ?*

L'étude du développement, notamment des premiers stades de vie des organismes, est fondamentale et permet d'acquérir des connaissances sur les histoires de vie des espèces (Tong *et al.*, 2013). L'embryogenèse est d'autant plus importante qu'elle est considérée comme un processus dynamique ayant un grand rôle dans la création et la future disposition du phénotype adulte (Pinder et Gozlan, 2004). Face à la diversité des modes de développement des espèces de Téléostéens, plusieurs théories (graduelle et saltatoire) se sont développées dans le but de décrire au mieux les périodes de développement des individus (Balon, 1990, 2001). Selon la théorie graduelle, le développement embryonnaire est un processus continu durant lequel l'évolution des structures et fonctions lors de l'ontogenèse est rendue possible grâce à l'accumulation de petits changements non visibles (Balon, 2001 ; Kamler, 2002). Généralement, cette méthode de description séquentielle est utilisée avec l'apparition des somites comme référence pour déterminer l'apparition de nouveaux tissus ou organes. Les tables de développement générées sont opérationnelles et permettent la description de l'ontogenèse de façon simple chez des espèces telles que le poisson zèbre, le médaka ou le bar (Kimmel *et al.*, 1995 ; Iwamatsu, 2004 ; Cucchi *et al.*, 2012).

Au contraire, la théorie saltatoire permet de décrire l'ontogenèse en fonction d'une série d'états stables, appelés étapes durant lesquelles des mécanismes de différenciation des cellules, des tissus et des organes évoluant à des vitesses différentes, vont s'accumuler, ponctués de seuils naturels d'instabilités structurelles et physiologiques qui conduisent à l'acquisition de nouvelles capacités (Balon, 1986 ; Duellman, 1989 ; Greenwood, 1989). Les tables de développement définies selon cette approche mettent en évidence les seuils biologiques importants lors de l'ontogenèse d'une espèce ou d'un groupe d'espèces, permettant notamment une plus grande souplesse dans la caractérisation du développement (McElman et Balon, 1979 ; Cunningham et Balon, 1985 ; Crawford et Balon, 1994).

Malgré ces deux approches, la description de l'ontogenèse et notamment les comparaisons interspécifiques des différentes périodes et phases du développement sont difficiles à réaliser de par la diversité des tables de développement actuelles. Effectivement, dans le cas du développement embryonnaire par exemple, selon les théories utilisées, l'embryogenèse peut être divisée de façon plus ou moins précise, en 3 phases pour la théorie saltatoire (clivage, embryon et éléuthéroembryon) ou encore 7 phases pour la théorie graduelle (zygote, clivage cellulaire, blastula, gastrula, segmentation, pharyngula et éclosion) (Balon, 1975b ; Kimmel *et al.*, 1995). Par conséquent, la méthode de description du développement très précise utilisée chez des espèces modèles peut ne pas être adaptée à toutes les espèces notamment à celles présentant une variabilité dans la séquence de l'ontogenèse.

**b) *Les variabilités intraspécifiques du développement***

Dans un premier temps, afin d'établir la séquence de développement de notre espèce d'intérêt, la perche commune, nous avons donc suivi la méthode graduelle. Cependant, durant nos observations, nous avons remarqué une grande variabilité de la séquence de l'ontogenèse entre les embryons notamment lors des périodes précoces du développement telles que le clivage cellulaire, la gastrulation ou encore durant l'apparition de certains tissus. Par conséquent, ces différences ne permettaient pas la description de l'embryogenèse selon la théorie graduelle et notamment l'utilisation de l'apparition des somites comme référence. Cette variabilité intraspécifique est peu décrite dans la littérature. Dans de nombreux cas, les auteurs ne prennent pas en compte ces variations intraspécifiques et choisissent de suivre le modèle de description graduelle. Cependant, certaines études mentionnent cette variabilité lors du développement, y compris chez les espèces modèles fortement domestiquées et adaptées à leur milieu comme le poisson rouge, le poisson zèbre ou encore le tilapia (Kimmel *et al.*, 1995 ; Morrison *et al.*, 2001 ; Fujimura et Okada, 2007 ; Tsai *et al.*, 2013). Ces différences de taux de développement peuvent apparaître entre les embryons de pontes différentes mais également au sein d'un même ponte, notamment lors des stades plus avancées de l'embryogenèse (pharyngula et éclosion) (Kimmel *et al.*, 1995 ; Fujimura et Okada, 2007 ; Tsai *et al.*, 2013). Pour pallier à ce problème, les auteurs utilisent de nombreuses pontes afin d'assurer un standard de développement avec la définition d'intervalles : l'ontogenèse des tissus, organes ou fonctions peut être décrite en fonction d'intervalle (apparition des battements du cœur entre 99 heures et 105 heures post-fécondation par exemple) (Shardo, 1995). Enfin, lorsque les différences de développement sont trop marquées au sein d'une même espèce, la description de l'ontogenèse peut alors être effectuée en référence à la longueur totale de l'embryon (notamment après l'éclosion) (Morrison *et al.*, 2001 ; Fujimura et Okada, 2007).

La variabilité intraspécifique du développement étant peu répertoriée mais présente tout de même chez quelques espèces, notamment celles fortement domestiquées, la théorie saltatoire et l'identification de seuils biologiques permettant d'intégrer une plus grande souplesse dans la caractérisation du développement pourraient être généralisées chez l'ensemble des espèces. Cependant, actuellement la détermination des différentes phases de développement selon cette théorie n'est pas assez précise notamment pour les étapes précoces (clivage cellulaire et gastrulation). Par conséquent, dans le but de caractériser le développement de notre espèce d'intérêt et d'identifier de façon précise les différentes phases et étapes du développement embryonnaire de la perche, nous avons créé une table de développement embryonnaire alternative et flexible, basée sur la théorie saltatoire. Cette table pourrait servir de référence pour décrire le développement embryonnaire d'autres Téléostéens, présentant notamment des variations dans les taux de développement.

**c) *Les limites de l'embryogenèse***

La diversité de description du développement diminuant la possibilité de comparaison entre les espèces provient principalement des théories précédemment citées, mais également des limites des



périodes embryonnaires et larvaires utilisées pour décrire l'ontogenèse des individus (Kováč et Copp, 1999). Effectivement, une des limites qui divise encore les auteurs en biologie du développement correspond au passage de la période embryonnaire à la période larvaire. Comme nous l'avons introduit dans l'état de l'art, deux écoles de pensée s'opposent dans la définition de cette transition (Kováč et Copp, 1999 ; Penaz, 2001 ; Urho, 2002 ; Teletchea et Fontaine, 2011). La première positionne cette transition lors de l'éclosion durant laquelle les individus sortent de leur enveloppe protectrice et sont confrontés à un changement de milieu, une augmentation du métabolisme et de la consommation d'oxygène et à une nouvelle forme de prédation induisant différents comportements en fonction du stade de développement (Korwin-Kossakowski, 2012). Ce phénomène est généralement la conséquence d'une demande en oxygène des individus plus importante que la capacité de diffusion du gaz au travers de l'enveloppe (Korwin-Kossakowski, 2012). Il est causé par la libération d'enzymes de digestion de l'enveloppe de l'œuf (Chorionases) ainsi que par les mouvements de l'embryon lui-même (Korwin-Kossakowski, 2012). Cependant, d'après la littérature, la durée de l'éclosion ainsi que le stade de développement auquel éclosent les individus varient énormément en fonction des espèces (Balon, 1975b, 1999 ; Geffen, 2002 ; Korwin-Kossakowski, 2012 ; Trabelsi *et al.*, 2013 ; Alix *et al.*, 2015).

Contrairement à l'éclosion, la seconde limite, la première prise de nourriture exogène, n'est pas accompagnée d'autant de variations morpho-anatomiques intraspécifiques (Penaz, 2001 ; Teletchea et Fontaine, 2011). Chez les espèces à développement indirect (présence d'une période larvaire), cette transition nécessite que de nombreuses structures et fonctions soient développées telles que celles impliquées dans la prise de nourriture, sa digestion et son assimilation (système visuel, système digestif, mobilité, comportement de chasse ...). Ce seuil d'une grande importance physiologique, écologique et comportementale a un rôle prépondérant dans la survie optimale des larves (Balon, 1990 ; Penaz, 2001 ; Urho, 2002 ; Teletchea et Fontaine, 2011). Lors de la détermination de la table de développement embryonnaire de la perche commune, nous avons identifié que l'éclosion correspondait à un intervalle variable durant l'embryogenèse alors que la première prise de nourriture était fixe et apparaissait à 15 jours post-fécondation à 13°C.

Afin de renforcer cette idée, la comparaison du développement de plusieurs espèces pourrait permettre d'identifier la première prise de nourriture exogène comme limite des périodes embryonnaires et larvaires chez d'autres espèces. Cette comparaison pourrait être effectuée en fonction de notre approche alternative de développement dans le but d'identifier des profils de développement similaires entre différentes espèces, de déterminer la pertinence de l'utilisation de notre méthode alternative de description du développement comme référence, et de caractériser les limites de la période embryonnaire chez plusieurs espèces. Les profils similaires identifiés pourraient permettre de déterminer des mécanismes sous-jacents potentiellement similaires ainsi que les facteurs

déterminant des différentes étapes de l'ontogenèse. D'un point de vue plus appliqué, cela pourrait permettre de généraliser les connaissances biologiques obtenues pour la gestion des périodes précoces sur la perche commune en considérant des groupes fonctionnels, comme décrits dans la classification réalisée pour la reproduction des poissons d'eau douce tempérée (Teletchea *et al.*, 2009a). Cela pourrait permettre une extrapolation des connaissances à d'autres espèces potentiellement intéressantes pour l'aquaculture et ainsi faciliter la diversification de la production de nouvelles espèces en pisciculture continentale. Dans ce but, j'ai choisi d'utiliser cette classification des espèces selon ces groupes fonctionnels afin de déterminer également si le même type d'approche pouvait être réalisé pour les premières phases de développement.

### **2. Comparaison interspécifique du développement d'espèce en fonction de la perche commune**

#### **a) *Choix de la classification***

Au contraire de l'approche phylogénétique, permettant la potentielle mise en évidence des caractères ancestraux communs entre les espèces, la classification de Teletchea *et al.* (2009a) est basée sur l'analyse de 29 traits de reproduction chez 65 espèces d'eau douce. Elle vise à proposer des groupes fonctionnels basés sur des convergences biologiques qui pourraient révéler des régulations similaires de la fonction de reproduction chez les espèces du même groupe. Cette classification peut s'avérer plus pertinente pour l'extrapolation de données biologiques entre des espèces. Par conséquent, elles regroupent des espèces en fonction de la similarité de traits biologiques reflétant les relations essentielles des individus avec leur milieu et des convergences biologiques (Teletchea *et al.*, 2009a). Au contraire d'autres classifications purement qualitatives basées uniquement sur la littérature (Balon, 1975a), l'approche de Teletchea *et al.* (2009a) est basée sur des méthodes mathématiques et une analyse de données quantitative (analyse des correspondances multiples). Cette classification identifie 10 groupes d'espèces principalement structurés par les besoins en température, la saison de ponte et les soins parentaux. Dans ce contexte, notre espèce d'intérêt, la perche commune, appartient au groupe des pondeurs printaniers précoces (PPP). Afin d'identifier des profils de l'embryogenèse similaire avec la perche commune et répondre à l'ensemble des questions préalablement posées, l'ontogenèse de cette espèce a donc été comparée aux tables de développement d'espèces appartenant au groupe des PPP. Afin de compléter l'analyse comparative, des espèces appartenant au groupe des pondeurs printaniers tardifs sans soins parentaux (PPT) ont aussi été étudiées. En effet, les espèces au sein d'un même groupe fonctionnel sont caractérisées par des besoins thermiques similaires au moment de la ponte. Cette température est également celle à laquelle se développent les embryons et l'un des facteurs abiotiques les plus importants pour le développement embryonnaire (Kamler, 2002, 2008 ; Teletchea *et al.*, 2009b). Par conséquent, nous pourrions émettre l'hypothèse que les espèces issues du groupe des PPP (température de ponte plus faible) auraient un développement plus lent et moins synchronique que les espèces du groupe des PPT (température de ponte plus élevée). Par conséquent, la

variabilité de développement interspécifique pourrait être moins forte au sein d'un même groupe qu'entre des groupes différents. Cela pourrait permettre de caractériser des profils de développement communs à un ensemble d'espèces et développer une approche similaire de classification par convergence des traits biologiques de développement.

b) *Choix des espèces et des critères*

Le choix des espèces étudiées a été effectué principalement en fonction des données de développement embryonnaire disponibles dans la littérature et de leur appartenance à un groupe fonctionnel. En effet, l'hypothèse de départ pourrait être que les espèces appartenant au même groupe de pondeurs, donc présentant des similarités biologiques pour la reproduction, pourraient être caractérisées également par des profils de développement embryonnaires proches. Au sein des pondeurs printaniers précoces, j'ai donc choisi de comparer le développement embryonnaire de la perche commune (*Perca fluviatilis*) avec la perchaude (*Perca flavescens*), le brochet (*Esox lucius*), le doré jaune (*Sander vitreus*), l'éperlan (*Osmerus eperlanus*) et la grémille (*Gymnocephalus cernuus*) (Mansueti, 1964a ; Kennedy, 1969 ; McElman et Balon, 1979 ; Kováč, 1993a ; Gorodilov et Melnikova, 2006 ; Mel'nikova et Gorodilov, 2006 ; Alix *et al.*, 2015). D'un autre côté, quelques espèces du groupe des pondeurs printaniers tardifs ont également été choisies dans le but de compléter l'analyse, de mettre en avant de potentielles différences entre ces groupes fonctionnels et potentiellement d'identifier des profils de développement intra-groupe plus homogènes que ceux intergroupes. Pour cela, la perche blanche (*Morone americana*), la carpe commune (*Cyprinus carpio*) et le poisson rouge (*Carassius auratus*), trois espèces appartenant au groupe des pondeurs printaniers tardifs ont été sélectionnées (Mansueti, 1964b ; Oyen *et al.*, 1991 ; Martins *et al.*, 2009 ; Tsai *et al.*, 2013). Au total, le développement embryonnaire de 9 espèces a été comparé selon la même méthode que celle décrite pour les percidés (Schaerlinger et Żarski, 2015). La liste des espèces utilisées ainsi que les groupes auxquels elles appartiennent dans la classification utilisée sont répertoriés dans le Tableau 11. Pour faciliter la compréhension de l'analyse, un code couleur, la température de développement embryonnaire utilisée dans chacune des études et des caractéristiques morphométriques de l'ovule, de l'embryon libre et de la larve ont été ajoutés pour chaque espèce. De plus, la perche commune et la perchaude sont caractérisées par des gangues épaisses glycoprotéiques entourant l'embryon en développement et représentées dans le tableau par des épaisseurs plus importantes des enveloppes (Tableau 11). Afin de tester la pertinence de l'utilisation de notre table alternative de développement, j'ai choisi d'étudier chaque phase et seuil défini dans cette méthode, quand cela était décrit dans la littérature pour les autres espèces. Ces différents évènements sont résumés dans le Tableau 12.










Espèce	Température d'incubation (°C)	Taille de l'ovule (mm)	Taille de l'embryon libre à l'éclosion (mm)	Taille de la larve à alimentation exogène (mm)	Temps de développement embryonnaire (jours)	Groupe fonctionnel
Eperlan <i>O. eperlanus</i>	18,3	0,85 	6,0	7,0	11	
Doré jaune <i>S. vitreus</i>	15	1,85 	7,0	9,4	15,5	
Perche commune <i>P. fluviatilis</i>	13	1,75 	5,6	6,2	15	Pondeurs printaniers précoces
Perchaude <i>P. flavescens</i>	10,3	1,65 	5,8	7,0	29	
Grémille <i>G. cernuus</i>	19,4	0,95 	3,7	4,6	8,2	
Brochet <i>E. lucius</i>	13	2,35 	8,3	10,2	13	
Perche blanche <i>M. americana</i>	18,3	0,75 	2,6	3,8	11,5	
Carpe commune <i>C. carpio</i>	25	1,35 	4,75		3	Pondeurs printaniers tardifs
Poisson rouge <i>C. auratus</i>	24	1,35 	4,5		5	

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des espèces utilisées pour la comparaison du développement embryonnaire.

Ce tableau répertorie les noms vernaculaires et scientifiques des espèces utilisées et précise la température d'incubation et l'épaisseur des enveloppes de l'œuf, la taille des ovocytes, de l'embryon libre à l'éclosion et de la larve à la première alimentation exogène. Enfin, les groupes auxquels appartiennent ces espèces sont définis selon la classification de Teletchea *et al.* (2009a).

Période	Phase	Etape	Seuils (début de chaque étape)
Embryonnaire	Clivage cellulaire (CC)	CC1	S1 : Clivage cellulaire synchrone
		CC2	S2 : Clivage cellulaire asynchrone
	Gastrulation (G)	G1	S3 : Gastrulation rapide
		G2	S4 : Gastrulation lente
	Organogenèse (O)	O1	S5 : 1ère différenciation cellulaire
		O2	S6 : Battements du cœur
		O3	S7 : Différenciation des organes associés au système digestif
		O4	S8 : Ouverture de la bouche
		O5	S9 : Mouvements coordonnés des nageoires pectorales
	Larvaire	L1	1ère prise de nourriture exogène

Tableau 12 : Tableau récapitulatif de l'ensemble des phases, étapes et seuils observés pour la comparaison inter-espèces.

c) *Méthode de comparaison*

Cette comparaison a été effectuée en deux étapes. Dans un premier temps, une comparaison générale du développement embryonnaire a été réalisée, les espèces ont été replacées dans leur groupe d'appartenance selon la classification précédemment citée (Teletchea *et al.*, 2009a) (Figure 42). Dans un second temps, le même type de comparaison a été effectué en considérant les espèces selon la taille des ovules pondus (Figure 43). En effet, le diamètre des ovules est un des paramètres utilisés dans cette classification et il a été décrit comme l'un des principaux facteurs intrinsèques pouvant expliquer les variations de durées d'incubation chez différentes espèces (de la fécondation à l'éclosion) (Kamler, 2002, 2008 ; Teletchea *et al.*, 2009b). Afin de déterminer l'apport de l'approche phylogénétique dans cette comparaison interspécifique, les espèces ont également été replacées selon leur proximité phylogénique. Cependant, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre la proximité phylogénique des espèces et les profils de développement. Par conséquent, afin d'éviter le surplus d'information dans cette discussion, ces résultats ne seront pas discutés.

Avant de pouvoir entamer cette comparaison, nous devons définir deux points importants : les limites de l'embryogenèse ainsi que l'échelle permettant de décrire l'ontogenèse des différentes espèces. Dans ce cadre, nous avons choisi l'activation des ovules et la première prise de nourriture exogène comme limites de l'embryogenèse. En effet, lors de l'étude des différentes tables de développement des espèces utilisées, j'ai remarqué que l'éclosion était un processus variable qui pouvait se dérouler durant quelques heures ou plusieurs jours (de 10 heures pour la perche blanche à 4,5 jours pour la perche commune) et par conséquent, englober plusieurs étapes du développement embryonnaire (6% à 37% du développement embryonnaire, pour la perche blanche et la perche commune, respectivement) (Mansueti, 1964b ; Alix *et al.*, 2015). De plus, même si la première prise de nourriture exogène n'était pas correctement définie chez l'ensemble de nos espèces, celle-ci semblait apparaître à des stades de développement moins variables que la phase d'éclosion et s'avérait par conséquent plus pertinente.

