



**Etude de l'impact de la teneur minérale de l'eau
d'élevage sur les mécanismes de maturation ovocytaire
et d'ovulation chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus
mykiss* et mise en place de mesures correctives par la
nutrition**

Emilien Segret

► **To cite this version:**

Emilien Segret. Etude de l'impact de la teneur minérale de l'eau d'élevage sur les mécanismes de maturation ovocytaire et d'ovulation chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et mise en place de mesures correctives par la nutrition. Biologie animale. Agrocampus Ouest, 2021. Français. NNT : 2021NSARB352 . tel-03895742

HAL Id: tel-03895742

<https://theses.hal.science/tel-03895742>

Submitted on 13 Dec 2022

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.

THESE DE DOCTORAT

INSTITUT NATIONAL D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR POUR L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET L'ENVIRONNEMENT

ECOLE INTERNE AGROCAMPUS OUEST

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : Biologie et physiologie animales

Par

Emilien SEGRET

Etude de l'impact de la teneur minérale de l'eau d'élevage sur les mécanismes de maturation ovocytaire et d'ovulation chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et mise en place de mesures correctives par la nutrition.

Thèse présentée et soutenue à AGROCAMPUS OUEST centre de Rennes, le 16/12/2021

**Unité de recherche : INRAe, Laboratoire de Physiologie et de Génomique du Poisson
INRAe, UMR Nutrition, Métabolisme, Aquaculture**

Thèse N° : B-352 2021-25

Rapporteurs avant soutenance :

Hervé MIGAUD
Éric SAILLANT

Professeur, Institute of aquaculture, University of Stirling, UK.
Professeur, Gulf Coast research laboratory, Mississippi, USA.

Composition du Jury :

Examineurs:

Hervé MIGAUD
Éric SAILLANT
Lucie GAVIN-PLAGNE
Bérénice SCHAERLINGER
Sandrine SKIBA-CASSY
Julien BOBE
Hervé LE BRIS

Professeur, University of Stirling, UK.
Professeur, Gulf Coast research laboratory, USA.
Chercheuse, IMV Technologie, L'Aigle.
Maître de conférence, Université de Lorraine, Nancy.
Directrice de recherche, INRAe NuMÉA, Saint-Pée-sur-Nivelle.
Directeur de recherche, INRAe LPGP, Rennes.
Professeur, AgroCampus Ouest, Institut Agro.

Co-dir. de thèse :
Dir. de thèse :
Président :

Invité(s)

Frédéric CACHELOU

Directeur Général, Viviers de Sarrance, Sarrance.

Titre : Etude de l'impact de la teneur minérale de l'eau d'élevage sur les mécanismes de maturation ovocytaire et d'ovulation chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et mise en place de mesures correctives par la nutrition.

Mots clés : Qualité, reproduction, truite arc-en-ciel

Résumé : L'étude décrit les pertes de qualité des ovocytes de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* dans une situation d'élevage particulière. Une méta-analyse a d'abord démontré que l'eau d'élevage des génitrices touchées par le défaut de qualité est relativement pauvre en sodium, chlorure et potassium.

Les mécanismes physiologiques impliqués dans l'apparition du défaut de qualité ont été étudiés, notamment par l'utilisation de technologies innovantes. Cette analyse a notamment révélé une ovulation partielle voire bloquée (absence d'ovulation dans les situations extrêmes), accompagnée d'une maturation ovocytaire anormalement longue. De plus, l'hydratation des ovocytes au moment de la maturation ovocytaire finale est réduite.

L'analyse moléculaire a mis en évidence

l'altération globale des profils d'expression géniques liés aux voies endocriniennes et aux mécanismes de maturation ovocytaire, d'hydratation et d'ovulation.

Afin de tester la possibilité de corriger ce phénomène, une supplémentation en sel (NaCl) dans l'aliment pendant la vitellogenèse a été mise en place. Les performances reproductives des génitrices ont été améliorées (augmentation du rapport gonado-somatique, des tailles et des qualités des ovocytes), sans effet néfaste (survies et taux de ponte équivalents). Ces résultats originaux nécessitent un approfondissement de la compréhension des mécanismes moléculaires et endocriniens associés à une reproduction dans une eau pauvre en sodium, chlorure et potassium.

Title: Impact of mineral water composition on final oocyte maturation and ovulation mechanisms for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Implementation of corrective measures by nutrition.

Keywords: Quality, reproduction, rainbow trout

Abstract: The study aimed at deciphering the mechanisms triggering reduced oocyte quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, in a specific breeding situation.

First, a meta-analysis suggested that low quality oocytes are produced in breeding water presenting a low relative abundance of sodium, chloride and potassium.

Using innovative technologies, the study revealed an impairment of ovulation mechanism (including ovulation blockage in some extreme situations), accompanied by an abnormally long duration of final oocyte maturation. A poor hydration of oocyte during final oocyte maturation was also reported.

Molecular analysis revealed the reduced

activation of the specific gene expression program occurring during final oocyte maturation, with a reduced number of activated genes, notably of known key players of the maturation-ovulation process.

A salt (NaCl) supplementation of the commercial diet was tested during vitellogenesis. Reproductive performance was improved (gonadosomatic index, oocyte size and viability), without causing any detrimental effect on fish (normal growth and survival).

These novel results are a first step toward a deeper understanding of molecular and endocrine mechanism causing oocyte quality loss when reproduction occurs in low salinity water.

Remerciements

Tant de kilomètres parcourus entre Rennes et les Pyrénées, Sarrance, Rébénacq, Lees-Athas, Bordeaux, Saint-Pée-Sur-Nivelle. Tant de photos d'œufs faites, tant de gens intéressants rencontrés. Quel bilan carbone pour cette thèse, quelle aventure au cours de laquelle on apprend tout d'abord à devenir un bon scientifique, mais où on en apprend aussi beaucoup sur soi-même.

A Julien Bobe, mon directeur de thèse. On ne pourrait souhaiter un meilleur encadrant de thèse. Merci de t'être embarqué dans ce projet. Merci de ta patience avec un étudiant totalement néophyte en biologie moléculaire, et plus généralement en recherche.

Aux membres du jury, et particulièrement aux rapporteurs, qui ont accepté d'examiner ce travail et de participer à ma soutenance. Un merci particulier à Hervé Le Bris, responsable de la dominante aquaculture d'AgroCampus Ouest lorsque j'y étudiais, et qui aujourd'hui préside ce jury.

A Emilie Cardona, grande artisane de ce travail, pour l'investissement qu'elle met dans tout ce qu'elle fait. Mille fois merci.

A Frederic Cachelou. Merci de m'avoir donné la liberté de mener à bien ce projet.

A Yoann Cachelou, qui sait à quel point j'aime travailler avec des gens que j'apprécie, et qui est par conséquent responsable de mon si long séjour dans le Béarn.

Aux financeurs de la région Nouvelle-Aquitaine et de l'Association Nationale pour la Recherche Technologique, qui ont permis la réalisation de ce projet. Merci notamment à Mme Bourdenx qui a instruit mon dossier avec pédagogie et plus généralement à la région Nouvelle-Aquitaine pour le financement de projets structurants pour les très petites entreprises. Ce genre de financement permet la collaboration entre monde scientifique et monde de la production, et l'embauche de jeune chercheurs motivés. Un grand merci au pôle de compétitivité Agri Sud-Ouest Innovation, et particulièrement à Dominique Faveur qui m'a épaulé dans le montage de ce projet et l'a défendu lors des différentes commissions.

Aux chevilles ouvrières, Floriane, Chloé et Marie qui, malgré leur petite taille, ont pris sur elles la lourde tâche de m'assister lors des expériences, sans jamais compter leurs heures.

Aux équipes de production des deux sites, Viviers de Rébénacq et de Sarrance, et aux employés NuMÉA de la pisciculture expérimentale de Lees-Athas, Patrick et Nicolas, pour les nombreux coups de main.

Aux membres du LPGP, pour le cadre de travail idéal que vous m'avez proposé, pour les moments à la paillasse, et pour les moments moins professionnels de grande qualité. Un regret toutefois pour le tournoi de ping-pong que je ne remporterai certainement jamais. Bon courage à toi Antoine, et aux autres.

Aux membres du laboratoire Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, et plus particulièrement à Sandrine Skiba et à Anne Surget : La première pour avoir co-encadré cette thèse en me mettant toujours dans les meilleures dispositions, la seconde pour toute l'aide et la gestion de crises lors des différentes expériences sur site, les dépôts d'échantillons mal étiquetés, les embouteillages de cryotubes dans le congélateur -80°C.

A Jean Dumont de l'UT2A, qui a réalisé toutes les analyses d'eau et de plasma présentées dans ce travail, et qui a fait preuve d'une flexibilité remarquable. A Gilles Bareille, pour l'expertise et les données de composition d'eau, ainsi que pour le sympathique intérêt dont il a fait preuve vis-à-vis de mon sujet. Merci aux membres du Cabinet d'Etudes Techniques Rurales Agricoles de Laroio, qui m'ont initié aux finesses de l'hydrogéologie, et qui par-dessus tout m'ont sensibilisé aux divergences d'opinion majeures existant vis-à-vis de l'origine des ophites de l'accident majeur des Pyrénées, sujet

tout bonnement déchirant au sein des écoles de Pau et de Bordeaux. Malheureusement, étant claustrophobe et par conséquent inapte à la spéléologie, je n'ai toujours pas d'avis sur la question.

Aux gens qui ont traversé cette thèse pour y amener de l'énergie et de la joie :

A Cyprien, toujours présent pour prendre de l'altitude.

A Sarah, qui n'a jamais le vertige quand il s'agit de descendre en rappel jusque dans les Pyrénées. Un mont perdu n'aurait suffi à nous éloigner, c'aurait été sans compter sur ton caractère extraordinaire et ta générosité exceptionnelle.

A Ludivine, qui assure aussi bien qu'un nœud de huit.

A Pauline que j'ai perdu dans un défilé mais qui faisait l'ascension de son côté, pour qu'on se retrouve au sommet.

A Drion, ravitaillement d'un moment incroyable, merci pour les discussions et les échanges constructifs sur la science, le management, la gestion de projet et le tarama. Merci aussi pour les discussions plus sérieuses sur les mérites comparés des spiritueux hexagonaux.

A Marie, une amie spéciale, passeuse hors-pair, pour sa disponibilité et son implication dans mon projet.

A Sophie, pour « l'assistance morale à étudiant en fin de thèse ».

Enfin, à Loup et Sébastien, pas les moindres, les piliers au corps frêle, qui ont été là depuis le début, au cours de tous mes voyages en Bretagne. Merci pour les discussions statistiques et pour les dégustations de gentiane. Bon courage à toi Séb, et à toi Juju.

A tous mes amis Rennais, Béarnais, aux anciens de Nancy, aux autres, qui m'ont côtoyé pendant ces trois dernières années, merci. Nos moments passés ensemble ont été de douces étapes au refuge pendant cette ascension qu'a été la thèse. J'ai beaucoup de chance de vous avoir.

A mon frère, à Celine (à Polo). Merci de m'avoir logé pendant ces longues périodes loin de chez moi, pas uniquement pour la chambre mais aussi pour la stabilité que je trouvais chez vous dans ces périodes mouvementées, je vous suis redevable plus que vous ne l'imaginez. J'espère un jour avoir l'occasion de vous rendre la pareille.

A mes parents, les seuls à qui je dédie ce travail. A ma mère, pour m'avoir toujours poussé. A mon père, pour m'avoir toujours soutenu. Votre fierté est l'unique récompense qui compte.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des illustrations.....	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des abréviations	9
I. Contexte	11
I.1. Contexte général	13
I.1.1. Historique de l'élevage	13
I.1.2. Historique de l'élevage piscicole	13
I.1.3. Historique de l'élevage de truite arc-en-ciel	14
I.1.4. Situation actuelle : L'importance de la maîtrise de la reproduction pour sécuriser la filière truite et la production alimentaire.....	15
I.2. Contexte scientifique : L'ovogenèse chez les salmonidés.....	17
I.2.1. Stratégie de reproduction et cycle sexuel.....	17
I.2.2. De la première division de méiose à la rupture de la vésicule germinative	18
I.2.3. Maturation ovocytaire et ovulation : Mécanismes et contrôle	21
I.2.4. L'ovocyte fécondable	31
I.2.3. Qualité des pontes : Définition et facteurs influençant la production d'ovocytes de qualité	32
I.3. Contexte du projet	41
I.3.1. Les partenaires du projet	41
I.3.2. Caractéristiques des sites d'expérimentations : Conduite d'élevage et environnement	42
I.4. Déroulement du projet.....	49
II. Chapitre 1 : Meta-analyse des données environnementales et d'élevage	53
II.1. Description des conditions d'apparition du phénomène au sein des bandes d'élevage.....	55
II.1.1. Introduction.....	55
II.1.2. Matériel et méthodes.....	56
II.1.3. Résultats et discussion	59
II.1.4. Conclusion	69
II.1.5. Annexes	71
II.2. Description et analyse comparative des environnements d'élevage	73
II.2.1. Introduction.....	73
II.2.2. Matériel et méthodes.....	74
II.2.3. Résultats et discussion	76

II.2.4. Conclusion	89
II.3. Conclusion du chapitre	90
II.4. Récapitulatif	91
III. Chapitre 2 : Mécanismes physiologiques entraînant le défaut de qualité des pontes	93
III.1. Description du défaut de qualité à l'échelle de la ponte et des génitrices touchées	95
III.1.1. Introduction.....	95
III.1.2. Matériel et méthodes.....	97
III.1.3. Résultats et discussion	102
III.1.4. Conclusion	109
III.1.5. Récapitulatif	111
III.2. Effect of a low water concentration in chloride, sodium and potassium on oocyte maturation, oocyte hydration, ovulation and egg quality in rainbow trout.	113
III.2.1. Abstract	114
III.2.2. Introduction.....	115
III.2.3. Material and methods.....	116
III.2.4. Results and discussion.....	122
III.2.5. Conclusion	132
III.2.6. Additional Files	133
III.2.7. Récapitulatif	135
III.3. Effect of a low water concentration in chloride, sodium and potassium on final oocyte maturation, oocyte hydration, and ovulation in rainbow trout: A transcriptomic approach.....	137
III.3.1. Abstract	138
III.3.2. Introduction.....	139
III.3.3. Material and methods.....	140
III.3.4. Results and discussion.....	143
III.3.5. Conclusion	156
III.3.6. Additional files.....	157
III.4. Conclusion du chapitre.....	159
III.5. Récapitulatif	161
IV. Chapitre 3: Effect of salt supplementation in commercial diet on reproduction of female rainbow trout.....	163
IV.1. Abstract	165
IV.2. Introduction	166
IV.3. Material and methods.....	168
IV.4. Results and discussion.....	170
IV.5. Conclusion	178
V.6. Récapitulatif	179

V.	Conclusion générale, discussion et perspectives	181
V.1.	Conclusion sur la nature du phénomène observé	183
V.2.	L'exploration des facteurs pouvant être impliqués dans l'apparition du phénomène.....	185
V.2.1.	Identification des espèces minérales en défaut dans l'eau de Sarrance	185
V.2.2.	Le patrimoine génétique et la consanguinité, facteurs possibles d'aggravation du phénomène	187
V.2.3.	L'état sanitaire des individus de Sarrance.....	188
V.2.4.	Les interactions non-considérées entre espèces minérales dans le milieu d'élevage et le rôle individuel des espèces identifiées.....	188
V.3.	La compréhension des mécanismes impliqués et les pistes d'exploration	191
V.3.1.	L'observation de la dérégulation des mécanismes moléculaires de FOM et d'ovulation en milieu appauvri en K ⁺ , Na ⁺ , Cl ⁻	191
V.3.2.	Une maturation incomplète expliquerait les pertes d'homéostasie des ovocytes	192
V.3.3.	La régulation des gènes par l'osmolarité du milieu comme piste de travail	193
V.3.4.	Mise en cause d'un défaut d'induction hormonale dans le phénomène observé	193
V.3.5.	L'implication possible de l'atrésie	194
V.4.	Mérites et limites de la supplémentation par l'aliment	197
V.4.1.	Une amélioration notable de la qualité mais des défauts de qualité peu marqués.....	197
V.4.2.	Les mécanismes en jeu.....	198
V.4.3.	La formulation de l'aliment et la stratégie d'alimentation	200
V.4.4.	Durée de la maturation folliculaire	200
V.4.5.	L'intérêt d'une supplémentation en potassium.....	200
	Références	203

Liste des illustrations

Figure 1: Reproduction du saumon sculpté de l'Abri du Poisson (échelle en centimètres)- Dams, 1987	13
Figure 2 : Schéma général du déroulement de l'ovogenèse (inspiré de Bromage & Cumaranatunga, 1988).....	18
Figure 3 : Evolution type des concentrations plasmatiques des gonadotropines FSH et LH (échelle arbitraire) au cours d'un cycle de reproduction chez la truite arc-en-ciel (Bobe et al., in Jalabert & Fostier, 2010) <i>IGS : indice gonadosomatique, exprimé en pourcentage du poids de gonades par rapport au poids de l'animal. Im : Immature ; PO : Post-Ovulation</i>	20
Figure 4 : Mécanismes d'induction de la maturation ovocytaire et d'inflammation des tissus folliculaires (<i>Crédits dessins: Segret et Beink®</i>)	22
Figure 5 : Mécanismes d'hydratation de l'ovocyte lors de la maturation ovocytaire (<i>Crédits dessins : Segret et Beink®</i>)	24
Figure 6 : Schéma structurel d'un ovocyte en reprise de méiose (Bonnet, 2007). <i>On observe la vésicule germinative (VG) centrale en migration. Le vitellus lipoprotéique et le réseau de gouttelettes lipidiques sont observables. PA : pôle animal. PV : végétatif (PV).</i>	26
Figure 7: Rupture localisée de l'enveloppe folliculaire au moment de l'ovulation (A) observée au microscope électronique à balayage et (B) à la loupe binoculaire. <i>L'ovocyte passe à travers la « porte » créée par la rupture des tissus pour se libérer des enveloppes folliculaires. Droits INRAE Cauty-Jalabert.</i>	27
Figure 8 : Mécanismes aboutissant au déchirement du tissu folliculaire et à l'ovulation (<i>Crédits dessins: Segret et Beink®</i>)	29
Figure 9 : (A) Ovaire de truite arc-en-ciel en maturation et (B) ovules de truite arc-en-ciel après ovulation. Photographies réalisées avec un objectif 18-55. <i>Droits image Segret</i>	31
Figure 10 : Synthèse des différents facteurs influençant la qualité des ovocytes de truite arc-en-ciel (à gauche) et des marqueurs de qualité utilisés (à droite) (<i>Crédits dessins : Segret et Beink®</i>)	38
Figure 11 : Carte des sites d'expérimentaux (droits IGN)	42
Figure 12 : Conduite d'élevage et plan de production du groupe Viviers (<i>droits dessins Segret</i>)	44
Figure 13: Protocole de ponte et évaluations de la qualité des ovocytes dans la ligne de production du groupe Viviers.....	45
Figure 14 : Photographies d'une ponte de mauvaise qualité (A) et de bonne qualité (B) à Sarrance, photographiées avec un objectif macroscopique 100mm.....	47
Figure 15: Pourcentage moyen de pontes de mauvaise qualité au sein des bandes au cours des dernières années sur le site de Sarrance	59
Figure 16: Cercle de corrélation des variables de l'analyse en composantes principales. <i>Analyse réalisée sur les variables zootechniques et environnementales enregistrées à Sarrance ces dix dernières années.</i>	60
Figure 17: Variance expliquée par les valeurs propres de l'ACP sur les variables zootechniques et environnementales enregistrées à Sarrance.....	61
Figure 18: (A) Contributions et (B) corrélations des variables zootechniques et environnementales de l'ACP avec les trois premières composantes principales	61
Figure 19: Résultats de la classification hiérarchique des individus de l'ACP sur les variables zootechniques et environnementales enregistrées à Sarrance	62
Figure 20: Taux de ponte présentant un défaut de qualité au sein de la bande en fonction de la densité d'élevage des génitrices de la bande à Sarrance.....	64

Figure 21 : Taux de ponte présentant un défaut de qualité au sein de la bande en fonction de la durée de la ponte de la bande à Sarrance	65
Figure 22 : Taux de ponte présentant un défaut de qualité en fonction du taux de génitrices ayant pondues au sein de la bande d'élevage à Sarrance (courbe moyenne en bleu).....	66
Figure 23: Taux de pontes présentant un défaut de qualité au sein de la bande en fonction de la conductivité moyenne de l'eau d'élevage pendant la période de ponte à Sarrance.....	68
Figure 24: Evolution de la température mensuelle moyenne de l'eau (en °C) sur le site de Rébénacq (en haut) et de Sarrance (en bas).....	77
Figure 25: Evolution du pH mensuel moyen de l'eau sur le site de Rébénacq (en haut) et de Sarrance (en bas)	79
Figure 26 : Evolution de la conductivité moyenne mensuelle de l'eau (en $\mu\text{S}/\text{cm}$) sur le site de Rébénacq (en haut) et de Sarrance (en bas)	81
Figure 27 : Pourcentage de variance expliquée par les composantes principales de l'ACP sur les concentrations minérales dans l'eau des trois sites (Sarrance, Rébénacq et Lees-Athas)	82
Figure 28: (A) Contributions et (B) corrélations des variables de l'analyse avec les trois premières composantes principales de l'ACP sur les concentrations minérales dans l'eau des trois sites (Sarrance, Rébénacq et Lees-Athas).....	83
Figure 30 : Cercle de corrélation des variables de l'analyse selon les composantes principales 1 et 2 de l'ACP sur les concentrations minérales dans l'eau des trois sites (Sarrance, Rébénacq et Lees-Athas)	84
Figure 30 : Projection des résultats d'analyse d'eau selon les composantes principales 1 et 2 de l'ACP sur les concentrations minérales dans l'eau des trois sites (Sarrance, Rébénacq et Lees-Athas).....	84
Figure 31: Diagramme de corrélation entre les concentrations des différents éléments minéraux et la conductivité dans l'eau de Sarrance (à gauche) et de Lees-Athas (à droite)	88
Figure 32 : Système de capture d'image VisEgg (Cardona et al., 2020)	99
Figure 33: Index de sévérité de la perte d'homéostasie des ovocytes observée à (A) Sarrance avec un objectif macroscopique 100mm et (B) dans la littérature (Gray, 1932)	102
Figure 34 : (A) Pourcentage (1) d'œufs lunés au sein des pontes à Sarrance, en fonction de leur qualité et photographies utilisées dans l'analyse VisEgg pour des pontes (2) de bonne qualité et (3) de mauvaise qualité après stripping	104
Figure 35: Pourcentage de survie des œufs de Sarrance à l'éclosion en fonction de la qualité des pontes selon les critères des techniciens de production	105
Figure 36 : Observations (A) à l'échographe et photographies (B) à l'objectif 18-55mm et (C) à l'objectif macroscopique 100mm de gonades et d'ovocytes en fin de vitellogenèse (FV), en reprise de méiose (post-vitellogenèse - PV), en maturation (MAT) et présentant un défaut de qualité (DEF) ..	107
Figure 37 : (A) rapport entre poids des ovocytes recueillis au stripping et poids total du poisson avant stripping (IOS) en fonction de l'origine et de la qualité des pontes.....	108
Figure 38: Water and plasma composition on both experimental sites	119
Figure 39 : Egg quality in the two experimental sites	122
Figure 40: Ultrasound staging for measure of maturation duration.....	123
Figure 41 : Egg quality depending on the duration of oocyte maturation.....	126
Figure 42 : Hydration of oocytes during final oocyte maturation.....	127
Figure 43 : Ovarian expression profiles of genes involved in FOM and ovulation.....	130
Figure 44 : Venn diagram showing the number of differentially expressed genes (DEG) between late-vitellogenesis and maturation stages regarding the rearing site (LSW or Control)	144
Figure 45 : Supervised hierarchical clustering analysis of the 129 DEG ($p < 0.01$) between late-vitellogenesis and maturation stages for the two sites. <i>The dendrogram on the left represents correlation distance between the genes expression pattern.</i>	146

Figure 46 : Ovarian expression profiles of interests genes.	148
Figure 47 : Ovarian expression profiles of <i>pgr</i> and <i>ptgbsd</i> genes.	149
Figure 48 : Gene ontology analysis of molecular functions using the ShinyGO online tool. Analysis performed exclusively on DEG from Control site (fold change>3; p.value<0.05) between late-vitellogenesis and maturation stages.....	151
Figure 49 : Gene ontology analysis of cellular components using the ShinyGO online tool. Analysis performed exclusively on DEG from Control site (fold change>3; p.value<0.05) between late-vitellogenesis and maturation stages.....	152
Figure 50 : Ovarian expression profiles of <i>wnk1b</i> and <i>scn1b</i> related genes.	153
Figure 51 : Absolute values of log-transformed expression fold-changes of (A) ADAMs and (B) MMPs superfamilies genes members regarding rearing site.	154
Figure 52: Ovarian expression profiles of ADAM and MMP related genes.....	155
Figure 53 : Female mean weights during experiment regarding diet quality (data compared by U-test)	171
Figure 54 : Plasma concentration of (A) Chloride, (B) Sodium and (C) Potassium regarding diet (control = dark blue; SS= light-blue) for two sampling dates.....	173
Figure 55: Gonadosomatic index regarding control or SS diet.....	174
Figure 56: Oocytes features of (A) mean surface and (B) variation coefficient of surface regarding the diet.....	175
Figure 57 : Oocyte whitening rate according to the diet	176

Liste des tableaux

Tableau 1 : Descriptif des variables de la base de données "inter-ponte"	57
Tableau 2: Descriptif des variables de la base de données "intra-ponte"	57
Tableau 3 : Résultats de l'analyse du taux de pontes de mauvaise qualité au sein de la bande d'élevage en fonction de l'année de ponte.....	71
Tableau 4 : Résultats de la classification hiérarchique des individus.....	71
Tableau 5 : Composition des eaux de Rébénacq et Sarrance.	86
Table 6 : Water composition in control (Rébénacq) and LSW (Sarrance) sites	133
Table 7 : Water composition in control (Rébénacq) and LSW (Sarrance) sites during reproduction period (October-November-December)	134
Table 8 : Over-represented terms in the exclusively DEG from Control site	157
Table 9 : Over-represented terms in the exclusively DEG from Control site	157
Table 10 : Biometric parameters and reproductive performances of females, egg features.....	171
Table 11 : Plasma composition for Na ⁺ , Cl ⁻ and K ⁺ at two points of the experiment.	172

Liste des abréviations

ACP : Analyse en composantes principales

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

DEF : Défaut

DM : Dry mass – Matière sèche

FAA : Free amino acid – Acides aminés libres

FOM : Final oocyte maturation – Maturation ovocytaire finale

FSH : Follicle stimulating hormone - Hormone de stimulation folliculaire

FV : Fin de vitellogénèse

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone - Gonadolibérine

GVBD : Germinal vesicle breakdown – Rupture de la vésicule germinative

ICP-AES : Coupled plasma atomic emission spectroscopy - Spectrométrie par torche à plasma

IFS : Index folliculaire-somatique

IOS : Index ovo-somatique

LH : Luteinizing hormone - Hormone lutéinisante

LSW : Low salinity water – Eau à faible salinité

LV : Late vitellogenesis – Fin de vitellogenesis

MAT : Maturant

MEC : Matrice extracellulaire

MIS : Maturation-Inducing Système – Stéroïde induisant la maturation ovocytaire

PGs : Prostaglandines

PV : Post-vitellogenesis – Reprise de méiose

SS : Salt supplemented – Régime supplémenté en sel

TDS : Total des solides dissouts

VG : Vésicule germinative

Vtg : Vitellogénine

WC : Water content – Teneur en eau

WM : Wet mass – poids de la phase aqueuse

I. Contexte

I.1. Contexte général

I.1.1. Historique de l'élevage

Le passage de l'ère Mésolithique à l'ère Néolithique est marqué par une sédentarisation des populations humaines et par le début des premières manipulations par notre espèce de son milieu naturel. Cette transition culturelle et économique débute au 12^{ème} millénaire avant Jésus-Christ, notamment dans la zone Mésopotamienne dite du croissant fertile et se répand sur le continent Eurasiatique et Africain au cours des millénaires suivants, au gré des migrations et des changements climatiques. La manipulation des espèces végétales pour la production de récoltes sédentarise l'Homme et entraîne le besoin de rapprocher les traditionnelles proies de l'Homme chasseur. L'élevage animal naît de cette transition entre tribus nomades et sédentaires. L'animal, jusqu'alors utilisé comme une source ponctuelle de protéines, de graisses et de peaux, devient aussi un outil de travail et une source de protéines récurrente (Gautier, 1995).

I.1.2. Historique de l'élevage piscicole

Le poisson fait partie intégrante du régime alimentaire de nos ancêtres, comme en témoignent ses représentations sur les gravures rupestres. La plus célèbre représentation d'un poisson date de l'âge paléolithique, le saumon sculpté de l'Abri du poisson aux Eyzies en Dordogne, est présentée en figure 1).

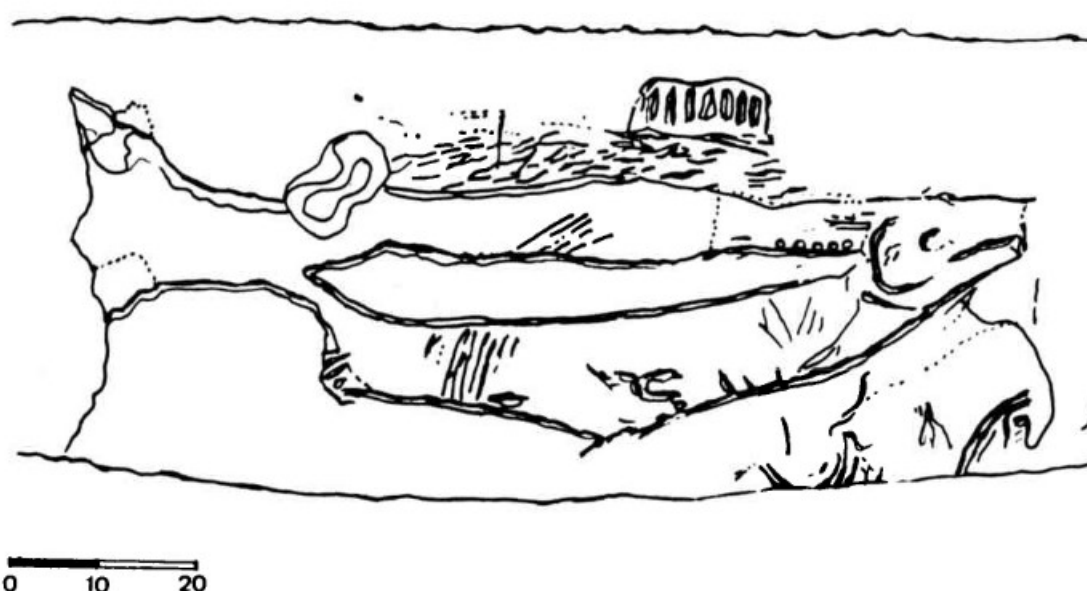


Figure 1: Reproduction du saumon sculpté de l'Abri du Poisson (échelle en centimètres)- Dams, 1987

La pisciculture, l'élevage du poisson, est une discipline d'élevage plurimillénaire. L'élevage de carpes en Chine et de tilapias en Egypte est antérieur à 2000 avant JC. Au Moyen-Âge, en France et en Europe

continentale, des carpes sont élevées dans les étangs au sein des domaines cléricaux. Ces modes primitifs de pisciculture extensive participent au nourrissage des populations. Le renouvellement des individus élevés se fait grâce aux captages de juvéniles en milieu naturel ou par la reproduction en milieu d'élevage, sans intervention humaine, grâce à des conditions proches de celles du milieu naturel. La consommation française d'animaux aquatiques issus de l'élevage est alors marginale (« Historique de l'aquaculture », 2011).

Le terme pisciculture n'apparaît que plus récemment avec son emploi en 1840 par le baron Edmond de Rivière, agronome Français, qui présente à la Société centrale d'Agriculture le premier protocole d'insémination artificielle des truites fario *Salmo trutta*, obtenu par le lieutenant allemand J-L. Jacobi en 1741 et consigné dans une lettre en 1758 (Du Monceau, 1796). En pressant le ventre d'animaux capturés pendant la période de fraie, il obtient des ovules ou des spermatozoïdes, mis en contact puis entreposés dans des boîtes grillagées. En prenant soin de placer ces boîtes grillagées dans un courant continu de rivière ou de canaux et de suivre un protocole précis établi au cours de plus de 23 années d'essais, il réussit à créer de nouvelles générations d'individus avec des rendements industriels. Jacobi réalise la première fécondation *in vitro* d'animal vertébré jamais relatée. Pourtant ses contemporains sont peu à s'intéresser à cette technique, qui tombe dans l'oubli et ne réapparaît qu'au siècle suivant. Grâce à la traduction des écrits du lieutenant Jacobi, le protocole de fécondation artificielle des salmonidés est formalisé pour la première fois en France (Coste, 1856) et est rapidement élargi aux autres espèces de salmonidés compatibles. La fécondation *in vitro* des ovocytes de truite arc-en-ciel a par la suite fait l'objet de nombreux travaux de la part des chercheurs Français, dont Rolland Billard dans les années 1970-1990. Ses travaux font aujourd'hui encore office de référence en la matière (Billard, 1978 ; 1992 ; Billard et al., 1975 ; 1981 ; Billard & De Montalembert, 1976 ; Billard & Jalabert, 1974).