Pour définir l'échelle de description du développement, nous avons utilisé les phases et seuils cités auparavant. Cependant, ces derniers devaient être représentés selon une référence ou unité (jours, heures, degrés jours, pourcentage). Les différentes tables de développement étudiées ayant été réalisées à des températures variables (entre 10,3°C et 25°C), la description de l'embryogenèse en fonction des jours ou heures s'avérait peu pertinente. En effet, la température est le principal facteur abiotique influençant la vitesse de développement (Kamler, 2002, 2008 ; Teletchea *et al.*, 2009b). De plus, l'unité des degrés jours est également variable en fonction de la température et ne prend pas en compte les autres paramètres pouvant faire varier le développement des individus (Schaerlinger et Żarski, 2015). Par conséquent, afin de minimiser l'impact des différentes températures d'incubation, l'unité de mesure utilisée lors de cette comparaison est un pourcentage de développement

embryonnaire (DE). Pour chacune des espèces, la totalité de la période embryonnaire représente 100%, de l'activation de l'ovule (0% du temps) à la première prise de nourriture exogène (100% du temps). La durée nécessaire pour atteindre chaque évènement du développement (seuils) a donc été normalisée en fonction de la première prise de nourriture exogène et transformée en pourcentage. Par exemple, pour une espèce dont le développement embryonnaire dure 10 jours (100% du DE), et chez laquelle l'ouverture de la bouche apparaît à 5 jours, le pourcentage de développement embryonnaire auquel se développe cette capacité est 50% (soit le moment d'apparition du seuil/la durée totale du développement embryonnaire \* 100). Par conséquent, cette méthode semble la plus adaptée afin de comparer de façon fiable l'embryogenèse de différentes espèces en minimisant l'impact des températures d'incubation.

### **3. Utilisation de l'approche alternative pour les comparaisons interspécifiques**

#### ***a) Généralités sur la comparaison du développement embryonnaire inter-espèces***

La diversité des espèces de Téléostéens s'accompagne d'une diversité des habitats, des comportements et des stratégies de reproduction dont les modes de développement (Jalabert, 2005 ; Teletchea *et al.*, 2009a, 2009b). En effet, le développement va refléter les caractéristiques du milieu dans lequel évolue l'individu (Balon, 1975a), pouvant entraîner des variations durant l'ontogenèse comme la température de l'eau ou le type d'eau. Par conséquent, les stratégies de reproduction liées au milieu des individus telles que les conditions de pontes (température, moment de ponte, type d'œufs) vont être directement en relation avec les modes de développement.

Lors de notre comparaison interspécifique du développement embryonnaire, les résultats obtenus montrent que la séquence d'apparition des différentes étapes de l'embryogenèse est similaire entre toutes les espèces (Figure 42 et Figure 43). Cependant, les durées des phases et étapes de développement sélectionnées peuvent différer entre les espèces. Notons que la durée de la phase d'organogenèse par rapport au taux global de développement embryonnaire ne sera pas traitée dans cette comparaison car ce processus se prolonge après l'éclosion. Par conséquent, la fin de la phase d'organogenèse ne peut être déterminée dans le cadre de ce travail.



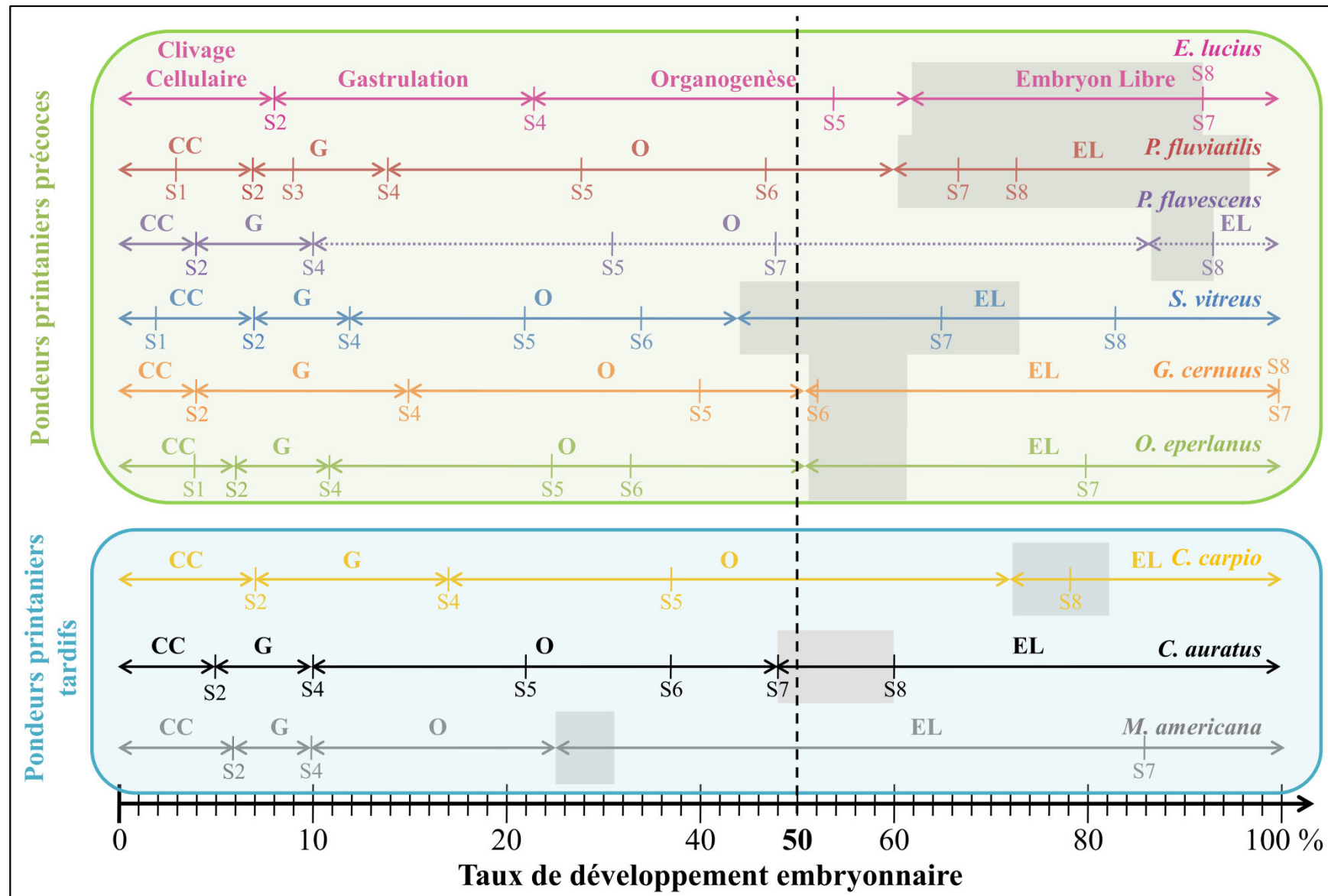
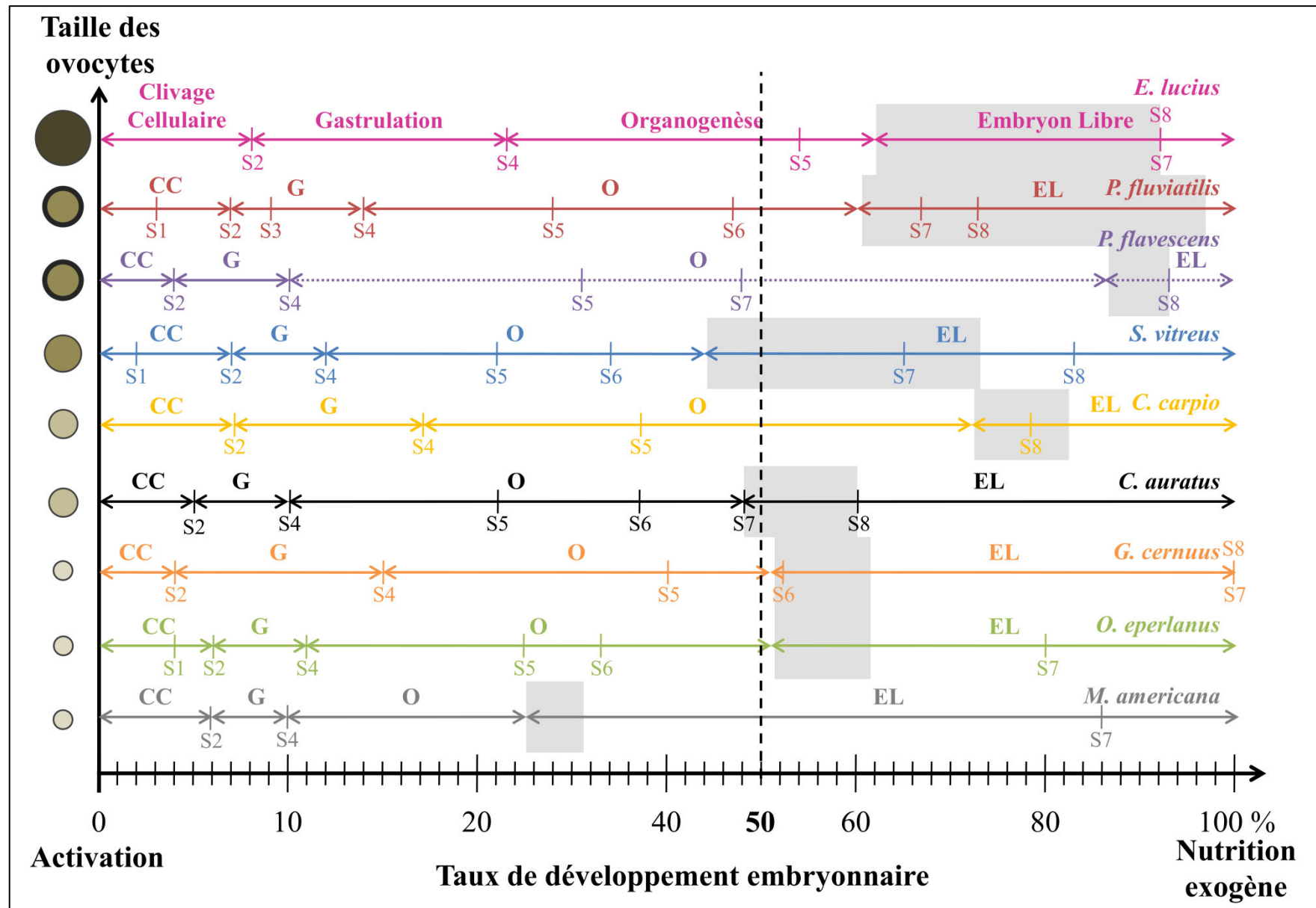


Figure 42 : Comparaison générale du développement embryonnaire de 9 espèces de poissons selon la classification de Teletchea *et al.*, 2009a.

Les espèces sont classées en fonction de leur cluster : pondeurs printaniers tardifs (rectangle bleu) et pondeurs printaniers précoces dont la perche commune (rectangle vert). Les différentes phases (CC, G, O et EL) ainsi que le début de chaque étape (S1 à S8) sont représentés en fonction des données de la littérature. Le rectangle gris représente la phase d'éclosion. La limite des 50% de développement embryonnaire est représentée par une ligne verticale en pointillés.



**Figure 43 : Comparaison générale du développement embryonnaire de 9 espèces de poissons en fonction de la taille des ovules.**

Les différentes phases (CC, G, O et EL) ainsi que le début de chaque étape (S1 à S8) sont représentés en fonction des données de la littérature. Les phases représentées en pointillés correspondent à celles peu documentées dans la littérature. Le rectangle grisé représente la phase d'éclosion. La limite des 50% de développement embryonnaire est représentée par une ligne verticale en pointillés.

Tout d'abord, nous pouvons remarquer que la durée relative des phases les plus précoces du développement, clivage cellulaire et gastrulation, ne varient pas énormément en fonction des espèces étudiées (Figure 42 et Figure 43). En effet, la phase de clivage cellulaire représente entre 4 et 9% du développement embryonnaire des individus avec une moyenne de 6,6%. Pour la perche commune (en rouge), espèce appartenant au groupe des PPP et présentant un des diamètres ovocytaires les plus importants, cette phase correspond à 7% du DE comme pour le doré jaune. Cependant, chez la perchaude faisant partie du même groupe fonctionnel et possédant des ovules de taille similaire à la perche commune, la première phase de développement embryonnaire est beaucoup plus courte.

D'après cette comparaison, aucune relation globale ne semble réellement mise en évidence entre les taux de développement embryonnaire du clivage cellulaire et la taille initiale des ovules ou la classification de Teletchea *et al.* (2009). En ce qui concerne la durée de la phase de gastrulation, les informations obtenues pour la plupart des espèces étudiées vont également dans ce sens. En effet, des relations positives entre le taux de développement et le diamètre des ovules ont déjà été mises en évidence (Kamler, 2002) mais aucune d'entre elles n'était significative pour le taux de développement avant l'éclosion (Kamler, 2002). Néanmoins, dans notre comparaison, nous pouvons tout de même remarquer deux exceptions pour la phase de gastrulation : la perche blanche et le brochet qui sont issus du groupe des PPT et des PPP, respectivement. En effet, la perche blanche est caractérisée par les ovules les plus petits de cette étude (0,75 mm de diamètre), contrairement au brochet qui présente les ovules les plus gros (2,35 mm de diamètre). Ces deux espèces présentent également les pourcentages de développement embryonnaires les plus extrêmes pour la phase de gastrulation (entre 4 et 15% du DE, respectivement) (Figure 42 et Figure 43).

Pour les seuils de développement de l'organogenèse, les mêmes conclusions apparaissent. En effet, l'acquisition de nouvelles capacités (S4, S5, S6, S7 et S8) dépendante de la durée des étapes précédentes, diffère donc en fonction des espèces. Le moment d'apparition de ces seuils au sein du développement embryonnaire ne semble pas corrélé avec l'appartenance à un groupe fonctionnel ni à la taille des ovules. Par conséquent, les espèces présentant des caractéristiques morphométriques des ovules similaires à la perche commune, ne suivent pas le même profil de développement. Cependant, nous pouvons tout de même remarquer une exception déjà évoquée auparavant : le brochet. En effet, cette espèce semble avoir besoin d'un plus grand taux de développement embryonnaire pour acquérir de nouvelles capacités, à commencer par l'acquisition des 1<sup>ères</sup> différenciations cellulaires. Par exemple, si nous choisissons un taux de développement arbitraire de 50%, nous pouvons effectivement remarquer que toutes les espèces à l'exception du brochet, ont dépassé le seuil des premiers battements du cœur. Au contraire, certaines espèces comme la perche blanche ont même terminé la phase d'éclosion (Figure 42 et Figure 43).

b) *L'éclosion*

Comme cela a été décrit auparavant, un des évènements majeurs de la vie des embryons est l'éclosion (Teletchea et Fontaine, 2011 ; Korwin-Kossakowski, 2012). D'après la littérature, la durée de l'éclosion ainsi que le stade de développement auquel éclosent les individus varient énormément en fonction des espèces (Balon, 1975b, 1999 ; Geffen, 2002 ; Korwin-Kossakowski, 2012 ; Trabelsi *et al.*, 2013 ; Alix *et al.*, 2015). En effet, lors de notre comparaison, la phase d'éclosion apparaît très variable en fonction des espèces et ce processus peut commencer à divers taux de développement embryonnaire. Par exemple, les embryons de perche blanche éclosent les plus précocement et sont peu développés (25% du DE, seuil S4 : battement du cœur) alors que ceux de la perchaude sont beaucoup plus tardifs et plus développés (86% du DE, seuil S7 : bouche ouverte). Par conséquent, les nouveaux embryons éclos ne seront pas au même stade de développement en fonction des espèces. Au sein d'une même espèce, nous avons pu remarquer que les embryons nouvellement éclos pouvaient également être très différents d'un point de vue développemental. En effet, la durée de l'éclosion étant plus ou moins étendue (de 6% à 37% du DE, pour la perche blanche et la perche commune, respectivement), de nouvelles capacités peuvent être acquises durant cet intervalle conduisant à une variabilité de développement intraspécifique chez les nouveaux embryons éclos. Ce dernier constat renforce également l'idée de différences interspécifiques de développement des embryons à l'éclosion.

Si nous utilisons la classification de Teletchea *et al.* (2009a), nous pouvons remarquer que cette approche permet de regrouper des espèces plus ou moins similaires en termes de développement embryonnaire au niveau du groupe des PPP dans laquelle on distingue deux types de profils (Figure 42). Le premier (type 1) correspond à des espèces dont la grande majorité du développement embryonnaire est effectuée dans les enveloppes de l'œuf (perche, perchaude, brochet) avec une courte phase d'embryon libre. Ces embryons à la fin de la phase d'éclosion sont avancés dans le développement et sont passés à l'étape O5, avec l'acquisition des mouvements coordonnés des nageoires pectorales. Le second type de profil de développement (type 2) correspond à des espèces passant la moitié de l'embryogenèse dans les enveloppes de l'œuf et l'autre moitié en tant qu'embryon libre (grémille, éperlan et doré jaune). A la fin de la phase d'éclosion, ces embryons sont moins développés que ceux de type 1 et n'ont pas encore atteint l'étape S8. Les embryons les plus développés (type 1) à l'issue de la phase d'éclosion (perche commune, brochet, perchaude) sont alors capables de s'échapper plus facilement lors de l'attaque de prédateur et de chasser des proies (mouvements des nageoires pectorales coordonnés et bouche ouverte). Cela pourrait potentiellement expliquer la courte durée entre la fin de l'éclosion et la première prise de nourriture exogène. Au contraire, d'autres espèces telles que le doré jaune, la grémille et l'éperlan (type 2) présentent des embryons beaucoup moins avancés à l'éclosion ayant dépassé uniquement les seuils des premiers battements du cœur ou de la formation des organes associés au système digestif. Ces embryons, quant à eux, ne possèdent pas cette capacité et pourraient potentiellement essayer de se cacher afin

d'échapper aux prédateurs. Au contraire des espèces du groupe des PPP, les espèces du groupe des PPT ne semblent pas avoir de profils de développement similaires. La perche blanche présente un développement embryonnaire atypique caractérisé par une éclosion très courte (Figure 42). La carpe commune, quant à elle, semble être plus proche du type 1 des pondeurs printaniers précoces. Enfin, le poisson rouge semble être caractérisé par un profil de développement entre les espèces des pondeurs printaniers précoces et la perche blanche.