I.1.3. Historique de l'élevage de truite arc-en-ciel

La truite Arc-en-Ciel *Oncorhynchus mykiss* appartient à la famille des salmonidés, dans laquelle on trouve notamment le saumon Atlantique *Salmo salar* et la truite Fario *Salmo trutta*. L'espèce est autochtone de la côte Ouest d'Amérique du Nord, répartie d'Alaska jusqu'au Nord-Mexique, originaire des cours d'eau parcourant les montagnes Rocheuses (Behnke, 2010). Ces populations de truite arc-en-ciel sauvages ont la capacité de mener un cycle de vie anadrome, évoluant alternativement en eaux douces et en milieu marin (Hardy, 2002).

Son introduction en élevage date de 1874. Le premier site de captage et d'écloserie d'œufs de truite Arc-en-Ciel a été officiellement enregistré par la « U.S. Fish Commission » dans sa station opérationnelle de la rivière McCloud (Nord-Californie). Les œufs et juvéniles de cette station auraient

été les premiers à alimenter les écloseries fédérales Etats-Uniennes. Certains auteurs considèrent que les poissons élevés dans les piscicultures jusqu'en 1925 (création d'un site de captage et d'une écloserie fédérale dans l'état de Washington) sont quasi-exclusivement issus de la lignée de la rivière McCloud (Dollar & Katz, 1964). D'autres avancent toutefois la présence d'un site de captage et d'écloserie privé, basé aussi aux abords de la rivière McCloud, au niveau de sa confluence avec la rivière Campbell Creek, et dont l'activité est antérieure à celle du site fédéral McCloud (Wales, 1939 ; MacCrimmon, 1972). On retrouve des traces d'envois d'œufs depuis Campbell Creek dès 1874, notamment dans des piscicultures Japonaises à partir de 1877. Par la suite, entre 1925 et 1960, 169 stations opèrent en Californie, créant le fond génétique de lignées aujourd'hui élevées dans le monde entier (Leitritz, 1970). Les échanges et envois d'œufs au sein des Etats-Unis ou à l'étranger se vulgarisent depuis des écloseries basées dans les Rocheuses.

Sa capacité d'adaptation aux densités d'élevage élevées fait de la truite Arc-en-Ciel la première espèce élevée en pisciculture intensive. L'apparition des systèmes d'élevage type raceway, l'amélioration des techniques de lutte contre les agresseurs pathogènes et l'industrialisation de la production d'aliments pour poisson dans les années 1960 permettent à la truiticulture de devenir une filière à part entière dans l'économie des pays producteurs.

En élevage, la truite Arc-en-Ciel est aujourd'hui présente sur tous les continents du monde (excepté Antarctique). Parmi les principales zones de production, on retrouve notamment le continent Américain, l'Europe, le Japon, l'Afrique du Sud, l'Iran, et l'Australie (FAO, 2021). Bien que nécessitant un milieu d'élevage fortement oxygéné, ce poisson tolère de larges gammes de températures et de qualités d'eau. Sa robustesse (possibilité d'élevage en milieu marin ou en eau douce), ses capacités de croissance ainsi que sa chair savoureuse expliquent le succès de cette espèce dans l'aquaculture.

I.1.4. Situation actuelle : L'importance de la maîtrise de la reproduction pour sécuriser la filière truite et la production alimentaire

La croissance démographique et l'évolution des comportements alimentaires s'accompagnent d'une hausse de la consommation des produits aquatiques, principalement couverte par l'aquaculture. La consommation mondiale des produits aquatiques devrait continuer à croître au cours des prochaines années, le rythme annoncé étant de +2.5% par an jusqu'en 2027 (hausse due notamment à la demande des pays émergents). En 2017, à l'échelle mondiale, la production de truite Arc-en-Ciel représente 811 590 tonnes pour une valeur de 3 605 millions de dollars, la classant au 16^{ème} rang des espèces aquacoles en termes de tonnage et au 12^{ème} rang en valeur marchande (FAO, 2019).

Stimulée par la réforme de la politique commune de la pêche au niveau européen, la France affiche depuis peu une ambition politique en faveur du développement de son aquaculture, comme le prouve le plan stratégique national pour le développement de l'Aquaculture (PSNPDA, 2015) élaboré par la Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture. L'objectif du gouvernement est de développer la filière aquacole française pour répondre à la demande croissante des consommateurs. Les produits de l'aquaculture française rencontrent un succès grandissant auprès des consommateurs, portés par un engouement pour une alimentation d'origine française, saine et durable. Le positionnement de la filière aquacole française lui assure donc des marchés porteurs et lui permet d'envisager un développement des volumes aquacoles produits.

Cependant, ce désir d'augmentation de la production aquacole doit faire face à plusieurs problématiques limitant le développement durable de l'aquaculture. Le développement de la pisciculture française est ralenti par la complexité d'installation de nouvelles structures de production. Alors que la production mondiale a été multipliée par douze ces trente dernières années, la France, quant à elle, a vu sa production stagner, en partie à cause des exigences environnementales liées à l'application de la Directive Cadre sur l'Eau. Selon FranceAgriMer, aucune nouvelle installation piscicole n'a été enregistrée depuis 1996 (FranceAgriMer, 2019). La filière de production d'œufs de truite française est fragile, seulement 2 producteurs Français sont présents dans l'hexagone et se partagent plus de 80% du marché métropolitain, tout en fournissant une part importante du marché Européen et Moyen-Orient. La situation décrite est proche d'un oligopole, les fournisseurs d'embryons sont très peu nombreux, leurs possibilités d'expansion et d'augmentation de production sont limitées. Le passé proche a démontré qu'une catastrophe de type sanitaire, naturelle, commerciale ou due à une mauvaise maîtrise de la reproduction peut provoquer l'arrêt très rapide de l'activité et laisser une partie de la filière dans l'impossibilité de se fournir en embryons.

Au vu de la fragilité des unités de production d'œufs fécondés mais aussi de leur importance pour les acteurs de la truiticulture française, la compréhension des mécanismes provoquant des variations de qualité des gamètes a été mise très tôt au centre des réflexions scientifiques en France. Les travaux de recherche pionniers menés par l'INRA dès les années 1970 en attestent. Toutefois, aujourd'hui encore, dans certaines situations d'élevage, des défauts de qualité des pontes de truite arc-en-ciel sont enregistrés sans que les facteurs impliqués dans ces pertes ne soient identifiés. Le travail exposé dans la suite de manuscrit a traité d'une situation de ce type.

I.2. Contexte scientifique : L'ovogenèse chez les salmonidés

I.2.1. Stratégie de reproduction et cycle sexuel

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum, 1792) est un poisson téléostéen membre de la famille des salmonidés. Gonochorique, les individus ne changent pas de sexe au cours de leur cycle vital. Les femelles atteignent la maturité sexuelle à l'âge de 24 ou 36 mois (première production d'ovules) selon les souches génétiques. La truite arc-en-ciel est une des rares, si ce n'est la seule espèce du genre *Oncorhynchus* capable de réaliser plusieurs cycles de reproduction successifs au cours de sa vie. Le cycle de reproduction dure 1 an en condition naturelle mais sa durée peut être réduite ou allongée sous contrôle photopériodique (Jalabert & Fostier, 2010 ; Jalabert, 2005).

L'ovaire contient à la fois des ovocytes engagés dans les divisions méiotiques, qui sont ovulés de manière synchronisée dans la cavité abdominale, et dans le même temps des ovogonies indifférenciées et des ovocytes primaires qui produiront les prochains ovocytes. On parle de gamétogenèse synchronisée par groupes. La femelle produit une grande quantité d'ovules géants (3 à 5 mm de diamètre en moyenne chez la truite arc-en-ciel, soit 20 fois plus qu'un ovocyte secondaire humain) (Wolf et al., 1995), avec des rendements de 2000 à 3000 œufs/kg de poids vif de génitrice dans des bonnes conditions (Tyler et al., 1996).

Chez la truite arc-en-ciel et en conditions naturelles, la gamétogenèse est annuelle et se déroule en plusieurs étapes :

- Prolifération et différenciation des ovogonies
- Accroissement de l'ovocyte primaire, pré vitellogenèse
- Vitellogenèse, dépôt du vitellus lipoprotéique, formation de la zona radiata
- Maturation ovocytaire
- Ovulation

L'aboutissement de l'ovogenèse chez la femelle est la libération d'un gamète bloqué en métaphase II de seconde division de méiose, l'ovocyte II, communément appelé ovule et souvent œuf (appellation incorrecte, l'œuf étant le produit de la fécondation d'un ovocyte). A noter que sa domestication a provoqué la perte de capacité d'oviposition de la truite arc-en-ciel d'élevage. Les ovocytes libérés dans la cavité abdominale sont extraits dans les élevages par massage abdominal (stripping) pour expulsion et récupération des gamètes via la papille uro-génitale.

I.2.2. De la première division de méiose à la rupture de la vésicule germinative

I.2.2.1. Les multiplications goniales

Les ovogonies, cellules germinales primordiales diploïdes différenciées des cellules somatiques dès les stades embryonnaires et qui formeront les futurs ovocytes, passent tout d'abord par une phase de multiplication. On parle de multiplication goniale se déroulant dans l'ovaire. Ce phénomène permet de renouveler le stock d'ovocytes engagés dans la méiose (Bromage & Cumaranatunga, 1988 ; Patiño & Sullivan, 2002).

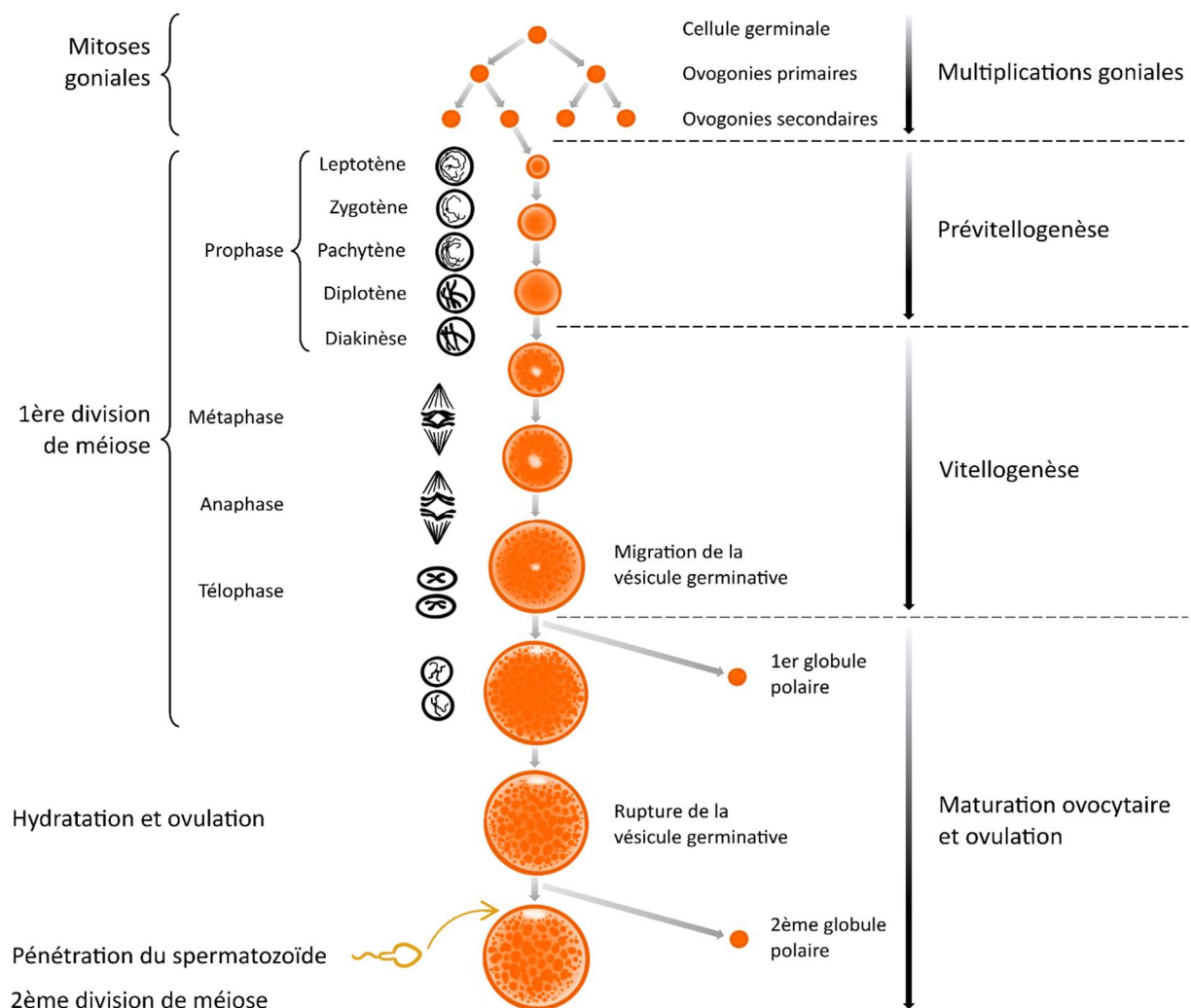


Figure 2 : Schéma général du déroulement de l'ovogenèse (inspiré de Bromage & Cumaranatunga, 1988)

(Crédits dessins : Segret et Beink®)

I.2.2.2. La pré vitellogénèse

Le début de la vitellogénèse est marqué par l'engagement de la première division de méiose, et le doublement du nombre de chromosomes. On ne parle plus d'ovogonie mais d'ovocyte I. Cette étape s'achève par la décondensation du matériel génétique au sein de la vésicule germinative et l'augmentation du volume ovocytaire suite à l'accumulation de nombreux organites cellulaires (Lubzens, 2010).

C'est à cette période que se différencient les cellules du follicule ovarien et que se mettent en place les enveloppes qui vont entourer l'ovocyte, comme le révèlent les profils d'expressions géniques au moment de l'engagement de la méiose (von Schalburg et al., 2005, 2006). Deux types de tissus forment les enveloppes principales. Les thèques constituent l'enveloppe externe du tissu folliculaire et sont composées de cellules fibroblastiques et de faisceaux de fibres de collagène parcourues par des capillaires sanguins. La granulosa, liée à l'ovocyte par des microvillosités à travers la *zona radiata* (matrice extracellulaire- MEC), est constituée d'une seule couche de cellules et est séparée de la thèque par une membrane basale (Selman et al., 1993 ; Le Menn et al., 2007). Les cellules de la granulosa communiquent pendant toute l'ovogénèse avec le milieu intracellulaire de l'ovocyte via des jonctions cellulaires (Cerdà et al., 1999) à travers la *zona radiata*. Cette communication cellulaire permet notamment l'approvisionnement de l'ovocyte pendant la vitellogénèse décrite ci-après.

I.2.2.3. La vitellogénèse

Suite à ces phases de préparation nucléaire et de différenciations folliculaires, l'ovocyte s'engage dans la vitellogénèse, au cours de laquelle le vitellus est accumulé au sein de l'ovocyte. Le vitellus est un ensemble lipidique, glucidique, protéique et lipoprotéique qui constituera les réserves indispensables au développement autonome du futur embryon.

Une partie de ces réserves est synthétisée directement dans l'ovocyte (vitellogénèse endogène) tandis qu'une autre partie est issue du raffinage d'une glycophosphoprotéine synthétisée dans le foie, les vitellogénines, présentes dans le cytoplasme sous deux formes avant maturation (Babin et al., 2007). Les vitellogénines sont les principaux précurseurs lipidiques de l'ovocyte. Dans le même temps, l'ovocyte assimile d'autres éléments tels que des minéraux et des vitamines. Des acides aminés libres et du glycogène constituent l'hyaloplasme, hydrosoluble, tandis que les constituants lipidiques, protéiques et lipoprotéiques (dont les vitamines), hydrophobes, sont concentrés dans les granules vitellines et les gouttelettes lipidiques observables à l'œil nu. Les réserves constituées dans le vitellus seront l'unique source d'énergie pour la nutrition embryonnaire puis larvaire. Elles représentent 80% du volume de la cellule avant hydratation (Jalabert & Fostier, 2010).

L'enveloppe extracellulaire de l'ovocyte se forme à partir de synthèse de lipoprotéines dans la *zona pellucida* (enveloppe au contact de la membrane vitelline de l'ovocyte). Cette enveloppe sera ensuite appelée chorion (Brooks et al., 1997 ; Wallace and Selman, 1981 ; 1990) et sera importante pour la protection mécanique de l'ovocyte ovulé et la prévention de la polyspermie.

Au cours de la vitellogenèse, (de 3 à 9 mois selon les cycles photopériodiques), le diamètre de l'ovocyte passe de 300-400µm à plus de 2mm. A ce stade, l'ovocyte est bloqué en métaphase de première division de méiose et possède toutes les réserves nécessaires au bon développement du futur embryon. Il est toujours lié à la granulosa par des jonctions cellulaires et sa vésicule germinative est en position centrale.

1.2.2.4. Contrôle neuroendocrinien des phases précoces de l'ovogenèse

Le rythme de reproduction de la truite arc-en-ciel est principalement influencé par la photopériode perçue par les géniteurs. La température de l'eau et les stress environnementaux peuvent aussi avoir un impact, plus limité, dans la temporalité des différentes phases du cycle sexuel (présenté en chapitre 1, partie 2). Les changements de photopériode et autres paramètres environnementaux « donneurs d'informations » sont intégrés au niveau du système nerveux central de la génitrice. Le cerveau contrôle le cycle reproducteur en agissant sur la glande hypophysaire via des neuropeptides et neurotransmetteurs (Le Menn et al., 2007 ; Lubzens, 2010 ; Wallace and Selman, 1981 ; 1990). L'un des neuropeptides majeurs caractérisé est la gonadolibérine (GnRH).

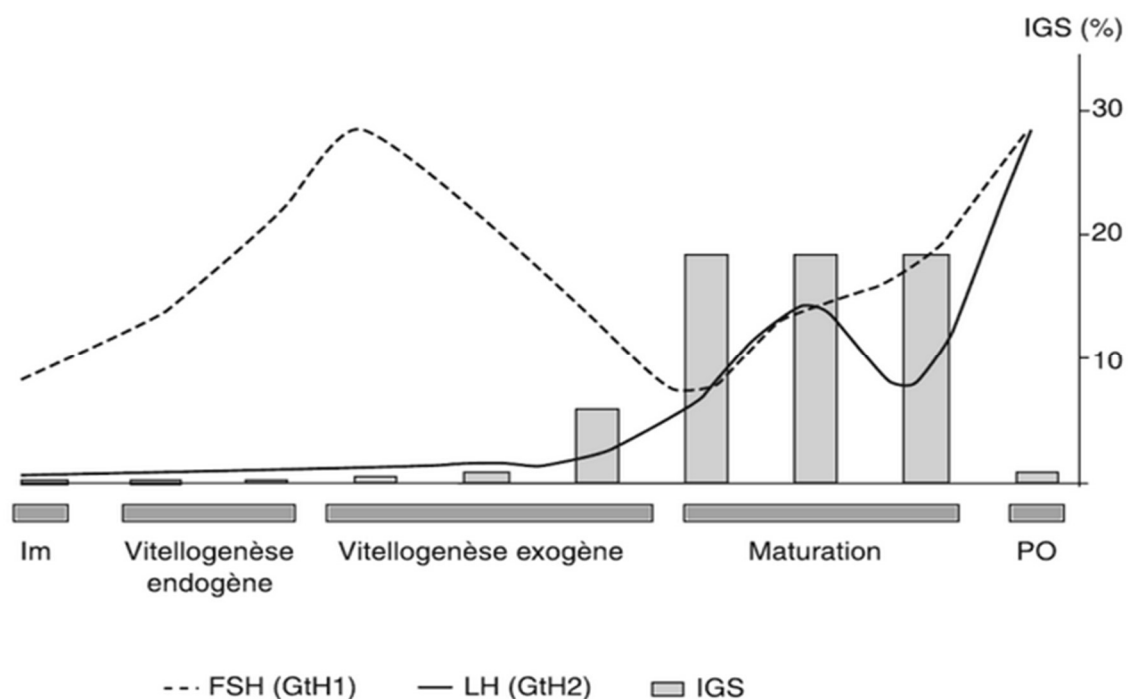


Figure 3 : Evolution type des concentrations plasmatiques des gonadotropines FSH et LH (échelle arbitraire) au cours d'un cycle de reproduction chez la truite arc-en-ciel (Bobe et al., in Jalabert & Fostier, 2010)

IGS : indice gonadosomatique, exprimé en pourcentage du poids de gonades par rapport au poids de l'animal. Im : Immature ; PO : Post-Ovulation

L'action couplée de GnRH, d'autres neurotransmetteurs tels que GABA et d'œstrogènes régule la synthèse hypophysaire d'hormones glycoprotéiques dont les deux plus caractéristiques sont l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) (figure 3). La variation des concentrations plasmatiques de ces hormones en fonction de la phase du cycle reproducteur est marquée.

Les variations de FSH correspondent aux phases d'initiation de la vitellogenèse. Cette hormone est un messenger important dans la régulation des phases de gamétogenèse précoce (Bon et al, 1999). La FSH augmente de nouveau en fin de cycle, pouvant jouer un rôle à ce moment ou dans le recrutement d'une nouvelle série de follicules.

La concentration en LH augmente en fin de cycle, au moment de l'initiation de la maturation ovocytaire. La perception de ce pic hormonal dans les ovaires induit la reprise de la méiose et les phases de maturation ovocytaire et d'ovulation ayant lieu suite à la vitellogenèse.

I.2.3. Maturation ovocytaire et ovulation : Mécanismes et contrôle

I.2.3.1. La maturation ovocytaire

A la fin de la vitellogenèse, la méiose reprend et l'ovocyte engage les mécanismes de maturation ovocytaire. La vésicule germinative (VG), contenant le matériel génétique de l'ovocyte, migre progressivement vers la périphérie de l'ovocyte et est observable à la loupe binoculaire. Lors de l'émission du premier globule polaire (réduction du stock chromosomique à $2n$), la membrane nucléaire disparaît, provoquant la rupture de la vésicule germinative (GVBD). L'ovocyte entre alors en métaphase de seconde division de méiose. On observe un changement d'aspect de l'ovocyte, qui devient translucide et au sein duquel apparaît un réseau de gouttelettes lipidiques. L'ovocyte s'hydrate et le volume ovocytaire augmente (Hurk & Peute, 1979 ; Grier et al., 2007; Jalabert & Fostier, 1984; Milla et al., 2006; Patiño & Sullivan, 2002; Wallace & Selman, 1990). Cette étape aboutit à l'obtention d'un ovocyte mature, hydraté, ayant acquis les compétences maturationnelles nécessaires à son ovulation, sa fécondation et son développement en un alevin viable et sans malformations. Les mécanismes de la maturation ovocytaire (méiose, réarrangement du cytosquelette et des organites cellulaires, protéolyses de composés cellulaires, hydratation) ne seront pas étudiés plus précisément dans ce manuscrit. Dans la suite de cette revue, seuls les mécanismes moléculaires liés à l'initiation de la maturation et à l'hydratation de l'ovocyte, importants dans le travail effectué par la suite, seront décrits.

A noter qu'à l'échelle de l'individu, cette étape marque la morphologie de la génitrice. A l'approche de la maturation, la robe des femelles s'assombrit sensiblement tandis que l'abdomen se gonfle et que la papille génitale est turgescente. Le comportement alimentaire change et la plupart des génitrices cessent de se nourrir plusieurs jours avant le début de la maturation (Luquet, 1986).

1.2.3.1.1. Mécanismes d'induction de la maturation ovocytaire : Acquisition des compétences maturationnelles

Comme évoqué, le début de la maturation ovocytaire est marqué par une augmentation temporaire du taux de LH plasmatique et une surexpression de ses récepteurs. Cette augmentation provoque une diminution de la production d'œstrogènes et la synthèse de progestérones (Nagahama & Yamashita, 2008).

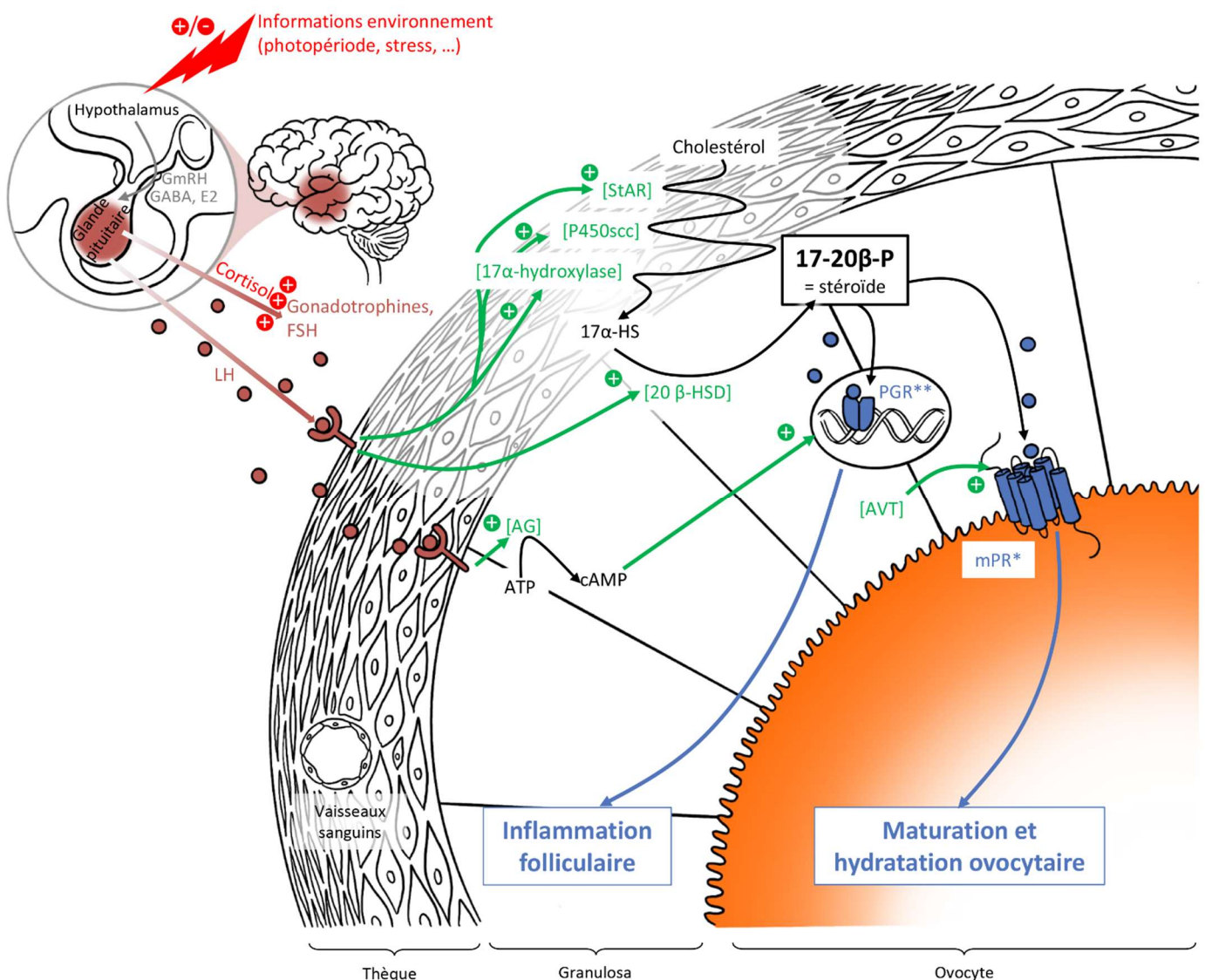


Figure 4 : Mécanismes d'induction de la maturation ovocytaire et d'inflammation des tissus folliculaires
(Crédits dessins: Segret et Beink®)

Chez la truite arc-en-ciel, c'est la 17,20 β P qui agit comme inducteur stéroïdien de maturation (MIS) (Fostier, 1973). La synthèse de ce messenger résulte d'une cascade d'activation complexe, impliquant le transfert du cholestérol libre vers les mitochondries des cellules de la thèque via les protéines de type StAR, l'oxydation du cholestérol, puis l'activation de plusieurs mécanismes concomitants localisés dans les cellules de la granulosa et de la thèque. L'activité de 17 α -hydroxylase augmente dans la thèque, aboutissant à la synthèse de 17 α -hydroxyprogesterone à partir des produits dérivés du cholestérol. Ce produit est ensuite transféré dans la granulosa et transformé en 17,20 β P par l'action de 20 β -hydroxystéroïde dehydrogenase (20 β -HSD) (Nakamura et al., 2005 ; Senthilkumaran et al., 2002, 2004; Tanaka et al., 2002 ; Young et al., 2005). Le mécanisme décrit constitue la voie de synthèse dominante dans les tissus folliculaires au début de la maturation. Parallèlement, les études transcriptomiques et protéomiques ont démontré une chute de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse ou la modulation d'œstrogènes (Bobe et al., 2006 ; 2008) dans les follicules de la truite arc-en-ciel.

L'ovocyte acquiert en parallèle la capacité de répondre à l'action de MIS. Cette acquisition des compétences maturationnelles implique une augmentation de l'activité des gènes des récepteurs membranaires de l'ovocyte à 17,20 β P et une intensification des communications entre granulosa et ovocyte via les jonctions cellulaires. L'acquisition de ces compétences maturationnelles serait notamment induite par l'activation de facteurs de croissances (IGF-I & IGF-II) (Bobe et al., 2003 ; 2004 ; Patiño and Sullivan, 2002; Patiño et al., 2003; Weber et al., 2007; Yamamoto and Yoshizaki, 2008).

MIS se lie ensuite à mPR, son récepteur membranaire de l'ovocyte, et l'activation du couple ligand récepteur va être à l'origine de l'engagement des mécanismes de maturation ovocytaire (figure 4).

Nombre d'autres facteurs ovariens jouent un rôle dans les mécanismes menant à l'engagement de la maturation ovocytaire, sans que le rôle de chacun n'ait toujours pu être précisément décrit. A noter le rôle de vasotocine-neurophysine VT 1 (gène *vt1*) dans la cascade d'activation aboutissant à l'ovulation et à l'engagement de la maturation ovocytaire chez le poisson-chat dit fossile *Heteropneustes fossilis* (revue par Joy & Chaube, 2015). Bien que son niveau d'implication soit encore mal compris, VT1 semble activer la maturation et l'ovulation (Balment et al., 2006 ; Singh & Joy, 2010). La surexpression des gènes *vt1* a été observée chez la truite arc-en-ciel au moment de la maturation ovocytaire (Bobe et al., 2006). Aussi, la surexpression d'activine et de follistatine en réponse à l'action de GTH révèle l'implication de ces protéines dans l'engagement de la maturation ovocytaire (Ge, 2000; Pang and Ge, 1999, 2002; Wang and Ge, 2003a,b). Chez le zebrafish, BMP-15 a été identifié comme un facteur clé dans la régulation de l'engagement de la maturation, son activité réduisant la sensibilité de l'ovocyte à MIS (Clelland et al., 2006 ; 2007).

1.2.3.1.2. Hydratation de l'ovocyte

Suite à l'acquisition des compétences maturationnelles et l'activation du couple MIS/mPR, la maturation ovocytaire débute. Les changements morphologiques de l'ovocyte observables au cours de ce processus sont notamment dus à une entrée d'eau dans la cellule. Cette hydratation des ovocytes a été décrite en particulier chez les poissons marins (Cerdà et al., 2007) mais a aussi été démontrée chez certains poissons d'eau douce, dont la truite arc-en-ciel (Milla et al., 2006). Alors que ce phénomène permet la gestion de la flottaison des ovocytes pour les poissons pélagophiles et permet la constitution d'une réserve d'eau douce pour les juvéniles de poissons marins qui évoluent dans un milieu hyper-osmotique, le rôle de cette hydratation chez les poissons d'eau douce est plus discuté.