Le diamètre des ovules a été décrit comme étant l'un des principaux facteurs intrinsèques pouvant expliquer les variations de durée d'incubation (de la fécondation à l'éclosion) (Kamler, 2002, 2008 ; Teletchea *et al.*, 2009b). En effet, d'après (Kamler, 1992)), la quantité ainsi que la qualité énergétique du vitellus sont des paramètres décisifs pour le développement embryonnaire (Kamler, 1992). Dans notre cas, le début de la phase d'éclosion très variable en fonction des espèces semble effectivement être en relation avec le diamètre des ovules, à l'exception du doré jaune et de la carpe commune. En effet, les espèces avec les ovules les plus petits semblent commencer à éclore à des taux de développement embryonnaire plus précoces et au contraire, les espèces présentant les ovules les plus gros présentent des taux de développement embryonnaire plus tardifs lors de la première éclosion. Cependant, le diamètre des ovules ne semble pas expliquer la durée d'éclosion très variable observée entre les espèces étudiées. En ce qui concerne les espèces du genre *Perca* (perchaude et perche commune), un facteur supplémentaire pourrait être pris en compte afin d'expliquer leur éclosion tardive durant le développement embryonnaire. Les pontes de ces espèces sont entourés d'une gangue élastique glycoprotéique dont le rôle est d'assurer la protection des embryons en développement (Formicki *et al.*, 2009). Cependant, cette enveloppe supplémentaire pourrait potentiellement être plus difficile à fragiliser par les enzymes de digestion et retarder la sortie de l'embryon. L'étude chez d'autres espèces possédant le même type d'enveloppe protectrice pourrait être intéressante afin de déterminer si cette particularité biologique influence ou non la phase d'éclosion. Les études utilisées pour ces comparaisons ayant été réalisées dans des conditions de qualité d'eau dites « optimales » pour chacune des espèces, les facteurs extrinsèques tels que le pH et la teneur en oxygène dissous ne peuvent pas être pris en compte pour expliquer une telle variabilité des profils de développement. Enfin, même si la température est le facteur extrinsèque le plus important lors de l'ontogenèse pouvant expliquer jusqu'à 90% des variations du taux de développement (Kamler, 2002 ; Korwin-Kossakowski, 2012), l'utilisation de taux de développement en pourcentage (en fonction de la première prise de nourriture exogène) nous permet de minimiser son impact. Nous pouvons tout de même remarquer que la phase d'éclosion semble plus courte chez les espèces se développant à des températures plus élevées (18,3 à 25°C) que celles se développant à des températures plus froides (10,3 à 15°C). En effet, la température est un facteur important permettant de synchroniser l'éclosion des individus au sein d'une même ponte (Korwin-Kossakowski, 2012). Afin de confirmer cette

tendance, l'étude de l'embryogenèse à différentes températures chez des espèces variées pourrait être envisagée.

En conclusion, cette approche basée sur divers traits de reproduction, y compris le diamètre ovocytaire, nous permet de mieux regrouper des espèces avec des profils de développement similaires particulièrement au niveau de la phase d'éclosion par rapport à l'utilisation simple du diamètre ovocytaire. Afin de compléter cette comparaison et pouvoir mettre en évidence des tendances dans les profils de développement, un nombre plus important d'espèces devrait être pris en compte. Néanmoins, lors des phases précoces du développement, cette approche ne semble pas optimale pour regrouper les espèces avec des profils de développement similaires.

#### **4. Comparaisons interspécifiques : les grandes conclusions**

##### ***a) Pertinence de notre méthode alternative de description***

Lors de l'étude bibliographique des différentes tables de développement, de nombreuses méthodes de description de l'embryogenèse ont été observées. En effet, la description pouvait être effectuée selon une échelle de temps et de taille des embryons libres (perche blanche ; (Mansueti, 1964b)), selon la description graduelle des stades de clivages cellulaires, blastula, gastrula et le nombre de somites (poisson rouge ; (Tsai *et al.*, 2013), selon la théorie saltatoire et la détermination de seuil (doré jaune, grémille ; (McElman et Balon, 1979 ; Kováč, 1993a). Enfin, cette description était également effectuée en utilisant une partie ou plusieurs de ces méthodes, en fonction de la phase de développement de l'embryon (carpe commune, éperlan, perchaude, brochet ; (Mansueti, 1964a ; Kennedy, 1969 ; Oyen *et al.*, 1991 ; Gorodilov et Melnikova, 2006). Pour ne citer qu'un exemple, concernant l'éperlan, le début de l'embryogenèse a été décrit selon la théorie graduelle et l'utilisation des somites, puis au cours de l'organogenèse, les auteurs ont utilisés la position des organes associés au système digestif (notamment du foie) afin d'établir la séquence de développement (Gorodilov et Melnikova, 2006). Ce manque d'homogénéité dans la description de l'embryogenèse chez ces différentes espèces a conduit à l'absence de certaines informations, notamment l'apparition de seuils, lors de l'utilisation de notre méthode alternative (perche blanche, brochet, perchaude par exemple). En effet, certains de ces seuils sont relativement faciles à identifier chez les embryons et communs avec la description saltatoire du développement chez d'autres espèces (1ères différenciations cellulaires, battements du cœur ou première prise de nourriture) (Paine et Balon, 1984a ; Cunningham et Balon, 1985). En revanche, les seuils correspondant à l'étape d'asynchronie du clivage cellulaire, de changement de vitesse de la gastrulation et de différenciation des organes associés au système digestif sont plus difficiles à caractériser et ne sont pas toujours étudiés. Les critères utilisés lors de l'établissement de notre table alternative de développement ne sont peut-être pas toujours pertinents ou faciles à mettre en œuvre et sont donc perfectibles. La caractérisation *in vivo* du développement d'autres espèces d'intérêt pourrait notamment permettre de confirmer ou d'infirmer la pertinence de



nos seuils biologiques définis pour la perche commune. De plus, des études de l'embryogenèse dans des conditions variées (température, oxygène ou qualité de l'eau) pourraient permettre de confirmer la pertinence et la constance d'apparition de ces seuils biologiques lors du développement.

Malgré ces limites, en général, l'approche alternative du développement embryonnaire mise en œuvre dans ce travail permet effectivement de réaliser avec facilité des comparaisons inter-espèces tout en prenant compte la variabilité intra- et interspécifique. En effet, la plupart des seuils définis dans notre travail sont également décrits dans les tables des espèces étudiées ce qui confirme leur importance biologique. L'utilisation de cette approche alternative pourrait donc être généralisée lors de l'étude de l'embryogenèse de plusieurs espèces au sein des Téléostéens. La variabilité du développement intraspécifique inhérente au développement des espèces, même domestiquées, pourrait alors être caractérisée avec plus de précision et de flexibilité que l'approche graduelle et saltatoire. Au contraire des espèces modèles (poisson zèbre, tilapia, poisson rouge), cette variabilité du taux de développement apparaît dès les phases précoces de l'embryogenèse (clivage cellulaire et gastrulation) chez la perche commune, espèce en cours de domestication. Le développement d'autres espèces potentiellement intéressantes pour l'aquaculture (comme le sandre) pourrait donc être caractérisé par cette approche intégrative des variations de l'ontogenèse précoce et tardive au début du processus de domestication. Cela pourrait permettre d'identifier les seuils biologiquement importants lors du développement et de porter une attention particulière aux conditions d'élevage pouvant influencer, d'une façon ou d'une autre, l'embryogenèse de ces espèces.

Enfin, les seuils identifiés dans cette méthode n'étant pas spécifiques aux caractéristiques des poissons uniquement, cette approche pourrait également être testée chez des espèces d'autres taxa présentant des variations dans leur séquence de développement (amphibiens, oiseaux ...).

### b) *Le processus d'éclosion et la première prise de nourriture*

Nous avons remarqué lors de notre comparaison interspécifique, que la séquence des étapes et seuils de développement était identique avec des variations de durée uniquement dont la plus importante concerne la phase d'éclosion. En effet, cette phase est très variable en fonction des espèces, tant pour la durée que pour le/les stades de développement auxquels elle apparaît. Le début de l'éclosion peut être observé à différentes étapes, plus ou moins précoces du développement, entraînant des différences morphologiques et anatomiques chez les embryons. De plus, la durée de l'éclosion étant très variable, elle peut comprendre l'acquisition de nouvelles capacités comme l'ouverture de la bouche, induisant une différence de développement des nouveaux embryons éclos. Par conséquent, malgré les arguments avancés par de nombreux auteurs en faveur de l'éclosion comme limite entre les périodes embryonnaire et larvaire (Teletchea et Fontaine, 2011 ; Korwin-Kossakowski, 2012), d'un point de vue purement développemental et morphologique, celle-ci n'apparaît pas comme une limite pertinente. Cette comparaison permet de confirmer que l'éclosion ne correspond pas à un stade fixe

dans le développement mais à un intervalle plus ou moins court chez plusieurs espèces, qui englobe plusieurs stades et parfois étapes de l'embryogenèse et qui est dépendante de l'espèce étudiée. Dans ce cadre, la première prise de nourriture exogène apparaît plus pertinente car moins variable que l'éclosion en termes de développement comme pour la perche par exemple (Penaz, 2001 ; Teletchea et Fontaine, 2011). Cependant, comme cela a été précisé auparavant, ce seuil n'est pas traité avec autant d'attention dans les descriptions de l'ontogenèse que la phase d'éclosion. Une caractérisation plus approfondie de ce seuil serait donc nécessaire chez d'autres espèces que la perche afin de déterminer ou non, son importance développementale.

### c) *La perche commune, espèce de référence : pertinence des classifications*

Un des objectifs de cette comparaison inter-espèces était de définir la pertinence de l'utilisation de la perche commune comme référence d'un groupe d'espèces. Dans un premier temps, nous avons donc comparé les espèces dans le contexte de la classification de Teletchea *et al.* (2009) avec comme groupe principal celui des pondeurs printaniers précoces dont la perche fait partie. Les résultats obtenus pour cette comparaison inter-espèces des pondeurs printaniers précoces a permis de potentiellement mettre en évidence deux types de profils de développement embryonnaire dans ce groupe notamment basés sur la phase d'éclosion. Elle a également permis d'identifier de façon qualitative des espèces présentant un profil de développement réellement différent par rapport aux autres espèces et appartenant à d'autres groupes de pondeurs (perche blanche). Dans un second temps, la comparaison générale du développement embryonnaire des espèces en fonction de la taille des ovules n'a pas apporté énormément d'éléments. Nous avons pu mettre en évidence qu'il y avait une variation dans les durées des étapes et phases de développement mais sans lien important avec le diamètre des ovules, excepté pour deux espèces (brochet et perche blanche) ainsi que la phase d'éclosion. Enfin, la comparaison interspécifique selon la classification phylogénétique (non présentée ici) n'a pas apporté également de réponse quant aux potentiels mécanismes évolutifs communs en fonction des espèces proches d'un point de vue phylogénique reflétant des profils de développement similaires (pour les critères que nous avons observés).

Par conséquent, d'après les données de la littérature actuelle, la généralisation des connaissances zootechniques accumulées chez la perche commune pour les premiers stades de vie selon la classification de Teletchea *et al.* (2009a) ne peut pas être effectuée au sein du groupe des pondeurs printaniers précoces (Teletchea *et al.*, 2009a). La reproduction et son succès (dont le développement embryonnaire) étant l'un des points clefs de la domestication et de l'élevage de nouvelles espèces d'intérêt aquacole, la création d'une classification intégrant des traits de reproduction et de développement embryonnaire et larvaire pourrait être envisagée afin de regrouper des espèces similaires. Afin de pouvoir mettre en relation cette classification du développement avec la classification de Teletchea *et al.* (2009), quelques caractéristiques importantes telles que la saison de

pontes, la température de développement et le diamètre des ovules pourraient être conservées. Effectivement, la saison de ponte est particulièrement liée à la température de ponte et donc de développement, principal facteur extrinsèque influençant la vitesse de l'ontogenèse (Kamler, 2002, 2008 ; Teletchea *et al.*, 2009b). De plus, comme cela a été décrit auparavant, le diamètre des ovules est le principal facteur intrinsèque pouvant expliquer les variations de durées d'incubation (Kamler, 2002, 2008 ; Teletchea *et al.*, 2009b). D'autres variables, intéressantes d'un point de vue développemental mais également appliqué pourraient être intégrées comme le moment de la première prise alimentaire exogène, le type de développement des espèces (direct ou indirect) mais aussi la valeur énergétique globale du vitellus de ovules pondus. En effet, cela permettrait de prendre en compte la quantité et la qualité du vitellus, paramètres décisifs pour le développement de l'embryon (Kamler, 1992), mais également des caractéristiques structurantes des groupes fonctionnels de la classification de Teletchea *et al.* (2009) et enfin, d'associer les histoires de vie des espèces par la caractérisation du développement direct et indirect (fortement dépendant de l'investissement des géniteurs dans la vitellogenèse) (Flegler-Balon, 1989 ; Balon, 1999). L'intégration de l'ensemble dans la création de groupes fonctionnels d'espèces dont les stratégies de reproduction et les modes de développement sont proches pourrait constituer une nouvelle classification permettant potentiellement de déterminer des régulations des fonctions de reproduction et de développement similaires entre des espèces du même groupe fonctionnel. De plus, cela pourrait également permettre de généraliser les connaissances zootechniques d'une espèce connue, comme la perche commune, à d'autres espèces du même groupe, notamment lors du développement précoce. En effet, actuellement, malgré le contrôle de la fonction de reproduction chez la perche commune, la qualité des gamètes obtenue et les succès de développement restent encore très variables (Schaerlinger et Żarski, 2015). La caractérisation correcte des différents succès de développement et des anomalies associées à ce dernier chez la perche commune pourrait être transposée à d'autres espèces d'intérêt aquacole et limiter les investissements en termes de coûts, de temps et de recherches approfondies sur ces nouvelles espèces.

### **B. Mesures et variabilités du succès de développement chez les Téléostéens**

#### **1. Qu'est-ce que le succès de développement et les limites des méthodes d'évaluation actuelles?**

##### ***a) Pourquoi et comment définir le succès de développement ?***

Lors de l'embryogenèse des Téléostéens, de nombreux défauts (mortalités, malformations, arrêt du développement) peuvent apparaître et conduire à différents succès de développement dans des conditions naturelles ou d'élevage. Ils peuvent alors avoir des répercussions importantes sur les populations en général et sur la production en élevage qui repose principalement sur l'obtention d'embryons viables et normaux (Bobe et Labbé, 2010 ; Zhang et Smith, 2015). Ces défauts sont principalement liés à la qualité des gamètes et notamment des ovules, facteur clef du succès de l'embryogenèse, difficile à déterminer et maîtriser (Bobe, 2015). Etant donné la grande variété

d'anomalies observée durant l'ontogenèse, la caractérisation la plus exhaustive du développement et de ces succès variables est nécessaire afin de comprendre les origines de ces anomalies, l'impact des facteurs biotiques et abiotiques sur le développement et de mesurer la qualité des gamètes (Bobe, 2015). En l'absence d'indicateur prédictif, l'évaluation du succès de développement est la principale mesure de la qualité des gamètes impliquant, par conséquent, des définitions proches entre ces deux termes. Ce succès de développement pourrait donc être défini comme la capacité d'un zygote ou d'un embryon à survivre, se développer et à grandir normalement. Il inclut donc deux principaux paramètres, les mortalités embryonnaires et les malformations qui peuvent être évaluées à différents stades du développement.

b) ***Comment mesurer le succès de développement ?***

Dans la littérature, de nombreux indicateurs sont utilisés afin de mesurer le succès de développement notamment en relation avec la qualité des gamètes (Bobe et Labbé, 2010). Ces indicateurs sont principalement divisés en 3 catégories de variables traduisant la survie, l'éclosion et les malformations des embryons et des larves (Tableau 13) (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013 ; Bobe, 2015). Pour caractériser la survie, des taux sont calculés à différents stades de l'embryogenèse dont les plus fréquemment utilisés sont le stade oeillé et la fin de la résorption du vitellus (Bonnet *et al.*, 2007a, 2007b ; Bobe et Labbé, 2010). Effectivement, l'évaluation de la survie est généralement effectuée à des moments du développement facilement identifiables par l'observateur. Le stade oeillé correspond à la pigmentation des yeux des embryons et est, par conséquent, très facile à caractériser, même chez des espèces où les œufs pondus sont opaques. Les malformations peuvent également être déterminées à différents moments du développement en fonction des espèces étudiées : le taux de blastomères anormaux lors du clivage cellulaire ou encore le taux de malformation à l'éclosion, à la fin de la résorption vitelline ou au moment de la première prise de nourriture (Tableau 13) (Aegerter *et al.*, 2005 ; Castets *et al.*, 2012 ; Nguyen *et al.*, 2012 ; Skaalsvik *et al.*, 2015 ; Samarin *et al.*, 2016). Au contraire des deux paramètres précédents pouvant être identifiés à différentes étapes du développement, les paramètres caractérisant l'éclosion sont souvent peu nombreux. Le paramètre le plus étudié est le taux d'éclosion qui peut être inclus dans la survie (capacité de l'embryon à survivre jusqu'à l'éclosion) mais traduit également les malformations (si l'individu possède des malformations sévères, il ne pourra pas éclore). Peu d'étude s'intéressent à d'autres paramètres traduisant l'éclosion comme la durée d'incubation ou la durée de l'éclosion (Tableau 13) (Castets *et al.*, 2012). Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente de cette discussion, l'éclosion n'apparaît pas comme un seuil développemental important dans la vie de l'embryon puisque ce dernier peut éclore à différents stades ou étapes de l'embryogenèse. Cependant, dans le contexte de caractérisation du succès de développement, l'importance écologique de l'éclosion et l'intégration d'autres variables (survie et malformations) au sein de cette catégorie justifie entièrement la pertinence de son utilisation. Le taux de fécondation est un indicateur très répandu permettant non pas d'évaluer la capacité de

développement d'un œuf mais la compétence de l'ovule à être fécondé ou du sperme à féconder. En fonction du moment auquel ce taux de fécondation est déterminé (plus ou moins tardivement durant l'embryogenèse), il peut être également considéré comme un taux de survie. Enfin, plusieurs études utilisent également des indicateurs tels que la taille des larves à l'éclosion et des taux de résistance de ces mêmes larves pour caractériser la qualité de ces larves (Tableau 13) (Castets *et al.*, 2012 ; Skaalsvik *et al.*, 2015).

De nombreux outils sont donc disponibles pour attester du succès de développement des embryons, notamment en lien avec la qualité des gamètes (Tableau 13). La mesure de ces indicateurs permet aux auteurs de définir des groupes de succès de développement, principalement 2 ou 3 (bon, intermédiaire et mauvais) qui sont définis, en général, à partir de seuils arbitraires tels que 80% de taux d'éclosion, 90% de survie au stade oillé ou l'absence de fécondation à des stades tardifs de l'embryogenèse (Tableau 13) (Aegerter *et al.*, 2005 ; Castets *et al.*, 2012 ; Bouleau *et al.*, 2014 ; Mommens *et al.*, 2014).

Auteurs	Espèces	Paramètres évalués	Méthode utilisée pour définir les groupes	Groupes définis
Aegerter <i>et al.</i> , 2005	Truite arc-en-ciel ( <i>O. mykiss</i> )	Taux de survie au stade oeuillé Taux de malformation à la résorption du sac vitellin	Arbitraire	<b>Bon</b> : au dessus de 90% de survie. <b>Intermédiaire</b> : entre 67 et 89% de survie. <b>Mauvais</b> : entre 0 et 29 % de survie.
Bouleau <i>et al.</i> , 2014	Poisson zèbre ( <i>D. rerio</i> )	Taux d'éclosion	Arbitraire	<b>Bon</b> : au dessus de 80% d'éclosion.
Bonnet <i>et al.</i> , 2007b	Truite arc-en-ciel ( <i>O. mykiss</i> )	Taux de malformation à la résorption du sac vitellin	Arbitraire	<b>Bon</b> : en dessous de 10% de malformation <b>Intermédiaire</b> : entre 10 et 63% de malformation <b>Mauvais</b> : au dessus de 63% de malformation
Castets <i>et al.</i> , 2012	Perche commune ( <i>P. fluviatilis</i> )	Taux de fécondation à 72 hpf Taux d'éclosion Durée d'incubation Durée d'éclosion Taux de malformation Taille de la larve à l'éclosion Taux de survie des larves Tolérance au jeûne	Analyse de données ACP/ACH sur l'ensemble des paramètres de développement embryonnaire	<b>Bon</b> : larves résistantes avec peu de malformations <b>Intermédiaire</b> : larves moins résistantes avec plus de malformations <b>Mauvais</b> : pas de fécondation à 72 hpf
Samarin <i>et al.</i> , 2016	Brochet ( <i>E. lucius</i> )	Taux de survie au stade oeuillé Taux d'éclosion Taux de malformation		Pas de définition de groupe
Mommens <i>et al.</i> , 2014	Flétan ( <i>H. hippoglossus</i> )	Taux de fécondation Taux d'éclosion	Arbitraire	<b>Bon</b> : taux de fécondation au dessus de 91% et taux d'éclosion au dessus de 86% <b>Mauvais</b> : taux de fécondation en dessous de 16% et taux d'éclosion en dessous de 7%
Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Cobia ( <i>R. canadum</i> )	Taux de fécondation Taux de blastomères anormaux Taux d'éclosion Taux de malformation des larves à la première prise de nourriture	Arbitraire	<b>Bon</b> : au dessus de 50% de taux de fécondation <b>Mauvais</b> : 0% de fécondation
Quiñones-Arreola <i>et al.</i> , 2015	Sériole ( <i>S. rivoliiana</i> )	Taux de fécondation Taux d'éclosion		Pas de définition de groupe

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des méthodes et indicateurs d'évaluation du succès de développement en lien avec la qualité des gamètes.

Les paramètres de survie sont représentés en bleu, les paramètres d'éclosion en rouge, les paramètres de malformation en vert et ceux de mesure de la résistance en orange.



c) *Quelles sont les limites des méthodes d'évaluation actuelles ?*

Face à la diversité de paramètres utilisés pour évaluer le succès de développement (Tableau 13), plusieurs limites des méthodes actuelles d'évaluation peuvent être mises en évidence. En effet, les outils d'évaluation de la qualité des gamètes étant très peu prédictifs, les paramètres utilisés pour attester de cette qualité sont principalement le succès de développement. Dans la plupart des études actuelles, un nombre limité d'indicateurs est utilisé. En effet, certaines études ne se basent que sur un ou deux de ces indicateurs, ne prenant pas en compte l'ensemble de la diversité des anomalies de développement (Tableau 13) (Rime *et al.*, 2004 ; Aegerter *et al.*, 2005 ; Osure et Phelps, 2006 ; Bonnet *et al.*, 2007a ; Bouleau *et al.*, 2014 ; Mommens *et al.*, 2014 ; Quiñones-Arreola *et al.*, 2015). Cela empêche notamment de caractériser la dynamique des mortalités embryonnaires et par conséquent les origines de ces dernières (Bobe, 2015).

Malgré leur simplicité d'utilisation, la pertinence biologique de ces paramètres a très peu été étudiée et peut potentiellement présenter des faiblesses ou des redondances dans certaines études. Par exemple, la pigmentation des yeux utilisée comme stade pour caractériser la survie chez de nombreuses espèces (Tableau 13), ne semble pas être un seuil important d'un point de vue développemental et par conséquent, l'utilisation unique de ce paramètre ne permet pas de comprendre les mécanismes qui ont conduit à un succès plus ou moins important du développement. Lors de l'utilisation de multiples paramètres, la pertinence biologique des variables utilisées ainsi que la redondance de ces paramètres dans les analyses (apportant la même information biologique) n'est pas toujours testée (Castets *et al.*, 2012). Cela peut entraîner des biais dans les études, notamment lors de l'utilisation de méthodes mathématiques pour définir les groupes de succès de développement.

Effectivement, les méthodes permettant de définir des groupes de succès de développement présentent également des limites. Généralement, les seuils utilisés pour caractériser ces groupes sont arbitraires et décidés par les auteurs ou ne sont pas indiqués (Tableau 13) (Aegerter *et al.*, 2005 ; Bonnet *et al.*, 2007a ; Nguyen *et al.*, 2012 ; Bouleau *et al.*, 2014 ; Mommens *et al.*, 2014). Lorsque la méthode de définition des groupes utilisée est basée sur des approches mathématiques telles que des classifications ascendantes hiérarchiques, les seuils utilisés sont alors définis de manière quantitative et non plus arbitraire (Castets *et al.*, 2012). Cependant, il est important de noter que lors de l'utilisation de ce type de méthode, des biais peuvent être introduits, notamment par la redondance de certaines variables biologiques, comme précisé auparavant. L'équilibre entre ces différentes variables doit donc être respecté, notamment lors de l'utilisation de groupes de paramètres caractérisant la survie, l'éclosion ou les malformations.

Actuellement, les méthodes d'évaluation du succès de développement et de la qualité des gamètes présentent des limites non négligeables. En effet, elles sont souvent arbitraires et n'intègrent seulement qu'une petite partie des paramètres de développement ne prenant pas en compte l'ensemble

des défauts de l'ontogenèse ce qui diminue la possibilité de compréhension des potentielles origines de ces problèmes.

### d) *Quels facteurs influencent le succès de développement ?*

La qualité des gamètes, et par conséquent, le succès de développement peuvent être influencés par de nombreux facteurs et particulièrement les facteurs environnementaux, les pratiques d'élevage et le rang de domestication des espèces comme cela a pu être décrit dans l'état de l'art de cette thèse (Bobe, 2015 ; Valdebenito *et al.*, 2015). Dans le contexte de diversification de la production aquacole, les impacts des pratiques d'élevage et notamment des systèmes ou conditions de production des animaux sur le succès de développement sont importants à étudier. En effet, un des paramètres limitant de la production aquacole est l'obtention de gamètes de qualité et de succès de développement (Bobe et Labbé, 2010 ; Bobe, 2015). Lors de nos travaux, nous avons pu mettre en évidence l'effet du système d'élevage des géniteurs sur l'apparition des malformations, un des paramètres intégrés dans la définition du succès de développement. Au contraire de la littérature actuelle, nous avons pu notamment remarquer que l'utilisation de l'un ou l'autre des systèmes d'élevage ne faisait pas varier le taux global de malformations chez les embryons (Koumoundouros, 2010 ; Boglione *et al.*, 2013b). Cependant, des différences au niveau des catégories de malformations (squelettique, cardiaque, vitellus, mâchoire) ont été observées entre les deux populations et les résultats ont également montré une relation entre la fréquence de certaines catégories de malformation et les conditions d'élevage des géniteurs.

Par ailleurs, la diversification des produits aquacoles s'appuie également sur un processus de domestication de nouvelles espèces inhérent au mode de production (Fontaine, 2009 ; Fontaine *et al.*, 2009). Cependant, l'impact de ce processus sur les fonctions biologiques des espèces est peu connu, mais souvent mis en avant (Lorenzen *et al.*, 2012). L'étude des effets de rangs de domestication variés sur la biologie des espèces, et notamment la fonction de reproduction (Teletchea et Fontaine, 2014), semble être indispensable afin de comprendre dans quelle mesure ce facteur peut affecter le succès de développement et la qualité des gamètes des Téléostéens. Des résultats préliminaires de notre étude de comparaison de deux populations différentes (première génération F1 et plusieurs générations Fx de domestication) montrent deux types de profils de développement en fonction des populations. Effectivement, des effets plutôt négatifs sont observés sur la survie et les taux d'éclosion des embryons chez la population Fx avec un rang de domestication plus important comme cela a déjà été décrit chez plusieurs espèces (Fleming *et al.*, 1996 ; Salze *et al.*, 2005 ; Jonsson et Jonsson, 2006 ; Crespel *et al.*, 2008 ; Krejszefz *et al.*, 2009 ; Lanes *et al.*, 2012). En outre, la qualité des embryons obtenus, mesurée par le taux global de malformations, ne semble pas impactée par le rang de domestication. Cependant, lors de la caractérisation des catégories de malformations, nous avons pu remarquer que les taux de malformations squelettiques étaient plus importants chez les embryons F1 que chez les embryons Fx. L'ensemble des facteurs biotiques et abiotiques ainsi que les histoires de

vie des géniteurs utilisés ayant été identiques pour les deux populations étudiées à l'exception du rang de domestication, les effets observés seraient directement liés à ce facteur. Ces taux de malformations spécifiques différents uniquement pour le squelette pourraient être expliqués par la sélection artificielle réalisée tout au long du processus de domestication par l'Homme afin d'obtenir uniquement des phénotypes intéressants pour l'aquaculture (Doux fils *et al.*, 2015). Malgré l'ensemble de ces résultats, les mécanismes impliqués dans la régulation du succès de développement sont encore peu compris à cause, notamment, de l'absence de caractérisation et d'homogénéisation des mesures du succès de développement (Bobe, 2015).

### **2. Développement d'une approche originale**

#### **a) *Originalité de cette approche***

Aux vues de la multiplicité des paramètres et de l'absence d'une méthode d'évaluation non arbitraire du succès de développement (Tableau 13), nous nous sommes intéressés dans cette étude à la pertinence de ces paramètres dans la définition de groupe de pontes présentant différents succès de développement. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur les connaissances acquises tout au long de ce travail lors de la définition de l'embryogenèse normale de notre espèce d'intérêt mais également à travers la caractérisation de défauts de développement, les malformations. Afin de prendre en compte l'ensemble des aspects de la définition du succès de développement préalablement cités, nous avons étudié de nombreux paramètres de l'embryogenèse comprenant des variables de survie, d'éclosion et de malformation. Cette approche multiparamétrique est également quantitative puisqu'elle est basée sur des outils mathématiques d'analyses de données tels que l'analyse en composante principale et des classifications hiérarchiques ascendantes.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré que parmi les 16 paramètres mesurés durant l'embryogenèse, la combinaison d'uniquement 3 d'entre eux était la plus pertinente pour générer des groupes de pontes homogènes caractérisés par des succès de développement variables. En effet, l'ajout de paramètres supplémentaires ne permettait pas de mieux définir ces groupes entraînant une hétérogénéité du nombre de pontes au sein des groupes, mais également diminuant l'explication de la variabilité entre les individus par l'analyse de données. Ces trois paramètres pertinents, le taux de survie au début de l'organogenèse (à 72h chez la perche commune), le taux d'éclosion et le taux global de malformation, ont déjà été utilisés auparavant dans une étude similaire, afin de déterminer la qualité des gamètes chez la perche commune (Castets *et al.*, 2012). Dans cette étude, 14 paramètres avaient été utilisés dont 8 concernant le développement embryo-larvaire tous intégrés dans une analyse de données similaire à la nôtre (Tableau 13). Deux groupes de qualité variable avaient été définis par cette approche à l'aide des paramètres de résistance des larves et du taux global de malformations, principalement. Malgré l'identification des relations entre les paramètres dont certains semblaient apporter la même information biologique (survie à 7 jours sans nourriture et tolérance au jeûne), l'ensemble des variables de développement ont été conservées afin de déterminer les groupes de

qualité de pontes entraînant une redondance de l'information mais aussi un effet plus important de ces variables pour la caractérisation des groupes (Castets *et al.*, 2012). Dans notre étude, au contraire, sur les 16 paramètres utilisés, 12 uniquement ont été conservés dans les analyses de données et 4 ont été supprimés afin d'atténuer ce biais potentiel. Différentes combinaisons de paramètres ont ensuite été testées afin de déterminer les plus pertinents pour la description de groupes aux succès de développement variables.

Notre étude est l'une des premières qui apporte des réponses sur la caractérisation de profils de développement embryonnaire variables par une approche multiparamétrique et des indicateurs simples. La combinaison de ces paramètres d'intérêt permet de prendre en compte un maximum de diversité possible du développement embryonnaire. Au contraire des études précédentes (Castets *et al.*, 2012 ; Nguyen *et al.*, 2012 ; Mommens *et al.*, 2014 ; Samarin *et al.*, 2016), la pertinence biologique de ces paramètres en tant qu'outils de mesure du développement a été évaluée et des liens entre certaines de ces variables ont été mis en évidence. Ces relations statistiques pourraient potentiellement être expliquées par des mécanismes biologiques sous-jacents communs. Cependant, de nouvelles analyses sont encore nécessaires avant de pouvoir comprendre ces mécanismes.

Le succès de développement étant l'un des principaux paramètres utilisés afin de déterminer la qualité ovocytaire, les groupes définis dans cette étude pourraient également permettre de mieux caractériser cette qualité. En effet, la qualité des ovules peut être considérée comme continue (Bobe, 2015). Par conséquent, les auteurs, ne sachant pas quel seuil choisir pour définir différents groupes de qualité, le choisissent souvent de façon arbitraire, comme nous avons pu le voir auparavant (Aegerter *et al.*, 2005 ; Bonnet *et al.*, 2007a ; Nguyen *et al.*, 2012 ; Bouleau *et al.*, 2014 ; Mommens *et al.*, 2014 ; Quiñones-Arreola *et al.*, 2015) (Tableau 13). Notre approche permet de regrouper des pontes similaires dans des groupes aux succès de développement variables par une approche mathématique et quantitative. Par conséquent, cette méthode permet de définir plusieurs seuils quantitatifs et formant des groupes homogènes dont les pontes présentent des caractéristiques similaires au sein de chaque groupe. Ces succès de développement variables pourraient permettre, à l'avenir, de mieux comprendre et appréhender la qualité des gamètes.

Enfin, cette approche a également permis de caractériser la dynamique des mortalités embryonnaires, rarement effectuée dans les études précédentes (Bobe, 2015). En effet, le suivi des taux de survie des différents groupes de pontes obtenus (à 24, 48, 72 heures post-fécondation et à l'éclosion) a révélé des étapes sensibles du développement embryonnaire potentiellement sujettes à des mortalités massives. Deux pics de mortalité ont notamment été déterminés : durant la gastrulation et entre le début de l'organogenèse et l'éclosion. Néanmoins, les causes de ces mortalités n'ont pas pu être déterminées. L'étude plus précise de ces phases et un suivi plus régulier des taux de survie pourraient apporter de nombreuses informations sur les origines de ces mortalités.

b) *Généralisation de cette approche comme nouvel outil*

Les indicateurs pertinents de cette étude ne sont pas nouveaux et sont déjà largement utilisés chez de nombreuses espèces de poissons afin de caractériser la qualité du développement et des gamètes. Cependant, la combinaison de l'utilisation de ces outils et de l'analyse de données effectuée est une approche originale permettant de décrire plus de profils de succès de développement que ce qui peut être traditionnellement utilisé (Tableau 13) (Aegerter *et al.*, 2005 ; Bonnet *et al.*, 2007a ; Bobe et Labbé, 2010 ; Castets *et al.*, 2012 ; Nguyen *et al.*, 2012 ; Migaud *et al.*, 2013 ; Mommens *et al.*, 2014 ; Bobe, 2015). De par la simplicité d'identification des indicateurs, cette méthode pourrait donc être facilement généralisée à plusieurs espèces dans différents domaines de la recherche appliquée ou fondamentale, chez les pisciculteurs, lors de campagnes d'échantillonnage sur le terrain ou encore pour de nouvelles expérimentations. D'un point de vue fondamental, l'utilisation de cette approche pourrait être généralisée pour étudier l'impact de différents facteurs (domestication, pratiques d'élevage, facteurs intrinsèques et extrinsèques) sur le succès de développement embryonnaire et la qualité des gamètes de différents géniteurs chez la perche commune. L'utilisation de ces trois paramètres pertinents permettrait d'intégrer aisément les résultats de reproduction obtenus aux groupes de succès variables tout en évitant la mesure de multiples paramètres, bien souvent redondants, et facilitant les expérimentations dans ce domaine. Ces différents paramètres sont également très pratiques lors d'études sur le terrain car aisément mesurables et pouvant être observés à l'aide d'une loupe uniquement. De plus, les pontes de perche commune étant disponibles facilement au niveau des zones littorales des lacs ou des rivières (Żarski *et al.*, 2016), l'évaluation du taux de survie au début de l'organogenèse pourrait indiquer à l'expérimentateur, lors de campagnes d'échantillonnage, le profil potentiel de développement des pontes.

Dans le cadre de la généralisation de pratiques d'élevage aux nouvelles espèces en cours de domestication, cette approche pourrait facilement être transposée à d'autres espèces. En effet, les paramètres utilisés lors de cette approche sont des indicateurs très simples à déterminer car très visuels. Les succès de développement d'espèces telles que celles appartenant au groupe des pondeurs printaniers précoces pourraient être aisément caractérisés. Cette information pourrait également être intégrée à des comparaisons interspécifiques afin de mettre en évidence des succès de développement similaires ou variables, valider nos indicateurs sur d'autres espèces et potentiellement identifier des problèmes communs entre ces espèces. Grâce au transfert de ces connaissances aux pisciculteurs, les individus présentant les meilleurs succès de reproduction pourraient être sélectionnés afin de créer de nouveaux lots de géniteurs aux performances de reproduction intéressantes. Cependant, le suivi du taux de croissance chez la progéniture pourrait également être associé car c'est un des paramètres importants en aquaculture (Doux fils *et al.*, 2015). Cela permettrait de déterminer si les géniteurs caractérisés par des pontes dont le succès de développement embryonnaire est élevé présentent également des phénotypes intéressants pour la croissance. De plus, le succès de développement

pouvant varier en fonction du rang de ponte (Brooks *et al.*, 1997 ; Castets, 2011), la constance de ces résultats devrait également être vérifiée dans le temps, sur plusieurs années de reproduction.

Enfin, la qualité des gamètes étant l'un des principaux problèmes chez les espèces d'élevage et notamment en début de domestication, sa caractérisation est compliquée et longue (Migaud *et al.*, 2013 ; Bobe, 2015). Cette approche multiparamétrique, appliquée dans des conditions contrôlées et optimales, pourrait permettre de définir différents phénotypes de développement et les outils d'évaluation les plus pertinents chez ces espèces au début du processus de domestication. La qualité des gamètes pourrait alors être caractérisée de façon plus rapide et efficace et ainsi intégrée plus facilement dans la sélection des lots de géniteurs. Cependant, des études génétiques portant sur l'héritabilité de ces traits liés au succès de développement, importants pour la production aquacole pourraient être réalisées, d'autant plus que les informations disponibles à ce sujet sont encore éparses (Bobe, 2015).

### c) *Limites de cette approche et perspectives*

Malgré les nombreux points positifs énoncés auparavant, cette approche de détermination de succès de développement variables comporte quelques limites. En effet, lors de cette étude, les taux de survie les plus précoces ont été identifiés avant le stade oeillé de par la facilité d'observation chez cette espèce. Cela n'est possible que chez des espèces de poissons pondant des ovules transparents. Chez les espèces à œufs opaques (truite ou saumon par exemple), ce taux serait difficile à déterminer. De plus, afin d'effectuer le suivi de la survie embryonnaire comme nous l'avons décrit, il est indispensable que la manipulation régulière des œufs en développement n'induisse pas des malformations ou des mortalités pouvant entraîner des biais dans les résultats obtenus (Milla *et al.*, 2011).