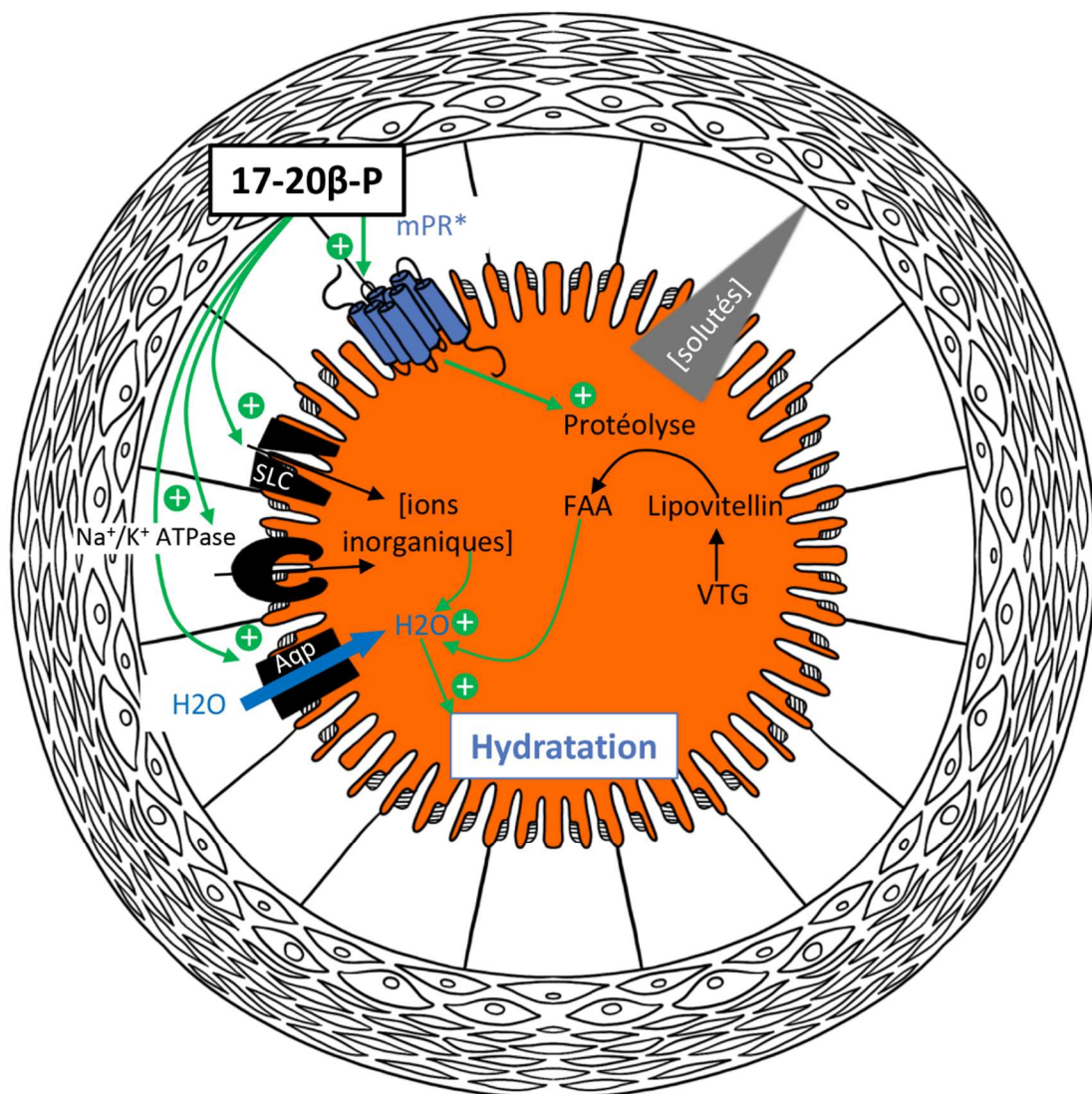


Figure 5 : Mécanismes d'hydratation de l'ovocyte lors de la maturation ovocytaire
(Crédits dessins : Segret et Beink®)

Il en résulte toutefois une augmentation conséquente du volume de l'ovocyte (la teneur en eau augmente de plus de 25% lors de la maturation de la truite arc-en-ciel), induisant la création d'une pression hydrostatique exercée sur les tissus folliculaires au moment de l'ovulation. Cette pression participerait au déchirement des enveloppes folliculaires et à la libération des ovocytes.

Ce phénomène d'hydratation résulte de trois mécanismes finement régulés lors de la maturation et décrits ci-après : (1) la libération d'électrolytes dans l'ovocyte suite à la protéolyse de lipovitellines contenues dans le vitellus et (2) le transport membranaire d'ions inorganiques dans le milieu cellulaire. Ces deux mécanismes aboutissent à la création d'un déséquilibre osmotique provoquant l'entrée d'eau dans l'ovocyte, permise par (3) la synthèse des canaux membranaires de type aquaporine (Cerdà et al., 2007).

(1) Les cystéines protéases comme les cathepsines L et/ou B (Carnevali et al., 2006; Cerdà et al., 2007) clivent les protéines dérivées de Vtg-A (vitellogénine stockée dans l'ovocyte immature). La lyse d'une partie des protéines du vitellus génère la création d'acides aminés libres (FAA) et de peptides agissant en effecteurs osmotiques (Wallace & Begovac, 1985 ; Wallace & Selman, 1985), créant un appel d'eau entrant. Cette modification de composition de l'ovocyte rend le cytoplasme translucide et provoque l'apparition du réseau de gouttelettes lipidiques hydrophobes, coalescentes. Les changements morphologiques décrits ci-avant sont caractéristiques d'un ovocyte en maturation (Grier et al., 2007; Jalabert and Fostier, 1984; van den Hurk and Peute, 1979; Wallace et al., 1992; Wallace and Selman, 1981).

(2) Outre les FAA d'origine endogène, l'ovocyte accumule des composés inorganiques, impliqués dans la création de l'appel osmotique. Dans l'ovocyte maturant, l'accumulation de K^+ a été démontré chez plusieurs espèces bentophiles (Greeley et al., 1991; Wallace et al., 1992), tout comme l'augmentation des concentrations cellulaires en Mg^{2+} , Ca^{2+} ou Cl^- (Fabra et al., 2006 ; Finn et al., 2002b; LaFleur & Thomas, 1991; Selman et al., 2001; Watanabe & Kuo, 1986). Le mode de transport de ces espèces ioniques est encore discuté mais la surexpression de certains membres de superfamilles de transporteurs membranaires de soluté (Solute Carriers - SLC), généralement impliqués dans les mécanismes d'osmorégulation, indique leur implication dans ce phénomène (Bobe et al., 2006 ; Nakada et al., 2005). Certaines études suggèrent l'implication des pompes Na^+/K^+ ATP dépendantes dans ces mécanismes (Chen et al., 2003 ; LaFleur & Thomas, 1991).

(3) On suppose que l'entrée d'eau est permise par les canaux membranaires de la famille des aquaporines (AQP). Ces protéines forment un canal de transport passif permettant le passage des molécules d'eau et de petits solutés dans le sens du gradient osmotique. L'expression différentielle de certains membres de cette famille lors de mécanismes physiologiques précis laisse penser que

l'organisme régule l'expression des gènes *aqp* pour gérer le niveau d'hydratation des tissus (Takata et al., 2004 ; Rojek et al., 2008). Les principaux travaux menés sur l'implication de membres d'AQP dans l'hydratation des ovocytes de poissons l'ont été chez la daurade royale *Sparus aurata* et ont prouvé qu'AQP-1b (AQP1 chez le mammifère) permettait l'entrée d'eau dans l'ovocyte au moment de la maturation (Fabra et al., 2005 ; 2006). L'étude menée par analyse transcriptomique sur les tissus folliculaires de la truite arc-en-ciel a démontré l'activation importante d'*aqp4*, autre membre de la superfamille, durant la maturation ovocytaire finale (FOM) (Bobe et al., 2006).

A noter enfin que l'importance relative des FAA et des solutés inorganiques dans la création de l'appel osmotique est variable selon les espèces, et diverge selon le milieu de vie et de ponte. Chez les espèces marines bentophiles, au contraire des espèces pélagophiles, l'appel osmotique au sein des ovocytes est majoritairement créé par l'accumulation d'osmolytes inorganiques (Fabra, 2006).

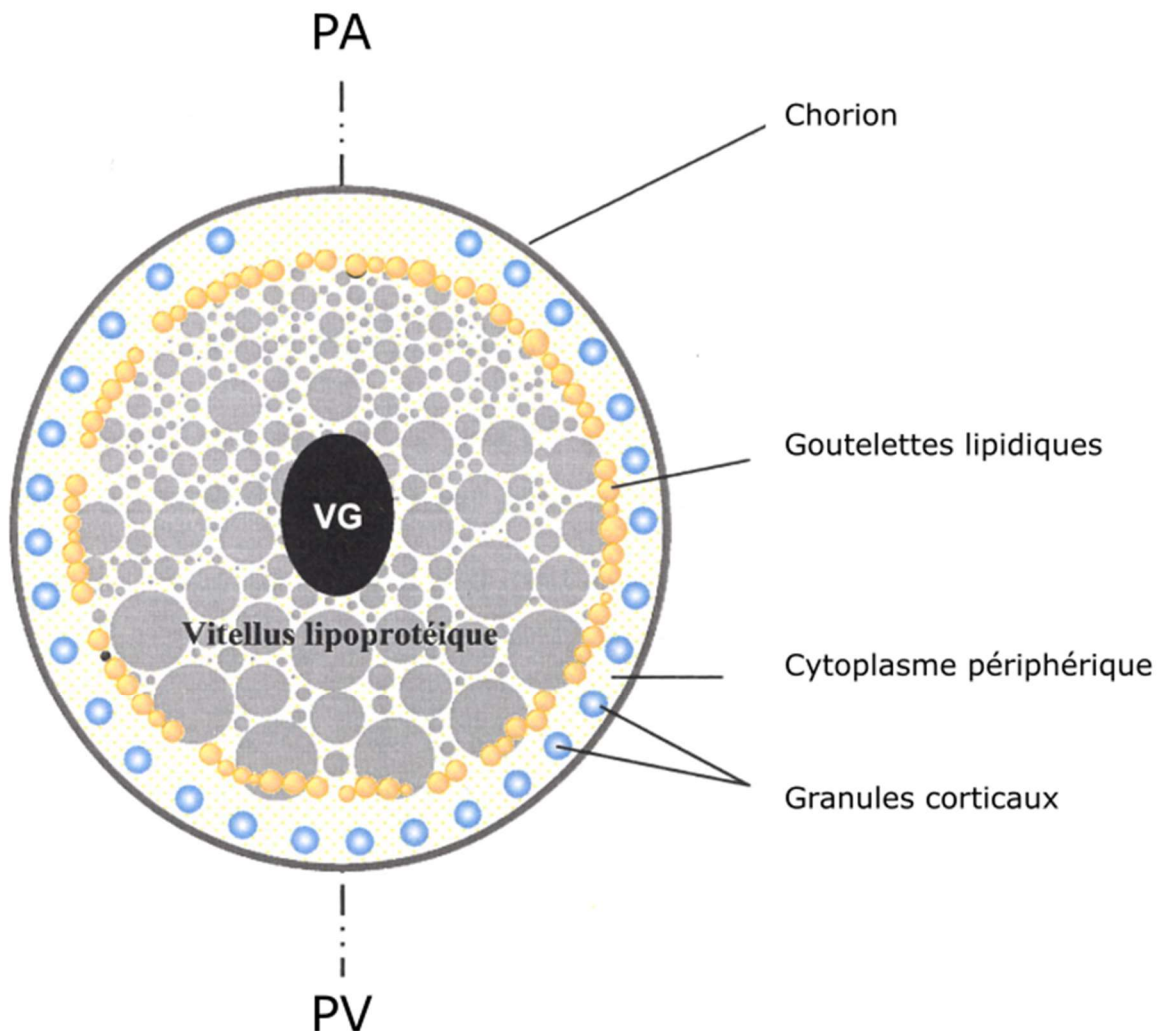


Figure 6 : Schéma structurel d'un ovocyte en reprise de méiose (Bonnet, 2007).
On observe la vésicule germinative (VG) centrale en migration. Le vitellus lipoprotéique et le réseau de gouttelettes lipidiques sont observables. PA : pôle animal. PV : végétatif (PV).

Bien que discutée, l'hydratation des ovocytes de poissons d'eau douce est prouvée par plusieurs études (Bobe, 2006 ; Milla, 2006 ; Singh and Joy, 2010) et implique des transports membranaires, actifs ou passifs, finement régulés.

1.2.3.2. L'ovulation

Après la maturation et l'hydratation des ovocytes, ces derniers sont libérés des tissus folliculaires dans la cavité abdominale : ce phénomène est l'ovulation. L'ovulation se produit entre 48 et 96H à 10-13°C après le début de la maturation (Bry, 1981 ; Fostier et al., 1981) et dure quelques heures. Certaines études montrent des résultats de fécondation suboptimaux lorsque la fécondation est réalisée juste après l'ovulation (Mylonas et al., 1992). Ces observations suggèrent que les mécanismes de maturation continuent quelques heures après l'ovulation. Ces deux phénomènes (FOM et ovulation) peuvent donc se chevaucher dans le temps.

1.2.3.2.1. Aspects mécaniques et structuraux

La libération des ovocytes nécessite la séparation totale des enveloppes folliculaires et du gamète. L'ovulation induit une réaction inflammatoire à large échelle chez le mammifère (Espey, 1980 ; 1994 ; Ohnishi et al., 2005 ; Thibault, 1999) et les études sur le poisson montrent que de nombreuses protéases et anti-protéases sont impliquées dans les mécanismes ovulatoires (Ogiwara et al., 2005 ; 2012 ; 2015), notamment chez la truite arc-en-ciel et fario (Bobe et al., 2006 ; Bobe & Goetz, 2001a,b; Garczynski & Goetz, 1997; Hajnik et al., 1998). L'ovulation s'accompagne donc de profonds réarrangements du follicule.

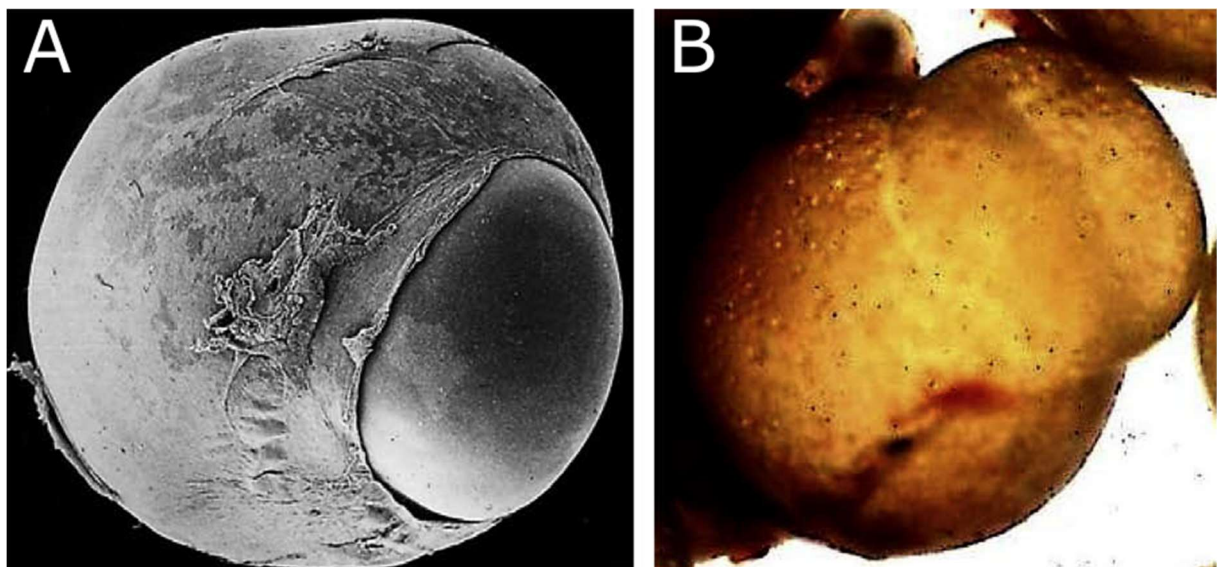


Figure 7: Rupture localisée de l'enveloppe folliculaire au moment de l'ovulation (A) observée au microscope électronique à balayage et (B) à la loupe binoculaire.
L'ovocyte passe à travers la « porte » créée par la rupture des tissus pour se libérer des enveloppes folliculaires.
 Droits INRAe Cauty-Jalabert.

Les jonctions cellulaires, tout comme les cellules de la thèque et les matrices extracellulaires riches en collagène, sont dénaturées sous l'action de protéases et de facteurs pro-inflammatoires. Les microvillosités se rétractent, et l'adhésion et les communications intercellulaires sont anéanties (Cerdà et al., 1999 ; York et al., 1993).

L'expulsion de l'ovocyte se produit suite à une rupture localisée de l'enveloppe folliculaire (figure 7). A l'approche de l'ovulation, le flux sanguin ovarien est réorienté. Chez la souris, la réduction de l'irrigation de l'apex des follicules, indispensable à la rupture des follicules, est réduite par l'activation de vasoconstricteurs (Migone et al., 2016). Des gènes codant des facteurs de coagulation sont massivement surexprimés (Bobe et al., 2006) pour éviter des symptômes hémorragiques. Certaines cellules de la thèque se différencient et deviennent structurellement proches des cellules musculaires lisses. Les actions d'enzymes protéolytiques spécifiques et des mécanismes d'apoptose affaiblissent le tissu. Enfin, la pression hydrostatique exercée par l'ovocyte néo-hydraté sur les enveloppes folliculaires localement affaiblies, combinée à l'action contractile des tissus de la thèque (Jalabert and Szöllösi, 1975; Szöllösi et al., 1978 ; Szöllösi and Jalabert, 1974), provoque cette rupture localisée de l'enveloppe et une libération du gamète et du liquide coelomique (milieu isotonique contenant des protéines anti protéases et antibactériennes) dans la cavité abdominale.

1.2.3.2.2. Mécanismes endocriniens et moléculaires

Malgré les différentes études en la matière, le programme complet de régulations génétiques et endocriniennes associées à l'inflammation de l'ovaire lors de l'ovulation chez le poisson n'est pas totalement arrêté, les différentes technologies et méthodologies utilisées proposant des résultats contrastés. Les mécanismes et activations cités ci-après sont parmi les plus largement discutés par la littérature scientifique et ceux d'intérêt pour la suite de notre étude. Ils ne forment pas une liste exhaustive des acteurs de l'ovulation.

Contrôle endocrinien

Suite au pic de LH décrit précédemment, l'activation des récepteurs gonadotropiques entraîne l'élévation de la concentration en AMP cyclique (AMPC) dans les cellules de la granulosa. L'AMPC agit comme un second messenger qui active notamment la synthèse d'un récepteur nucléaire (Pgr, aussi appelé nPR) au MIS. Le couple 17,20βP / Pgr agit comme un facteur de transcription dans les cellules folliculaires, jouant un rôle clé dans l'expression de nombreux facteurs et protéines présentés ci-après dans le paragraphe, impliqués dans l'inflammation et la protéolyse des tissus (Hagiwara et al., 2014 ; Liu et al., 2017 ; Ogiwara & Takahashi, 2017 ; Tang et al., 2016 ; Zhu et al., 2015).

Le couple MIS/Pgr induit la synthèse de prostaglandines (PGs) (figure 8), qui jouent un rôle clé au sein de cette cascade d'activations (Espey and Richards, 2006; Takahashi et al., 2018). Elles induisent l'ovulation *in vitro* et *in vivo* chez la truite arc-en-ciel et chez d'autres téléostéens (Goetz & Theofan, 1979; Goetz & Nagahama, 1985; Jalabert & Szollosi, 1975; Kagawa et al., 2003; Kagawa & Nagahama, 1981; Pankhurst, 1985; Stacey & Pandey, 1975), alors que l'inhibition de la synthèse de PGs empêche l'ovulation (Cetta & Goetz, 1982; Lister and Van Der Kraak, 2008; Patino et al., 2003).

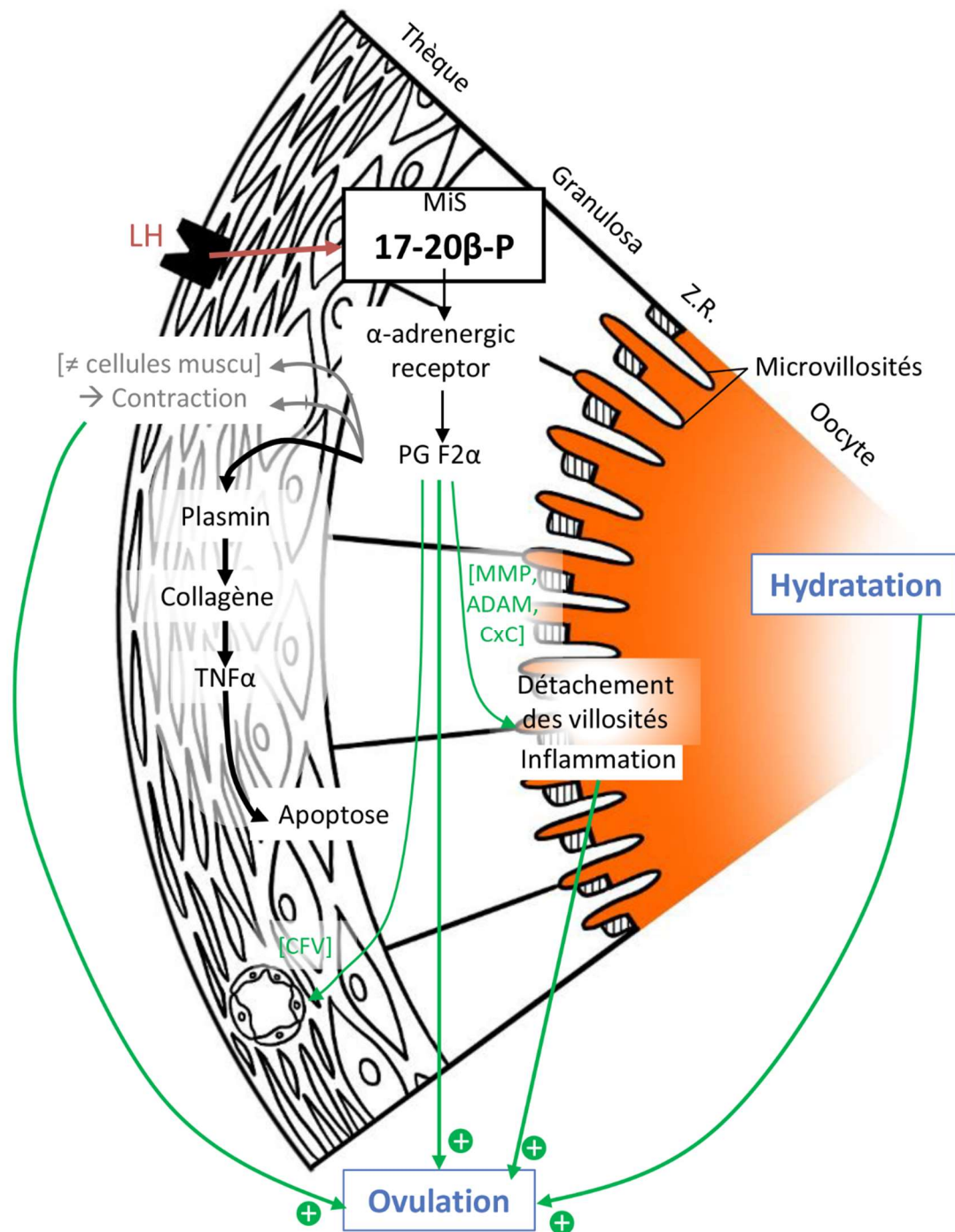


Figure 8 : Mécanismes aboutissant au déchirement du tissu folliculaire et à l'ovulation (Crédits dessins: Segret et Beink®)

PGF2 α est la forme active identifiée chez la truite arc-en-ciel (Jalabert, 1976), induisant la différenciation et la contraction des cellules de la thèque.

Mécanismes inflammatoires

Le modèle actuellement avancé pour expliquer la dégradation de la MEC ovarienne chez le zebrafish (Takahashi, 2019) implique deux voies principales d'activation d'enzymes protéolytiques, agissant consécutivement. La première est la voie des plasmines et la seconde la voie des « matrix metalloprotéases » (MMP). La voie des plasmines implique trois acteurs majeurs : l'activateur-1 type urokinase de plasminogène (Plau1), l'activateur-inhibiteur de plasminogène (Pai1) et la plasmine. La réduction de la synthèse de l'inhibiteur Pai1 permet l'activation de Plau1 qui convertit le plasminogène membranaire de l'ovocyte, inactif, en plasmine active, libre dans l'espace intercellulaire. La plasmine hydrolyse la laminine, composante majeure de la membrane basale du follicule (Takahashi, 2019).

La voie des MMP va ensuite dégrader, par la synthèse de Mmp15 et Mmp2, les différentes formes de collagène présentes dans la membrane basale et dans la MEC des cellules de la thèque. Les protéines de la superfamille MMP peuvent réguler la matrice extracellulaire en se liant et en dégradant les protéines membranaires et extracellulaires (Curry & Osteen, 2003; Curry & Smith, 2006). L'implication de superfamilles de métalloprotéases dans ces mécanismes est déjà bien renseignée. Les observations de surexpression de gènes de la superfamille des MMP prouvent que ses membres sont des acteurs clés des processus inflammatoires et protéolytiques de l'ovulation (Curry & Smith, 2006; Hagiwara et al., 2020; Takahashi et al., 2019). L'activation des enzymes MMP par l'augmentation de LH durant l'ovulation a été démontrée chez le mammifère (Bakke et al., 2002; Jo et al., 2004) et chez le poisson (Crespo et al., 2010; 2013 ; Liu et al., 2017).

Plusieurs membres de la superfamille de métalloprotéases ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase) (Reiss & Saftig, 2009; Yamamoto et al., 1999) tels que *adam22* sont surexprimés avant l'ovulation de la truite arc-en-ciel (Bobe et al., 2006). Les produits de l'expression de ces gènes sont impliqués dans les phénomènes de protéolyses à large spectre chez le poisson (Berndtson & Goetz, 1988; 1990; Liu et al., 2018) et le mammifère (Sriraman et al., 2008). Leur caractère transmembranaire et leur domaine riche en désintégrine leur permet de réguler les adhésions et communications cellulaires. Leur domaine métallo protéique clive efficacement le collagène, très présent dans la MEC et dans les cellules de la thèque.

Des membres de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale (TNF) sont activés et impliqués dans les mécanismes d'apoptose et de destruction de la matrice-extra cellulaire des cellules de la thèque au cours de la rupture folliculaire chez la truite fario (Bobe & Goetz, 2001b ; Crespo et al., 2010).

Enfin, d'autres gènes associés à des fonctions inflammatoires tels que *cxc14* (CXC chemokine-related) ou à des fonctions de coagulation sanguine (*cf5*- Coagulation factor V) sont aussi surexprimés pendant la période péri-ovulatoire (Bobe et al., 2006).

Tous ces mécanismes provoquent l'affaiblissement et la rupture programmée du « mur » folliculaire. Le résultat est l'obtention d'un ovocyte libre dans la cavité abdominale pour la truite arc-en-ciel, pouvant être prélevé par massage abdominal, possédant le matériel biologique pour être fécondé.

1.2.4. L'ovocyte fécondable

L'ovule obtenu est une cellule animale très différenciée, bloquée en métaphase II de seconde division de méiose, contenant les organites cellulaires habituels mais présentant aussi de nombreuses spécificités liées aux fonctions remplies. Sa structure est similaire à celle présentée pour illustrer la reprise de méiose (figure 6), exceptée la vésicule germinative qui s'est rompue pendant l'expulsion du premier globule polaire. A ce stade, l'espace périvitellin (espace entre la membrane vitelline et le chorion) est normalement indiscernable à l'œil nu, et le réseau lipidique est composé d'un grand nombre de gouttelettes de très petite taille, rendant très difficile la distinction des phases lipidiques et protéiques dans l'ovocyte.

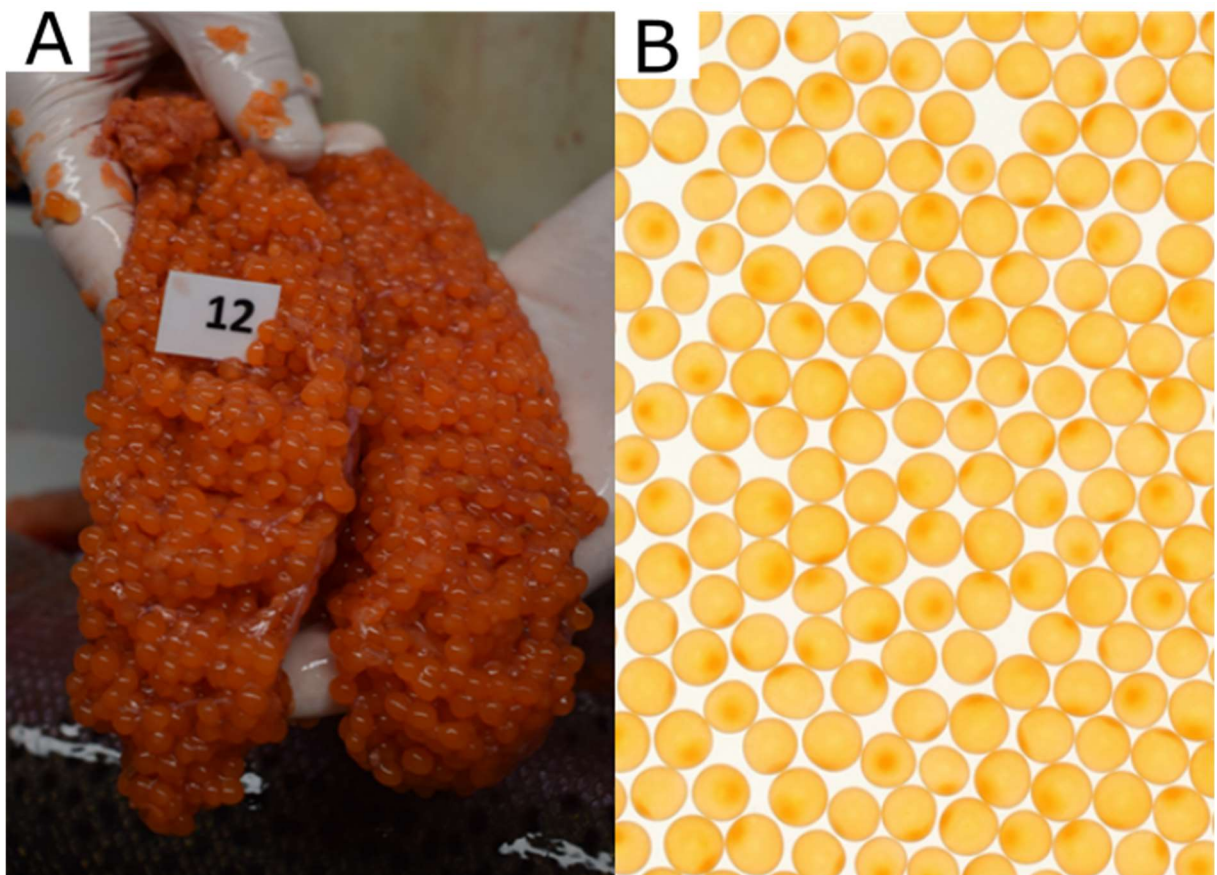


Figure 9 : (A) Ovaire de truite arc-en-ciel en maturation et (B) ovules de truite arc-en-ciel après ovulation. Photographies réalisées avec un objectif 18-55. Droits image Segret

Les alvéoles corticales, ou granules corticaux, sont présentes dans le cytoplasme et expulsées au moment de la fécondation. Cette expulsion et le déséquilibre osmotique engendré contribuent à la formation de l'espace périvitellin qui prévient la polyspermie et protège l'ovule fécondé (Kudo & Yazaka, 1997 ; Linhart et al., 1995). L'ovocyte contient les réserves nécessaires à son développement, constituées lors de l'ovogenèse. La cellule ne réalise donc que peu d'échanges avec le milieu extérieur suite à l'ovulation, seuls l'oxygène, l'eau et certains ions peuvent alors être incorporés dans le milieu intracellulaire (Gray, 1932).

Outre les éléments exposés ci-avant, l'ovocyte contient un ensemble d'éléments nucléaires et cytoplasmiques nécessaires à la fécondation et au développement précoce de l'embryon. Les molécules vitellines non-organiques suivantes sont présentes au sein de l'ovule :

- ARN messagers (ARNm) assurant le transfert de l'information génétique de l'ADN aux ribosomes
- ARN ribosomiques, facteurs de traduction assurant l'édification des ribosomes et la synthèse protéique
- Hormones (Montverdi & Di Giulio, 2000)
- Stéroïdes
- Pigments respiratoires (Craik, 1985)
- Immunoglobines et agents d'immunités

I.2.3. Qualité des pontes : Définition et facteurs influençant la production d'ovocytes de qualité

Que ce soit chez les mammifères ou chez les poissons, l'ovule peut présenter des défauts. Ces défauts de qualité se traduisent par des baisses du taux de fécondation ou du développement des embryons. Les études menées sur le sujet ont défini la qualité des ovules de poisson comme étant leur capacité à être fécondés et à se développer en embryons viables et sans malformation (Bobe & Labbé, 2008). Mon étude traitant des conditions d'apparition d'un défaut de qualité des ovocytes chez la truite arc-en-ciel, je rappelle ici comment la qualité des ovocytes est évaluée et quels sont les facteurs qui peuvent provoquer des défauts chez les salmonidés d'élevage. La liste des facteurs n'est pas exhaustive mais décrit les principales situations rencontrées ou soupçonnées dans notre cas.