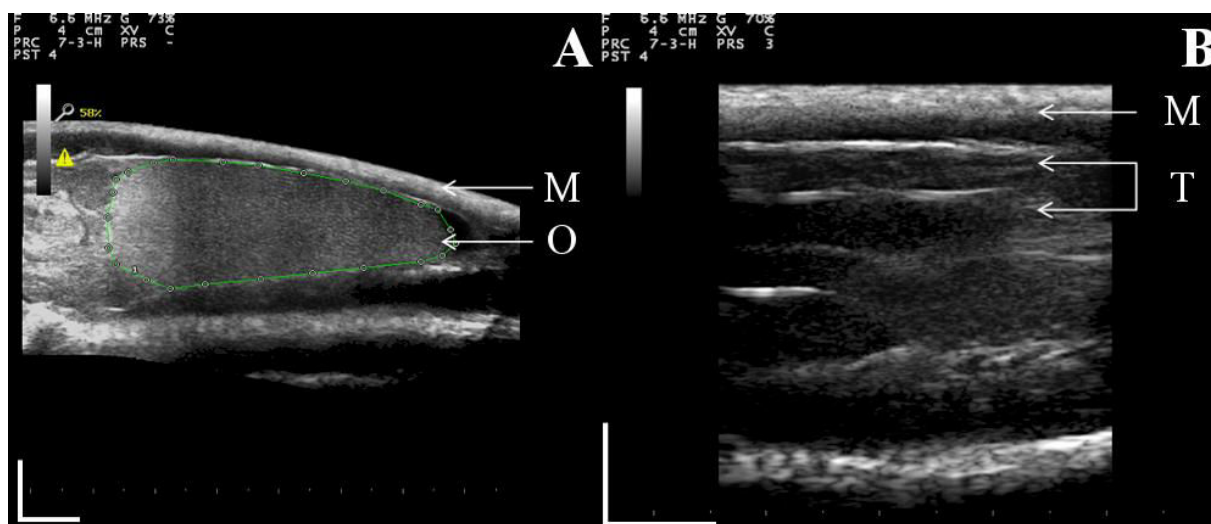
Notre approche n'est pas exhaustive et l'ensemble des paramètres de développement utilisés dans la littérature (Tableau 13) n'a pas été mesuré. Afin de compléter ces résultats, le taux de fécondation à 24 heures post-fécondation pourrait être évalué. En effet, à la fin de ces premières 24 heures de développement, l'intégralité du clivage cellulaire s'est déjà déroulée chez la perche commune dont des évènements majeurs tels que la transition mi-blastuléenne. Un défaut lors de ces évènements pourrait induire des mortalités importantes (Tadros et Lipshitz, 2009). De plus, ce constat remet également en cause l'utilisation du taux de fécondation à 72 heures post-fécondation dans l'étude de Castets *et al.*, (2012) chez la perche commune. De par son évaluation très tardive durant le développement chez cette espèce (lors de l'organogenèse), nous constatons que de nombreux évènements développementaux ont pu avoir lieu (comme le pic de mortalité identifié dans notre étude entre la fin du clivage cellulaire et la gastrulation) induisant un biais dans la mesure du taux de fécondation.

Même si les indicateurs utilisés dans cette étude sont intéressants dans le domaine de la recherche comme de l'aquaculture en général, des indicateurs prédictifs de la qualité des gamètes et



des performances de reproduction dont le succès de développement chez les poissons sont donc encore à développer (Bobe et Labbé, 2010 ; Migaud *et al.*, 2013 ; Bobe, 2015). Afin de comprendre l'origine de la variabilité du succès de développement, la qualité des ovules pourrait être déterminée à l'aide d'approches moléculaires ou biochimiques comme cela a déjà été fait chez différentes espèces (Rime *et al.*, 2004 ; Bonnet *et al.*, 2007a, 2007b ; Castets *et al.*, 2012 ; Corporeau *et al.*, 2012). Effectivement, les groupes de pontes que nous avons définis en fonction des succès de développement pourraient également être utilisés pour la mesure de la qualité ovocytaire et permettre d'identifier plus précisément les causes de ces profils différents. Le nombre d'espèces candidates intéressantes pour l'aquaculture étant important, la détermination et la compréhension de mécanismes communs impliqués dans la régulation de la qualité des gamètes et des succès de développement est l'un des enjeux majeurs. Cette approche couplée à des méthodes moléculaires pourrait permettre d'envisager un début de réponse.

Enfin, la qualité ovocytaire étant principalement déterminée durant l'ovogenèse, l'évaluation du déroulement de ce processus pourrait être envisagée pour approfondir les recherches sur les causes des succès de développement variables. Actuellement, plusieurs outils sont utilisés lors du cycle de reproduction des Téléostéens afin d'identifier le bon déroulement et la qualité de celui-ci. Cependant, ces outils sont généralement invasifs, comme l'indice gonadosomatique ou la détermination histologique de l'avancement de la gamétogenèse (Treasurer et Holliday, 1981) et ne permettent pas le suivi des succès de développement chez les individus. Une des méthodes potentiellement intéressantes pour la caractérisation du déroulement de la gamétogenèse est l'échographie. En effet, depuis quelques années, cette technique se développe dans le but de trouver de nouveaux indicateurs non invasifs et prédictifs du succès de la reproduction (Mattson, 1991 ; Martin-Robichaud et Rommens, 2001 ; Moghim *et al.*, 2002 ; Novelo et Tiersch, 2012 ; Macrì *et al.*, 2013 ; Bureau du Colombier *et al.*, 2015). Dans ce but, de premiers tests d'échographie ont été réalisés au sein de notre équipe afin de sexer les perches durant le cycle de reproduction et d'identifier de potentiels indicateurs non invasifs du succès de la reproduction. Cependant, les premiers résultats de cette expérience permettent uniquement de sexer les individus durant le cycle de reproduction (Figure 44), mais pas de prédire la qualité de la reproduction.



**Figure 44 : Echographies de perches communes durant le cycle de reproduction.**

(A) : Perche femelle. L'ovaire de la femelle est détourné avec une ligne verte. (B) : Perche mâle. M : muscle, O : ovaire, T : testicules.

Nous avons tout de même pu remarquer la présence d'anomalies dans les gonades des individus sexés telles qu'un excès de liquide pouvant correspondre à des ovocytes en atrophie ou des tumeurs (observations personnelles). Ces premiers résultats sont donc concluants, mais des expériences complémentaires sont encore nécessaires afin d'étudier plus finement les problèmes pouvant apparaître lors de la gamétogenèse et influencer le développement précoce chez cette espèce. L'identification de ces indicateurs prédictifs du succès de reproduction pourrait permettre de comprendre l'effet de certains facteurs sur le cycle de reproduction des individus ainsi que sur leurs performances de reproduction en lien avec les modes de production actuels de l'aquaculture. Enfin, l'ensemble de ces connaissances pourrait participer à l'établissement de nouvelles méthodes de gestion des animaux afin d'améliorer non pas la quantité mais la qualité des produits.

**CONCLUSIONS ET  
PERSPECTIVES**

Face à l'augmentation de la production aquacole, le modèle piscicole utilisé aujourd'hui et reposant sur l'élevage d'un faible nombre d'espèces est remis en question (Fontaine, 2009 ; Fontaine *et al.*, 2009). Une des alternatives durables proposées est la diversification de la production par la domestication de nouvelles espèces d'intérêt autochtones intégrée dans le territoire, dont la perche commune (marché de niche du pourtour alpin). Ce processus de domestication nécessite la maîtrise des connaissances sur la biologie de l'espèce et le contrôle de toutes les phases du cycle de vie de l'espèce sur plusieurs générations en captivité. La fonction de reproduction et les performances associées à cette dernière, comme l'obtention d'œufs, de larves et de juvéniles de qualité, sont les points essentiels de ce processus (Teletchea et Fontaine, 2014). Malgré l'acquisition de connaissances solides sur le cycle de reproduction de la perche commune et son contrôle (Fontaine *et al.*, 2015a, 2015b ; Żarski *et al.*, 2015), la qualité des gamètes obtenue reste très variable et peu d'informations sont disponibles sur le développement précoce de cette espèce et par conséquent sur les succès et défauts caractérisant les performances de reproduction. Les objectifs de ce travail visaient donc à étudier les potentiels liens existants entre les succès et défauts de développement et la qualité des gamètes, notamment des ovules, chez la perche commune. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de caractériser des performances de reproduction variables à partir de la définition d'une table de référence de l'embryogenèse de la perche commune tout en apportant des arguments à certaines controverses du domaine de la biologie du développement.

Dans la première partie de ce travail, les résultats nous ont permis dans un premier temps de définir une table de référence alternative permettant de décrire le développement embryonnaire d'une espèce non-modèle telle que la perche commune selon le statut cellulaire et l'acquisition de nouvelles capacités. Parmi les deux théories proposées pour décrire l'embryogenèse chez les poissons, nous avons choisi celle de la théorie saltatoire développée par Balon (Balon, 1986). Par conséquent, cette table est basée principalement sur l'identification des étapes et seuils décisifs en fonction du développement de plusieurs fonctions biologiques et organes. De par sa flexibilité, ce type de table de développement permet de tenir compte de la variation intra- et inter-espèces de la séquence de l'ontogenèse. Dans notre discussion, la comparaison du développement de plusieurs espèces a conduit à mettre en évidence des séquences de développement variables au sein du groupe des pondeurs printaniers précoces et tardifs (Balon, 1975a ; Teletchea *et al.*, 2009a). Une étude plus approfondie de la littérature, d'un nombre d'espèces plus conséquent issues de différents groupes fonctionnels (pondeurs automnaux ou hivernaux) et de nouveaux paramètres pourrait permettre de mettre en évidence des profils similaires de développement embryonnaire et d'identifier la pertinence de nos seuils dans un cadre plus global. Dans un second temps, d'un point de vue développemental et morphologique, la limite entre les périodes embryonnaire et larvaire a été caractérisée comme étant la première prise exogène de nourriture. En effet, cet évènement correspond à un seuil très important et beaucoup moins variable que la phase d'éclosion chez notre espèce d'intérêt. De plus, la comparaison

de l'embryogenèse de 9 espèces de Téléostéens effectuée dans la discussion générale de ce travail met en évidence la variabilité de la durée du processus d'éclosion mais également l'hétérogénéité des stades de développement auxquels les embryons éclosent. Par conséquent, l'éclosion apparaît comme une limite arbitraire entre les périodes embryonnaires et larvaires contrairement à la première prise de nourriture exogène (Balon, 1975b). Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer les potentielles origines des variations du processus d'éclosion.

Lors de la seconde partie de cette thèse, la caractérisation de plusieurs catégories de malformations à partir de notre table de développement nous a permis d'établir des liens entre ces différents types d'anomalies pouvant, pour certaines, être issues de facteurs communs. De plus, la détermination de l'effet de différentes conditions d'élevage, plus ou moins intensives, des géniteurs sur l'apparition de ces catégories spécifiques de malformation est une première étape dans la compréhension des potentielles origines de ces anomalies. Cependant, comme décrit pour les anomalies des blastomères apparaissant durant le clivage cellulaire (Vallin et Nissling, 1998), nous pourrions envisager que certaines de ces malformations se résorbent au cours du développement larvaire. Afin d'approfondir les origines de ces malformations et de déterminer leur impact sur la production aquacole, un suivi complet de l'apparition de ces anomalies depuis les étapes les plus précoces du développement jusqu'à la fin de la période larvaire pourrait être mis en place. Ces résultats pourraient permettre d'améliorer la production par une gestion des écloséries non pas basée uniquement sur la quantité mais également sur la qualité des produits. Par ailleurs, la diversification des produits aquacoles s'appuie également sur un processus de domestication de nouvelles espèces inhérent au mode de production (Fontaine, 2009 ; Fontaine *et al.*, 2009). Les résultats préliminaires de notre étude de comparaison de deux populations différentes (première génération et plusieurs générations de domestication) montrent des effets plutôt négatifs d'un rang de domestication plus élevé sur le succès de développement. Afin de compléter ces résultats et tenter de comprendre l'origine de ces différences de performances de reproduction, plusieurs indicateurs d'évaluation de la gamétogenèse pourraient être étudiés (indice gonadosomatique, histologie des gonades, indicateurs physiologiques). Ces résultats pourraient ouvrir de nouvelles pistes dans la compréhension de ces différents facteurs liés au mode de production actuel en aquaculture.

Finalement, la troisième partie de ce travail a permis de définir une approche originale multiparamétrique, simple et efficace de mesure du succès de développement embryonnaire chez les Téléostéens par l'utilisation de nombreux indicateurs des performances de reproduction. Cette approche a mis en évidence des groupes aux profils de développement variables en fonction de trois indicateurs pertinents faciles à mesurer au cours de l'ontogenèse chez de nombreuses espèces. Elle pourrait être utilisée comme véritable outil dans différents contextes, appliqués ou fondamentaux, et également généralisée à de nouvelles espèces en cours de domestication. Malgré la pertinence de ces

indicateurs, aujourd'hui, l'étape clef est l'identification d'outils précoces et prédictifs des performances de reproduction. La caractérisation de nouveaux indicateurs, notamment moléculaires et biochimiques, et le rôle de la qualité de l'ovule en fonction de ces succès de développement est encore un sujet à approfondir. L'identification de nouveaux indicateurs pourrait mener à la compréhension de l'effet de facteurs potentiellement responsables, en amont, des divergences de développement des individus. Cela permettrait d'une part d'améliorer les connaissances théoriques en biologie de la reproduction mais également d'envisager de nouvelles stratégies pour la gestion des espèces d'élevage en général.



**LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Schéma récapitulatif du cycle de reproduction chez les femelles de Téléostéens, de l'induction à l'ovulation. _____	11
Figure 2 : Schéma récapitulatif de la nomenclature des intervalles de l'ontogenèse chez le poisson utilisée par Balon (1975b, 1979). _____	14
Figure 3 : Comparaison des histoires de vie chez les poissons et des types d'acquisition des nutriments. _____	18
Figure 4 : Schéma des enveloppes d'un embryon en développement. _____	24
Figure 5 : Photographies de clivages cellulaires normaux et anormaux chez l'aiglefin. _____	26
Figure 6 : Photographie de différentes malformations embryonnaires chez la carpe, la truite arc-en-ciel et le barbeau ( <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> et <i>Barbus barbus</i> , respectivement). _____	27
Figure 7 : Schéma d'un embryon présentant une lordose et une cyphose. _____	27
Figure 8 : Etude comparative de la transition maternel à zygotique chez différents organismes modèles. _____	38
Figure 9 : Facteurs influençant la reproduction chez les Téléostéens et méthodes d'estimation des performances de reproduction. _____	41
Figure 10 : Carte de répartition des populations naturelles et introduites des espèces <i>P. fluviatilis</i> et <i>P. schrenkii</i> dans le monde. _____	51
Figure 11 : Perche commune mature. _____	53
Figure 12 : Position, nombre et morphologie des gonades de la perche commune au cours du cycle de reproduction, <i>P. fluviatilis</i> . _____	53
Figure 13 : Programme photo-thermique utilisé chez la perche commune, <i>P. fluviatilis</i> . _____	54
Figure 14 : Caractérisation histologique des différents stades de maturation ovocytaire chez la perche commune, au cours d'un cycle de reproduction. _____	56
Figure 15 : Pontes de perche commune. _____	59
Figure 16 : Œufs et détails de la gangue de perche commune. _____	60
Figure 17 : Développement normal de l'embryon chez la perche commune, <i>P. fluviatilis</i> . _____	62
Figure 18 : Larves de perche commune, <i>P. fluviatilis</i> . _____	64
Figure 19 : Classification de 65 espèces d'eau douce selon Teletchea et al., 2009a. _____	65
Figure 20: Embryonic total length during the organogenesis period. _____	88
Figure 21: Morphological characterization of <i>P. fluviatilis</i> spawn and zygote. _____	89
Figure 22: Cell cleavage and gastrulation periods. _____	90
Figure 23: Comparison of the embryonic morphology during <i>P. fluviatilis</i> organogenesis. _____	94
Figure 24: Detailed description of an embryo 7 dpf representative to the beginning of the O3 period. _____	95
Figure 25: Detailed description of an embryo at 9 dpf representative of the end of the O3 period. _____	97
Figure 26: Detailed description of an embryo at 11 dpf representative of the O4 period. _____	99
Figure 27: Detailed description of an embryo at 15 dpf at the end of the O5 period. _____	101
Figure 28: Detailed description of an embryo at 15 dpf at the end of the O5 period. _____	102
Figure 29: Comparison of the developmental process between free and embedded embryos. _____	104
Figure 30: Detailed description of the digestive at 15 dpf. _____	106
Figure 31: Developmental table of the Eurasian Perch ( <i>P. fluviatilis</i> ). _____	110
Figure 32: Description of the most frequent deformities in NHE. _____	130
Figure 33: Histological description of NHE presenting cardiac and yolk edema. _____	131
Figure 34: Histological description of several kinds of eyes deformities in NHE. _____	133
Figure 35: Description of the digestive, urinary and fins-related-structures deformities in NHE. _____	134
Figure 36: Study of the potential correlations between the types of deformities. _____	136
Figure 37: Incidence of the deformities according to the organs and the rearing conditions of breeders (RAS vs. pond). _____	137
Figure 38: Identification of potential relationships between parameters used to describe the developmental success. _____	154
Figure 39: The survival rate at 72h, the hatching and deformities rates are sufficient to make a reliable spawn clustering according to their developmental success. _____	158
Figure 40: Box plot representation indicating the differences of the survival rate at 72h, hatching and deformities rates between the 3 spawn clusters. _____	160
Figure 41: Identification of the steps with massive lethalties during perch embryogenesis. _____	162

<i>Figure 42 : Comparaison générale du développement embryonnaire de 9 espèces de poissons selon la classification de Teletchea et al., 2009a.</i>	177
<i>Figure 43 : Comparaison générale du développement embryonnaire de 9 espèces de poissons en fonction de la taille des ovules.</i>	178
<i>Figure 44 : Echographies de perches communes durant le cycle de reproduction.</i>	196

**LISTE DES TABLEAUX**

## LISTE DES TABLEAUX

---

<i>Tableau 1 : Différents termes appliqués aux individus lors de la transition embryon-larve.</i>	20
<i>Tableau 2 : Définitions d'un espèce/individus/population domestique selon la littérature.</i>	47
<i>Tableau 3 : Description des niveaux de domestication des poissons d'aquaculture.</i>	48
<i>Tableau 4 : Caractéristiques des différentes populations utilisées lors de ce travail de thèse.</i>	73
<i>Table 5: Durations of cell cleavages from 2 cells to the high blastula stage.</i>	91
<i>Table 6: Timing of the gastrulation and the somitogenesis.</i>	92
<i>Table 7: Comparison of the development of the Eurasian perch with other percid fish.</i>	111
<i>Table 8: Characteristics of fish groups.</i>	126
<i>Table 9: Water quality of breeder's tanks and hatchery incubators.</i>	127
<i>Table 10: Pearson's correlations table on the deformities rates in all newly hatched embryos.</i>	136
<i>Tableau 11 : Tableau récapitulatif des espèces utilisées pour la comparaison du développement embryonnaire.</i>	174
<i>Tableau 12 : Tableau récapitulatif de l'ensemble des phases, étapes et seuils observés pour la comparaison inter-espèces.</i>	174
<i>Tableau 13 : Tableau récapitulatif des méthodes et indicateurs d'évaluation du succès de développement en lien avec la qualité des gamètes.</i>	188

**LISTE DES  
INFORMATIONS  
SUPPLEMENTAIRES**



## LISTE DES INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

---

<i>Additional file 1: Time lapse video of the cell cleavage.....</i>	<i>117</i>
<i>Additional file 2: Time lapse video of the gastrulation.....</i>	<i>117</i>
<i>Additional file 3: Real time record of the circulation on the yolk.....</i>	<i>117</i>
<i>Additional file 4: Real time record of the peristaltic undulations in the rectum.....</i>	<i>117</i>
<i>Additional file 5: Origins, gonadogenesis induction and broodstock management.....</i>	<i>151</i>
<i>Additional file 6 : Description of the biological parameters studied.....</i>	<i>152</i>
<i>Additional file 7: Pearson's correlations table on the 16 variables of the reproductive performances.....</i>	<i>155</i>
<i>Additional file 8: Influence of survival, hatching or deformities parameters on the spawn clustering.....</i>	<i>157</i>
<i>Additional file 9: Box plot representation of the studied parameters in the three spawn clusters defined.....</i>	<i>161</i>
<i>Additional file 10: Comparison of the mean values of parameters the four spawn clusters.....</i>	<i>162</i>