I.2.3.1. Evaluation de la qualité des ovules

Alors que les premiers travaux analysant les performances de reproduction s'attachaient principalement à l'évaluation de la fécondité absolue et relative (nombre d'ovules produits total et nombre d'ovules produit par kilo de poids vif de génitrice) (Gall, 1975), les valeurs de survie moyenne

des œufs à différents stades de développement ont été intégrées plus tard aux indicateurs de qualité (Bromage & Cunmaranatunga, 1988 ; Estay et al., 1994). Les stades embryonnaires contrôlés furent traditionnellement la survie au stade œillé (apparition des yeux sur l'embryon à 190°C.J post-fécondation) et la survie à l'éclosion (330°C.J post-fécondation). Plus tard, la survie à résorption totale des réserves vitellines de l'alevin (passage à une alimentation exogène – 550°C.J post-fécondation) a été considérée pour l'évaluation de la qualité des ovocytes (Nagler et al., 2000). Cette approche prend en compte la survie mais aussi la viabilité à moyen terme des individus en considérant le taux de malformations chez les alevins, ce facteur étant pertinent pour évaluer la qualité des ovocytes (Aegerter & Jalabert, 2004).

Le phénotypage morphologique des ovocytes propose une autre approche utilisée pour évaluer la qualité des ovocytes au sein d'une ponte. La taille des ovocytes et l'apparence visuelle de ces derniers sont des informations immédiatement accessibles après ovulation. Toutefois, bien que la corrélation entre taille des ovules et taille des alevins ait été prouvée (Springate & Bromage, 1985 ; Heath et al., 2003), aucune relation entre la taille de l'ovule et la survie des alevins en condition d'élevage n'a été démontrée (Bromage et al., 1992 ; Estay et al., 1994 ; Knox et al., 1988) et le sujet est encore débattu (Bobe & Labbé, 2010; Campbell et al. 1992; Jastrebski & Morbey, 2009; Migaud et al., 2013). On notera toutefois que pour un professionnel producteur d'œufs embryonnés de truite arc-en-ciel, des œufs embryonnés de taille importante sont commercialement mieux valorisés auprès des clients. Des techniques en cours de développement et présentées dans cette étude proposent une automatisation du phénotypage des pontes par imagerie numérique (Cardona et al., 2020). L'outil d'analyse VisEgg, dont j'ai participé au développement au cours de ma thèse, est présenté dans la section « Description du défaut de qualité à l'échelle de la ponte et des génitrices touchées » (chapitre 2, partie 1). A partir de photos des ovocytes hydratés, l'outil mesure les critères de qualité de chaque ponte (pourcentage d'ovocytes blancs, pourcentages d'ovocytes lunés, et coefficient de variation de la taille des ovocytes au sein de la ponte). La présence d'ovocytes lunés (avant hydratation) ou blancs (24H après hydratation) est interprétée comme un indicateur direct de la perte d'homéostasie des ovocytes (Gray, 1932).

Le patrimoine génétique de la génitrice et les conditions environnementales ou zootechniques auxquelles cette dernière est exposée au cours de la gamétogenèse vont avoir un impact sur la qualité de l'information génétique contenue dans l'ovocyte au moment de l'ovulation. Le bon déroulement des premières étapes du développement embryonnaire est la conséquence de l'action de ces produits d'expression géniques. Les contrastes génétiques (Amsterdam et al., 1999 ; Driever et al., 1996 ; Golling et al., 2002 ; Haffter et al., 1996 ; Kane et al., 1996 ; Marandel et al., 2012), transcriptomiques (Bonnet et al., 2007 ; Ma et al., 2019 ; Weber et al., 2021) et protéomiques (Crespel, 2008 ; Ziv, 2008)

entre ovocytes de bonne et mauvaise qualité ont été décrits. L'analyse du transcriptome et du protéome des ovocytes donne des informations pertinentes sur leur qualité. A noter enfin que chez la truite arc-en-ciel les abondances de microARN (régulateurs majeurs de certains processus physiologiques) sont contrastées selon la qualité des ovocytes étudiés (Ma et al., 2015), ce qui ouvre la porte à de futures investigations sur l'importance du miRNAome dans l'évaluation de la qualité des ovocytes.

Des techniques en cours de développement pourraient être utiles pour le phénotypage des pontes. Comme certains travaux le démontrent, l'utilisation de la spectroscopie vibrationnelle proche infra-rouge pour définir la qualité d'une ponte semble possible (Bik et al., 2020 ; Ishigaki et al., 2018). Cette technique permet une description non-invasive des composants biochimiques de l'ovocyte, donnant des informations détaillées sur la composition et la structure des molécules contenues dans l'ovocytes (important pour les acides gras notamment).

1.2.3.2. Alimentation des génitrices

L'alimentation des génitrices est importante pour obtenir des ovocytes de bonne qualité. Chez le poisson d'élevage, la carence alimentaire affecte le succès de reproduction (Izquierdo et al., 2001). Chaque situation d'élevage est unique et les rations références utilisées dans les études peuvent être discutées, mais on observe dans la littérature dédiée qu'une restriction alimentaire au cours de la vitellogenèse cause une inhibition de la maturation des gonades chez le bar *Dichentrachus labrax* (Cerdà et al., 1994) et le mâle saumon Atlantique *Salmo salar* (Berglund, 1995). L'étude menée sur le bar a montré qu'une réduction importante de la ration journalière distribuée aux génitrices provoque un retard d'ovulation et une diminution du taux d'œstradiol plasmatique. Au contraire, une restriction modérée de la ration journalière a un impact positif sur la qualité des pontes en diminuant le nombre d'ovocytes non-viables chez la truite arc-en-ciel (Cardona et al., 2019).

Bien que les études sur les besoins spécifiques des géniteurs soient rares, la démonstration de l'effet de la formule de l'aliment sur la qualité des ovocytes produits a été démontrée assez tôt (Washburn, 1990). La qualité des lipides et des acides gras insaturés distribués dans l'aliment des génitrices est importante pour la formation des réserves et de la membrane des ovocytes chez les poissons (Tocher, 2003 ; Watanabe et al., 1984) et notamment chez les salmonidés (Migaud, 2013 ; Pickova, 1999).

De plus, les protéines (Gunasekera et al., 1996 ; Watanabe et al., 1984 ; 1985), les vitamines (Blom & Dabrowski, 1995 ; Palace & Werner, 2006 ; Fontagné-Dicharry, 2010) et les minéraux (Lall & Milley, 2008) présents dans l'aliment impactent la qualité de la reproduction des poissons.

I.2.3.3. Qualité de l'eau d'élevage

Certains caractères physico-chimiques de l'eau ont un impact sur la reproduction des salmonidés.

I.2.3.3.1. Température

Les salmonidés sont peu sensibles à la température comme signal de contrôle du cycle de gamétogenèse (Bromage et al., 2001 ; Wang, 2010). Toutefois des températures extrêmes au moment des phases finales de la maturation ont un impact sur la durée de maturation, la date d'ovulation et la qualité des ovocytes produits (Beacham & Murray, 1988 ; Güner et al, 2012 ; Pankhurst & Thomas, 1998 ; Taranger et al., 1999 ; Taranger & Hansen, 1993). Pour la truite arc-en-ciel, ces dysfonctionnements ovariens surviennent pour des gammes de températures supérieures à 14°C (King & Pankhurst, 2000 ; Pankhurst et al., 1996) ou inférieures à 4°C (Nakari et al., 1987 ; 1988).

I.2.3.3.2. pH

Les modifications du pH de l'eau peuvent altérer les performances de reproduction des salmonidés (Ikuta et al., 2003 ; Ikuta & Kitamura, 1995 ; Johnson, 1977 ; Jones, 1985 ; Tam, 1990), réputés sensibles aux variations de pH et aux pH bas (Havas & Rosseland, 1995 ; Peterson, 1989).

I.2.3.3.3. Composition de l'eau d'élevage

La composition minérale de l'eau d'élevage peut avoir un impact sur les performances de reproduction chez les poissons (Brooks et al., 1997 ; Bobe & Labbe, 2010).

La migration anadrome réalisée par certains salmonidés au moment de leur reproduction implique l'évolution et l'adaptation des individus à des eaux présentant des salinités variées. En élevage, ces variations de salinité (variations de richesse en ions majeurs dans le milieu) sont difficilement reproduites. Cette non-variation peut avoir un impact sur la qualité de la reproduction. Chez le saumon Coho (*Oncorhynchus kisutch*), un cycle vital effectué uniquement en eau douce induit des diminutions de qualité des gamètes et la présence de follicules atrétiques au sein des gonades (Valdebenito et al., 2015) alors qu'un transfert en eau de mer au début du cycle reproducteur provoque une diminution notable du pourcentage de survie des ovocytes produits au stade œillé (Werthemer, 1984). Au contraire, une alternance entre élevage en eau de mer puis transfert en eau douce améliore la qualité des ovules produits chez l'omble chevalier *Salvelinus alpinus* (Atse et al., 2002). Chez d'autres espèces, l'effet de la salinité sur les survies et le développement embryonnaire a été démontré, par exemple chez la plie *Pleuronectes platessa* (Berghahn & Karakiri, 1990), le poisson mordeur *Cyprinodon macularius* (Kinne & Kinne, 1961) ou encore le barramundi *Lates calcarifer* (Sampathkumar et al., 1993). Tous ces résultats montrent que la tonicité du milieu joue un rôle dans la régulation des mécanismes de reproduction par la régulation de l'expression de gènes d'intérêt, comme cela a été démontré chez le mammifère (Burg & Garcia-Perez, 1992).

L'eau d'élevage est en outre un fournisseur d'éléments minéraux pour le poisson (Prabhu et al., 2016). Certains de ces éléments minéraux sont indispensables pour de nombreuses fonctions physiologiques des géniteurs (Lall & Milley, 2008). Lorsque l'aliment et l'eau d'élevage ne suffisent pas à fournir la quantité de minéraux nécessaire au besoin du poisson, des situations de carences apparaissent et peuvent impacter la reproduction. Chez la truite arc-en-ciel, des carences en fer (Desjardins, 1985) ou en manganèse et en zinc (Takeuchi et al., 1981) provoquent une diminution de la survie à l'éclosion.

Enfin, les poissons sont sensibles aux pollutions anthropiques. Pour n'en citer que quelques-unes, les molécules dérivées d'insecticides, les polychlorobiphényles, les métaux lourds, le bisphénol A, les organochlorés ou autres perturbateurs endocriniens sont des éléments dont la présence en quantité anormale dans l'environnement (due à l'activité humaine) impacte la reproduction des individus et la survie des embryons et juvéniles (Aulsebrook, 2020 ; Brown et al., 2015 ; Jezierska et al., 2009 ; Lahnsteiner et al., 2005 ; Matsui et al., 1992 ; Mauck et al., 1978 ; Miller, 1993 ; Smith & Cole, 1973 ; van Leeuwen et al., 1986 ; Von Westernhagen et al., 1989 ; Westin et al., 1985). Les pollutions des eaux de surface sont responsables de diminutions des recrutements de stocks de poissons sauvages exploités par les pêcheries industrielles. L'exemple des qualités de reproduction du cabillaud *Morus gadhua* ou du sprat *Sprattus sprattus*, diminuées par de telles pollutions en mer Baltique (Grauman & Sukhorukova, 1982), illustre ce phénomène.

I.2.3.4. Facteurs génétiques

L'amélioration des outils et programmes de sélection génétique ces dernières décennies permet de proposer aux sélectionneurs des leviers d'action efficaces pour l'amélioration des lignées commerciales (Migaud, 2013). Les analyses de génétique quantitative réalisées dans les années 1970 avaient démontré l'héritabilité des taux de fécondation, de survie des pontes au stade œillé et au stade alevins (Kanis et al., 1976 ; Su et al., 1997). Toutefois les faibles valeurs d'héritabilité obtenues ($h^2 \in [0.08 ; 0.13]$) ainsi que la difficulté d'évaluation de l'effet maternel rendaient inefficace l'intégration de ce critère dans un schéma de sélection. Les caractères de ponte (nombre d'œufs, taille des œufs, fécondité relative) ont été étudiés et présentent des héritabilités variables mais exploitables ($h^2 \in [0.05 ; 0.67]$) (Gall, 1975 ; Gall and Gross, 1978 ; Gall and Huang, 1988 ; Gall and Neira, 2004 ; Gjedrem, et al., 1986 ; Su et al., 1997, 2002) et certains de ces caractères ont été intégrés dans les schémas de sélection truite en France, notamment suite à de récents travaux (D'Ambrosio et al., 2020).

I.2.3.5. Zootechnie

I.2.3.5.1. Décalage photopériodique des dates de pontes

Des traitements par photopériodes sont couramment appliqués pour des besoins commerciaux, afin de décaler les dates de ponte. Mal maîtrisés, ces décalages photopériodiques peuvent entraîner des diminutions de qualité des pontes chez la truite arc-en-ciel, même lorsque les températures restent dans des gammes acceptables pour la reproduction (11-12°C) (Bonnet et al., 2007). Ces traitements provoquent des diminutions de survie des alevins à la résorption et des taux de malformations plus élevé. Des résultats similaires ont été observés pour le bar *Dichentrarchus labrax* pour certains régimes photopériodiques (Carillo, 1989 ; Dechauvelle, 1987). La diminution de la période de repos sexuel et de vitellogenèse implique pour la génitrice une importante mobilisation de ressources dans un temps restreint. L'accélération des cycles sexuels représente un défi physiologique pour les génitrices et entraîne des mauvais résultats dans des situations trop intenses.

I.2.3.5.2. Stress et maladies

Le stress des animaux d'élevage est provoqué par des facteurs tels que l'élevage en fortes densités ou en confinement, les manipulations répétées des individus ou encore les attaques de prédateurs (Schreck, 2010). Les stress environnementaux ne sont volontairement pas inclus dans cette section (pollutions, hypoxie, hyperthermie). Chez le poisson, la réponse de l'organisme à un stress suit un modèle relativement bien décrit (Barton and Iwama, 1991; Donaldson, 1981 ; Reading, 2018 ; Wendelaar-Bonga, 1997).

Dans un premier temps, l'organisme de l'individu stressé induit une réponse dite primaire. Pour compenser le déséquilibre perçu, l'activation d'une cascade neuroendocrinienne provoque la synthèse de catécholamines et l'activation de l'axe hypothalamo-pituitaire. L'activation de cet axe stimule la sécrétion d'hormones corticotropes qui vont agir au niveau inter-rénal pour stimuler la synthèse d'hormones glucocorticoïdes, et notamment de cortisol, marqueur de stress le plus vulgarisé chez le poisson téléostéen (Schreck, 2001). L'action commune des glucocorticoïdes et des catécholamines va entraîner les réponses secondaires et tertiaires au stress (Campbell, 1994) et serait responsable de l'inactivation de la cascade hormonale de reproduction, inhibant la synthèse des hormones reproductives (Milla et al., 2009 ; Tort, 2011 ; Wendelaar, 2011).

Les réponses secondaires sont marquées par la mobilisation de glycogène hépatique, substrats énergétiques nécessaires pour lutter contre les effets nocifs du stress, tandis que la synthèse protéique est inhibée à l'échelle de l'organisme (Mazeaud et al., 1977 ; Pickering, 1981). Cette mobilisation énergétique pendant les phases précoces et tardives de vitellogenèse peut entrer en compétition avec l'approvisionnement des gonades en lipides et vitellogénines (Baltzegar et al., 2013 ; Reading et al.,

2018). De plus la balance hydrominérale de l'individu stressé est altérée, résultant en des flux d'eau plus élevés au sein des tissus et à des modifications des concentrations électrolytiques ayant des conséquences sur les mécanismes d'osmorégulation. Aussi, le stress aboutit à une immunodépression des individus. Des stress chroniques chez des génitrices fragilisées par l'ovogenèse provoquent des situations propices à l'apparition de symptômes pathologiques chez les femelles exposées à des infections bactériennes, virales ou parasitaires (Brock & Bullis, 2001). Ces pathologies peuvent avoir un impact direct sur la qualité des ovocytes dès l'ovulation, ou provoquer des mortalités ou malformations aux stades juvéniles suite à une transmission verticale d'agents infectieux tels que *Flavobacterium psychrophilum* (Brown et al., 1997) ou *Renibacterium salmoninarum* (Funkhouser & Bordenstein, 2013).

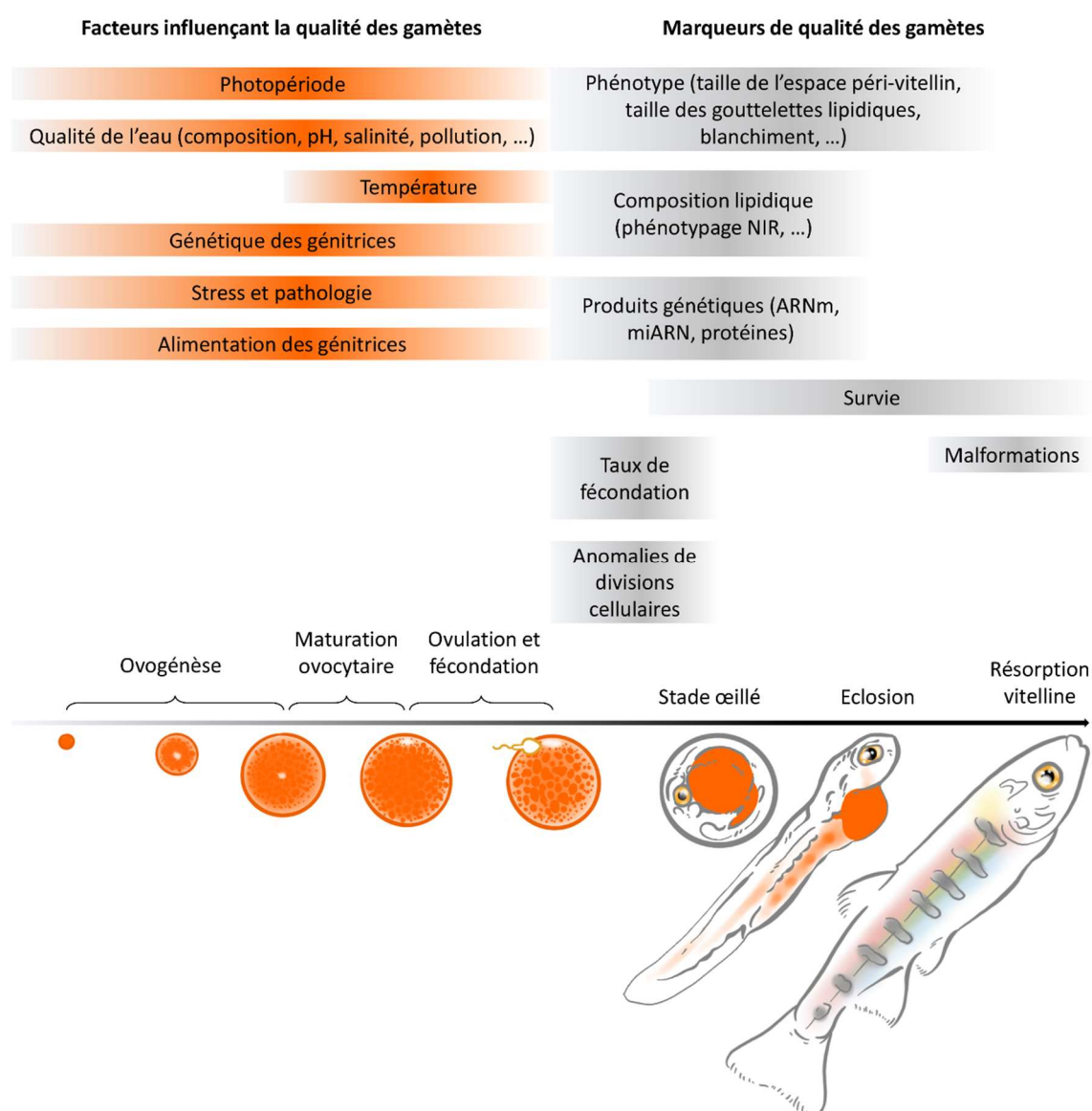


Figure 10 : Synthèse des différents facteurs influençant la qualité des ovocytes de truite arc-en-ciel (à gauche) et des marqueurs de qualité utilisés (à droite) (Crédits dessins : Segret et Beink®)

Les natures des réponses dites tertiaires résultant des réponses présentées ci-avant sont diverses, dont des réponses comportementales (comportements d'évitement, inhibition des comportements reproductifs) (Aegerter et al., 2005 ; Schreck, 2001).

A noter aussi que l'atrésie, phénomène au cours duquel la femelle interrompt son cycle de reproduction et réabsorbe des ovocytes (Reading et al., 2018), apparaît dans des situations d'élevage particulièrement stressantes chez des espèces sensibles (Sullivan, 2003 ; Valdebenito et al., 2015). Les cellules de l'ovaire subissent une apoptose et l'homéostasie des ovocytes est détruite au sein des gonades, par l'action des enzymes lytiques sécrétées (Donato et al., 2003). Lorsque l'ovulation a lieu malgré ces situations, les pontes atrétiques sont de mauvaise qualité.

Ainsi, selon la sévérité, la temporalité et la chronicité du stress infligé, la qualité de la reproduction des salmonidés peut être diminuée (Campbell, 1992 ; 1994 ; Contreras-Sanchez, 1995 ; Small et al, 2008).

I.3. Contexte du projet

I.3.1. Les partenaires du projet

Région-Nouvelle aquitaine et ANRT

La Région Nouvelle-Aquitaine et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie ont été les partenaires financiers de ce projet.

Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement

Le projet s'est construit en collaboration avec deux partenaires scientifiques INRAE :

- Le Laboratoire de Physiologie et de Génomique du Poisson (LPGP), basé à Rennes (35). Les travaux menés au laboratoire sont centrés sur la biologie du poisson, via l'étude de ses grandes fonctions physiologiques par la génomique, la biologie cellulaire, la transgénèse, l'endocrinologie ou encore la biologie intégrative. Le LPGP a été le partenaire scientifique majeur du projet, sous la supervision de Julien Bobe, directeur de thèse et directeur du laboratoire. Le laboratoire m'a accueilli pendant les périodes d'analyse de données, d'analyse moléculaire et de rédaction, me faisant profiter de sa structure, de son équipement d'analyse et de l'expertise scientifique et technique de son personnel.
- L'unité Nutrition, Métabolisme, Aquaculture (NuMÉA), basée à Saint-Pée-sur-Nivelle (64). Ce laboratoire mène depuis plusieurs années des projets de recherches sur la nutrition des poissons d'élevage, et a adopté une démarche de biologie intégrative allant de l'étude de la régulation de l'expression des gènes aux performances de l'animal dans son système d'élevage. La directrice de l'unité, Sandrine Skiba, a co-encadré le doctorat. L'unité a mis à disposition ses équipements et son personnel, qui a régulièrement été sollicité pour participer aux nombreux prélèvements et échantillonnages réalisés au cours de cette thèse. La station expérimentale de Lees-Athas, rattachée à l'unité NuMÉA, pratique la reproduction de truite arc-en-ciel et est située à seulement 6 kilomètres des sites de production d'un des partenaires privés présentés ci-après.

Viviers de Sarrance et de Rébénacq

Le projet de recherche a été conçu à partir d'une problématique formulée par les sociétés Viviers de Sarrance (VDS) et Viviers de Rébénacq (VDR), membre du même groupe. Ces sociétés privées, basées à Sarrance [43.049999,-0.6014075] et Rébénacq [43.155948,-0.405067] dans les Pyrénées-Atlantiques (figure 11), pratiquent la sélection et la multiplication de truites arc-en-ciel depuis plus de 30 ans. On y produit des œufs fécondés commercialisés chez des pisciculteurs ou des associations de pêche, pour assurer le renouvellement des cheptels dans les bassins de production ou au sein des parcours de pêche.

I.3.2. Caractéristiques des sites d'expérimentations : Conduite d'élevage et environnement

Ici sont présentées les principales caractéristiques de la conduite d'élevage et de production des truites pratiquées sur les sites du groupe, afin de faciliter la compréhension des problématiques traitées dans cette étude.

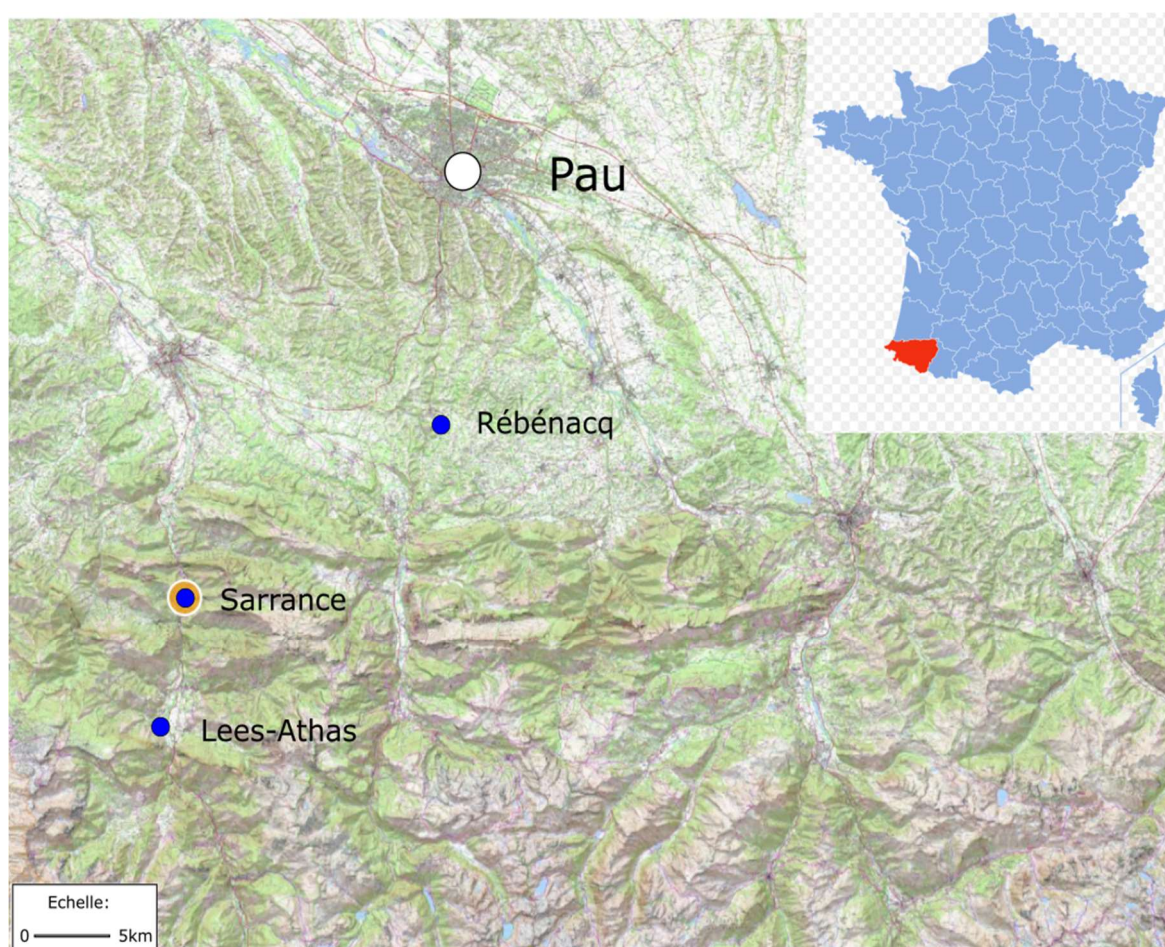


Figure 11 : Carte des sites d'expérimentaux (droits IGN)

I.3.2.1. Souche génétique

La souche génétique exploitée par le groupe est la souche Viviers, propriété de la société Viviers de Sarrance, issue d'une stratégie de sélection débutée en 1995 (premier entretien de souche enregistré auprès du Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français- SYSAAF), principalement basée sur des critères de croissance, de morphologie et de rendement chair. Depuis 3 générations, des critères de performance et de qualité des pontes ont été intégrés aux schémas de sélection suite aux résultats des travaux menés en collaboration avec le SYSAAF. La souche de truite arc-en-ciel élevée à Sarrance est une souche automnale, qui pond naturellement pendant le mois de novembre.

I.3.2.2. Sites et conduite d'élevage

Le groupe possède trois sites d'élevage distincts :

- Un site basé à Escot [43.065607,-0.603647], alimenté en eau par une résurgence, utilisé uniquement pour les entretiens du noyau de sélection et pour le renouvellement du stock de multiplicateurs sur les deux sites (Rébénacq et Sarrance – transfert au stade alevin 50g vers les deux sites- Figure 12).
- Un site basé à Rébénacq, jouissant d'une alimentation en eau par source. Ce site reçoit les alevins multiplicateurs d'Escot à 50g. A l'âge de deux ans, les génitrices réalisent leur première reproduction (œufs non-fécondés commercialisés pour la consommation humaine). Certaines génitrices sont ensuite placées sous contrôle photopériodique pour avancer les dates d'ovulations, selon les protocoles fournis par les travaux de la littérature (Breton et al., 1983). Les génitrices effectuent ainsi deux cycles de reproduction après leur première ponte, produisant des ovocytes toute l'année. Ces ovocytes sont récoltés et transportés à Sarrance pour fécondation et commercialisation. A l'âge de trois ans et demi et après leur troisième cycle de reproduction, les génitrices de Rébénacq sont réformées et commercialisées pour la consommation humaine (très grosses truites principalement pour fumage).
- Un site basé à Sarrance, jouissant d'une alimentation en eau par source. La gestion du renouvellement des génitrices et de leurs cycles de reproduction est la même qu'à Rébénacq, mais les génitrices sont exploitées jusqu'à l'âge de quatre ans et demi et réalisent au cours de leur vie 4 cycles de reproduction (un de plus qu'à Rébénacq). Les individus réformés sont ensuite transformés pour le marché de la nourriture pour animaux de compagnie. La fécondation de tous les ovocytes produits par le groupe (Sarrance et Rébénacq) est réalisée à Sarrance, ainsi que le tri, l'incubation et la commercialisation (conditionnement et expédition) des œufs embryonnés.

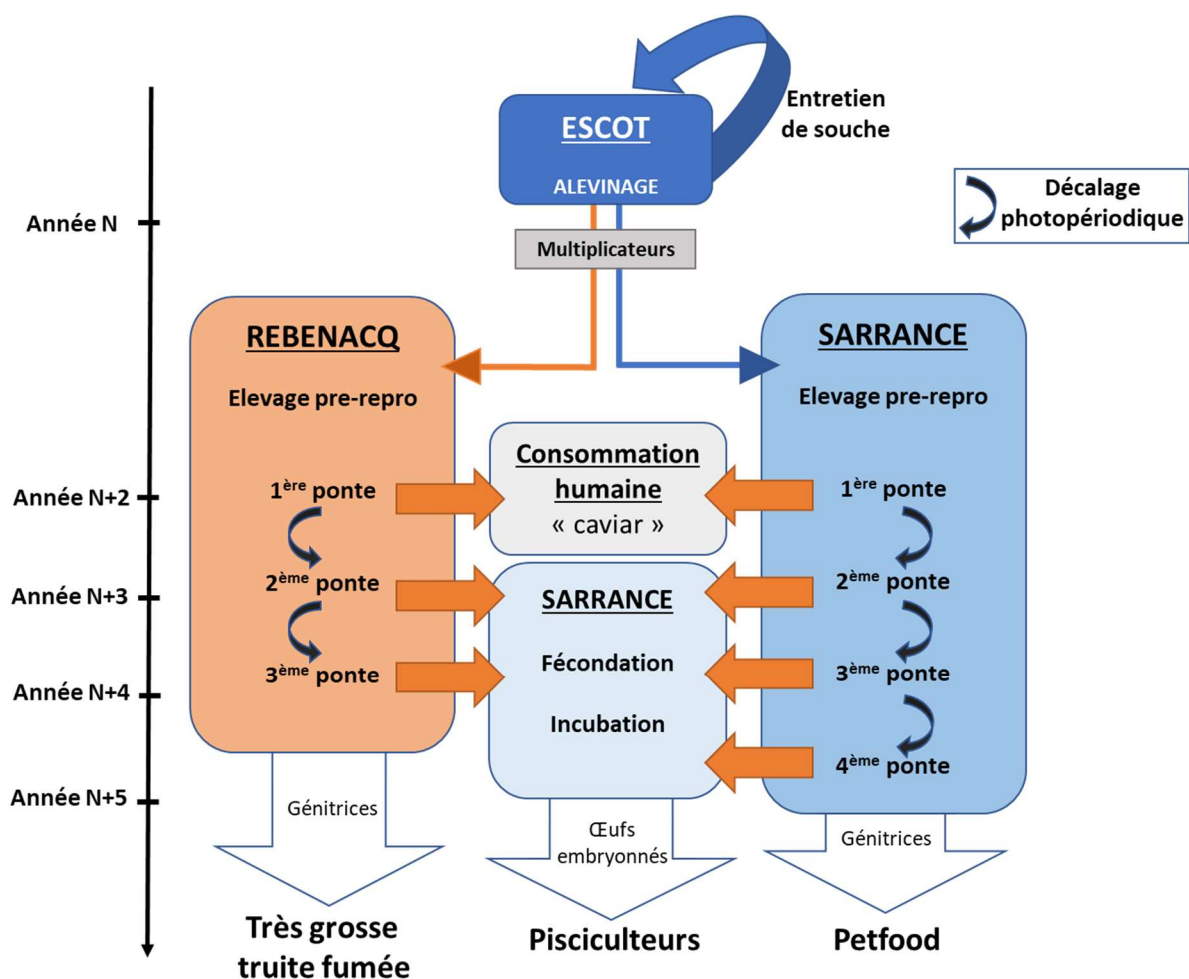


Figure 12 : Conduite d'élevage et plan de production du groupe Viviers (droits dessins Segret)

1.3.2.2.1. Alimentation

Les deux sites présentent les mêmes pratiques d'alimentation et des conduites d'élevage similaires. Les multiplicatrices sont nourries durant toute leur durée d'élevage avec le même aliment, issu d'un unique fournisseur (46% protéine brute, 19% matière grasse brute, 0.9% phosphore, 11.5% cendre, 19 MJ/kg énergie brute, Omega-3 4.8%, Omega-6 1.25%) (Le Gouessant, Lamballe, France). La formule de cet aliment, propriété de l'entreprise, a été établie suite au travail collaboratif de recherche et développement entre le groupe et le fournisseur. Le taux de rationnement journalier appliqué est celui recommandé par le fournisseur (0.6% du poids vif pendant le repos sexuel et 0.3% du poids vif 4 semaines avant le début de la ponte, puis 0.3% du poids vif 3 fois par semaine pendant la ponte).

1.3.2.2.2. Décalages photopériodiques

Les manipulations photopériodiques permettent d'avancer les dates de ponte (novembre sous photopériode naturelle). Elles sont réalisées au cours du deuxième et troisième cycle de reproduction des femelles, afin d'obtenir des pontes estivales puis printanières. Les enchainements photopériodiques sont réalisés selon les protocoles cités précédemment (Breton et al, 1983 ;

(Takashima, 1984 ; Bromage, 1984) en appliquant successivement un repos sexuel de 8 à 12 semaines selon les besoins de la production, puis 10 semaines de jours dits longs (18 à 22H d'éclairage journalier) et 16 semaines de jours dits courts (8 à 12H d'éclairage journalier) à l'issue desquels les génitrices de la bande d'élevage ovulent. Chaque bande d'élevage est composée de 3000 à 5000 génitrices. Ces décalages sont appliqués aux 8 (à Rébénacq) ou 9 (à Sarrance) bandes d'élevage présentes sur chaque site (respectivement 2 et 3 générations de génitrices divisées chacune en 4 et 3 bandes d'élevage). Cette gestion permet une production d'ovocytes constante toute l'année.

1.3.2.2.3. Ponte et suivis qualité

A l'issue des jours courts, chaque génitrice est anesthésiée une fois par semaine (MS-222, 130mg/L) et un test d'ovulation est pratiqué par pression abdominale. Si la génitrice n'a pas ovulé (aucun ovocyte ne sort), elle est renvoyée dans le bassin d'élevage et sera de nouveau testée la semaine suivante. Si la génitrice a ovulé, les œufs sont extraits par massage abdominal (stripping) et recueillis.

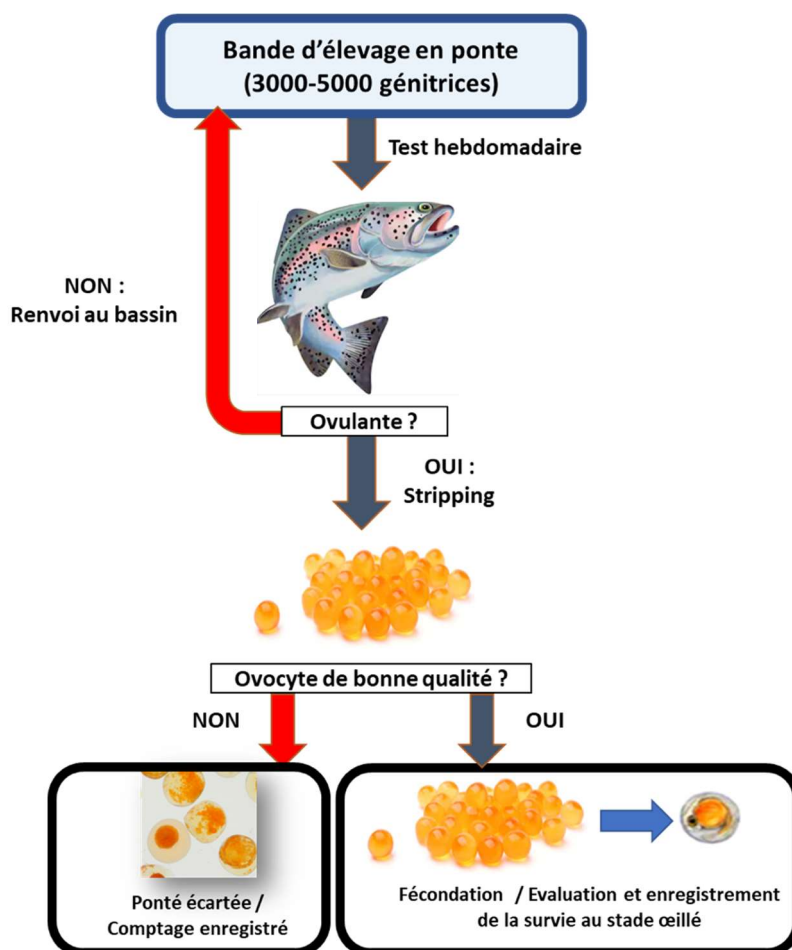


Figure 13: Protocole de ponte et évaluations de la qualité des ovocytes dans la ligne de production du groupe Viviers

La qualité des gamètes est évaluée visuellement par l'opérateur de ponte et les pontes présentant des ovocytes de mauvaise qualité sont écartées de la chaîne de production (on parle du phénotype « luné », discuté ci-après). Un comptage des pontes de bonne qualité et des pontes avec des ovocytes de mauvaise qualité (pontes dites « fausses » par les opérateurs) est réalisé. Chaque semaine, le rapport entre nombre de pontes de mauvaise qualité et nombre de pontes total de la bande est enregistré. Ce rapport sera par la suite calculé pour l'ensemble de la bande d'élevage lorsque toutes les génitrices de la bande auront pondu (figure 13).

Une fois toutes les pontes de la journée réalisée, les œufs de bonne qualité sont fécondés puis mis en incubation. Au cours de l'incubation, le nombre d'œufs morts est relevé après le stade « œillé ». La survie à ce stade est relevée pour chacune des semaines de ponte, et une moyenne globale pour l'ensemble des pontes de la bande d'élevage peut être établie.

I.3.2.2.4. Fécondation

Les ovocytes sont fécondés en moyenne 3 heures après le stripping des femelles. Les néo mâles sont sacrifiés et les gonades mâles sont dilacérées. La laitance est extraite et diluée (1/10ème) dans un conservateur (Storfish, IMV Technologies, L'Aigle, France). Afin d'écarter les laitances de mauvaise qualité, la motilité des spermatozoïdes est contrôlée au microscope avant fécondation (la concentration n'est pas contrôlée). Les ovocytes sont alors fécondés par lot de 4 litres. Chaque lot est fécondé par les spermatozoïdes issus d'au moins 6 mâles différents, afin de lisser les variabilités de qualité individuelle du sperme. La laitance est mise en contact avec les œufs (10mL de solution diluée pour 1L d'ovocytes) et un activateur de motilité (Actifish, IMV Technologies, L'Aigle, France). Après 5 minutes de repos, le mélange (œuf, laitance et activateur) est hydraté abondamment puis transféré dans les incubateurs.

I.3.2.3. Le défaut de qualité observé

Le site de Sarrance est touché de manière récurrente par un défaut de qualité des pontes (voir chapitre 1 partie 1 & 3 pour une description fine de la fréquence et de la sévérité du phénomène). Ce défaut de qualité se manifeste au sein des pontes par des ovocytes qui présentent un phénotype dit « luné » dès l'ovulation (figure 14.A). Ce phénotype, renseigné par la littérature pour les salmonidés (Mansour, 2007 ; Nomura, 1984) et connu des professionnels de la reproduction, est significatif d'ovocytes non fécondables car ayant perdu leur homéostasie (Gray, 1932). Des ovocytes présentant cet aspect sont généralement observés à l'issu d'un vieillissement post-ovulatoire trop long dans la cavité abdominale (Aegerter & Jalabert, 2004 ; Sakai, 1975 ; Samarin et al, 2008 ; 2015 ; Springate, 1984 ; Valdebenito et al., 2015). D'autres études montrent que ce phénotype est aussi présent chez les salmonidés

directement après l'ovulation dans des situations d'atrésie au sein des tissus folliculaires (Valdebenito et al., 2015).

A Sarrance, vu les passages hebdomadaires des génitrices dans une eau à $9\pm 0.4^{\circ}\text{C}$ (soit une durée maximale de vieillissement de 66°J dans la cavité abdominale) et à la lumière des durées de conservation dans la cavité abdominale renseignées par la littérature citée précédemment (aucune diminution de la survie à l'éclosion à 84°J observée dans l'étude Aegerter & Jalabert (2004), une diminution de la qualité des œufs à partir de 115°J dans l'étude de Samarin et al. (2008)), le phénomène observé à Sarrance ne semble pas dû à un vieillissement excessif après l'ovulation (vieillissement post-ovulatoire) mais à un défaut de qualité observable dès l'ovulation, ce qui constituera notre hypothèse de travail.

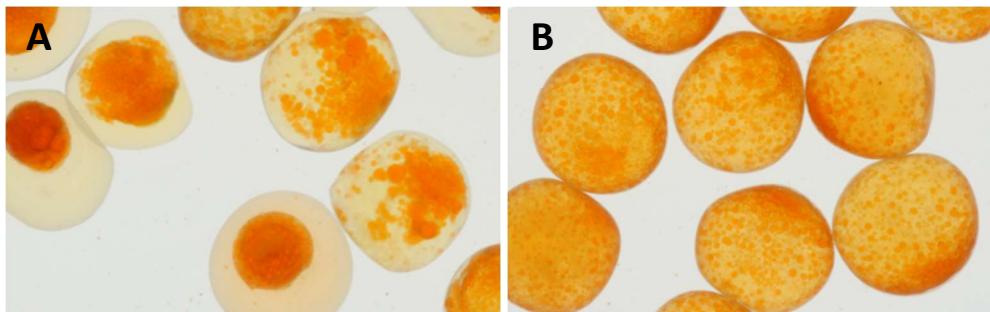


Figure 14 : Photographies d'une ponte de mauvaise qualité (A) et de bonne qualité (B) à Sarrance, photographiées avec un objectif macroscopique 100mm.

Ce défaut de qualité n'apparaît que très peu sur le site de Rébénacq pour des multiplicatrices sœurs et cousines des génitrices de Sarrance ($3,2\pm 1.4\%$ de pontes écartées de la chaîne de production en moyenne sur les 3 dernières années, contre $19,7\pm 6,9\%$ sur la période 2016-2018 à Sarrance), malgré une conduite d'élevage et une génétique similaire. L'occurrence très faible du phénomène sur le site de Rébénacq a permis d'utiliser ce site comme site témoin lors des analyses réalisées au cours de ce programme. Au contraire, le site de reproduction de Lees-Athas (INRAE NuMÉA) présenterait des défauts de qualité similaires à ceux rencontrés à Sarrance (données non-chiffrées et non-publiées, issues de communication avec les professionnels et les chercheurs travaillant sur le site) alors que la génétique des génitrices diffère de celle de Viviers. Les conditions environnementales (qualité de l'eau d'élevage et profil hydrogéologique) des sites de Sarrance et Lees-Athas sont très proches. Toutefois vu l'absence de données chiffrées et la difficulté de mener les expériences sur trois sites simultanément, le site de Lees-Athas n'a pas été utilisé au cours de l'étude, mais mériterait d'être exploité à l'avenir.

I.4. Déroulement du projet

Ce projet de thèse a pour objectif général de caractériser ce défaut de qualité. Les objectifs détaillés sont :

- L'identification des causes possibles à l'origine des défauts de qualité des œufs, qu'elles soient d'ordre environnementales et/ou zootechniques.
- La détermination des mécanismes physiologiques et moléculaires sous-jacents.
- La mise en place de mesures correctives.

Le travail réalisé sera présenté ci-après, en 3 chapitres, chacun répondant à un de ces objectifs.

La première partie du travail, sujet du chapitre 1, correspond à la description fine de l'environnement d'élevage et des situations d'occurrence du phénomène. Cette description a été réalisée dans un premier temps par l'analyse des données d'élevage enregistrées par la société VDS depuis 2008. Cette méta-analyse permet la compréhension du modèle d'occurrence des défauts de qualité, par la mise en évidence de corrélations entre l'apparition de ces défauts et certains paramètres environnementaux et d'élevage. La seconde partie de la description a été réalisée par la caractérisation de l'environnement d'élevage et la comparaison avec d'autres sites d'élevages non-sujets à des défauts de qualité des pontes. Le but était de cibler les principales différences de composition de l'eau et les variations observables au cours d'un cycle d'élevage.

La seconde partie du travail est présentée dans le chapitre 2. Le premier axe de cette partie a été le phénotypage de pontes de mauvaise qualité et des géniteurs dont elles sont issues, afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aboutissant à une ponte de mauvaise qualité. Des dissections de génitrices touchées par le phénomène ont été réalisées. Des biotechnologies innovantes de phénotypage, comme l'échographie pour l'analyse de la maturation ovocytaire ou l'imagerie numérique pour l'évaluation de la qualité des œufs (Cardona et al. 2021), ont été utilisées pour étudier le déroulement des mécanismes au cours des phases finales d'ovogenèse (maturation ovocytaire et ovulation). La durée de la maturation ovocytaire, la qualité de l'hydratation des ovocytes avant l'ovulation et le niveau d'expression des gènes jouant des rôles clés dans ces mécanismes ont été étudiés en comparant géniteurs des sites touchés et géniteurs des sites indemnes (les travaux cités ci-avant sont présentés dans l'article publié dans le journal Aquaculture, Segret et al., 2021). Une étude comparative des profils transcriptomiques sur le site contrôle et le site touché a été réalisée pour cibler les gènes anormalement exprimés chez les individus concernés par le phénomène.

Le chapitre 3 présente les résultats d'une expérience de mise en place de mesures correctives. L'objectif de l'expérience a été de tester la possibilité de remédier à la carence ionique. Les génitrices

de Sarrance ont été nourries avec un aliment enrichi en minéraux pendant un cycle complet de gamétogenèse. La comparaison des résultats de fécondité entre animaux témoins ou nourris avec un aliment enrichi en sel a été réalisée.

II. Chapitre 1 : Meta-analyse des données environnementales et d'élevage

Le travail présenté dans ce chapitre caractérise l'environnement d'élevage (facteurs environnementaux et zootechniques). Ce chapitre se compose de deux parties, la première décrivant la méta-analyse qui a été menée afin d'établir les liens entre le modèle d'apparition du défaut de qualité et les variations des différentes variables zootechniques et environnementales considérées. La seconde partie propose une comparaison de la composition chimique de l'eau de Sarrance (site touché) à celle de l'eau de Rébénacq (site contrôle), afin de déterminer les principales différences dans les profils ioniques de ces eaux.

II.1. Description des conditions d'apparition du phénomène au sein des bandes d'élevage

II.1.1. Introduction

La reproduction des truites arc-en-ciel nécessite des conditions d'élevage précises et maîtrisées. De nombreux facteurs influencent la qualité de la reproduction de la truite arc-en-ciel. Comme évoqué dans la partie « contexte scientifique », le patrimoine génétique des génitrices, les facteurs zootechniques tels que le stress, l'alimentation, les manipulations photopériodiques, ainsi que des facteurs environnementaux tels que la température ou les caractéristiques physico-chimiques de l'eau d'élevage sont connus pour influencer la reproduction de la truite arc en ciel (Bobe & Labbé, 2010 ; Bromage, 1992 ; Brooks, 1997 ; Migaud, 2013). Toutefois les situations d'élevage sont généralement complexes, avec des particularités conditionnées par l'environnement, les installations et la conduite d'élevage. Malgré les connaissances et la maîtrise des cycles et des procédés de reproduction, aucune des solutions correctives mises en place dans le passé (diminution de la densité d'élevage, modification des cycles photopériodiques, travail sur la formulation de l'aliment) n'a été efficace pour enrayer le défaut de qualité présent sur le site d'étude. La problématique, complexe et multifactorielle, est difficile à comprendre dans son intégralité. Toutefois, malgré les variations zootechniques importantes au cours des années (aliment, photopériodes, bassins, biomasses), le phénomène est notablement récurrent et le facteur environnemental (qualité de l'eau) est traditionnellement évoqué comme une cause probable du défaut de qualité par les éleveurs et les chercheurs ayant travaillé à Sarrance, sans qu'aucune preuve ne soit venue étayer ces croyances. Bien que notre approche soit sans *a priori*, une de nos hypothèses concerne la composition de l'eau d'élevage.

Des données zootechniques et environnementales ont été enregistrées sur le site de reproduction depuis 2008. Ces données, liées à la qualité des pontes et aux conditions de production, ont été relevées chaque semaine pendant plus de 10 ans. La complexité des situations et la colinéarité entre

les variables présentes dans le jeu de données ont jusqu'alors empêché l'extraction d'un modèle clair d'apparition de ce défaut de qualité en fonction des facteurs zootechniques et environnementaux.

L'objectif de cette partie est de cibler les facteurs impliqués dans ce phénomène pour orienter la suite des investigations. Pour ce faire, une méta-analyse est présentée. Cette analyse appréhende les situations dans lesquelles le défaut de qualité prend des valeurs extrêmes. L'exploration des données a été faite dans un premier temps en étudiant l'occurrence du phénomène ces dernières années. Une analyse en composantes principales (ACP) avec classification hiérarchique a été réalisée, afin d'observer les comportements des différentes variables zootechniques et environnementales par rapport aux variables d'intérêt de l'étude (variables liées aux performances et à la qualité des pontes). La validation des résultats de l'exploration par des tests de corrélation est ensuite présentée, démontrant le lien statistique entre les variables d'intérêt et les variables révélées par l'ACP. Pour compléter l'étude, une analyse du modèle d'apparition des pertes de qualité au sein des bandes d'élevage a été réalisée en intégrant la dimension temporelle. Cette étude permet d'identifier les génitrices ou les périodes de la ponte (au sein d'une bande) particulièrement touchées par les diminutions de qualité.

II.1.2. Matériel et méthodes

II.1.2.1. Présentation des bases de données

Les données utilisées pour la méta-analyse présentée ici sont issues des relevés de données réalisés par l'entreprise Viviers de Sarrance au cours des dix dernières années d'élevage au moment de l'analyse (2008-2018). Deux jeux de données ont été utilisés au cours de l'analyse présentée dans ce paragraphe :

- Un jeu de données présentant les caractéristiques et performances globales de ponte de chaque bande d'élevage. Ce jeu de donnée sera désigné ci-après comme « inter-ponte ». Une ponte pour une bande d'élevage représente un individu. Le jeu de données est composé de 93 individus. Ce jeu de données est composé de 16 variables. Ces variables peuvent être regroupées au sein de 4 grandes catégories, les variables dites temporelles, les variables d'élevage, les variables liées aux performances de ponte et les variables environnementales (tableau 1).
- Un jeu de données présentant les résultats de ponte hebdomadaires. Cette base de données est désignée ci-après « intra-ponte » (tableau 2). Une semaine de ponte pour une bande d'élevage en particulier représente un individu. Le jeu de données est composé de 443 individus et de 6 variables. Ces variables peuvent être regroupées en trois catégories, les variables temporelles, les variables d'élevage et de ponte et les variables de performance de ponte.

II.1.2.2. Analyse des données

L'ensemble de l'analyse de données a été réalisé en utilisant le logiciel R (R Core Team, 2014) et l'environnement Rstudio (Racine, 2012). Les figures ont été produites en utilisant le package ggplot2 (Wickham, 2009). L'analyse du pourcentage annuel moyen de pontes touchées par le défaut de qualité a été réalisée grâce à un U-test. Dans ce cas de comparaison multiple, la correction des seuils de significativité de Bonferroni a été appliquée (Dunn, 1959). Par soucis de lisibilité, les résultats des comparaisons de groupes ont été reportées en Annexe 1.

Tableau 1 : Descriptif des variables de la base de données "inter-ponte"

Variables	Unité	Description
Variables temporelles		
Année de la ponte	-	De 2007 à 2018
Mois de la ponte	-	-
Variables d'élevage		
Bassin d'élevage	-	-
Densité d'élevage	Kg.m ⁻³	Biomasse de génitrices dans le bassin / Volume du bassin
Poids moyen des génitrices	Kg	-
Âge des génitrices	mois	-
Année de naissance génitrices	-	-
Nombre génitrices dans bassin	-	-
Variables de performances de ponte		
% de pontes de mauvaise qualité	%	Nombre de pontes écartées (mauvaise qualité) / Nombre total de pontes
Survie au stade oeillé	%	Survie moyenne des œufs issus des pontes conservées après stripping
Fécondité absolue	Nb œufs	Nombre d'œufs par femelle
Fécondité relative	Oeufs / kg	Nombre d'œufs par femelle / Poids moyen des femelles
Durée de la ponte	Jours	Durée en jours entre les premières et les dernières ovulations de la bande (T0 = 5% de génitrices ayant ovulés; Tfin = 95% de génitrices ovulées)
Taille des œufs	mm	
Variables météorologiques		
Précipitations jours longs	mm	Précipitations cumulées pendant les 26 semaines précédant l'ovulation
Conductivité moyenne ovulation	µS.cm ⁻¹	Conductivité moyenne pendant les 16 semaines précédant les dernières ovulations

Tableau 2: Descriptif des variables de la base de données "intra-ponte"

Variables	Unité	Description
Variables temporelles		
Semaine	-	Semaine de ponte
Mois	-	Mois de ponte
Année	-	Année de ponte
Variables d'élevage et de ponte		
Bassin d'élevage	-	
Nombre total de semaines de pontes de la bande	-	Nombre de semaines nécessaire à l'ovulation de 95% des génitrices de la bande
Taux de génitrices pondues dans la bande d'élevage	%	Nombre de génitrices ayant pondu / Nombre total de génitrices
Variables de performances de ponte		
Pourcentage de pontes de mauvaise qualité	%	Nombre de pontes écartées (mauvaise qualité) / Nombre total de pontes

II.1.2.3. Analyse en composantes principales et classification hiérarchique

Une ACP a été réalisée afin d'explorer le modèle de variation des variables quantitatives d'intérêt (variables de performances de ponte) (Abdi et al., 2010 ; Husson et al., 2017 ; Jolliffe, 2002). Pour l'analyse présentée sur la base de données « inter-ponte », 6 variables quantitatives d'intérêt ont été choisies car présentant peu de colinéarité et des corrélations avec les premières composantes principales. Ces variables sont la densité d'élevage, la conductivité moyenne de l'eau, le poids moyen des génitrices, le pourcentage de pontes de mauvaise qualité, la survie moyenne des œufs au stade œillé, la fécondité relative des génitrices et le nombre de semaine de ponte pour chaque bande d'élevage. Ces données ont été transformées par centrage réduction.

Une analyse des valeurs propres a été réalisée afin de mesurer la variance expliquée par chaque composante principale de l'analyse. Cette analyse permet de déterminer le nombre de composantes principales (dimension ou Dim) à prendre en considération. Seules les valeurs propres supérieures à 1 (expliquant plus de 10% de la variance) ont été retenues (Kaiser, 1961 ; Peres-Neto et al., 2005). Les résultats de l'analyse des valeurs propres sont présentés.

Une classification hiérarchique (clustering) sur composante principale a ensuite été réalisée dans le but d'identifier des groupes d'individus similaires et ainsi d'étudier le comportement des variables d'intérêt au sein de ces groupes d'individus. L'ACP a permis de réduire la dimension des données à quelques variables continues, la classification hiérarchique permet de confirmer et d'affiner les résultats préliminaires en caractérisant les variables les plus contributives à la définition de chaque groupe, ainsi que le comportement de ces variables au sein du groupe, comparativement au comportement global de ces variables sur le jeu de données (Husson et al., 2010).

II.1.2.4. Tests de corrélation

Les résultats obtenus ont été validés par des tests de corrélation de Kendall, la distribution des données ne suivant pas une loi normale (test de Shapiro-Wilk).

II.1.2.5. Analyse du modèle d'apparition des pertes de qualité au sein d'une bande d'élevage

Pour compléter l'étude, une analyse temporelle du modèle d'apparition des pertes de qualité au sein des bandes d'élevage a été réalisée. Le but était d'identifier le moment à partir duquel la perte de qualité intervient majoritairement au sein d'une bande d'élevage en ponte. Pour cette étude, le jeu de données dit « intra-ponte » (résultats hebdomadaires des bandes) a été utilisé. Ce jeu de données a permis d'étudier le défaut de qualité en fonction du moment où la génitrice a pondu, par rapport aux autres individus de la même bande. A Sarrance, chaque bande est composée de 3000 à 5000 génitrices, qui mettent en moyenne 64 jours à pondre. Afin d'être comparables, les performances hebdomadaires

de ponte ont été étudiées en fonction d'un pourcentage d'avancement de la ponte (ratio entre le nombre de poissons ayant pondus dans la bande et le nombre de poissons total dans la bande).

II.1.3. Résultats et discussion

II.1.3.1. Le défaut de qualité est récurrent mais variable

Le taux moyen de pontes touchées par le défaut de qualité varie entre 18.9% et 35.4% selon les années (figure 15). Les différences de résultat d'une bande d'élevage à l'autre créent une grande variabilité au sein d'une même année : par exemple, pour l'année 2015, où 9 bandes d'élevage ont pondu, le taux de défaut de qualité variait de 18.1% à 66.7% selon les bandes d'élevage.

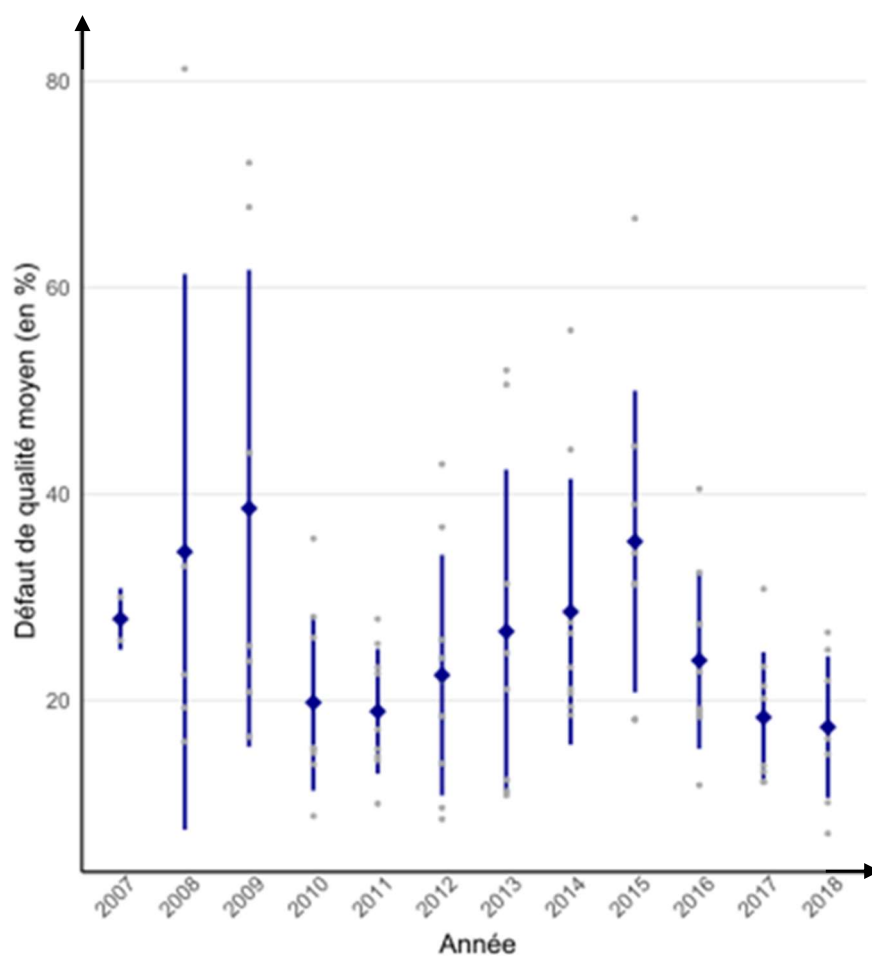


Figure 15: Pourcentage moyen de pontes de mauvaise qualité au sein des bandes au cours des dernières années sur le site de Sarrance

Les comparaisons réalisées ne montrent pas de différence significative entre les années de ponte. La correction de Bonferroni rend toutefois le test de comparaison très stringent (niveau de signification appliqué pour rejeter H_0 : $p.value < 0.0008$). Les résultats sont parfois inférieurs aux seuils de significativité généralement utilisés, suggérant que certaines années tendent à être plus touchées (significativités des tests présentés en annexe, tableau 3.A).

Ces résultats illustrent la récurrence du phénomène sur le site d'étude, avec des taux variables et importants de pontes de mauvaise qualité chaque année. A noter que pour des multiplicateurs de la même lignée génétique Viviers, élevés dans des conditions zootechniques similaires, le phénomène n'est pas observé sur le site voisin de Rébénacq, lui aussi producteurs d'œufs fécondés.