**LISTE DES ESPECES**

## LISTE DES ESPECES

Nom scientifique	Nom vernaculaire (Français/Anglais)
<i>Albula vulpes</i>	Tarpon/Bonefish
<i>Alosa sapidissima</i>	Alose Canadienne
<i>Anguilla anguilla</i>	Anguille d'Europe/European eel
<i>Barbus barbus</i>	Barbeau commun/Barbel
<i>Blicca bjoerkna</i>	Brême bordelière/White bream
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nématode/Nematode
<i>Carassius auratus</i>	Poisson rouge/Goldfish
<i>Channa argus</i>	Poisson à tête de serpent/Snakehead
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe commune/Common carp
<i>Danio rerio</i>	Poisson zebra/Zebrafish
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Loup de mer ou Bar Européen/Sea bass
<i>Drosophila melanogaster</i>	Drosophile/Common fruit fly
<i>Esox lucius</i>	Brochet du Nord/Northern pike
<i>Etheostoma caeruleum</i>	Dard arc-en-ciel/Rainbow darter
<i>Gadus morhua</i>	Morue de l'Atlantique/Atlantic cod
<i>Galaxias maculatus</i>	Inanga/Common galaxias
<i>Gymnocephalus cernuus</i>	Grémille/Ruffe
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Flétan de l'Atlantique/Atlantic halibut
<i>Leuciscus idus</i>	Ide/Ide
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Aiglefin/Haddock
<i>Morone americana</i>	Bar-perche
<i>Mus musculus</i>	Souris/Mouse
<i>Neogobius melanostomus</i>	Gobie à tâches noires/Round goby
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel/Rainbow trout
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Saumon royal/Chinook salmon
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia du Nil/Nile tilapia
<i>Oryzias latipes</i>	Médaka/Japanese rice fish
<i>Osmerus eperlanus</i>	Eperlan
<i>Pagrus major</i>	Brême de mer japonaise/Red seabream
<i>Perca flavescens</i>	Perchaude/Yellow perch
<i>Perca fluviatilis</i>	Perche commune/Eurasian perch
<i>Perca Schrenkii</i>	
<i>Percina caprodes</i>	Fouille-roche zébré/Logperch
<i>Rhodeus sericeus</i>	Bouvière/Bitterling
<i>Rutilus rutilus</i>	Gardon/Roach
<i>Salmo salar</i>	Saumon de l'Atlantique/Atlantic salmon
<i>Salmo trutta</i>	Truite commune/Brown trout
<i>Sander lucioperca</i>	Sandre/Pike-perch
<i>Sander vitreus</i>	Doré jaune/Walleye
<i>Stizostedion vitreum</i>	
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Rotengle/Rudd
<i>Scophthalmus maximus</i>	Turbot commun/Turbot
<i>Silurus glanis</i>	Silure glane/Wels catfish
<i>Solea senegalensis</i>	Sole Sénégalaise/Senegalese sole

## LISTE DES ESPECES

<i>Solea solea</i>	Sole commune/Common sole
<i>Sparus aurata</i>	Daurade royale/Gilthead seabream
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Oursin de mer/Sea urchin
<i>Thunnus orientalis</i>	Thon rouge du Pacifique/Pacific bluefin tuna
<i>Thunnus thynnus</i>	Thon rouge de l'Atlantique/Atlantic bluefin tuna
<i>Xenopus laevis</i>	Xénope/African clawed frog
<i>Zingel streber</i>	Streber du Danube/Danube streber

**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Aanes H., Winata C.L., Lin C.H., Chen J.P., Srinivasan K., Lee S.G.P., Lim A.Y.M., Hajan H.S., Collas P., Bourque G., Gong Z., Korzh V., Aleström P. et Mathavan S. (2011) Zebrafish mRNA sequencing deciphers novelties in transcriptome dynamics during maternal to zygotic transition. *Genome Research*, **21** : 1328–1338.
- Abdulfatah A., Fontaine P., Kestemont P., Gardeur J.-N. et Marie M. (2011) Effects of photothermal kinetics and amplitude of photoperiod decrease on the induction of the reproduction cycle in female Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquaculture*, **322-323** : 169–176.
- Abdulfatah A., Fontaine P., Kestemont P., Milla S. et Marie M. (2013) Effects of the thermal threshold and the timing of temperature reduction on the initiation and course of oocyte development in cultured female of Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquaculture*, **376-379** : 90–96.
- Aegerter S. et Jalabert B. (2004) Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, **231** : 59–71.
- Aegerter S., Jalabert B. et Bobe J. (2005) Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Molecular Reproduction and Development*, **72** : 377–385.
- Afonso J.M., Montero D., Robaina L., Astorga N., Izquierdo M.S. et Gines R. (2000) Association of a lordosis-scoliosis-kyphosis deformity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) with family structure. *Fish Physiology and Biochemistry*, **22** : 159–163.
- Ahlbert I.-B. (1973) Ontogeny of double cones in the retina of perch fry (*Perca fluviatilis*, Teleostei). *Acta Zoologica*, **54** : 241–254.
- Alix M., Chardard D., Ledoré Y., Fontaine P. et Schaerlinger B. (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. *EvoDevo*, **6** : 26.
- Alix M., Schaerlinger B., Ledoré Y., Chardard D. et Fontaine P. (2013) Developmental staging and deformities characterization of the Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, **78** : 29.
- Andrades J.A., Becerra J. et Fernandez-Llebrez P. (1996) Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, **141** : 1–11.
- Ashworth C.J., Toma L.M. et Hunter M.G. (2009) Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **364** : 3351-3361.
- Avery T.S., Killen S.S. et Hollinger T.R. (2009) The relationship of embryonic development, mortality, hatching success, and larval quality to normal or abnormal early embryonic cleavage in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, **289** : 265–273.
- Babin P.J., Cerdá J. et Lubzens E. (2007) *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Springer, 508 p.
- Balon E.K. (1975a) Reproductive guilds of fishes : a proposal and definitions. **32** : 821-864.
- Balon E.K. (1975b) Terminology of intervals in fish development. *Journal of Fish fisheries research board canada*, **32** : 1663–1670.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Balon E.K. (1979) The theory of saltation and its application in the ontogeny of fishes: steps and thresholds. *Environmental Biology of Fishes*, **4** : 97–101.
- Balon E.K. (1986) Saltatory ontogeny and evolution. *Rivista di biologia*, **79** : 151–190.
- Balon E.K. (1990) Epignesis of an epigeneticist : the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. *Guelph Ichthyology Reviews*, **1** : 1–48.
- Balon E.K. (1999) Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguistic offenses). *Environmental Biology of Fishes*, **56** : 17–38.
- Balon E.K. (2001) Saltatory ontogeny and the life-history model: Neglected processes and patterns of evolution. *Journal of Bioeconomics*, **3** : 1–26.
- Balon E.K. (2002) Epigenetic processes, when natura non facit saltum becomes a myth, and alternative ontogenies a mechanism of evolution. *Environmental Biology of Fishes*, **65** : 1–35.
- Balon E.K. (2004a) Evolution by epigenesis: Farewell to Darwinism, neo-and otherwise. 97, 269–312.
- Balon E.K. (2004b) About the oldest domesticates among fishes. *Journal of fish Biology*, **65** : 1–27.
- Baroux C., Autran D., Gillmor C.S., Grimanelli D. et Grossniklaus U. (2008) The Maternal to Zygotic Transition in Animals and Plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **73** : 89–100.
- Bégout Anras M.L. et Lagardère J.P. (2004) Domestication et comportement chez les poissons téléostéens. *Productions animales*, **17** : 211–215.
- Bilio M. (2008) Controlled reproduction and domestication in aquaculture. *European Aquaculture Society, Oostende*, 67.
- Bobé J. (2015) Egg quality in fish: Present and future challenges. *Animal Frontiers*, **5** : 66–72.
- Bobé J. et Labbé C. (2010) Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, **165** : 535–548.
- Boglione C., Gavaia P., Koumoundouros G., Gisbert E., Moren M., Fontagné S. et Witten P.E. (2013a) Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes. *Reviews in Aquaculture*, **5** : S99–S120.
- Boglione C., Gisbert E., Gavaia P., E. Witten P., Moren M., Fontagné S. et Koumoundouros G. (2013b) Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Reviews in Aquaculture*, **5** : S121–S167.
- Bondarenko V., Drozd B. et Policar T. (2015) Effect of water temperature on egg incubation time and quality of newly hatched larvae of northern pike (*Esox lucius* L., 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, **31** : 45–50.
- Bonnet E., Fostier A. et Bobé J. (2007a) Microarray-based analysis of fish egg quality after natural or controlled ovulation. *Bmc Genomics*, **8** : 17.
- Bonnet E., Fostier A. et Bobé J. (2007b) Characterization of rainbow trout egg quality: A case study using four different breeding protocols, with emphasis on the incidence of embryonic malformations. *Theriogenology*, **67** : 786–794.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Bouleau A., Desvignes T., Traverso J.M., Nguyen T., Chesnel F., Fauvel C. et Bobe J. (2014) Maternally Inherited *npm2* mRNA Is Crucial for Egg Developmental Competence in Zebrafish. *Biology of Reproduction*, **91** : 43–43.
- Brooks S., Tyler C.R. et Sumpter J.P. (1997) Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **7** : 387–416.
- Bruslé J. et Quignard J.P. (2001) *Biologie des poissons d'eau douce européens*. Lavoisier, Paris. 621 p.
- Brzuska E. (1979) The in vivo method of estimating the stages of oocytes maturation in carp *Cyprinus carpio* L. *Acta Hydrobiol.*, **21** : 423–433.
- Bureau du Colombier S., Jacobs L., Gesset C., Elie P. et Lambert P. (2015) Ultrasonography as a non-invasive tool for sex determination and maturation monitoring in silver eels. *Fisheries Research*, **164** : 50–58.
- Burggren W.W. (2004) What is the purpose of the embryonic heart beat? Or how facts can ultimately prevail over physiological dogma. *Physiological and Biochemical Zoology*, **77** : 333–345.
- Cahu C. et Zambonino J.-L. (2007) Ontogenèse des fonctions digestives et besoins nutritionnels chez les larves de poissons marins. *Cybium*, **31** : 217–226.
- Castets M.-D. (2011) *Fonction de reproduction et régulation de la qualité chez la perche commune Perca fluviatilis*. Vandoeuvre-les-Nancy, INPL, 301 p.
- 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. *Theriogenology*, **78** : 432–442.e13.
- Chevey P. (1925) *Recherches sur la perche et le bar. Etudes embryogénique, systématique et biogéographique des Percidés Européens*. Faculté des Sciences de Paris, Paris. 292 p.
- Cieśla M., Jończyk R., Gozdowski D., Śliwiński J., Rechulicz J. et Andrzejewski W. (2014) Changes in ide *Leuciscus idus* (L.) females' reproductive parameters after stimulation with carp pituitary homogenate (CPH) and Ovopel: the effect of domestication? *Aquaculture International*, **22** : 77–88.
- Clutton-Brock J. (1999) *A natural history of domesticated mammals*. Cambridge University Press, 238 p.
- Collazo A., Bolker J.A. et Keller R. (1994) A phylogenetic perspective on teleost gastrulation. *The American naturalist*, **144** : 133–152.
- Conte F.. (2004) Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, **86** : 205-223.
- Cooper J.E. (1978) Eggs and larvae of the logperch, *Percina caprodes* (Rafinesque). *The American Midland Naturalist*, **2** : 257–269.
- Corporeau C., Vanderplancke G., Boulais M., Suquet M., Quéré C., Boudry P., Huvet A. et Madec S. (2012) Proteomic identification of quality factors for oocytes in the *Pacific oyster Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics*, **75** : 5554-5563.
- Craig J.F. (1974) Population dynamics of perch, *Perca fluviatilis* L. in Slapton Ley, Devon. *Freshwater Biology*, **4** : 417–431.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Crawford S. et Balon E.K. (1994) Alternative life histories of the genus *Lucania*: 2. Early ontogeny of *L. goodei*, the bluefin killifish. *Environmental Biology of Fishes*, **33**: 331–367.
- Crespel A., Rime H., Fraboulet E., Bobe J. et Fauvel C. (2008) Egg quality in domesticated and wild seabass (*Dicentrarchus labrax*): a proteomic analysis. *Cybium, Revue Internationale d'Ichtyologie*, **32** : 1.
- Cucchi P., Sucré E., Santos R., Leclère J., Charmantier G. et Castille R. (2012) Embryonic development of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Helgoland Marine Research*, **66** : 199–209.
- Cunningham J.E.R. et Balon E.K. (1985) Early ontogeny of *Adinia xenica* (Pisces, Cyprinodontiformes): 1. The development of embryos in hiding. *Environmental biology of fishes*, **14** : 115–166.
- Cuvier-Péres A. et Kestemont P. (2001) Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiology and Biochemistry*, **24** : 279–285.
- Depêche J. et Billard R. (1994) Embryology in fish. *A Review. Société Française d'Ichtyologie*, 123.
- Devlin R.H. et Nagahama Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, **208** : 191–364.
- Diaz J.-P., Mani-Ponset L., Blasco C. et Connes R. (2002) Cytological detection of the main phases of lipid metabolism during early post-embryonic development in three teleost species: *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* and *Stizostedion lucioperca*. *Aquatic Living Resources*, **15** : 169–178.
- Divanach P.B.C., Boglione C., Menu B., Koumoundouros G., Kentouri M. et Cataudella S. (1996) Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions. *Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects*, **45** : 66.
- Dosch R., Wagner D.S., Mintzer K.A., Runke G., Wiemelt A.P. et Mullins M.C. (2004) Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish I. *Developmental cell*, **6** : 771–780.
- Douxfils J., Mandiki S., Mathieu C., Milla S. et Kestemont P. (2015) Domestication and Responses to Stress. *Biology and Culture of Percid Fishes* pp. 743–760. Springer,
- Douxfils J., Mandiki S.N.M., Marotte G., Wang N., Silvestre F., Milla S., Henrotte E., Vandecan M., Rougeot C., Mélard C. et Kestemont P. (2011) Does domestication process affect stress response in juvenile Eurasian perch *Perca fluviatilis*? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **159** : 92–99.
- Duarte C.M., Marbá N. et Holmer M. (2007) Rapid domestication of marine species. *Science*, **316** : 382.
- Duellman W.E. (1989) Alternative life-history styles in anuran amphibians: evolutionary and ecological implications. *Alternative life-history styles of animals* pp. 101–126. Springer,
- Eriksen M.S., Bakken M., Espmark A., Braastad B.O. et Salte R. (2006) Prespawning stress in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: maternal cortisol exposure and hyperthermia during embryonic development affect offspring survival, growth and incidence of malformations. *Journal of Fish Biology*, **69** : 114–129.

- Essner J.J., Amack J.D., Nyholm M.K., Harris E.B. et Yost H. J. (2005) Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development*, **132** : 1247–1260.
- FAO (2016) *Contributing to food security and nutrition for all*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 190 p.
- Faria C., Borges R., Gil F., Almada V.C. et Gonçalves E.J. (2002) Embryonic and larval development of *Lipophrys pholis* (Pisces: Blenniidae). *Scientia Marina*, **66** : 21–26.
- Fernández I., Hontoria F., Ortiz-Delgado J.B., Kotzamanis Y., Estévez A., Zambonino-Infante J.L. et Gisbert E. (2008) Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, **283** : 102–115.
- Flegler-Balon C. (1989) Direct and indirect development in fishes—examples of alternative life-history styles. *Alternative life-history styles of animals* pp. 71–100. Springer,
- Fleming I.A., Jonsson B., Gross M.R. et Lamberg A. (1996) An Experimental Study of the Reproductive Behaviour and Success of Farmed and Wild Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Applied Ecology*, **33** : 893–905.
- Fontaine P. (2004) L'élevage de la perche commune, une voie de diversification pour l'aquaculture continentale. *Productions animales*, **17** : 189–193.
- Fontaine P. (2009) Développement de la pisciculture continentale européenne et domestication de nouvelles espèces. *Agriculture*, **18** : 144–147.
- Fontaine P., Abdulfatah A. et Teletchea F. (2015a) Reproductive Biology and Environmental Determinism of Perch Reproductive Cycle. *Biology of Perch* pp. 167–192.
- Fontaine P., Gardeur J.-N., Kestemont P. et Georges A. (1997) Influence of feeding level on growth, intraspecific weight variability and sexual growth dimorphism of Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. reared in a recirculation system. *Aquaculture*, **157** : 1–9.
- Fontaine P., Legendre M., Vandeputte M. et Fostier A. (2009) Domestication of new species and sustainable development in fish culture. *Cahiers Agricultures*, **18** : 119–124.
- Fontaine P., Wang N. et Hermelink B. (2015b) Broodstock Management and Control of the Reproductive Cycle. *Biology and Culture of Percid Fishes: Principles and Practices* (ed. by P. Kestemont, K. Dabrowski, et C.R. Summerfelt), pp. 103–122. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Formicki K., Smaruj I., Szulc J. et Winnicki A. (2009) Microtubular Network of the Gelatinous Egg Envelope Within the Egg Ribbon of European Perch, *Perca Fluviatilis* L. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, **39** : 147–151.
- Fostier A. et Jalabert B. (2004) Domestication et reproduction chez les poissons. *INRA productions animales*, .
- Fujimura K. et Okada N. (2007) Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system: Developmental stages of Nile tilapia. *Development, Growth & Differentiation*, **49** : 301–324.
- Gabe M. (1968) *Les principes généraux de la technique histologique*. Masson Paris, Paris. 184 p.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Gaillard J. (2014) *Rôle des étangs de barrage à vocation piscicole dans la dynamique des micropolluants en têtes de bassins versants*. Université de Lorraine, 225 p.
- Geffen A. (2002) Length of herring larvae in relation to age and time of hatching. *Journal of Fish Biology*, **60** : 479–485.
- Gillet C., Dubois J.P. et Bonnet S. (1995) Influence of temperature and size of females on the timing of spawning of perch, *Perca fluviatilis*, in Lake Geneva from 1984 to 1993. *Environmental biology of fishes*, **42** : 355–363.
- Gorodilov Y.N. et Melnikova E.L. (2006) Embryonic development of the European smelt *Osmerus eperlanus eperlanus* (L.) (Neva population). *Russian Journal of Marine Biology*, **32** : 173–185.
- Greenwood P.H. (1989) Ontogeny and evolution: saltatory or otherwise? *Alternative Life-history Styles of Animals* pp. 245–259. Springer,
- Guma'a S.A. (1978) The effects of temperature on the development and mortality of eggs of perch, *Perca fluviatilis*. *Freshwater Biology*, **8** : 221–227.
- Gupta P. et Nandi S. (2012) Isolation and Culture of Preantral Follicles for Retrieving Oocytes for the Embryo Production: Present Status in Domestic Animals: Isolation and Culture of Preantral Follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, **47** : 513-519.
- Hall T.E., Smith P. et Johnston I.A. (2004) Stages of embryonic development in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Morphology*, **259** : 255–270.
- Heibo E., Magnhagen C. et Vøllestad L.A. (2005) Latitudinal variation in life-history traits in Eurasian perch. *Ecology*, **86** : 3377–3386.
- Henrotte E., Mandiki R.S.N.M., Prudencio A., Vandecan M., Mélard C. et Kestemont P. (2010) Egg and larval quality, and egg fatty acid composition of Eurasian perch breeders (*Perca fluviatilis*) fed different dietary DHA/EPA/AA ratios: Effect of feed on perch reproduction quality. *Aquaculture Research*, **41** : e53-e61.
- Hensel K. (1999) To be a juvenile and not to be a larva: an attempt to synthesize. *Environmental biology of fishes*, **56** : 277–280.
- Hill J. et Johnston I.A. (1997) Photomicrographic atlas of Atlantic herring embryonic development. *Journal of fish biology*, **51** : 960–977.
- Hinaux H., Pottin K., Chalhoub H., Père S., Elipot Y., Legendre L. et Rétaux S. (2011) A Developmental Staging Table for *Astyanax mexicanus* Surface Fish and Pachón Cavefish. *Zebrafish*, **8** : 155–165.
- Hokanson K.E.F. et Kleiner C.F. (1974) Effects of constant and rising temperatures on survival and developmental rates of embryonic and larval yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchill). *The early life history of fish* pp. 437–448. Springer,
- Hopwood N. (2007) A history of normal plates, tables and stages in vertebrate embryology. *The International journal of developmental biology*, **51** : 1–26.
- Huntingford F.A. (2004) Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes. *Journal of Fish Biology*, **65** : 122–142.