II.1.3.2. Le défaut de qualité est corrélé à plusieurs variables d'élevage et environnementales

L'analyse des valeurs propres (figure 17) indique que les trois premières composantes principales sont suffisamment explicatives pour être les seules retenues dans l'analyse (seuil à 10%) (Kaiser, 1961 ; Peres-Neto et al., 2005). La première composante principale présente une variance expliquée de 44% soit une projection très intéressante des relations inter-variables. Six des sept variables analysées, dont la variable d'intérêt « qualité des pontes », contribuent à plus de 7% dans la définition de la composante principale 1 (min = 8.9% pour la variable densité ; max = 28.0% pour la variable défaut de qualité) (figure 17.B). Les valeurs absolues des coefficients de corrélation entre ces 6 variables et la

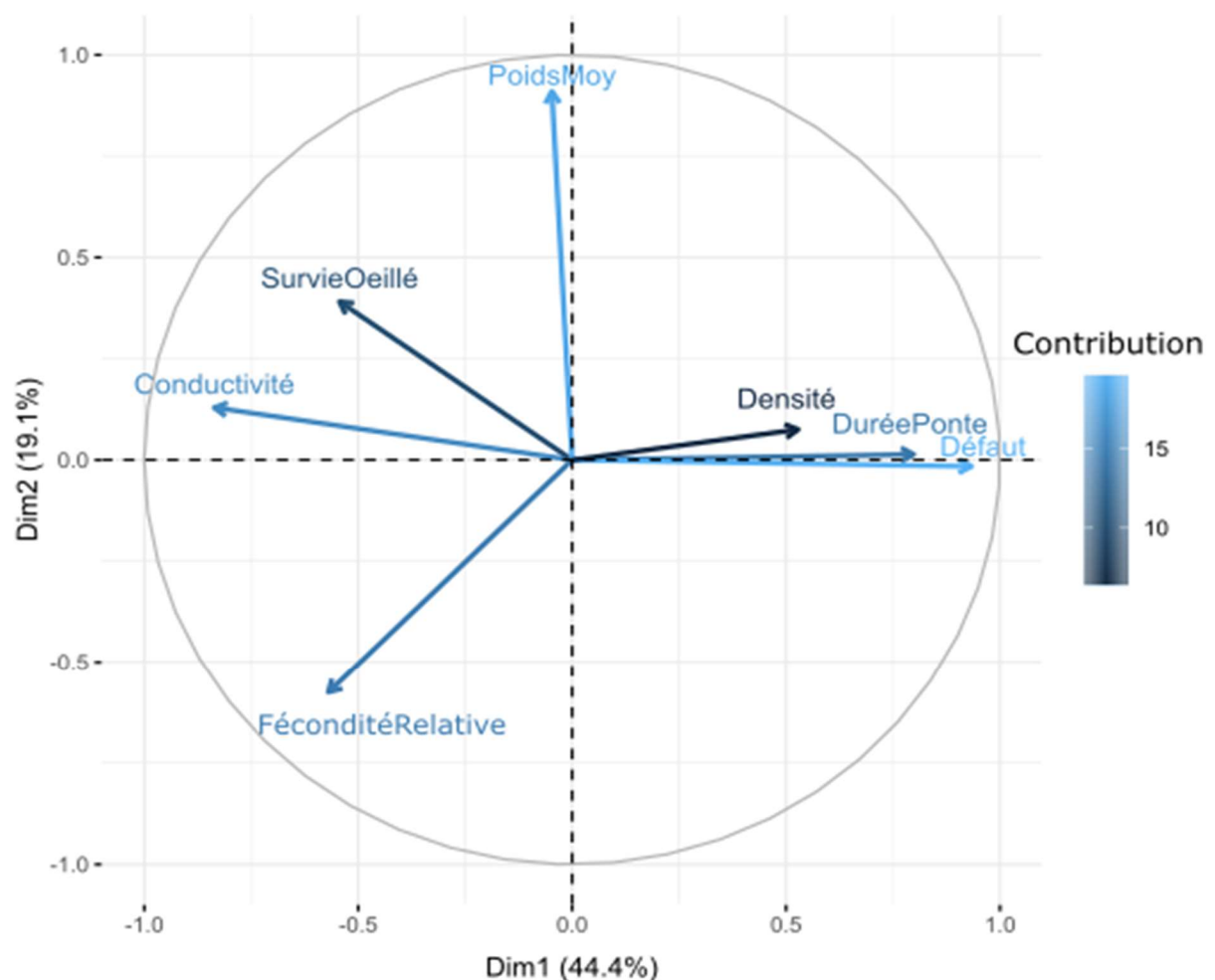
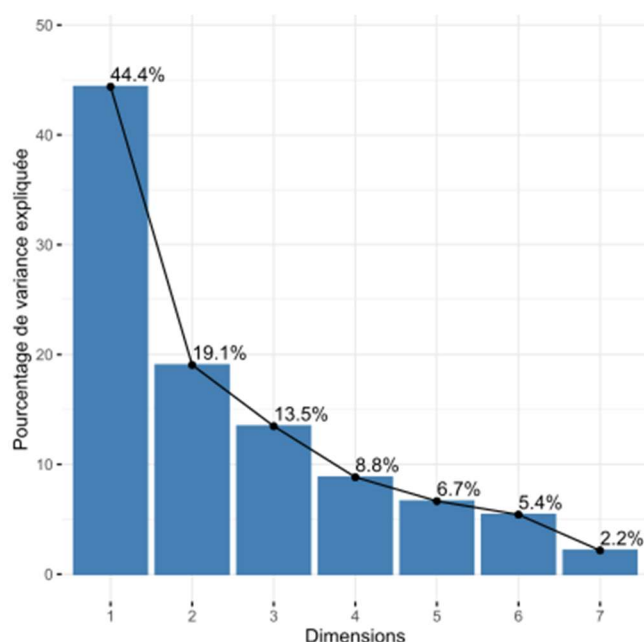


Figure 16: Cercle de corrélation des variables de l'analyse en composantes principales.
Analyse réalisée sur les variables zootechniques et environnementales enregistrées à Sarrance ces dix dernières années.

composante principale 1 sont supérieures à 0.27 (min = 0.27 pour la variable densité ; max = 0.87 pour la variable défaut de qualité) (figure 17.A). L'analyse de cette composante principale est très explicative.



La projection des corrélations entre variables montre que l'apparition du défaut de qualité est corrélée à la durée de la période de ponte de la bande et à la densité d'élevage (figure 16). Au contraire, la conductivité de l'eau d'élevage, la survie au stade œillé et, dans une moindre mesure, la fécondité relative des génitrices, sont des variables anti-corrélées au défaut de qualité.

Figure 17: Variance expliquée par les valeurs propres de l'ACP sur les variables zootechniques et environnementales enregistrées à Sarrance

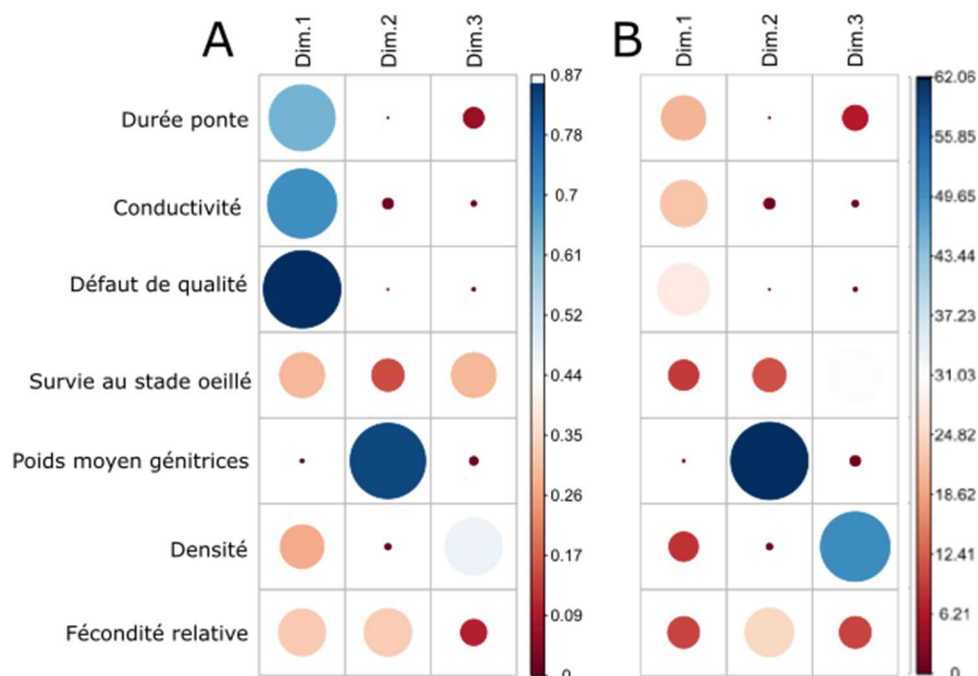


Figure 18: (A) Contributions et (B) corrélations des variables zootechniques et environnementales de l'ACP avec les trois premières composantes principales

Pour chaque variable, la taille et la couleur du cercle représentent l'importance de (A) la contribution de cette variable et de (B) la corrélation de cette variable avec la composante principale concernée.

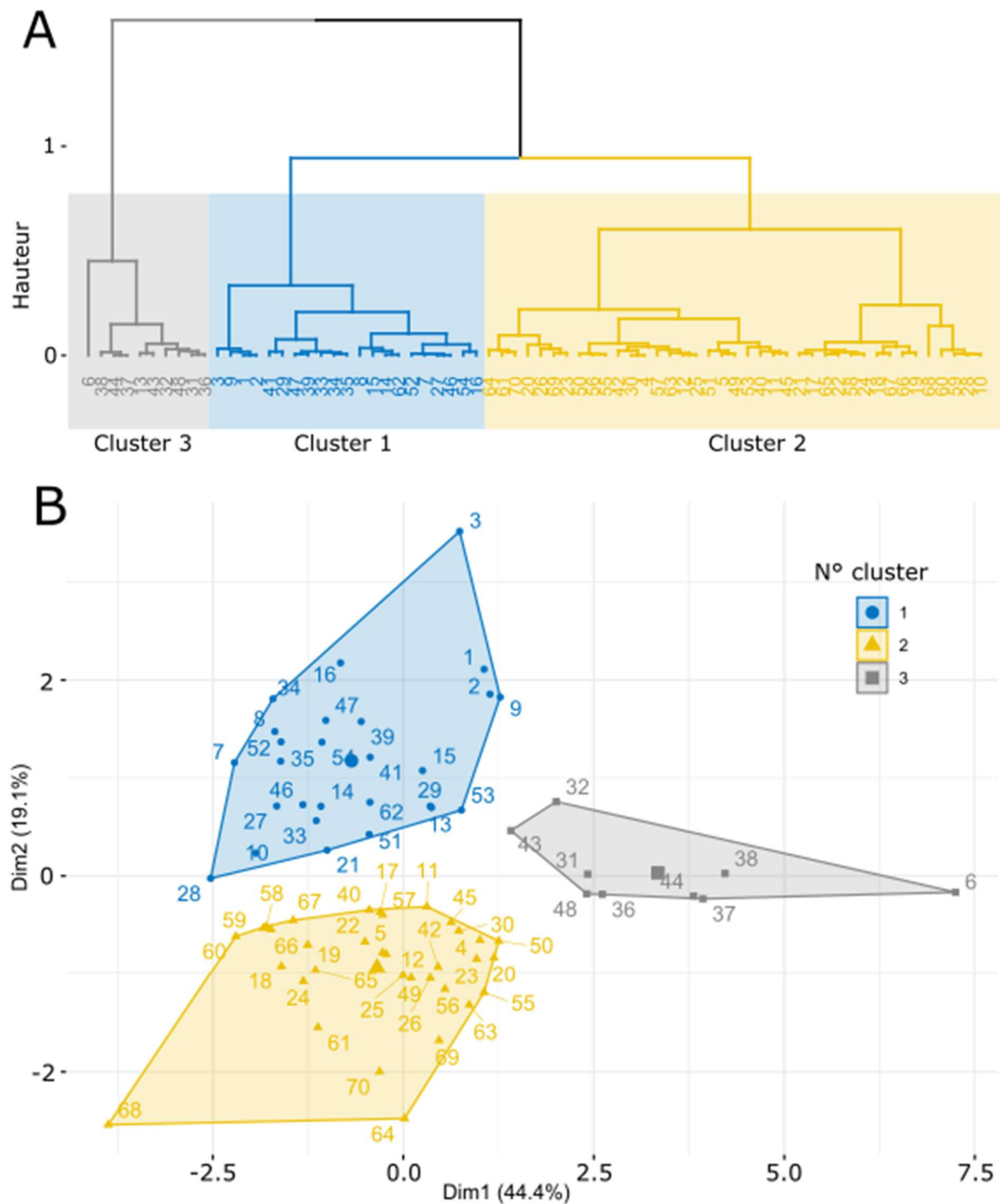


Figure 19: Résultats de la classification hiérarchique des individus de l'ACP sur les variables zootechniques et environnementales enregistrées à Sarrance

Ces tendances sont parfaitement illustrées par la classification hiérarchique des individus projetés sur les deux premières composantes principales (figure 19). On observe la discrimination de trois groupes d'individus avec des caractéristiques de projection similaires, appelés clusters. Le cluster 3 présente un groupe d'individus avec une projection moyenne du groupe de 3.34 selon la composante principale 1. Cette projection positive sur la dim.1 traduit des valeurs importantes pour les variables d'intérêt de l'étude : le cluster 3 présente une densité moyenne, une durée de ponte, une fécondité relative et un défaut de qualité plus importants que la moyenne des observations. Au contraire, la conductivité moyenne est plus faible au sein de ce groupe que sur l'ensemble des individus (annexe 2). Les variables de survie des œufs au stade œillé et de poids moyen des génitrices ne sont pas associées significativement au modèle du cluster 3.

Ainsi le défaut de qualité est plus important dans des situations où les génitrices sont élevées en forte densité. De plus, dans les bandes d'élevage où les génitrices sont « désynchronisées » (longue durée entre les premières et les dernières pondeuses pour des génitrices exposées à la même photopériode), la qualité des pontes diminue. Ces résultats sont discutés plus tard dans cette partie.

Une augmentation de la conductivité se traduit par une meilleure qualité des pontes. Cette observation originale est approfondie et discutée ci-après. La survie au stade œillé et la fécondité relative suivent, dans une moindre mesure, la même tendance (faible selon la composante principale 1). Ces résultats montrent que la perte de qualité est générale dans la bande d'élevage. Les génitrices pondent moins et les pontes non-écartées au premier tri (pontes non-comptabilisées dans la variable « défaut de qualité ») présentent des survies faibles. Enfin, le défaut de qualité est indépendant du poids moyen des individus sur la dim.1.

Ces résultats ne concernent que les projections sur la composante principale 1 (40% de variabilité expliquée dans la projection) et sont approfondis dans les paragraphes suivants.

II.1.3.3. Le défaut de qualité est exacerbé par le stress

Les résultats préliminaires ont permis d'identifier la densité d'élevage comme étant une variable suivant les mêmes évolutions que le défaut de qualité. Une analyse plus précise a permis de démontrer la corrélation qui existe entre les deux variables (coefficient de corrélation de Kendall : 0.29 ; p.value = 5.20E-04).

La densité d'élevage agit directement sur le niveau de stress et l'état physiologique des salmonidés (Fagerlund et al., 1981; Leatherland & Cho, 1985 ; Schreck & Patino, 1985; Trzebiatowski et al., 1981). Ce stress se traduit dans un premier temps par une augmentation du niveau de cortisol (Campbell, 1994), mais aussi par des variations des différentes espèces ioniques dans le plasma sanguin (Na^+ , K^+ , Mg^{2+}) (Laidley & Leatherland, 1988). L'impact du stress sur la qualité de la reproduction des poissons

a été largement étudié (Contreras-Sanchez, 1995 ; Small et al, 2008). La perte de qualité des œufs provoquée par une augmentation chronique du niveau de stress chez les génitrices, démontrée dans notre étude, a été plusieurs fois observée dans la littérature (Campbell, 1992 ; 1994). L'effet du stress sur les différents indicateurs de qualité habituellement mesurés dépend de la sévérité du stress et de la phase du cycle de reproduction pendant laquelle le stress est appliqué (Schreck, 2001). Dans le cas de l'étude présentée ici, le stress lié aux conditions de densité est chronique et appliqué tout au long du cycle d'ovogenèse.

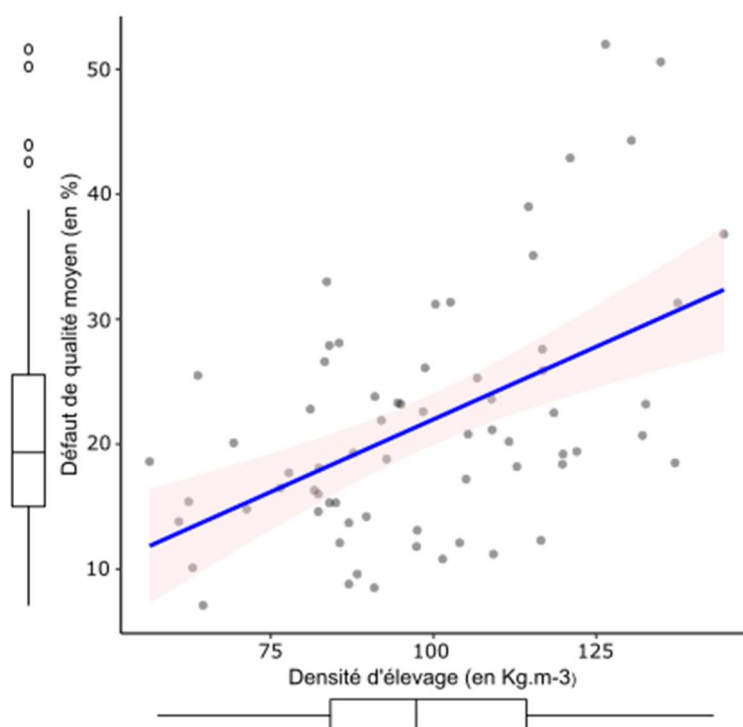


Figure 20: Taux de ponte présentant un défaut de qualité au sein de la bande en fonction de la densité d'élevage des génitrices de la bande à Sarrance

Il est toutefois original de remarquer que pour les densités d'élevage les moins importantes, le taux moyen de pontes de mauvaise qualité reste supérieur à ce qui a pu être observé sur le site de production d'œufs de Rébénacq, pour des densités similaires (défaut de qualité moyen de $3.2\% \pm 1.4\%$ pour des densités entre 40 et 70kg.m^{-3}). De plus des observations non-mesurées montrent que des génitrices élevées dans des conditions de densité modérées sur le site de Sarrance (40 à 50kg.m^{-3} – relativement basses par rapport aux densités observées dans l'ACP), avec un nombre réduit de manipulations (génitrices du noyau de sélection) présentent elles aussi des défauts de qualité. Ce résultat suggère que les densités fortes et le stress qu'elles induisent sont des facteurs aggravant du défaut de qualité, mais que ce défaut apparaît quelle que soit la densité d'élevage des génitrices. D'autres facteurs entrent en cause dans l'apparition de ce phénomène.

II.1.3.4. Le défaut de qualité touche les bandes d'élevage à ponte « désynchronisées » et les pondeuses « tardives »

II.1.3.4.1. Les bandes d'élevage dont les ovulations des génitrices sont mal synchronisées présentent une diminution de la qualité des pontes

Il existe une corrélation très significative entre la durée de la ponte de la bande et le défaut de qualité au sein de cette bande d'élevage (figure 21 ; coefficient de corrélation de Kendall : 0.63 ; p .value = $8.60E-15$). Une bande dont la ponte s'étale dans le temps va être plus touchée par des pertes de qualité. L'aspect temporel de ce dérèglement est souligné ici et sera discuté dans le second chapitre de l'étude.

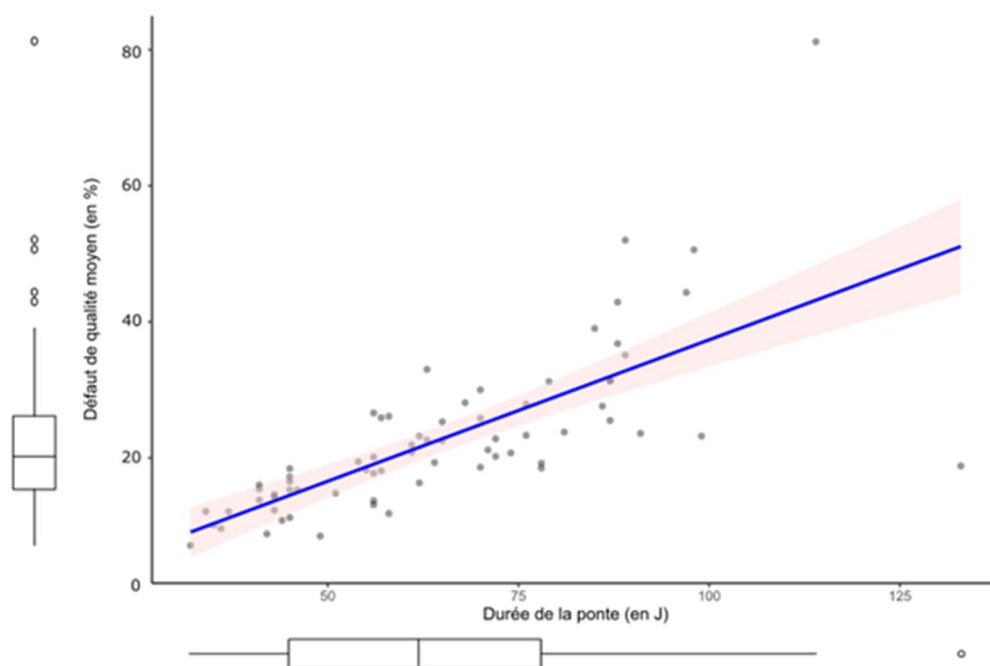


Figure 21 : Taux de ponte présentant un défaut de qualité au sein de la bande en fonction de la durée de la ponte de la bande à Sarrance

Les manipulations photopériodiques réalisées sur les sites, présentées précédemment dans le contexte du projet, permettent d'avancer les dates de ponte et sont basées sur les résultats des travaux publiés (Breton et al, 1983 ; Takashima, 1984 ; Bromage, 1984). Dans ces études, la ponte d'une bande d'élevage dure entre 42 et 63 jours en ponte naturelle ou sous décalage photopériodique. Alors qu'à Rébénacq les durées de pontes d'une bande sont comparables à celles présentées dans la littérature, la ponte d'une bande d'élevage à Sarrance dure en moyenne 68 jours et 25% des bandes pondent durant plus de 78 jours. La ponte d'une bande d'élevage est donc anormalement étalée dans le temps. Il est peu probable que cette désynchronisation soit dépendante de la lignée génétique des individus étudiés dans la mesure où les chiffres obtenus à Rébénacq permettent d'écarter cette

hypothèse. La corrélation entre ponte anormalement longue et défaut de qualité suggère un dérèglement dans la temporalité de l'ovulation.

II.1.3.4.2. Le défaut de qualité touche les individus qui pondent tardivement au sein des bandes d'élevage

Les résultats précédents ont été complétés par une caractérisation du modèle d'apparition de la perte de qualité au sein d'une bande d'élevage (figure 22). Cette étude souligne que le défaut de qualité moyen est plus marqué en début et en fin de bande d'élevage.

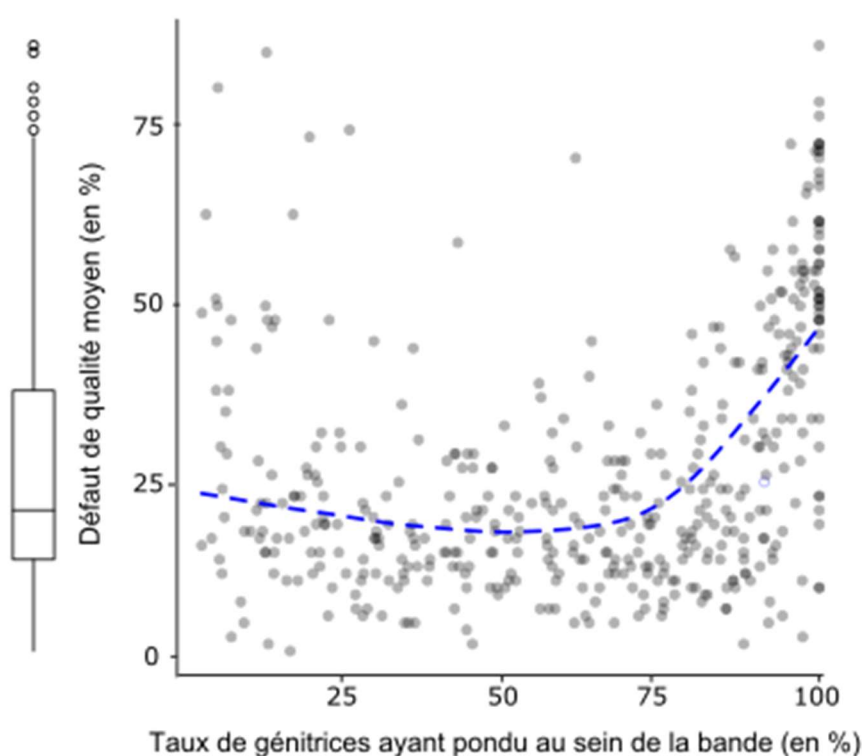


Figure 22 : Taux de ponte présentant un défaut de qualité en fonction du taux de génitrices ayant pondues au sein de la bande d'élevage à Sarrance (courbe moyenne en bleu).

Les premières pondeuses de la bande présentent un pourcentage de pontes de mauvaise qualité supérieur aux pondeuses temporellement « médianes ». Vu les obligations de l'entreprise, le stripping des individus n'est effectué que lorsque 5% des génitrices de la bande a ovulé. Cette première étape de stripping a parfois lieu plusieurs semaines après les premières ovulations au sein de la bande d'élevage. Le défaut de qualité observé en début de ponte serait dès lors la traduction d'un vieillissement post-ovulatoire dans la cavité abdominale de la génitrice. Ce phénomène de surmaturation a été plusieurs fois décrit dans la littérature chez le poisson (Bromage, 1994 ; Fitzpatrick et al., 1987) et plus particulièrement chez la truite arc-en-ciel (Aegerter, 2004 ; Billard, 1981 ; Escaffre, 1976 ; Lahnsteiner, 2000 ; Sakai, 1975).

Les résultats de l'ensemble des bandes suggèrent que l'augmentation du défaut de qualité en fin de ponte est élevée (+24% de défaut de qualité moyen entre le jour où 75% de génitrices ont pondu et le jour où la dernière génitrice a été vidée de ses œufs- 100% en abscisse). Le phénomène de perte de qualité touche donc particulièrement les dernières pondeuses de la bande d'élevage.

Les baisses de qualité de ponte sont marquées pour les bandes d'élevage dont la durée de pontes s'étire et ces baisses touchent particulièrement les pondeuses les plus tardives de ces bandes d'élevage. Au vu de ces résultats et de ceux présentés plus tôt sur l'impact de la densité sur la qualité des pontes, il est intéressant de noter que l'exposition des génitrices au stress a un impact sur les dates d'ovulation des poissons (Schreck, 2001). Durant la vitellogenèse des truites arc-en-ciel, les stress modérés et ponctuels avancent les dates d'ovulation (Contreras-Sanchez, 1998) tandis que les stress chroniques et sévères retardent la date d'ovulation, entraînent la production d'œufs plus petits et de moins bonne qualité (survie des alevins inférieure au contrôle) (Campbell et al., 1992). Ces effets sont les mêmes que ceux observés sur le site d'étude où les densités d'élevage pratiquées et le stress occasionné provoquent d'importantes hétérogénéités des dates de pontes et de la qualité des œufs au sein d'une bande d'élevage. Toutefois, comme décrit précédemment, le défaut de qualité est observable quel que soit le niveau de stress, et ce phénomène est basal sur le site de Sarrance et exacerbé par la conduite d'élevage stressante pour les individus.

II.1.3.4.3. Un défaut de qualité qui augmente quand la conductivité de l'eau diminue

Le défaut de qualité est anti-corrélé à la conductivité dans l'eau d'élevage (figure 23 ; coefficient de corrélation de Kendall : -0.47 ; p.value = 5.22E-09). La conductivité moyenne d'une eau mesure la capacité de cette eau à conduire un courant électrique. Les variations de conductivité de l'eau traduisent les variations de concentration de la totalité des espèces ioniques majeures en solution dans cette eau (Rusydi, 2017). La relation entre conductivité de l'eau et maturation des gonades est documentée pour les espèces d'eau douce dites électrosensibles telles que les Gymnotiformes ou les Mormyrids (Kirschbaum & Schugardt 1995). Chez *Mormyrus rume probosciostris*, espèce vivant dans les zones tropicales et effectuant une migration potamodrome (uniquement en eau douce) au moment de sa reproduction, une forte diminution de la conductivité liée à la saison des pluies active la maturation des gonades, alors qu'une augmentation de la conductivité inhibe la maturation sexuelle de cette espèce (Schugardt & Kirschbaum, 2004). Nous avons déjà vu que chez les salmonidés, le maintien en mer de femelles saumons Atlantique pendant la période de reproduction induit des retards ou blocages d'ovulation et des faibles fécondités relatives (Haffray, 1995). Les diminutions de salinité et de conductivité sont dans cette situation nécessaires à une reproduction réussie.

La diminution de la conductivité est liée à une diminution de la concentration en espèces ioniques dans l'environnement d'élevage. Cette diminution de certaines espèces ioniques dans l'environnement d'élevage se traduit par une modification de la composition du milieu intérieur des individus (Kopp, 2013). Cette variation peut alors avoir un impact sur les mécanismes d'osmorégulation et de maintien de l'équilibre ionique nécessaires au maintien de l'homéostasie (Dolomatov, 2012). Les effets de l'évolution d'espèces dans des milieux carencés en espèces ioniques majeures ont été décrits (Brauner et al., 2012 ; Gonzalez et al., 2005) mais globalement peu de données existent sur l'impact de telles situations sur la reproduction des salmonidés. Une étude portant sur une population sauvage d'omble de fontaine évoluant dans une eau de très faible conductivité a souligné les mauvaises performances de reproduction de ces salmonidés (Enge et al., 2021), mais l'étude ne précise pas si cette hypo-osmolarité agit sur la gamétogenèse ou sur la survie des alevins. Ainsi, bien que le phénomène observé dans l'étude suive une logique inverse à celle observée au cours des migrations naturelles des salmonidés, les observations présentées plus haut tendent à montrer que dans des situations extrêmes les carences ioniques peuvent déséquilibrer les processus physiologiques des poissons.

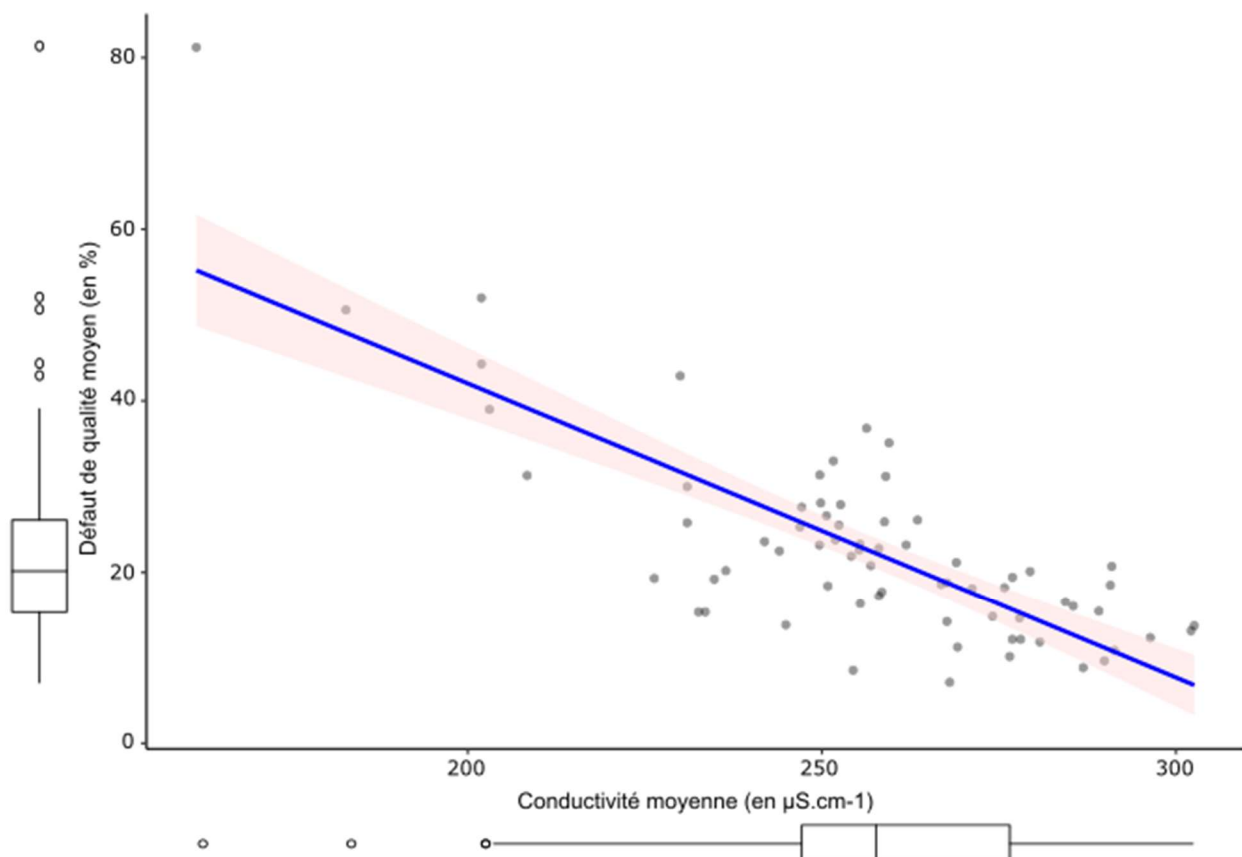


Figure 23: Taux de pontes présentant un défaut de qualité au sein de la bande en fonction de la conductivité moyenne de l'eau d'élevage pendant la période de ponte à Sarrance

Une étude des mécanismes impliqués dans l'apparition de ce défaut est nécessaire afin de mieux comprendre la relation entre conductivité et défaut de qualité. De plus, il n'est pas exclu que le phénomène observé ici ne soit pas dû à la diminution globale de la conductivité, mais à celle de la concentration d'une ou d'un petit nombre d'espèces ioniques. Une investigation approfondie de la composition de l'eau d'élevage et des variations de concentration des espèces ioniques la composant est nécessaire. Cet approfondissement devrait permettre de cibler les espèces ioniques impliquées dans ce phénomène.

II.1.4. Conclusion

L'exploration des données d'élevage a permis d'identifier plusieurs variables corrélées aux diminutions de qualité des œufs observées sur site. Les hautes densités d'élevage induisent généralement une augmentation du stress. Le stress est impliqué dans la diminution de la qualité des ovocytes produits. De plus, les stress chroniques pendant l'ovogenèse provoquent des retards d'ovulation chez la truite arc-en-ciel. Or l'analyse des données souligne des durées de pontes anormalement longues corrélées avec l'apparition de pontes de mauvaise qualité, particulièrement pour les génitrices pondant tardivement au sein de la bande. Le stress induit par les densités élevées accentue la perte de qualité.

Toutefois les observations de défauts de qualité chez des génitrices élevées en densité modérée ainsi que l'anti-corrélation entre la conductivité de l'eau d'élevage et l'apparition du défaut de qualité plaident pour un modèle plus complexe. Le stress induit par la densité ne serait qu'un facteur aggravant du phénomène, comme le suggère sa faible contribution aux composantes principales présentées ci-avant. La conductivité de l'eau d'élevage et donc sa richesse ionique semble, en revanche, avoir un fort impact sur l'apparition du défaut de qualité.

Cette dernière piste doit être approfondie afin de comprendre quelles espèces ioniques sont impliquées dans ce phénomène, et quels sont les mécanismes impactés aboutissant à la diminution de la qualité des œufs. Ce travail nécessitera une compréhension globale des évolutions de composition de l'eau d'élevage au cours d'un cycle, et une caractérisation plus fine du phénomène de perte de qualité.

Il est important de noter que la méta-analyse présentée ici repose sur des données qualitatives ou semi-quantitatives, notamment l'estimation visuelle d'un défaut de qualité de ponte (à partir d'un nombre d'œufs blancs significatifs) effectuée par de nombreux opérateurs différents au cours des années. Malgré tout, cette analyse fait ressortir des hypothèses fortes qui seront testées dans la suite de l'étude et notamment les liens entre les défauts de qualité des œufs, la faible conductivité de l'eau et la durée de la période de ponte qui seront explorés dans la suite du travail. La remarquable corrélation entre baisse de conductivité de l'eau et intensité du phénomène nous pousse à formuler

l'hypothèse que la qualité de l'eau serait le principal facteur explicatif du phénomène et pourrait aussi être à l'origine de la variabilité observée sur la durée de ponte et son importance chez les pondeuses tardives.

II.1.5. Annexes

Tableau 3 : Résultats de l'analyse du taux de pontes de mauvaise qualité au sein de la bande d'élevage en fonction de l'année de ponte

A – Résultats des tests de comparaison du défaut de qualité en fonction des années

B – Description de la variable « défaut de qualité » en fonction des années

A

p-values des tests de comparaisons:											
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
2007											
2008	0,643										
2009	0,945	0,571									
2010	0,155	0,193	0,038								
2011	0,131	0,153	0,027	0,880							
2012	0,248	0,353	0,094	0,655	0,550						
2013	0,403	0,632	0,236	0,327	0,259	0,593					
2014	0,670	0,923	0,581	0,099	0,073	0,226	0,497				
2015	0,869	0,355	0,714	0,010	0,006	0,030	0,099	0,327			
2016	0,400	0,627	0,233	0,332	0,263	0,600	0,993	0,491	0,097		
2017	0,099	0,104	0,015	0,698	0,812	0,404	0,173	0,043	0,003	0,176	
2018	0,091	0,094	0,014	0,634	0,741	0,363	0,155	0,039	0,003	0,158	0,920
Niveau de signification corrigé de Bonferroni : 0,0008											

B

Année	n	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
2007	2	25,80	30,00	27,90	2,97
2008	5	16,00	81,20	34,40	26,93
2009	7	16,50	72,10	38,61	23,11
2010	9	8,80	35,70	19,80	8,53
2011	9	10,00	27,90	18,94	6,05
2012	9	8,50	42,90	22,46	11,66
2013	9	10,80	52,00	26,69	15,69
2014	9	18,58	55,87	28,59	12,88
2015	9	18,10	66,70	35,40	14,61
2016	9	11,80	40,50	23,88	8,56
2017	9	12,10	30,80	18,37	6,32
2018	8	7,10	26,60	17,43	6,85

Tableau 4 : Résultats de la classification hiérarchique des individus

Cluster 1						
Variable	v.test	Moyenne dans la catégorie	Ecart-type dans la catégorie	Moyenne globale	Ecart-type global	p.value
Poids moyen des génitrices	6,436	4,353	0,565	3,622	0,748	1,23E-10
Survie au stade oeillé	4,035	0,785	0,048	0,745	0,066	5,47E-05
Conductivité	3,029	475,236	74,809	425,740	107,552	2,45E-03
Fécondité relative	-2,035	950,185	209,491	1041,229	294,443	4,18E-02
Défaut de qualité	-2,504	0,181	0,063	0,226	0,118	1,23E-02
Cluster 2						
Variable	v.test	Moyenne dans la catégorie	Moyenne globale	Ecart-type dans la catégorie	Ecart-type global	p.value
Fécondité relative	4.106208	1191,000	1041,229	291,425	294,443	4,02E-05
Survie au stade oeillé	-2.627683	0,723	0,745	0,057	0,066	8,60E-03
PoidsMoy	-5.888702	3,076	3,622	0,401	0,748	3,89E-09
Cluster 3						
Variable	v.test	Moyenne dans la catégorie	Moyenne globale	Ecart-type dans la catégorie	Ecart-type global	p.value
Défaut de qualité	6.073397	0,451	0,226	0,149	0,118	1,25E-09
Durée de la ponte	4.349058	92,444	64,586	8,783	20,438	1,37E-05
Densité d'élevage	4.145321	124,867	98,150	13,365	20,564	3,39E-05
Fécondité relative	-3.171486	748,556	1041,229	162,913	294,443	1,52E-03
Conductivité	-5.469099	241,386	425,740	113,001	107,552	4,52E-08

II.2. Description et analyse comparative des environnements d'élevage

II.2.1. Introduction

L'hydrogéologie étudie les interactions entre les structures géologiques souterraines et l'eau (Castany, 1982 ; Fetter, 2018). Cette discipline permet d'expliquer les relations entre la qualité de l'eau (physique et chimique) et la nature de son parcours sous-terrain. Dans le cadre de notre étude, la description de l'environnement d'élevage a nécessité la compréhension du contexte géologique dont sont issues les sources alimentant les trois sites étudiés (Sarrance, Rébénacq et Lees-Athas). Dans le cas des deux sources de Sarrance et Lees-Athas, dont les résurgences sont situées en Vallée d'Aspe (Pyrénées-Atlantiques, France), les bassins versants identifiés de ces sources se situent à des altitudes de respectivement 1670 mètres (43.05691 ; -0.526915) et de 1580 mètres (42.946559 ; -0.690765). La source alimentant la pisciculture de Rébénacq (dite « Œil du Neez, source alimentant en eau potable la ville de Pau) est issue de pertes du gave d'Ossau (gave est le terme désignant les rivières Béarnaises), qui prend sa source au pied du pic du Midi d'Ossau, et dont le bassin versant, étendu, est composé d'une grande partie de la vallée d'Ossau, soit plus de 400km² (Bauer et al., 1992). Les bassins versants et les résurgences étudiés se situent dans des contextes géomorphologiques de karst, structures issues de l'érosion des roches carbonatées et salines provoquant de nombreuses infiltrations et écoulements aboutissant à la formation d'un aquifère souterrain (Ford & Williams, 2013). Dans les cas d'étude présentés ici, le réseau karstique est composé de roches carbonatées calciques, espèces minérales prédominantes dans l'eau de l'aquifère (Auly, 1999 ; Rey, 2008). La composition minérale de l'eau, tout comme la conductivité, est directement impactée et modulée par le contexte hydrogéologique des bassins versants et des parcours souterrains de l'eau.

Or la partie précédente (Chapitre 1 - Partie 1) a permis d'identifier la conductivité comme une variable corrélée à l'apparition du défaut de qualité des œufs étudié. La conductivité d'une eau est un indicateur fiable de la concentration totale en solides dissous (TDS) (Rusydi, 2018). La conductivité de l'eau dépend de la concentration en ions de l'eau, de l'osmolarité et de la température. Pour des eaux de faible turbidité, de température semblable et dont les espèces minérales présentes sont similaires, la conductivité reflète la quantité d'espèces minérales dissoutes dans une eau et peut permettre de comparer des eaux d'origines différentes ou prélevées à différentes périodes de l'année (Hayashi, 2004 ; Siosemarde, 2010). Ce paramètre, plus facile à mesurer que le TDS, est communément utilisé comme indicateur de ce dernier (Daniels et al., 2017). En complément des données de conductivité, les analyses de composition minérale d'une eau permettent de comprendre le profil de l'eau (ions prédominants, variations saisonnières, espèces minérales corrélées à la conductivité).

La connaissance du contexte hydrogéologique, de la conductivité et des compositions minérales de l'eau d'élevage permet d'avoir une compréhension globale des profils d'eau d'élevage, et d'identifier les interactions existantes entre les différents paramètres environnementaux et les résultats d'élevage (ou zootechniques) obtenus dans cette eau.

L'objet de cette partie est donc l'analyse des profils physico-chimiques des eaux d'élevage afin d'identifier les paramètres remarquablement différents selon les sites, et de déterminer ceux qui pourraient être impliqués dans le défaut de qualité observé. Le site de Lees-Athas (INRAEe NuMÉA), soupçonné d'être également sujet au défaut de qualité, a été intégré dans l'analyse lorsque la disponibilité des données de qualité d'eau le permettait. Les résultats de ce site sont considérés à titre indicatif car nous n'avons pu valider nous-même l'occurrence du phénomène de perte de qualité.

Dans un premier temps, les analyses des profils thermiques, de pH et de conductivité des sites ont été réalisées. Une analyse en composante principale puis des tests statistiques paramétriques ont permis l'identification des concentrations ioniques différentes selon les sites. Vu le peu de données d'analyses de compositions minérales de l'eau disponibles, nous n'avons pas pu tester directement l'effet des espèces minérales sur le défaut de qualité. Toutefois, un test de corrélation entre les concentrations en espèces minérales identifiées et la conductivité a permis de valider l'implication de ces espèces ioniques dans le défaut de qualité.

II.2.2. Matériel et méthodes

II.2.2.1. Présentation des bases de données

Pour l'étude statistique et la caractérisation environnementale des sites, plusieurs bases de données ont été utilisées :

- Une regroupant les données de température, de conductivité et de pH. Ce sont des données environnementales importantes pour la conduite d'élevage, relevées chaque semaine par le groupe Viviers sur les sites de production de Sarrance et Rébénacq depuis plusieurs années. Ces relevés hebdomadaires sont réalisés depuis 2008 à Sarrance et depuis 2016 à Rébénacq. Les données pour Lees-Athas sont issues de la campagne de prélèvement présentée ci-après (12 relevés).
- Une regroupant les données de composition minérale de l'eau en amont de la pisciculture de Rébénacq. Elles ont été obtenues grâce à l'agence régionale de santé (ARS) Nouvelle-Aquitaine. La source dite « Œil du Neez » est la principale alimentation en eau de la pisciculture de Rébénacq (elle se situe 500 mètres en amont de la pisciculture) mais est aussi l'alimentation en eau potable de la ville de Pau. Cette source fait donc l'objet d'un suivi de qualité mensuel de la part de l'ARS.

Les données mensuelles de composition minérale sur la période 2008-2019 ont été utilisées (134 mesures).

- Le site de Viviers de Sarrance réalise des autocontrôles annuels de composition minérale de l'eau depuis 2010, effectués par le Laboratoire des Pyrénées et des Landes, spécialisé en analyses minérales (Lagor, Pyrénées-Atlantiques, France). Ce jeu de données est composé de 9 analyses de composition minérale de l'eau d'élevage.
- Bien que non analysées dans ce rapport, des données issues de l'Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM), communiquées par Gilles Bareille, ont permis d'étayer les analyses en incorporant des données de compositions minérales issues de 18 cours d'eau de la région, pour 61 points de prélèvement. Chaque point a été prélevé au moins deux fois, ainsi le jeu de données se compose de 139 analyses de composition minérale.
- Pour combler les lacunes en matière d'analyses de composition minérale de l'eau sur le site de Sarrance (seulement 9 prélèvements en dix ans, à des périodes de l'année identiques, avec des seuils de détection peu précis causant l'absence de valeurs pour certaines espèces ioniques importantes) et sur le site de Lees-Athas, une campagne de prélèvements et d'analyses mensuels a été réalisée sur les années 2019-2020 pour les 3 sites étudiés, pendant un cycle hydrologique complet (12 mois). Les caractéristiques de cette campagne sont présentées ci-après.

Toutes ces bases de données ont été regroupées et raffinées pour réaliser l'analyse.

II.2.2.2. Campagne de prélèvement et analyses d'eau

Pour les trois sites, les compositions d'eau ont été analysées tous les mois pendant un an. L'eau en amont des bassins expérimentaux et de production a été prélevée dans des flacons prévus à cet effet (fournis par le laboratoire d'analyse - évite les contaminations). Les quantifications ont été réalisées par un laboratoire spécialisé (Ultra Traces Analyses Aquitaine, Pau, France). Les abondances des principales espèces ioniques renseignées comme impliquées dans la physiologie des poissons ont été mesurées. Les teneurs en calcium (Ca), potassium (K), magnésium (Mg) et sodium (Na) ont été mesurées par spectroscopie d'émission optique à plasma (Zhang, 2010). Les teneurs en cuivre (Cu), fer (Fe), manganèse (Mn), sélénium (Se) et zinc (Zn) ont été analysées par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (Zhang, 2011). Le nitrate (NO_3), le bicarbonate (HCO_3) et le sulfate (SO_4) ont été mesurés par chromatographie ionique. Les résultats obtenus ont été traités pour comparaison des différents sites en utilisant un U-test.

II.2.2.3. Analyse en composantes principales

Comme dans la partie 1, une ACP a été effectuée afin de comparer les différents profils minéraux des trois sites d'élevage. Les résultats des analyses de la campagne d'échantillonnage ont été utilisés. Les

douze variables d'entrée sont les concentrations en espèces ioniques mesurées (Na, K, Cl, SO₄, Mg, Ca, Zn, Cu, Mn, Fe, NO₃, HCO₃). Ces données ont été transformées par centrage réduction. Les valeurs propres ont été analysées afin de mesurer la variance expliquée par chaque composante principale.

II.2.2.4. Analyse des données

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel R (R Core Team, 2014) et l'environnement Rstudio (Racine, 2012). Les figures ont été produites en utilisant le package ggplot2 (Wickham, 2009). Pour le site de Lees-Athas, les paramètres ne sont présentés graphiquement que lorsque le nombre de données est suffisant et pertinent. Dans le cas contraire, les données sont résumées dans le texte.

Les corrélations entre concentration en éléments minéraux et conductivité ont été analysées grâce au test de corrélation de Kendall, la distribution des données ne suivant pas une loi normale (test de Shapiro-Wilk). Le résultat des tests est présenté dans un corrélogramme.

II.2.3. Résultats et discussion

II.2.3.1. Profils thermiques des eaux d'élevage : Températures basses et stables à Sarrance, variables à Rébénacq

Les profils thermiques de l'eau à Sarrance et Rébénacq sont contrastés (figure 24). La température moyenne de l'eau de Sarrance est stable (moyenne annuelle 8.6°C) avec des variations faibles (moyenne minimale enregistrée à 8.2°C en janvier, moyenne maximale de 9.0°C en septembre). Les températures à Lees-Athas (issues de la campagne de prélèvement – 1 point de mesure par mois pendant un an), ont un profil similaire (moyenne 8.0 °C ; min 7.9°C en janvier ; max 8.2°C en août). L'eau de Rébénacq subit des variations de température plus importantes (min 8.6°C en février ; max 14.2°C en septembre) avec des augmentations considérables en période estivale, entraînant une augmentation importante de la température moyenne annuelle (moyenne 10.8°C).

Ces profils thermiques valident le contexte hydrogéologique des résurgences. La température faible et stable observée à Sarrance indique un long temps de séjour de l'eau dans un réservoir souterrain tampon situé en altitude (Freixes, 1998) et un temps de parcours souterrain court jusqu'à la résurgence de la pisciculture de Sarrance. A Rébénacq, la température basse sur les périodes automnales, hivernales et printanières, et la variabilité observée en été indiquent un profil différent où l'eau a un temps de parcours assez court depuis le bassin versant en altitude, mais avec un séjour aérien plus important avant le captage de la pisciculture de Rébénacq. L'origine de l'eau de la source (pertes du gave d'Ossau après un parcours aérien) explique cette variabilité.

La stabilité de la température sur les sites de Sarrance et de Lees-Athas soulève des questions. Dans la nature, la saisonnalité des cycles de reproduction des poissons est guidée par des signaux naturels

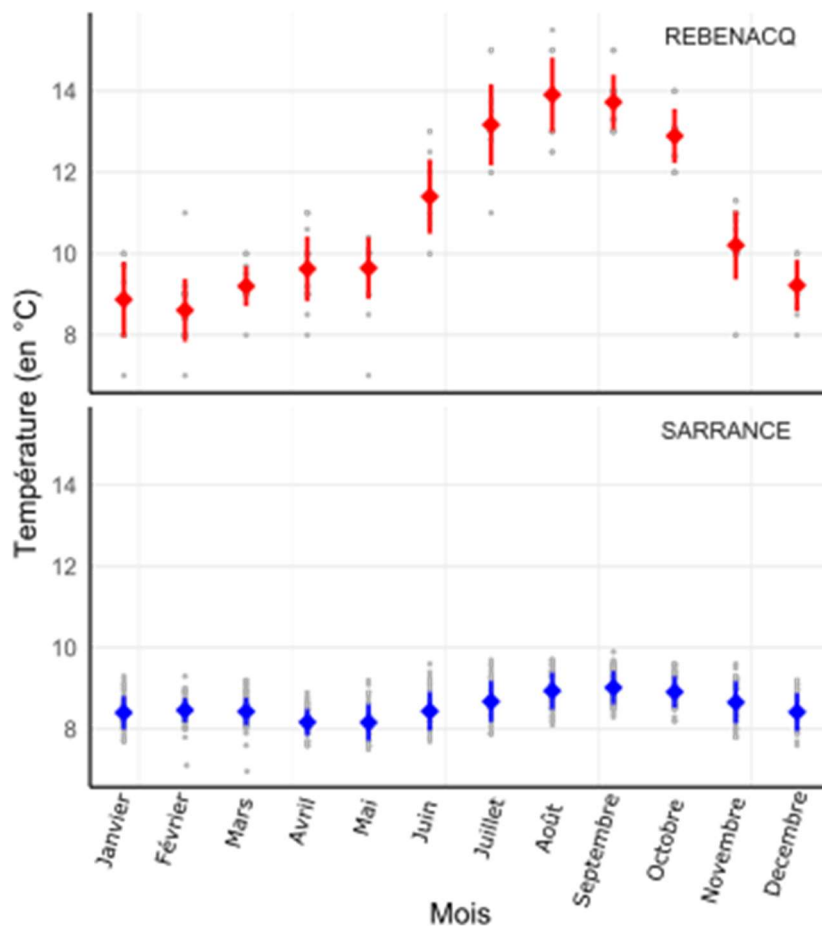


Figure 24: Evolution de la température mensuelle moyenne de l'eau (en °C) sur le site de Rébénacq (en haut) et de Sarrance (en bas)

issus de l'environnement, le but étant la production de gamètes lors des saisons les plus favorables à la survie des alevins (Bromage, 2001). Ces signaux peuvent agir sur l'initiation de la gamétogenèse, sur le déroulement de la vitellogénèse, sur l'engagement des gamètes dans les phases finales de maturation ovocytaire et d'ovulation, et sur plusieurs de ces étapes (Wang, 2010). Avec la variation de photopériode, évoquée précédemment, la variation de température est le signal le plus important chez de nombreuses espèces de poissons. Le principe de cycle photothermal, bien décrit (Fontaine, 2006 ; Martin-Robichaud, 2004), est basé sur la complémentarité entre variations de durée d'éclairage et de température pour mimer les conditions naturelles et induire un cycle complet de gamétogenèse.

Plusieurs études ont par exemple démontré que malgré une photopériode adaptée, la diminution de la température de l'eau d'élevage était indispensable pour induire la gamétogenèse (Migaud et al, 2002) et les phases finales de maturation ovocytaire et d'ovulation chez *Perca fluviatilis* (Migaud et al, 2004) et *Perca flavescens* (Shewmon et al., 2007). Toutefois les salmonidés sont peu sensibles à la température comme signal de contrôle de la gamétogenèse (Bromage et al., 2001 ; Wang, 2010). Chez la truite arc-en-ciel, l'initiation de la gamétogenèse peut être induite à n'importe quel moment de

l'année par l'exposition des génitrices à une photopériode de jours longs (Randall & Bromage, 1998) tandis que la vitellogénèse se déroule normalement en conditions de température constantes (Bromage et al., 1993). Enfin la maturation ovocytaire et l'ovulation ne nécessitent pas de variation de température pour être déclenchées (Pankhurst et al., 1996).

A la lumière des études menées sur les salmonidés, l'absence de variation de température observée à Sarrance n'est pas à l'origine des retards d'ovulations et des défauts de qualité observés.

Toutefois les températures basses observées tout au long de l'année sur les deux sites sont sujettes à discussion. Comme évoqué dans le contexte scientifique, l'effet de la température sur la maturation sexuelle des génitrices de salmonidés est relativement bien renseigné. Les températures élevées au moment des phases finales de la maturation ont un impact sur les durées de maturation, les dates d'ovulation et la qualité des ovocytes produits (Beacham & Murray, 1988 ; Güner et al., 2012 ; King & Pankhurst, 2000 ; Pankhurst et al., 1996 ; Pankhurst & Thomas, 1998 ; Taranger et al., 1999 ; Taranger & Hansen, 1993). Cependant, pour la truite arc-en-ciel, ces dysfonctionnements ovariens surviennent pour des gammes de températures supérieures à 14°C (température identifiée comme limite haute de l'optimal de reproduction des truite arc-en-ciel), soit des gammes de températures bien supérieures à celles rencontrées à Sarrance (température stable à 9°C). On peut d'ailleurs noter que les températures hautes atteintes sur la période estivale à Rébénacq provoquent parfois les phénomènes décrits par la littérature (perte de qualité, ovulation décalée).

Au contraire, l'impact des températures basses sur le cycle de reproduction des truites arc-en-ciel est moins renseigné. Des retards d'ovulation ont été décrits pour les salmonidés (Nakari et al., 1987 ; 1988 ; Johnston et al., 1992), suggérant que les températures basses réduisent les réponses hormonales et l'absorption de vitellogénine (œufs plus petits) (Davies & Bromage, 2002). Cependant, les blocages d'ovulation apparaissent pour des températures inférieures à 7°C chez le saumon atlantique (Johnston et al., 1992) et à 4°C chez la truite arc-en-ciel (Nakari et al., 1987 ; 1988).

Aucun dysfonctionnement ovarien n'a été décrit dans la littérature pour des températures dans les gammes observées à Lees-Athas ou Sarrance (7.5-9.-5°C). Des exemples ont démontré la capacité de la truite arc-en-ciel à mener plusieurs cycles de gamétogenèse complets sans anomalie dans des conditions d'élevage à température stable et similaire à celles de Sarrance (8.5-9°C) (Duston & Bromage, 1988). Vu la littérature sur le sujet, les gammes de température à Sarrance et Lees-Athas ne peuvent pas être facilement impliquées dans une anomalie de la gamétogenèse, dans ses phases précoces ou finales (maturation ovocytaire et ovulation).

II.2.3.2. Evolution du pH : Une eau plus alcaline à Sarrance qu'à Rébénacq

Les pH enregistrés sur les sites sont stables autour de leur valeur moyenne (Rébénacq - 7.8 ± 0.07 ; Sarrance – 8.0 ± 0.03) (figure 25). La basicité (ci-après désignée par alcalinité) des eaux de ces deux sites se justifie par la nature carbonaté-calcique des karsts considérés. Les concentrations conséquentes en bicarbonate et en calcium (détaillées dans la suite de cette partie) dans l'eau des sources sont conséquentes et expliquent cette alcalinité légère.

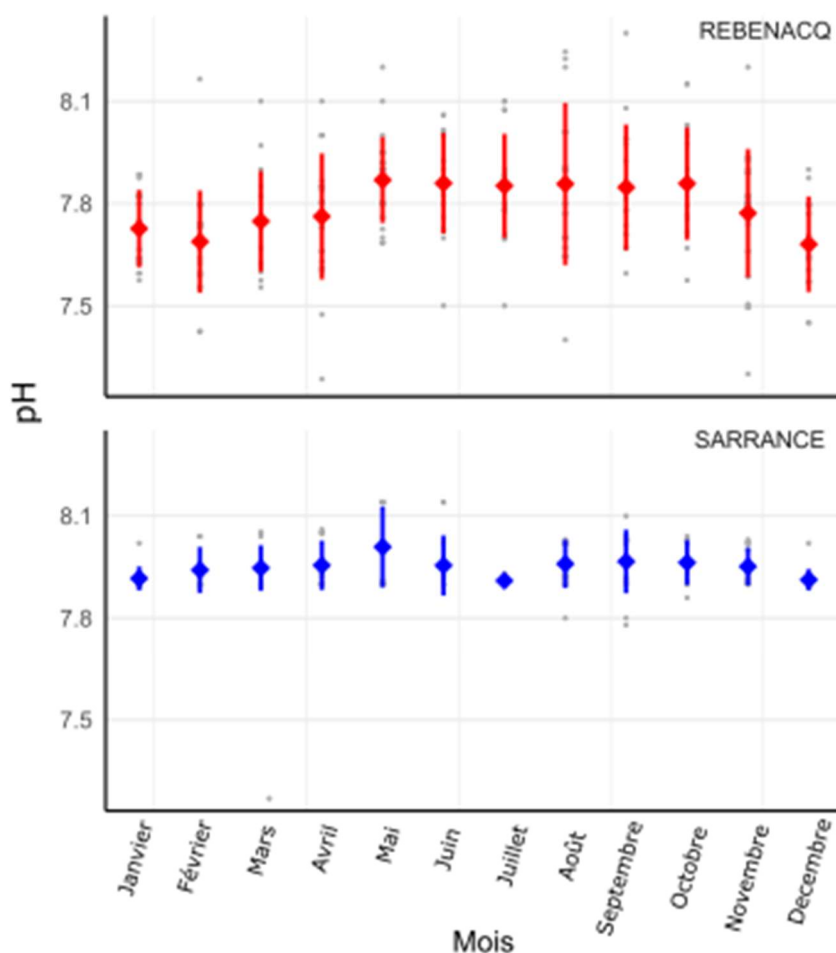


Figure 25: Evolution du pH mensuel moyen de l'eau sur le site de Rébénacq (en haut) et de Sarrance (en bas)

Le pH à Sarrance est significativement plus élevé qu'à Rébénacq (U-test – p.value = $7.40E-07$). Cette différence s'explique par la surface du bassin versant de la source de Rébénacq, très étendu et couvert d'une végétation moyennement dense de basse montagne, tandis que le bassin versant de Sarrance est haut en altitude, réduit en surface et couvert d'une végétation désertique de moyenne-haute montagne. Or l'activité respiratoire du système racinaire provoque l'acidification des sols et de l'eau s'infiltrant dans ces systèmes (Oh & Richter, 2004 ; Richter, 1995).

Les modifications du pH de l'eau peuvent altérer les performances de reproduction des salmonidés (Ikuta et al., 2003 ; Ikuta & Kitamura, 1995 ; Johnson, 1977 ; Jones, 1985 ; Tam, 1990), réputés pour être des espèces sensibles aux variations de pH ainsi qu'aux pH bas (Havas & Rosseland, 1995 ; Peterson, 1989). La plupart des études citées précédemment soulignent les impacts négatifs d'une acidification mineure ou majeure du milieu, principalement dans des contextes de pollution atmosphériques (pluies acides). Toutefois, peu de situations d'alcalinités modérées comme celles observées à Sarrance et à Rébénacq sont étudiées dans la littérature. Chez le médaka *Oryzias latipes*, une étude transcriptomique a montré l'adaptation des individus à un stress alcalin (pH = 9.2) par un ralentissement des fonctions liées à la reproduction (Yao et al., 2012). Une étude sur les comportements d'évitement de plusieurs espèces de poissons selon le pH de l'eau d'élevage (Peterson, 1989) a montré que la truite arc-en-ciel évolue sans comportement d'évitement dans des eaux aux pH compris entre 5.9 et 10.0, avec un déplacement préférentiel vers l'eau à pH=9.0. Ces résultats supportent l'hypothèse que les comportements d'évitements des truites, qui reflètent les situations de stress physiologiques et qui sont particulièrement marqués pendant les périodes de reproduction (Ikuta et al., 2003), ne se manifestent pas dans des eaux à alcalinité modérée.

Vu les résultats des études menées sur les salmonidés, il semble difficile d'incriminer les valeurs prises par le pH dans l'apparition du phénomène.

II.2.3.3. Etude de la conductivité sur les sites : Des variations temporelles inverses au cours de l'année, mais pas de différence de la conductivité annuelle moyenne

Une comparaison des conductivités des deux sites sur l'ensemble du cycle hydrologique ne révèle pas de différence significative (moyenne Sarrance : $258 \pm 23 \mu\text{S/cm}$; moyenne Rébénacq : $257 \pm 19 \mu\text{S/cm}$). Une comparaison des valeurs absolues mensuelles de conductivité (U-test) révèle cependant des différences significatives entre les deux sites pour chaque mois de l'année, excepté en mai et décembre. D'un site à l'autre, les variations saisonnières de conductivité suivent des évolutions inverses (figure 26). A Sarrance, on observe des valeurs moyennes de conductivités basses sur la période janvier-mai (période 1 - moyenne : $234 \pm 7 \mu\text{S/cm}$) alors que les valeurs de conductivité prises sur la période Juillet-Novembre sont plus élevées (période 2 - moyenne : $281 \pm 8 \mu\text{S/cm}$). La tendance observée à Lees-Athas est la même, avec un contraste exacerbé (janvier – $185 \mu\text{S/cm}$; septembre - $319 \mu\text{S/cm}$).

A Rébénacq, la conductivité est relativement haute pendant la période Décembre-Avril (période 1 - moyenne : $275 \pm 9 \mu\text{S/cm}$) et basse du mois de Juin au mois d'octobre (période 2 - moyenne : $244 \pm 8 \mu\text{S/cm}$). Ces observations sont confirmées par les tests statistiques qui révèlent des différences

significatives entre période 1 et période 2 sur les deux sites (U-test : Sarrance - p .value= 0.008 ; Rébénacq - p.value = 0.008).

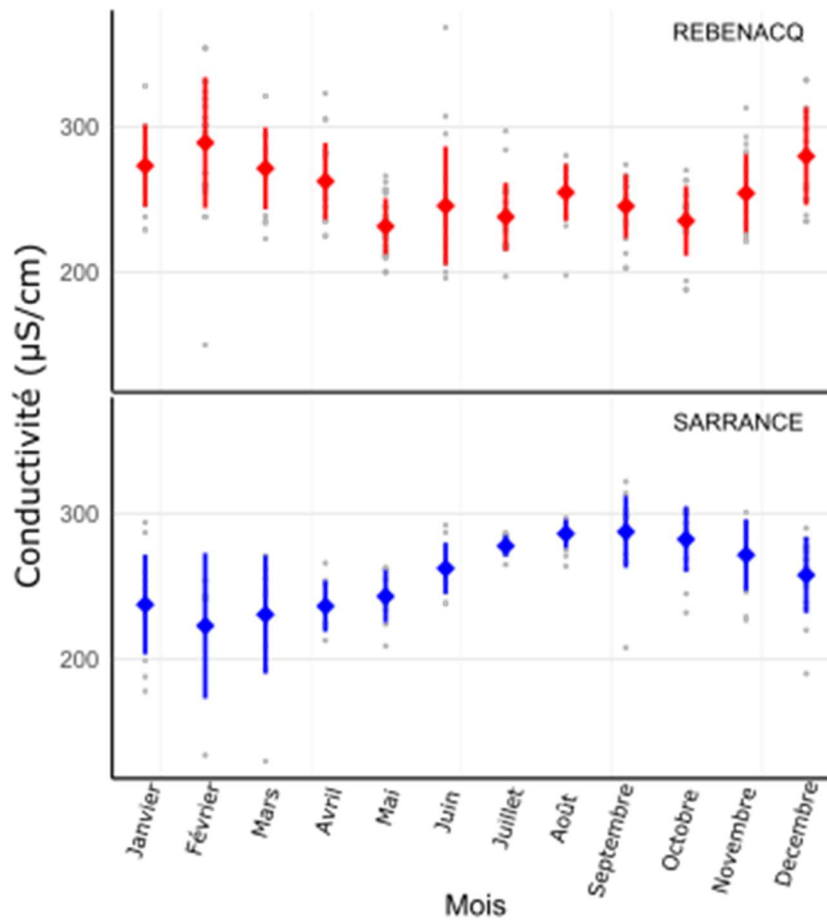


Figure 26 : Evolution de la conductivité moyenne mensuelle de l'eau (en $\mu\text{S/cm}$) sur le site de Rébénacq (en haut) et de Sarrance (en bas)

Les contextes hydrogéologiques des deux sites expliquent ces observations. Les deux périodes évoquées correspondent à deux régimes hydrauliques distincts en région montagneuse. Les précipitations sont importantes dans ces régions (moyenne des précipitations cumulées estimées ces cinq dernières années : Sarrance - 1769mm ; Brest – 941mm ; source Météo-France). La période 1 correspond à la saison des fontes des neiges et des fortes précipitations, se traduisant par des forts débits des sources et rivières. Une augmentation de la conductivité dans une situation de fort débit indique la vidange de conduits souterrains remplis d'eau ayant séjourné plus longtemps dans l'aquifère, et donc plus minéralisée (Maillet, 1906 ; Williams, 1989). Le réseau souterrain à Rébénacq est complexe et fracturé, avec des réseaux stagnants durant les périodes d'étiage et vidangés par les débits importants de printemps. Ce type d'observation est classique dans des situations karstiques (Plagnes, 1997). Ces observations sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle la résurgence est alimentée directement par les pertes du gave d'Ossau en amont dans la vallée.