- Isogai S., Horiguchi M. et Weinstein B.M. (2001) The Vascular Anatomy of the Developing Zebrafish: An Atlas of Embryonic and Early Larval Development. *Developmental Biology*, **230** : 278–301.
- Iwamatsu T. (2004) Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development*, **121** : 605–618.
- Izquierdo M.S., Fernandez-Palacios H. et Tacon A.G.J. (2001) Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, **197** : 25–42.
- Jalabert B. (2005) Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutrition Development*, **45** : 261–279.
- Jamet J.-L. et Desmolles F. (1994) Growth, reproduction and condition of roach (*Rutilus rutilus* (L.)), perch (*Perca fluviatilis*, L.) and ruffe (*Gymnocephalus cernuus* (L.)) in eutrophic Lake Aydat (France). *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, **79** : 305–322.
- Jeziarska B., Ługowska K. et Witeska M. (2009) The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*, **35** : 625–640.
- Jia Y., Meng Z., Liu X. et Lei J. (2015) Molecular components related to egg quality during the reproductive season of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture Research*, **46** : 2565–2572.
- Johnson D.W. et Katavic I. (1984) Mortality, growth and swim bladder stress syndrome of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae under varied environmental conditions. *Aquaculture*, **38** : 67–78.
- Jonsson B. et Jonsson N. (2006) Cultured Atlantic salmon in nature: a review of their ecology and interaction with wild fish. *ICES Journal of Marine Science*, **63** : 1162–1181.
- Kamler E. (1992) *Early life history of fish: an energetics approach*. Springer Science & Business Media, 267 p.
- Kamler E. (2002) Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **12** : 79–103.
- Kamler E. (2008) Resource allocation in yolk-feeding fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **18** : 143–200.
- Kane D.A. et Kimmel C.B. (1993) The zebrafish midblastula transition. *Development*, **119** : 447–456.
- Keckeis H., Bauer-Nemeschkal E. et Kamler E. (1996) Effects of reduced oxygen level on the mortality and hatching rate of *Chondrostoma nasus* embryos. *Journal of Fish Biology*, **49** : 430–440.
- Kennedy M. (1969) Irish pike investigations. *Irish Fisheries Investigations*, **5** : 1–33.
- Kestemont P., Jourdan S., Houbart M., Mélard C., Paspatis M., Fontaine P., Cuvier A., Kentouri M. et Baras E. (2003) Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences. *Aquaculture*, **227** : 333–356.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B. et Schilling T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, **203** : 253–310.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Konstantinov K.G. (1957) Comparative analysis of the morphology and biology of perch, pike perch and Volga pike-perch during several developmental stages. *Tr Inst Morfol Zhivoth Akad Nauk SSSR*, **16** : 181–236.
- Korwin-Kossakowski M. (2008) The Influence of Temperature during the Embryonic Period on Larval Growth and Development in Carp, *Cyprinus Carpio* L., and Grass Carp, *Ctenopharyngodon Idella* (Val.): Theoretical and Practical Aspects. *Archives of Polish Fisheries*, **16** : 231–314.
- Korwin-Kossakowski M. (2012) Fish hatching strategies: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **22** : 225–240.
- Korzelecka-Orkisz A., Smaruj I., Pawlos D., Robakowski P., Tański A., Szulc J. et Formicki K. (2010) Embryogenesis of the Stinging Catfish, *Heteropneustes Fossilis* (Actinopterygii: Siluriformes: Heteropneustidae). *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, **40** : 187–197.
- Kottelat M. et Freyhof J. (2007) *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, 646 p.
- Koumoundouros G. (2010) Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture. *Recent Advances in Aquaculture Research*, **661** : 125–48.
- Koumoundouros G., Gagliardi F., Divanach P., Boglione C., Cataudella S. et Kentouri M. (1997) Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture*, **149** : 215–226.
- Kováč V. (1992) Early development of the yellow pope, *Gymnocephalus schraetser*. *Folia zoologica*, **41** : 365–377.
- Kováč V. (1993a) Early development of ruff, *Gymnocephalus cernuus*. *Folia zoologica*, **42** : 269–280.
- Kováč V. (1993b) Early development of the balon's ruff, *Gymnocephalus baloni* Holčík & Hensel, 1974. *Folia zoologica*, **42** : 349–360.
- Kováč V. (1994) Early ontogeny of three *Gymnocephalus* species (Pisces: Percidae): reflections on the evolution of the genus. *Environmental biology of fishes*, **40** : 241–253.
- Kováč V. (2000) Early development of *Zingel streber*. *Journal of Fish Biology*, **57** : 1381–1403.
- Kováč V. et Copp G.H. (1999) Prelude: looking at early development in fishes. *When do fishes become juveniles?* pp. 7–14. Springer,
- Kratochwil C.F., Sefton M.M. et Meyer A. (2015) Embryonic and larval development in the Midas cichlid fish species flock (*Amphilophus* spp.): a new evo-devo model for the investigation of adaptive novelties and species differences. *BMC Developmental Biology*, **15** : 15.
- Krejszef S., Targońska K., Źarski D. et Kucharczyk D. (2009) Domestication affects spawning of the ide (*Leuciscus idus*)—preliminary study. *Aquaculture*, **295** : 145–147.
- Kristan J., Stejskal V. et Policar T. (2012) Comparison of reproduction characteristics and broodstock mortality in farmed and wild eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) females during spawning season under controlled conditions. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **12** : 191–197.

- Kroupova H., Prokes M., Macova S., Penaz M., Barus V., Novotny L. et Machova J. (2010) Effect of nitrite on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **29** : 535–540.
- Kryzhanovsky S.G., Disler N.N. et Smirnova E.N. (1953) Ecomorphological principles of development in percids. *Trudy Inst. Morph. Zhiv. Severtsova*, **10** : 3–138.
- Kunz Y. (2004) *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Kulwer Fish & Fisheries, Dordrecht, The Netherlands. 637 p.
- Kupren K., Rams I., Źarski D. et Kucharczyk D. (2016) Early development and allometric growth patterns of rheophilic cyprinid common dace *Leuciscus leuciscus* (Cyprinidae: Leuciscinae). *Ichthyological Research*, **63** : 382–390.
- Kvenseth A.M., Pittman K. et Helvik J.V. (1996) Eye development in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): differentiation and development of the retina from early yolk sac stages through metamorphosis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53** : 2524–2532.
- Lanes C.F., Bizuayehu T.T., Bolla S., Martins C., de Oliveira Fernandes J., Bianchini A., Kiron V. et Babiak I. (2012) Biochemical composition and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstocks. *Aquaculture*, **324–325** : 267–275.
- Lawrence C. (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, **269** : 1–20.
- Lazard J. et Levêque C. (2009) Introductions et transferts d'espèces de poissons d'eau douce. *Cahiers Agricultures*, **18** : 157–163.
- Lekang O.-I. (2013) *Aquaculture Engineering*. Wiley-Blackwell, 415 p.
- Lereboullet A. (1854) *Recherches d'embryologie comparée sur le développement du brochet, de la perche et de l'écrevisse*. Imprimerie impériale, Paris. 376 p.
- Liew H.J., Ambak M.A. et Abol-Munafi A.B. (2006) Embryonic development of clownfish, *Amphiprion ocellaris*, under laboratory conditions. *Journal of Sustainability Science and Management*, **1** : 64–73.
- Lorenzen K., Beveridge M.C.M. et Mangel M. (2012) Cultured fish: integrative biology and management of domestication and interactions with wild fish. *Biological Reviews*, **87** : 639–660.
- Lubzens E., Young G., Bobe J. et Cerdà J. (2010) Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, **165** : 367–389.
- Lugowska K. (2009) Embryonic Development of Barbel (*Barbus barbus*). *Israeli Journal of Aquaculture*, **61** : 68–72.
- Lugowska K. et Sarnowski P. (2011) Heads or tails—fish hatching. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, **41** : 13–17.
- Lund I., Steinfeldt S.J., Suhr K.I. et Hansen B.W. (2008) A comparison of fatty acid composition and quality aspects of eggs and larvae from cultured and wild broodstock of common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture Nutrition*, **14** : 544–555.

- Lyman-Gingerich J. et Pelegri F. (2007) Maternal factors in fish oogenesis and embryonic development. *The Fish Oocyte* pp. 141–174. Springer,
- Macrì F., Liotta L., Bonfiglio R., De Stefano C., Ruscica D. et Aiudi G. (2013) Ultrasound measurement of reproductive organs in juvenile European sea bass *Dicentrarchus labrax*: Ultrasound in juvenile *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Biology*, **83** : 1439–1443.
- Mansueti A.J. (1964a) Early development of the yellow perch, *Perca flavescens*. *Chesapeake Science*, **5** : 46–66.
- Mansueti A.J. (1964b) Eggs, larvae, and young of the white perch, *Roccus americanus*, with comments on its ecology in the estuary. *Chesapeake Science*, **5** : 3–45.
- Martin-Robichaud D.J. et Rommens M. (2001) Assessment of sex and evaluation of ovarian maturation of fish using ultrasonography. *Aquaculture Research*, **32** : 113–120.
- Martins C.I.M., Pistrin M.G., Ende S.S.W., Eding E.H. et Verreth J.A.J. (2009) The accumulation of substances in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) affects embryonic and larval development in common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, **291** : 65–73.
- Mattson N.S. (1991) A new method to determine sex and gonad size in live fishes by using ultrasonography. *Journal of Fish Biology*, **39** : 673–677.
- McElman J.F. et Balon E.K. (1979) Early ontogeny of walleye, *Stizostedion vitreum*, with steps of saltatory development. *Environmental Biology of Fishes*, **4** : 309–348.
- McElwain A., Ray C., Su B., Shang M., Fobes M.C., Duncan P., Thresher R., Dunham R.A. et Bullard S.A. (2013) Osteological and histopathological details of unilateral microphthalmia and anophthalmia in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, **400–401** : 135–141.
- Mellinger J. (2002) *Sexualité et reproduction des poissons*. CNRS Editions, Paris. 349 p.
- Mel'nikova E.L. et Gorodilov Y.N. (2006) The peculiarities of larval development of the European smelt *Osmerus eperlanus eperlanus* (L.). *Russian Journal of Marine Biology*, **32** : 241–244.
- Mendelson T.C., Imhoff V.E. et Iovine M.K. (2006) Analysis of Early Embryogenesis in Rainbow and Banded Darters (Percidae: Etheostoma) Reveals Asymmetric Postmating Barrier. *Environmental Biology of Fishes*, **76** : 351–360.
- Migaud H., Bell G., Cabrita E., McAndrew B., Davie A., Bobe J., Herráez M.P. et Carrillo M. (2013) Gamete quality and broodstock management in temperate fish. *Reviews in Aquaculture*, **5** : S194–S223.
- Migaud H., Fontaine P., Kestemont P., Wang N. et Brun-Bellut J. (2004) Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture*, **241** : 561–574.
- Migaud H., Fontaine P., Sulistyó I., Kestemont P. et Gardeur J.-N. (2002) Induction of out-of-season spawning in Eurasian perch *Perca fluviatilis*: effects of rates of cooling and cooling durations on female gametogenesis and spawning. *Aquaculture*, **205** : 253–267.
- Migaud H., Mandiki R., Gardeur J.-N., Fostier A., Kestemont P. et Fontaine P. (2003) Synthesis of sex steroids in final oocyte maturation and induced ovulation in female Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquatic Living Resources*, **16** : 380–388.
- Migaud H., Wang N., Gardeur J.-N. et Fontaine P. (2006) Influence of photoperiod on reproductive performances in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture*, **252** : 385–393.

- Milla S., Sambroni E., Kestemont P. et Jalabert B. (2011) Effects of mechanical perturbation at various times during incubation on egg survival, hatching and malformation rates in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, and the influence of post-ovulatory oocyte ageing. *Aquaculture Research*, **42** : 1061–1065.
- Moghim M., Vajhi A.R., Veshkini A. et Masoudifard M. (2002) Determination of sex and maturity in *Acipenser stellatus* by using ultrasonography. *Journal of Applied Ichthyology*, **18** : 325–328.
- Mommens M., Fernandes J.M., Tollefsen K.E., Johnston I.A. et Babiak I. (2014) Profiling of the embryonic Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) transcriptome reveals maternal transcripts as potential markers of embryo quality. *BMC genomics*, **15** : 1.
- Moodie G.E.E., Loadman N.L., Wiegand M.D. et Mathias J. (1989) Influence of egg characteristics on survival, growth and feeding in larval walleye (*Stizostedion vitreum*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **46** : 516–521.
- Mooij W.M., Van Rooij J.M. et Wijnhoven S. (1999) Analysis and Comparison of Fish Growth from Small Samples of Length-at-Age Data: Detection of Sexual Dimorphism in Eurasian Perch as an Example. *Transactions of the American Fisheries Society*, **128** : 483–490.
- Morrison C.M., Miyake T. et Wright Jr J.R. (2001) Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Journal of Morphology*, **247** : 172–195.
- Munro A.D. et Lam T. J. (1996) Control of gonad growth, maturation and spawning in teleost fish: A review. 1–53.
- Nagahama Y. (1994) Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*, **38** : 217–217.
- Nguyen H.Q., Reinertsen H., Rustad T., Tran T.M. et Kjørsvik E. (2012) Evaluation of egg quality in broodstock cobia *Rachycentron canadum* L.: Evaluation of egg quality in cobia. *Aquaculture Research*, **43** : 371-385.
- Novelo N.D. et Tiersch T.R. (2012) A Review of the Use of Ultrasonography in Fish Reproduction. *North American Journal of Aquaculture*, **74** : 169–181.
- O’Boyle S., Bree R.T., McLoughlin S., Grealy M. et Byrnes L. (2007) Identification of zygotic genes expressed at the midblastula transition in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **358** : 462–468.
- Olin M., Jutila J., Lehtonen H., Vinni M., Ruuhijärvi J., Estlander S., Rask M., Kuparinen A. et Lappalainen J. (2012) Importance of maternal size on the reproductive success of perch, *Perca fluviatilis*, in small forest lakes: implications for fisheries management. *Fisheries Management and Ecology*, **19** : 363–374.
- Oliveira-Almeida I., Buzollo H., Costa R.D.S., Veríssimo-Silveira R., Porto-Foresti F. et Ninhaus-Silveira A. (2014) Structural analysis of embryogenesis of *Leiarius marmoratus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Zygote*, **23** : 742–757.
- Osure G.O. et Phelps R.P. (2006) Evaluation of reproductive performance and early growth of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) with different histories of domestication. *Aquaculture*, **253** : 485-494.

- Ott A., Löffler J., Ahnelt H. et Keckeis H. (2012) Early development of the postcranial skeleton of the pikeperch *Sander lucioperca* (Teleostei: Percidae) relating to developmental stages and growth. *Journal of Morphology*, **273** : 894–908.
- Ottesen O.H. et Bolla S. (1998) Combined effects of temperature and salinity on development and survival of Atlantic halibut larvae. *Aquaculture international*, **6** : 103–120.
- Oyen F., Camps L. et Bonga S.W. (1991) Effect of acid stress on the embryonic development of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic toxicology*, **19** : 1-12.
- Paine M.D. et Balon E.K. (1984a) Early development of the northern logperch, *Percina caprodes semifasciata*, according to the theory of saltatory ontogeny. *Environmental biology of fishes*, **11** : 173–190.
- Paine M.D. et Balon E.K. (1984b) Early development of the rainbow darter, *Etheostoma caeruleum*, according to the theory of saltatory ontogeny. *Environmental biology of fishes*, **11** : 277–299.
- Pankhurst N.W. et Munday P.L. (2011) Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Marine and Freshwater Research*, **62** : 1015.
- Patino R. et Sullivan C.V. (2002) Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, **26** : 57–70.
- Pelluet D. (1944) Criteria for the recognition of developmental stages in the salmon (*Salmo salar*). *Journal of Morphology*, **74** : 395–407.
- Penaz M. (2001) A general framework of fish ontogeny: a review of the ongoing debate. *Folia Zoologica*, **50** : 241–256.
- Pinder A.C. et Gozlan R.E. (2004) Early ontogeny of sunbleak. *Journal of Fish Biology*, **64** : 762–775.
- Policar T., Samarin A.M. et Mélard C. (2015) Culture Methods of Eurasian Perch During Ongrowing. *Biology and Culture of Percid Fishes* pp. 417–435. Springer,
- Price E.O. (1984) Behavioral aspects of animal domestication. *Quarterly Review of Biology*, 1–32.
- Pulcini D., Cataudella S., Boglione C., Russo T., Wheeler P.A., Prestinicola L. et Thorgaard G.H. (2015) Testing the relationship between domestication and developmental instability in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei, Salmonidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **114** : 608–628.
- Pyle G.G. et Couture P. (2015) Introduction to Biology of Perch. *Biology of Perch* pp. 1–6. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Quiñones-Arreola M.F., Arcos-Ortega G.F., Gracia-López V., Casillas-Hernández R., Weirich C., Morris T., Díaz-Tenorio M. et Ibarra-Gómez C. (2015) Desempeño reproductivo y calidad de huevos en reproductores de origen silvestre y domesticado-F1 de jurel *Seriola rivoliana* bajo las mismas condiciones de cultivo. *Latin american journal of aquatic research*, **43** : 953–962.
- Randák T., Kocour M., ŽláBek V., Policar T. et Jarkovský J. (2006) Effect of culture conditions on reproductive traits of brown trout *Salmo trutta* L. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 1–12.
- Réalís-Doyelle E., Pasquet A., De Charleroy D., Fontaine P. et Teletchea F. (2016) Strong Effects of Temperature on the Early Life Stages of a Cold Stenothermal Fish Species, Brown Trout (*Salmo trutta* L.). *PLOS ONE*, **11** : e0155487.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Reyes M.R., Arzbach H.H. et Braum E. (1992) In situ Development of Perch Eggs, *Perca fluviatilis* L. (Pisces, Percidae) in a Small Eutrophic Lake, Lake Plüsee, Holstein, Germany. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, **77** : 467–481.
- Rideout R.M., Trippel E.A. et Litvak M.K. (2004) Predicting haddock embryo viability based on early cleavage patterns. *Aquaculture*, **230** : 215–228.
- Rime H., Guitton N., Pineau C., Bonnet E., Bobe J. et Jalabert B. (2004) Post-ovulatory ageing and egg quality: a proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2** : 1.
- Saat T. et Veersatu A. (1996) The rate of early development in perch *Perca fluviatilis* L. and ruffe *Gymnocephalus cernuus* (L.) at different temperatures. *Ann Zool Fennici*, **33** : 693–698.
- Salze G., Tocher D.R., Roy W.J. et Robertson D.A. (2005) Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture Research*, **36** : 1488–1499.
- Samarin A.M., Blecha M., Uzhytchak M., Bytyutskyy D., Zarski D., Flajshans M. et Policar T. (2016) Post-ovulatory and post-stripping oocyte ageing in northern pike, *Esox lucius* (Linnaeus, 1758), and its effect on egg viability rates and the occurrence of larval malformations and ploidy anomalies. *Aquaculture*, **450** : 431–438.
- Sandström O., Abrahamsson I., Andersson J. et Vetemaa M. (1997) Temperature effects on spawning and egg development in Eurasian perch. *Journal of fish Biology*, **51** : 1015–1024.
- Schaerlinger B. et Żarski D. (2015) Evaluation and Improvements of Egg and Larval Quality in Percid Fishes. *Biology and Culture of Percid Fishes: Principles and Practices* (ed. by P. Kestemont, K. Dabrowski, et C.R. Summerfelt), pp. 193–223. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Schreck C.B., Contreras-Sanchez W. et Fitzpatrick M.S. (2001) Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, **197** : 3–24.
- Shardo J.D. (1995) Comparative embryology of teleostean fishes. I. Development and staging of the American shad, *Alosa sapidissima* (Wilson, 1811). *Journal of Morphology*, **225** : 125–167.
- Simmons A.E., Karimi I., Talwar M. et Simmons T.W. (2012) Effects of Nitrite on Development of Embryos and Early Larval Stages of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, **9** : 200–206.
- Simon T.P. (2015) Trait Canalization Analysis of Water Quality, Temperature, and Developmental Associations with Early Life Stages of Two Fish Species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **94** : 688–694.
- Skaalsvik T.H., Bolla S.L., Thornqvist P.-O. et Babiak I. (2015) Quantitative characteristics of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) egg quality throughout the reproductive season. *Theriogenology*, **83** : 38–47.
- Soares F., Ribeiro L., Gamboa M., Duarte S., Mendes A.C., Castanho S., Barata M., Lourenço T.M. et Pousão-Ferreira P. (2015) Comparative analysis on natural spawning of F1 meagre, *Argyrosomus regius*, with wild broodstock spawns in Portugal. *Fish Physiology and Biochemistry*, **41** : 1509–1514.
- Stepien C.A. et Haponski A.E. (2015) Taxonomy, Distribution, and Evolution of the Percidae. *Biology and Culture of Percid Fishes* pp. 3–60. Springer,



- Sucré E., Charmantier-Daures M., Grousset E., Charmantier G. et Cucchi-Mouillot P. (2009) Early development of the digestive tract (pharynx and gut) in the embryos and pre-larvae of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Biology*, **75** : 1302–1322.
- Sulistyo I., Rinchar J., Fontaine P., Gardeur J.-N., Capdeville B. et Kestemont P. (1998) Reproductive cycle and plasma levels of sex steroids in female Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquatic Living Resources*, **11** : 101–110.
- Swift D.R. (1965) Effect of temperature on mortality and rate of development of the eggs of the pike (*Esox lucius* L.) and the perch (*Perca fluviatilis* L.). *Nature*, **206** : 528.
- Szabó T., Radics F., Borsos Á. et Urbányi B. (2015) Comparison of the results from induced breeding of European catfish (*Silurus glanis* L.) broodstock reared in an intensive system or in pond conditions. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **15** : 379–384.
- Tadros W. et Lipshitz H.D. (2009) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, **136** : 3033–3042.
- Takashima F. et Hibiya T. (1995) An atlas of fish histology: normal and pathological features. *Kodansha Ltd. Tokyo* pp. 147. Kodansha Ltd. Tokyo,
- Taranger G.L., Carrillo M., Schulz R.W., Fontaine P., Zanuy S., Felip A., Weltzien F.-A., Dufour S., Karlsen Ø., Norberg B., Andersson E. et Hansen T. (2010) Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, **165** : 483–515.
- Targońska K., Szczerbowski A., Żarski D., Łuczyński M.J., Szkudlarek M., Gomułka P. et Kucharczyk D. (2014) Comparison of different spawning agents in artificial out-of-season spawning of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. *Aquaculture Research*, **45** : 765–767.
- Teletchea F. et Fontaine P. (2011) Particularities of early life stages in temperate freshwater fish species: comparisons with marine species and implications for aquaculture practices: Early life-stages in freshwater fish. *Aquaculture Research*, **42** : 630–654.
- Teletchea F. et Fontaine P. (2014) Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture. *Fish and Fisheries*, **15** : 181–195.
- Teletchea F., Fostier A., Kamler E., Gardeur J.-N., Le Bail P.-Y., Jalabert B. et Fontaine P. (2009a) Comparative analysis of reproductive traits in 65 freshwater fish species: application to the domestication of new fish species. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **19** : 403–430.
- Teletchea F., Gardeur J.-N., Kamler E. et Fontaine P. (2009b) The relationship of oocyte diameter and incubation temperature to incubation time in temperate freshwater fish species. *Journal of Fish Biology*, **74** : 652-668.
- Thorpe J.E. (1977) Morphology, physiology, behavior, and ecology of *Perca fluviatilis* L. and *P. flavescens* Mitchill. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, **34** : 1504–1514.
- Toner D. (2015) The Market for Eurasian Perch. *Biology and Culture of Percid Fishes* pp. 865–879. Springer,
- Tong X.H., Xu S.H., Liu Q.H., Li J., Xiao Z.Z. et Ma D.Y. (2013) Stages of embryonic development and changes in enzyme activities in embryogenesis of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture International*, **21** : 129–142.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Trabelsi A., Gardeur J.-N., Teletchea F., Brun-Bellut J. et Fontaine P. (2013) Hatching time effect on the intra-spawning larval morphology and growth in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Aquaculture Research*, **44** : 657–666.
- Treasurer J.W. (1981) Some aspects of the reproductive biology of perch *Perca fluviatilis* L. Fecundity, maturation and spawning behaviour. *Journal of Fish Biology*, **18** : 729–740.
- Treasurer J.W. et Holliday F.G.T. (1981) Some aspects of the reproductive biology of perch *Perca fluviatilis* L. A histological description of the reproductive cycle. *Journal of Fish Biology*, **18** : 359–376.
- Trounson A., Anderiesz C. et Jones G. (2001) Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*, **121** : 51–75.
- Tsai H.-Y., Chang M., Liu S.-C., Abe G. et Ota K.G. (2013) Embryonic development of goldfish (*Carassius auratus*): A model for the study of evolutionary change in developmental mechanisms by artificial selection. *Developmental Dynamics*, **242** : 1262–1283.
- Urho L. (2002) Characters of larvae—what are they? *Folia Zoologica*, **51** : 161–186.
- Valdebenito I.I., Gallegos P.C. et Effer B.R. (2015) Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. *Zygote*, **23** : 177–197.
- Vallin L. et Nissling A. (1998) Cell morphology as an indicator of viability of cod eggs – results from an experimental study. *Fisheries Research*, **38** : 247–255.
- Vasnetsov V.V. (1953) Etaps in the development of bony fishes. *Otcherky po Obshtch. Vopr. Ichthyol., AN SSSR Press, Moscow-Leningrad*, 207–217.
- Vilizzi L. et Kováč V. (2014) Alternative ontogenies and developmental plasticity: implications for ecological and evolutionary studies on species complexes. *Fish and Fisheries*, **15** : 523–531.
- Villamizar N., Blanco-Vives B., Migaud H., Davie A., Carboni S. et Sánchez-Vázquez F.J. (2011) Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: A review. *Aquaculture*, **315** : 86–94.
- Vlavanou R. (1996) *Elevage experimental de la perche Perca fluviatilis L.: développement larvaire et croissance*. Université de Metz, Metz. 148 p.
- Wagner D.S., Dosch R., Mintzer K.A., Wiemelt A.P. et Mullins M.C. (2004) Maternal control of development at the midblastula transition and beyond: mutants from the zebrafish II. *Developmental cell*, **6** : 781–790.
- Wang N., Gardeur J.-N., Henrotte E., Marie M., Kestemont P. et Fontaine P. (2006) Determinism of the induction of the reproductive cycle in female Eurasian perch, *Perca fluviatilis*: Identification of environmental cues and permissive factors. *Aquaculture*, **261** : 706–714.
- Wang N., Teletchea F., Kestemont P., Milla S. et Fontaine P. (2010) Photothermal control of the reproductive cycle in temperate fishes: Photothermal control of reproduction. *Reviews in Aquaculture*, **2** : 209–222.
- Westernhagen H.V., Dethlefsen V., Cameron P., Berg J. et Fürstenberg G. (1988) Developmental defects in pelagic fish embryos from the western Baltic. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, **42** : 13–36.

- Wiegand M.D. (1996) Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **6** : 259–286.
- Żarski D., Bokor Z., Kotrik L., Urbányi B., Horváth A., Targońska K., Krejszef S., Palińska K. et Kucharczyk D. (2011a) A new classification of a preovulatory oocyte maturation stage suitable for the synchronization of ovulation in controlled reproduction of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. *Reproductive biology*, **11** : 194–209.
- Żarski D., Horváth A., Held J.A. et Kucharczyk D. (2015) Artificial Reproduction of Percid Fishes. *Biology and Culture of Percid Fishes* pp. 123–161. Springer,
- Żarski D., Horváth A., Kotrik L., Targońska K., Palińska K., Krejszef S., Bokor Z., Urbányi B. et Kucharczyk D. (2012a) Effect of different activating solutions on the fertilization ability of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., eggs. *Journal of Applied Ichthyology*, **28** : 967–972.
- Żarski D., Krejszef S., Horváth A., Bokor Z., Palińska K., Szentes K., Łuczyńska J., Targońska K., Kupren K., Urbányi B. et Kucharczyk D. (2012b) Dynamics of composition and morphology in oocytes of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during induced spawning. *Aquaculture*, **364–365** : 103–110.
- Żarski D., Palińska K., Targońska K., Bokor Z., Kotrik L., Krejszef S., Kupren K., Horváth A., Urbányi B. et Kucharczyk D. (2011b) Oocyte quality indicators in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during reproduction under controlled conditions. *Aquaculture*, **313** : 84–91.
- Żarski D., Palińska-Żarska K., Łuczyńska J. et Krejszef S. (2016) The type of spawning agent affects the egg composition during out-of-season spawning but not during in-season spawning in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *General and Comparative Endocrinology*, **In press** : .
- Zhang K. et Smith G.W. (2015) Maternal control of early embryogenesis in mammals. *Reproduction, Fertility and Development*, **27** : 880.
- Zouiten D., Ben Khemis I., Slaheddin Masmoudi A., Huelvan C. et Cahu C. (2011) Comparison of growth, digestive system maturation and skeletal development in sea bass larvae reared in an intensive or a mesocosm system: Fish ontogeny in intensive or mesocosm hatchery. *Aquaculture Research*, **42** : 1723-1736.

**VALORISATION  
SCIENTIFIQUE DES  
TRAVAUX DE THESE**

**PUBLICATIONS :**

Internationales

**Alix M**, Chardard D, Ledoré Y, Fontaine P, Schaerlinger B. (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. **Evo-Devo**, 6 : 39.*

**Alix M**, Zarski D, Chardard D, Fontaine P, Schaerlinger B. (2017)

*Deformities in newly hatched embryos of Eurasian perch populations originating from two different rearing systems. **Journal of zoology**, doi:10.1111/jzo.12447.*

**Alix M**, Zarski D, Chardard D, Le Roux Y, Schaerlinger B, Fontaine P. (En préparation)

*An original approach to assess the developmental success of freshwater Teleost applied to the Eurasian Perch.*

**Alix M**, Chardard D, Krauss D, Touzé JL, Schaerlinger B, Fontaine P, Staub C. (En préparation)

*Ultrasonographic sex recognition of a freshwater teleostei, the Eurasian perch, Perca fluviatilis L.*

En collaboration

Khendek A, **Alix M**, Viot S, Ledoré Y, Rousseau C, Mandiki R, Kestemont P, Policar T, Fontaine P, Milla S. (2017)

*How does a domestication process modulate oogenesis and reproduction performances in Eurasian perch? **Aquaculture**, 473 : 206-214.*

**Alix M**, Blondeau-Bidet E, Grousset E, Shiranghi A, Vergnet A, Guinand B, Chatain B, Boulo B, Lignot JH. (2017)

*Effects of fasting and re-alimentation on gill and intestinal morphology and indicators of osmoregulatory capacity in genetically selected sea bass (Dicentrarchus labrax) populations with contrasting tolerance to fasting. **Aquaculture**, 468 : 314-325.*

Ecole doctorale RP2E

**Alix M**, Schaerlinger B, Ledoré Y, Chardard D, Bobe J, Fontaine P. (2015)

*Mise au point de la technique d'hybridation in situ sur des embryons de perche commune, Perca fluviatilis. Ecole doctorale RP2E ISBN : 978-2-9541008-3-8.*

### COMMUNICATIONS ORALES :

#### Internationales

**Alix M.** (2012)

*Proteomic and morphological study of Perca fluviatilis spawn: How evaluating its reproductive performance?* Training School LARVITA, LARVANET (COST), 5-7 Décembre 2012, Faro, Portugal.

Schaerlinger B, Staub C, Touzé JL, Chardard D, Krauss D, Ledoré Y, **Alix M**, Fontaine P. (2015)

*Sex determination and egg quality evaluation in Eurasian perch, Perca fluviatilis, using ultrasonography.* 5<sup>th</sup> International Workshop on the Biology of Fish Gametes, 7-11 Septembre 2015, Ancona, Italie.

### COMMUNICATIONS AFFICHEES :

#### Internationales

**Alix M**, Schaerlinger B, Ledoré Y, Chardard D, Fontaine P. (2013)

*Developmental staging and deformities characterization of the Eurasian perch, Perca fluviatilis.* 6th international symposium on fish and shellfish larviculture « larvi 2013 », 2-5 Septembre 2013, Ghent, Belgique.

**Alix M**, Chardard D, Feizbakhsh O, Ledoré Y, Schaerlinger B, Fontaine P. (2015)

*Histological study of embryogenesis and classification of developmental impairments in the Eurasian perch, Perca fluviatilis.* 5<sup>th</sup> International Workshop on the Biology, of Fish Gametes, 7-11 Septembre 2015, Ancona, Italie.

#### Nationales

**Alix M**, Schaerlinger B, Ledoré Y, Chardard D, Bobe J, Fontaine P. (2013)

*Mise en place du développement embryonnaire, caractérisation des malformations et mortalités chez la perche commune, Perca fluviatilis.* 5<sup>ème</sup> Journées d'animation Scientifique du Département INRA PHASE, 3-4 Octobre 2013, Paris, France.

**Alix M**, Chardard D, Ledoré Y, Fontaine P, Schaerlinger B. (2016)

*Etude du développement embryonnaire normal et anormal chez la perche commune (Perca fluviatilis).* Journées d'Animation Scientifique INRA PHASE, 5-6 Avril 2016, Tours, France.

#### Séminaire de l'école doctorale RP2E

**Alix M**, Schaerlinger B, Ledoré Y, Chardard D, Bobe J, Fontaine P. (2015)



*Mise en place du développement embryonnaire, caractérisation des malformations et mortalités chez la perche commune, Perca fluviatilis.* Séminaire RP2E, 16 janvier 2015, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

### **PARTICIPATION A DES TRAINING SCHOOL :**

*Optical microscopy and image analysis* (Mars 2015)

Training School AQUAGAMETE (COST), Faculty of Fisheries and Quality of Waters, Vodnany, République Tchèque

*Techniques for fish germline cryobanking* (Mai 2013)

Training School AQUAGAMETE (COST), Puerto Real, Cadiz, Espagne

*Biological basis for improving fish larvae quality* (Décembre 2012)

Training School LARVITA, LARVANET (COST), Faro, Portugal



## **Etude de la variabilité de l'embryogenèse chez la perche commune : développement d'approches alternatives**

Aujourd'hui, la durabilité du modèle de développement de l'aquaculture est de plus en plus questionnée et une des solutions proposées consisterait à diversifier la production piscicole *via* la domestication de nouvelles espèces comme la perche commune, *Perca fluviatilis*, une espèce d'eau douce tempérée très intéressante pour la diversification de l'aquaculture continentale européenne. De nombreux aspects de la biologie de sa reproduction sont connus cependant, peu d'informations sont disponibles sur son développement. Or, des défauts de développement précoce, dont les causes sont encore mal définies, impactent actuellement la qualité de la production piscicole. C'est dans ce contexte que cette thèse vise à caractériser les succès et défauts de développement embryonnaire chez la perche commune à travers trois axes principaux : (i) déterminer une table de référence de l'embryogenèse normale permettant (ii) définir les défauts de développement tels que les malformations dans des conditions d'élevage différentes et (iii) identifier les liens entre différents paramètres de développement embryonnaire afin de déterminer des profils de développement variables.

La première partie de ce travail a permis d'identifier la séquence précise de l'ontogenèse normale de cette espèce à travers la définition d'une table de développement embryonnaire alternative et flexible pour des espèces non-modèles, facilitant les comparaisons intra- et inter-espèces. Dans un second temps, l'identification la plus exhaustive possible de phénotypes anormaux a révélé 10 grandes catégories de malformations associées à des organes ou fonctions spécifiques. De plus, certains de ces défauts semblent fortement dépendants des conditions d'élevage des géniteurs ce qui permet d'identifier l'effet de potentiels facteurs extrinsèques sur le développement et d'améliorer les techniques de gestion des animaux. Enfin, l'ensemble de ces résultats et des paramètres mesurés durant l'embryogenèse ont permis d'effectuer une classification approfondie des pontes obtenues présentant des profils de développement similaires pour mettre en évidence des liens éventuels entre les divers phénotypes et paramètres utilisés. Les analyses de données effectuées ont montré que seulement 3 paramètres étaient nécessaires à la caractérisation de 4 profils de succès de développement variables : les taux de survie au début de l'organogenèse, d'éclosion et de malformations. A l'avenir, ces paramètres pourraient être généralisés permettant d'homogénéiser les critères d'évaluation du succès de développement chez d'autres espèces d'intérêt de poisson. L'ensemble de ces résultats constituent une base solide pour étudier l'effet des facteurs extrinsèques et/ou intrinsèques sur la qualité et le succès de développement embryonnaire.

**Mots clefs :** Embryogenèse, Approches alternatives, Variabilité du développement, Malformations, Mortalités, Perche commune

## **Study of the embryogenesis variability in the Eurasian perch: development of alternative approaches**

Currently, the durability of the aquaculture developmental model is clearly challenged and one solution consists to diversify the fish production by the domestication of new species such as the Eurasian perch (*P. fluviatilis*), a freshwater species promising and valuable for the diversification of European aquaculture. Several aspects of its reproductive biology are well known, nevertheless, only little information is available on its development. However, early developmental impairments, whose causes are unclear, actually impact the fish production quality. In this context, the present work aimed to characterize the developmental success and impairments in Eurasian perch on three main issues: (i) determine a model of normal embryogenesis table helping to (ii) define developmental impairments, in diverse rearing conditions and (iii) identify the relationships between various parameters of embryonic ontogenesis to characterize different patterns of developmental success.

The first part of this study allowed identifying the accurate timing of normal ontogenesis of this species through the definition of an alternative and flexible developmental table to describe non-model fish species, allowing the intra- and inter-specific comparisons. In the second part, the exhaustive characterization of abnormal phenotypes revealed 10 categories of deformities linked to specific organs or functions. Moreover, some of these categories seemed to be related to rearing-conditions of the breeders allowing identifying the potential effects of extrinsic factors on the development and improving the management of fish. Finally, the previous results and the parameters measured during embryogenesis help to classify the several spawns obtained with the same developmental pattern and to highlight the potential relationships between diverse phenotypes and parameters. In addition, the data analyses showed that only 3 parameters are reliable to assess the developmental success: survival rate at the onset of the organogenesis, hatching and deformities rates. Henceforth, these parameters and this classification could be generalized as a new strategy to assess the developmental success in other fish species. All of these results provide a good basic knowledge to study the potential effects of various extrinsic and/or intrinsic factors on the developmental success and the embryonic quality.

**Keywords:** Embryogenesis, Alternative approaches, Developmental variability, Deformities, Lethalities, Eurasian perch