La situation à Sarrance (et probablement à Lees-Athas) indique une conductivité qui diminue lorsque le débit augmente. L'eau s'infiltre au niveau du bassin versant, séjourne dans un réservoir tampon (température basse et stable) puis emprunte un réseau sous-terrain limité et lessivé où elle dissout différentes espèces ioniques. Le débit plus important au printemps induit une dilution plus importante des minéraux et un temps de séjour sous-terrain de l'eau moins long.

En conclusion, les contextes hydrogéologiques différents sur les deux sites entraînent des variations saisonnières de conductivité opposées. Toutefois, comme souligné au début du paragraphe, il n'y a pas de différence de valeur moyenne annuelle et les valeurs de conductivité relevées restent dans des valeurs supérieures à celles provoquant des problèmes de recrutement chez les salmonidés sauvages (valeurs comprises entre 4 et 45 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (Enge & Hesthagen, 2016 ; Enge, 2021). A conductivité annuelle moyenne égale, Rébénacq ne connaît pas les mêmes problématiques de défaut de qualité.

A la lumière de ces résultats, rien ne permet d'affirmer que l'anti-corrélation soulignée dans la première partie de l'étude entre conductivité et défaut de qualité soit liée à une valeur absolue de conductivité trop faible. Or nous savons que les concentrations ioniques dans l'eau sont corrélées à la conductivité. On peut donc raisonnablement penser que c'est la variation d'une ou plusieurs des espèces ioniques présentes dans l'eau qui a un impact sur le défaut de qualité. C'est pourquoi la suite de l'étude va caractériser les profils minéraux des eaux de Sarrance et de Rébénacq en identifiant les espèces ioniques présentant des profils très contrastés entre les sites.

II.2.3.4. Profils ioniques des eaux d'élevage

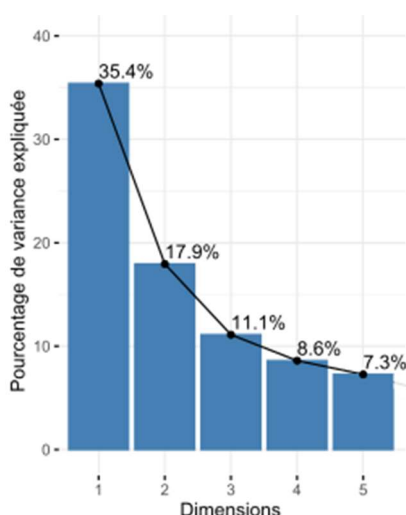


Figure 27 : Pourcentage de variance expliquée par les composantes principales de l'ACP sur les concentrations minérales dans l'eau des trois sites (Sarrance, Rébénacq et Lees-Athas)

L'analyse des valeurs propres indique que les trois premières composantes principales sont suffisamment explicatives pour être les seules retenues dans l'analyse (seuil à 10% - figure 27) (Kaiser, 1961 ; Peres-Neto et al., 2005). La première composante principale présente une variance expliquée de 35.4% soit une projection intéressante des relations inter variables et une discrimination efficace des individus selon ses axes.

Parmi les 12 variables utilisées dans l'analyse, 4 d'entre elles contribuent chacune à plus de 14% dans la définition de la composante

principale 1 (de 14.1% pour la concentration en NO_3 à 18.9% pour la variable concentration en Cl) (figure 28.A).

Les valeurs absolues des coefficients de corrélation entre les variables Cl, Na et K (variables les plus corrélées à dim.1) et la composante principale 1 sont respectivement de 0.80, de 0.78 et de 0.79 (figure 28.B). Ces trois variables sont très importantes dans la discrimination entre les différents échantillons de la projection. L'importante contribution des variables de concentration en SO_4 et HCO_3 respectivement dans les dim.2 et dim.3 est également à prendre en compte. Dans une moindre mesure, ces variables ont une importance dans la discrimination des différents échantillons du modèle.

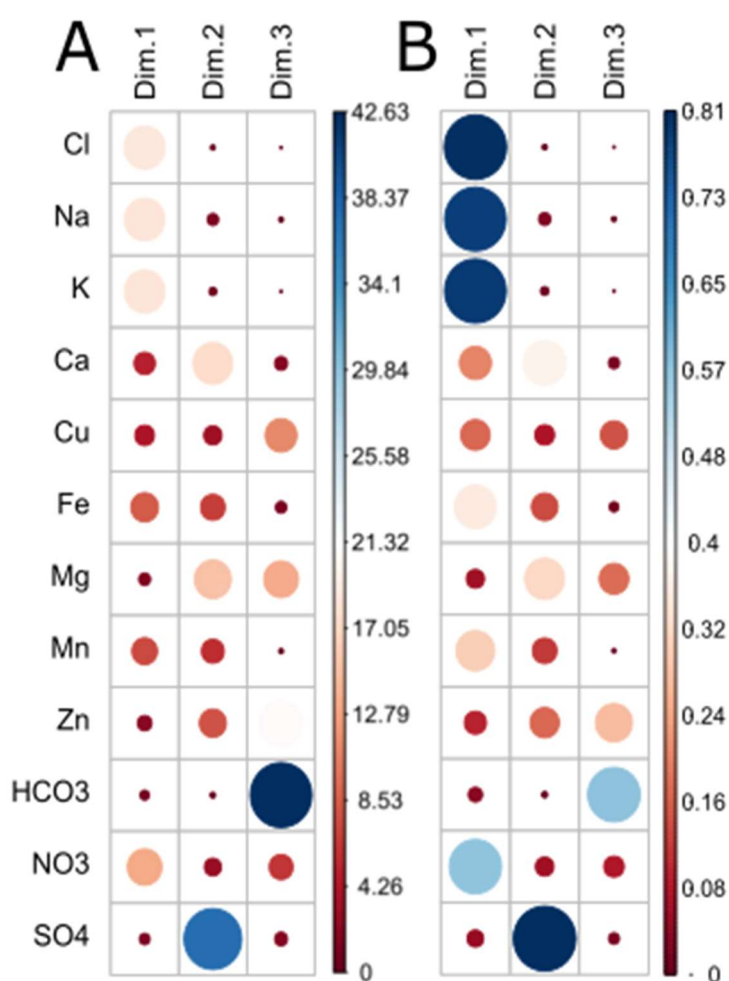


Figure 28: (A) Contributions et (B) corrélations des variables de l'analyse avec les trois premières composantes principales de l'ACP sur les concentrations minérales dans l'eau des trois sites (Sarrance, Rébénacq et Lees-Athas)

Le cercle des variables de l'ACP ainsi que la projection des individus selon les deux premières composantes principales (figure 29 & figure 30) soulignent la proximité des profils de l'eau de Sarrance et de Lees-Athas, et le contraste entre ces profils et celui de l'eau de Rébénacq.

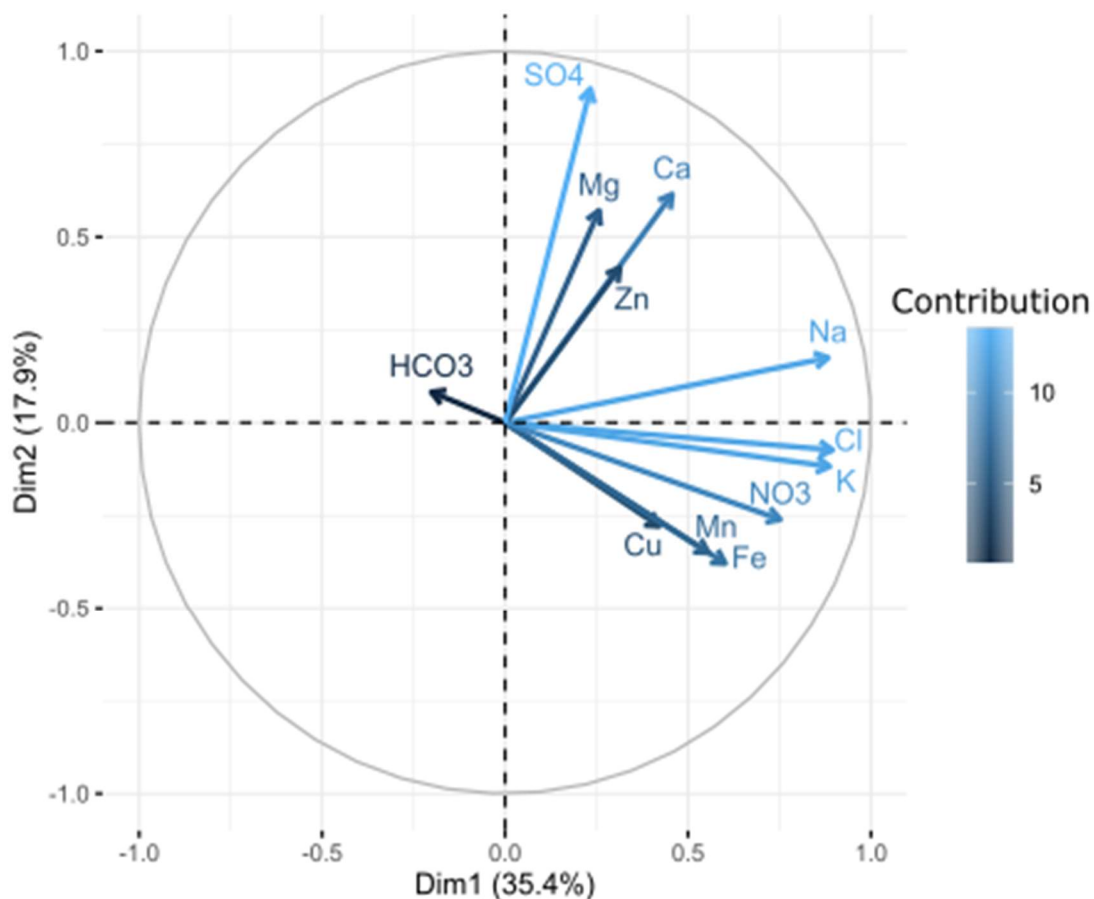


Figure 30 : Cercle de corrélation des variables de l'analyse selon les composantes principales 1 et 2 de l'ACP sur les concentrations minérales dans l'eau des trois sites (Sarrance, Rébenacq et Lees-Athas)

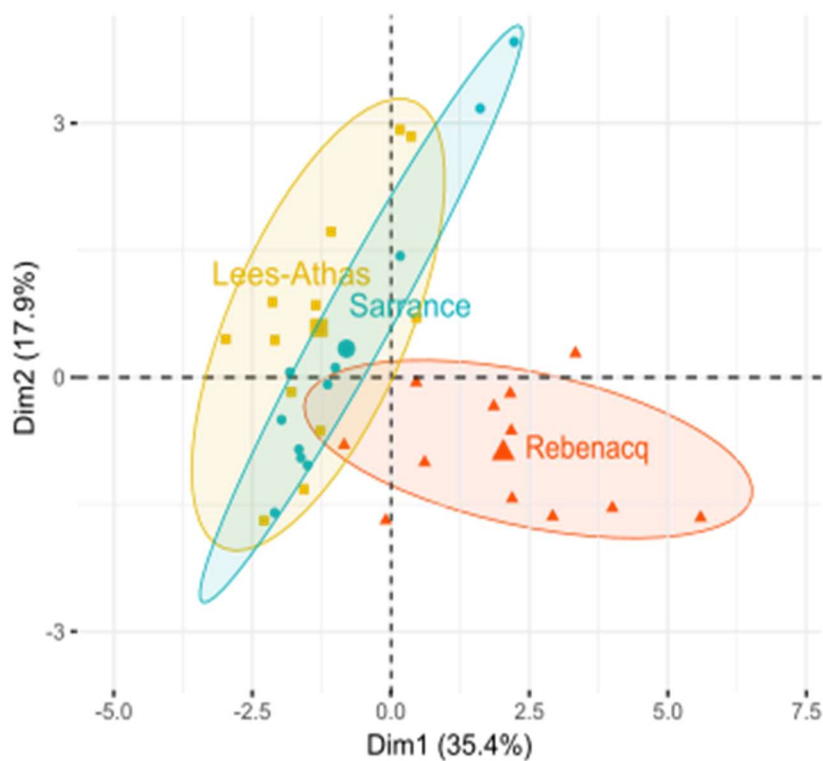


Figure 30 : Projection des résultats d'analyse d'eau selon les composantes principales 1 et 2 de l'ACP sur les concentrations minérales dans l'eau des trois sites (Sarrance, Rébenacq et Lees-Athas)

La discrimination entre ces profils se fait selon la composante principale 1, avec un profil bien distribué selon l'axe de dim.1 à Rébénacq, prenant des valeurs positives (projection du barycentre Rébénacq sur dim.1 : 2.27) alors que les échantillons Sarrance et Lees-Athas prennent des valeurs négatives sur dim.1 (projection du barycentre sur dim.1 – Sarrance : -1.02 ; Lees-Athas : -1.87). Comme évoqué précédemment, la dim.1 est principalement décrite par les concentrations en Cl, Na et K. Ces résultats montrent que ces variables permettent la discrimination des sites, avec des concentrations relatives plus fortes en Cl, Na et K à Rébénacq qu'à Sarrance et Lees-Athas.

On remarque le comportement similaire des variables de concentrations en éléments traces Cu, Fe et Mn ainsi que de la concentration en NO₃ sur dim.1 (projection prenant des valeurs positives). Toutefois les faibles contributions [7.26%-10.35%] et corrélations [0.31-0.53] de ces variables selon dim.1 rendent l'interprétation de ces résultats hasardeuse. Le rôle de ces éléments traces et du NO₃ sera discuté plus tard dans l'étude.

La composante principale 2, moins descriptive, souligne l'importance de la concentration en SO₄ dans la discrimination des groupes d'échantillons. Les eaux de Sarrance et de Lees-Athas présentent des concentrations en SO₄ plus importantes que l'eau de Rébénacq.

Les résultats des analyses d'eau (tableau 5) réalisées suite à la campagne d'échantillonnages mensuels confirment les résultats observés grâce à l'ACP : Les eaux de Sarrance et de Lees-Athas se démarquent de celle de Rébénacq par des concentrations moyennes annuelles en Na, K et Cl statistiquement plus faibles.

NO₃, Fe et Mn présentent eux-aussi des concentrations plus fortes à Rébénacq qu'à Sarrance et Lees-Athas. La valeur plus élevée prise par NO₃ à Rébénacq s'explique par les zones d'élevage en amont du parcours aérien du gave d'Ossau, parcours aérien inexistant à Sarrance et Lees-Athas, où les bassins versants sont protégés des activités anthropiques. Les études indiquent que malgré la différence significative observée, les concentrations en NO₃ mesurées sur les 3 sites restent du même ordre de grandeur et basses, par rapport aux valeurs seuils de toxicité référencées dans la littérature (comportement de nage anormal observé dès 100mg/L ; mortalités enregistrées pour des gammes de concentrations de 808 à 1913mg/L selon la dureté de l'eau ; une concentration à 30mg/L est considérée comme « basse » pour une eau d'élevage) (Baker, 2017 ; Davidson et al., 2014). Toutefois l'implication d'une carence en nitrate dans le dérèglement des fonctions de reproduction est peu probable (Dolomatov, 2011 ; Tripathi & Krishna, 2008).

Tableau 5: Composition de l'eau à Rébénacq et Sarrance. Moyenne (N= 12) et écart-type (ET) des valeurs annuelles de composition de l'eau (2020-2021).

Les différences entre les deux sites ont été analysées en utilisant un U-test non-paramétrique.

	Rébénacq		Sarrance		Lees-Athas		
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET	
Conductivité (µS/cm)	257	19	258	23	238	36	
Ions majeurs, en milligrammes par litre							
Bicarbonate	145,50	17,77	140,00	17,04	130,43	15,18	
Calcium	44,79	8,57	43,60	5,78	47,26	6,64	
Chlorure	2,29	0,84	1,24	0,39	1,35	0,49	*
Magnésium	4,29	0,51	5,16	2,41	2,55	1,32	
Potassium	0,47	0,13	0,21	0,09	0,23	0,10	*
Sodium	1,83	0,28	1,09	0,27	1,42	0,50	*
Sulfate	8,33	2,06	13,05	9,54	13,82	12,87	
Nutriments, en milligrammes par litre							
Nitrate	2,92	1,28	1,03	0,27	1,01	0,15	*
Eléments trace, en microgramme par litre							
Cuivre	0,22	0,09	0,14	0,07	0,17	0,07	
Fer	14,99	14,12	3,00	4,58	3,49	3,10	*
Manganèse	1,47	1,28	0,15	0,18	0,11	0,08	*
Sélénium	0,13	0,02	0,15	0,05	0,10	0,02	
Iode	1,35	0,53	1,04	0,18	1,12	0,34	
Zinc	1,37	0,70	1,35	0,83	1,57	1,73	

* indique une différence significative entre Rébénacq et les deux autres sites – U-test.

On observe, pour les trois sites, des valeurs importantes de calcium et de bicarbonate typiques d'un contexte géologique karstique carbonaté-calciue comme celui rencontré dans les chaînons béarnais (Klarica, 1997). Ces fortes concentrations sont relativement stables au cours de l'année (faible variabilité) mais expliquent la valeur « basale » de la conductivité sur les trois sites tout au long de l'année. On note de plus une présence de magnésium à Sarrance et Lees-Athas (pas de différence significative) qui s'explique par la nature dolomitique des strates traversées par l'eau au cours de son parcours sous-terrain (Delfaud, 1973).

A ce stade de l'étude, les résultats ont montré qu'une diminution de la conductivité provoque le défaut de qualité sur le site de Sarrance et qu'à conductivité égale, ce phénomène n'est pas observé à Rébénacq. L'étude détaillée des concentrations en espèces ioniques dans l'eau d'élevage (expliquant la conductivité) a permis d'observer que les concentrations en Na, K et Cl sont les variables les plus discriminantes entre les eaux des sites touchés de celle du site non-touché par la baisse de qualité des pontes. Les concentrations de ces espèces ioniques sont significativement plus faibles à Sarrance et Lees-Athas qu'à Rébénacq. Toutefois pour valider ces résultats et écarter les autres espèces ioniques présentant des concentrations différentes, l'étude de la corrélation entre concentration en espèces ioniques et conductivité doit permettre de valider ou d'infirmer l'hypothèse de l'implication de ces espèces ioniques dans ce phénomène.

II.2.3.5. Corrélation entre conductivité et concentration des différentes espèces ioniques étudiées dans les eaux de Sarrance et de Lees-Athas

Le diagramme de corrélation entre la conductivité et les concentrations en différentes espèces ioniques présentes dans les eaux de Sarrance et de Lees-Athas (figure 31) confirme l'importante corrélation qui existe entre la conductivité et la concentration en calcium et en bicarbonate, pour les raisons évoquées précédemment. Les concentrations en nitrate et en sulfate contribuent elles-aussi aux variations de conductivité [coefficients de corrélation respectifs 0.5-0.83]. Le constat est le même pour les concentrations en sodium, chlorure et potassium, dont les corrélations avec la conductivité sont importantes [0.68-0.91].

Enfin, le fer et le manganèse présentent des corrélations très faibles avec la conductivité [0.04-0.09]. Tout comme pour les autres éléments traces (Zn, Mg, Fe, Cu), les concentrations de ces espèces ne varient que très peu en fonction de la conductivité. Ces résultats montrent donc que la conductivité et les concentrations en éléments traces sont décorréliées, alors que le défaut de qualité est anti-corrélé à la conductivité.

Na, K et Cl sont les espèces ioniques dont les concentrations présentent des différences significatives entre sites touchés et non-touchés par le phénomène. Elles permettent de bien discriminer les deux profils de sites (résultats ACP) et sont étroitement corrélées aux variations de conductivité. Ces espèces sont donc retenues comme candidates pour être impliquées dans l'apparition du défaut de qualité.

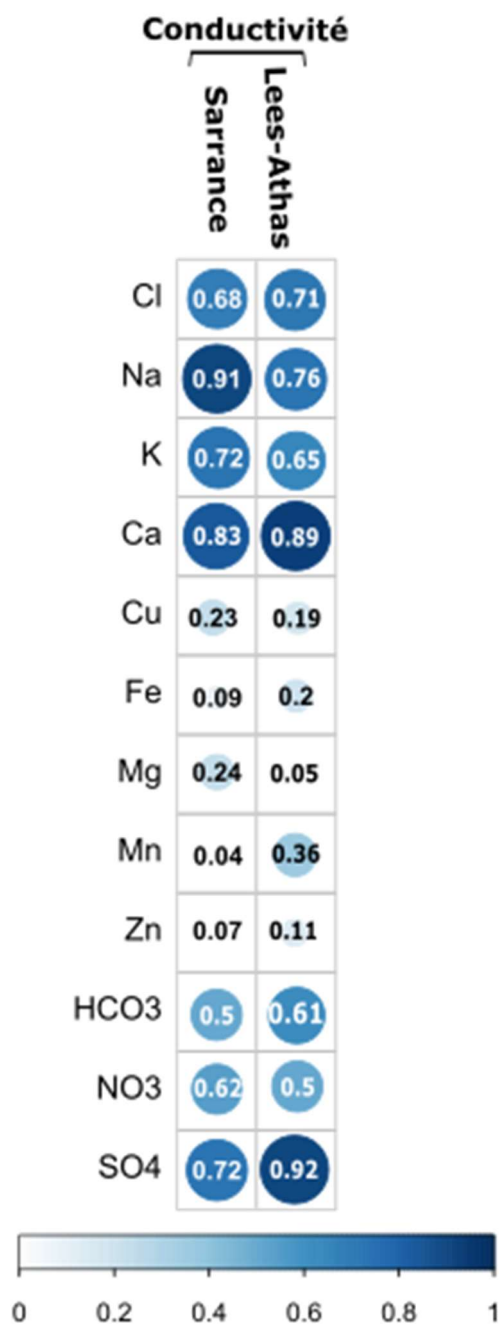


Figure 31: Diagramme de corrélation entre les concentrations des différents éléments minéraux et la conductivité dans l'eau de Sarrance (à gauche) et de Lees-Athas (à droite)

Il n'est toutefois pas exclu que l'apparition du phénomène s'explique par un modèle plus complexe et que certaines espèces ioniques non retenues aient un rôle dans cette apparition. L'approche proposée dans cette étude considère individuellement le comportement des espèces minérales dans l'eau d'élevage, mais cette approche réduite ne considère pas les rapports de concentrations ioniques des différentes espèces, dont certaines études ont démontré l'importance dans la croissance ou la toxicité pour certains poissons (Arabaci et al., 2010 ; Conceição et al., 1998 ; Derjsant-Li, 1999). D'autres facteurs physico-chimiques (potentiel d'oxydo-réduction, gaz dissout) n'ont pas été considérés dans

cette étude, les données disponibles et les travaux en la matière étant très rares et incomplets. Le potentiel d'oxydo-réduction de l'eau et le pH ont un effet sur l'état d'oxydation des espèces minérales présentes dans l'eau et donc sur la biodisponibilité de ces éléments pour les génitrices. Toutefois une exploration de cette piste nécessiterait une compréhension précise des relations entre biodisponibilité des espèces minérales et physiologie de la reproduction des poissons.

Ce travail pionnier mériterait d'être affiné par l'analyse fine de la chimie des eaux et des rapports entre espèces ioniques, ainsi que par la prise en compte d'autres paramètres écartés de cette étude (voir discussion générale). Toutefois, vu les résultats préalables et le manque de recul sur la problématique, il est difficile de tirer des conclusions plus précises quant aux déclencheurs du phénomène. Avec les données et résultats à disposition, la carence en ces éléments est la piste la plus sérieuse à suivre.

II.2.4. Conclusion

Après que la première partie de l'étude a permis d'identifier la conductivité comme une variable négativement corrélée à l'apparition du défaut de qualité étudié, le travail présenté ici a affiné la compréhension des paramètres environnementaux impliqués dans l'occurrence du défaut de qualité. La description détaillée des caractéristiques de l'eau d'élevage par l'analyse de la température, du pH, de la conductivité et des compositions ioniques a permis d'obtenir une vision globale des profils des eaux d'élevage. La température et le pH ont été écartés des pistes explorées. L'anti-corrélation entre conductivité et occurrence du défaut de qualité et l'absence de différence significative de conductivité entre sites touchés et non-touchés ont révélé l'implication de seulement certaines espèces ioniques dans l'occurrence du défaut. L'analyse de la composition minérale a permis de discriminer plusieurs éléments minéraux (Na, K, Cl) dont les concentrations sont à la fois très corrélées à la conductivité, mais aussi significativement inférieures dans l'eau des sites touchés par le phénomène. Cette approche statistique présente toutefois certaines limites car ne prend pas en compte les interactions entre espèces ioniques ou certains paramètres non-mesurés.

II.3. Conclusion du chapitre

La méta-analyse menée sur les facteurs environnementaux et zootechniques a permis d'identifier les concentrations faibles en chlorure, sodium et potassium dans l'eau de Sarrance comme étant les facteurs les plus susceptibles d'être impliqués dans l'apparition de ce phénomène. Cette hypothèse de travail sera suivie pour le reste de l'étude, et une investigation approfondie va être menée sur les mécanismes touchés par cette carence, menant à la production d'ovocytes de mauvaise qualité dès l'ovulation.

II.4. Récapitulatif

Chapitre 1 : Méta-analyse & caractérisation des facteurs environnementaux et zootechniques impliqués dans l'apparition du défaut de qualité

Objectifs principaux :

- Caractériser les conditions d'apparition du phénomène de perte de qualité des ovocytes
- Identifier les facteurs environnementaux et zootechniques impliqués dans l'apparition du phénomène

Résultats principaux :

Partie 1

- La densité d'élevage exacerbe le défaut mais ne le provoque pas
- Les bandes à pontes longues sont plus touchées par le défaut
- Les bandes touchées présentent une désynchronisation des dates de pontes au sein de la bande
- **L'apparition du défaut de qualité et la conductivité de l'eau sont corrélés**

Partie 2

- La température et le pH ne sont pas impliqués
- La conductivité n'est pas significativement différente de Sarrance à Rébénacq.
- **Les concentrations en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ à Sarrance sont fortement corrélées à la conductivité**
- **Les concentrations en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ discriminent l'eau de Sarrance de celle de Rébénacq**



Les concentrations faibles en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ à Sarrance sont retenues comme facteurs impliqués dans l'apparition du défaut de qualité

Chapitre 2 : Mécanismes physiologiques entraînant le défaut de qualité des pontes

Objectifs principaux :

- Identifier la période sensible d'apparition du défaut
- Identifier les mécanismes touchés par le défaut de qualité, à l'échelle de la génitrice, de l'ovocyte, et des tissus folliculaires

III. Chapitre 2 : Mécanismes physiologiques entraînant le défaut de qualité des pontes

Le chapitre 2 décrit dans un premier temps le phénomène de perte de qualité par le phénotypage des génitrices et des pontes de mauvaise qualité. Le but de la partie 1 de ce chapitre est de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aboutissant à une ponte de mauvaise qualité. Dans un second temps, le déroulement de la maturation finale de l'ovocyte a été étudié dans la partie 2 (durée de la maturation ovocytaire, hydratation des ovocytes avant l'ovulation, niveau d'expression des gènes jouant des rôles clés dans ces mécanismes) en comparant les génitrices des sites touchés et celles des sites indemnes. Ce travail est décrit dans l'article accepté et publié dans le journal *Aquaculture*, (Segret et al., 2021), et qui constitue cette partie (version prépublication présentée). Enfin la partie 3 de ce chapitre propose une étude comparative des profils transcriptomiques sur le site contrôle et le site touché, avec pour objectif la description globale des dérégulations moléculaires observées dans la partie 2, pour une meilleure compréhension des mécanismes touchés. Cette partie est présentée sous la forme d'un article, qui devrait être rapidement soumis pour publication.

III.1. Description du défaut de qualité à l'échelle de la ponte et des génitrices touchées

III.1.1. Introduction

Après ovulation, l'ovocyte libéré dans la cavité abdominale est enveloppé d'un chorion, matrice extracellulaire composée principalement de glycoprotéines, qui permet une protection mécanique (Brivio et al., 1991). Le chorion est séparé de la membrane vitelline par un espace périvitellin normalement indiscernable à l'œil nu (Lahnsteiner, 2000). La membrane vitelline assure l'imperméabilité de l'ovocyte et régule les transports moléculaires (Gray, 1932). Dans un ovocyte de bonne qualité, les phases intracellulaires lipidiques et protéiques sont confondues au sein de l'hyaloplasme. Les gouttelettes lipidiques sont alors distribuées dans la cellule et difficiles à discerner à l'œil nu (Mansour, 2007 ; Mansour et al., 2008). L'ovocyte est riche en vitellogénine et en globuline (protéine) (Fremont et al., 1976 ; Le Menn et al., 2007), solubilisées par l'importante osmolarité du milieu intérieur (Cardona et al., 2020 ; Gray, 1932 ; Van Heerden et al., 1996).

Chez les salmonidés, certains indicateurs de qualité des ovocytes ont été étudiés, principalement dans le cadre du vieillissement post-ovulatoire des ovocytes et des pertes de qualité que ce phénomène engendre (Craik & Harvey, 1984 ; Lahnsteiner, 2000 ; Mansour, 2007 ; Mansour et al., 2008 ; Nomura et al., 1974). Ces indicateurs s'appuient sur des paramètres morphologiques et biochimiques des ovocytes, significatifs d'une modification de composition du milieu intérieur de la cellule, causée par une perte d'homéostasie de l'ovocyte, aboutissant à la mort de la cellule (Gray, 1932 ; Lahnsteiner, 2000). L'indication de qualité (détaillée plus tard dans cette partie) est aussi applicable dans des

situations autres que celles de vieillissement post-ovulatoire. Le phénotype des pontes de mauvaise qualité observé à Sarrance, seulement quelques jours après ovulation, soulève des interrogations, une majorité des marqueurs de défaut de qualité observés dans certaines pontes ne pouvant pas être attribuée à un potentiel vieillissement post-ovulatoire (démonstré dans les parties précédentes).

Les observations et les tris qualité des pontes étant jusqu'alors réalisés de manière empirique par les opérateurs de ponte, aucune définition chiffrée du défaut de qualité à Sarrance n'existe, que ce soit à l'échelle de la génitrice, de la ponte ou de l'ovocyte. Cette absence de phénotypage précis rend difficile la comparaison avec les critères établis par la littérature et la compréhension des mécanismes impliqués.

Malgré quelques observations de gonades chez les génitrices réalisées à différents stades de maturation avant ovulation, aucun défaut morphologique des gonades et des ovocytes n'a pu être mis en évidence (du début de la vitellogenèse jusqu'à 15 jours avant l'ovulation estimée - résultats non-présentés dans cette section) avant la période de maturation ovocytaire. Ces observations ne laissaient pas présager d'un éventuel défaut de qualité des ovocytes à l'ovulation.

Dans le cadre de la partie 1 de ce chapitre, il a été mis en évidence que le défaut de qualité apparaît au moment des phases finales de la gamétogenèse. En effet, la fin de la gamétogenèse est ponctuée par la maturation ovocytaire et l'ovulation, déclenchées par des modifications simultanées de l'expression de différents gènes dans toute la gonade (Bobe et al., 2006). Ces deux phénomènes, concomitants, aboutissent à la libération hors des enveloppes folliculaires d'un ovocyte hydraté (Finn et al., 2002; LaFleur & Thomas, 1991 ; Milla, 2006 ; Watanabe & Kuo, 1986), ayant terminé la première division de méiose et ayant acquis les compétences maturationnelles nécessaires au bon déroulement de la fécondation et du développement embryonnaire (Bobe et al., 2009). Un dysfonctionnement au cours de ces étapes peut empêcher la libération des ovocytes ou provoquer la libération d'ovocytes n'ayant pas mûri correctement.

Afin de mieux comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans l'apparition du défaut de qualité et de cerner la période critique à laquelle ce dernier survient, cette partie de l'étude se consacre à définir précisément ce que sont, dans le cas de Sarrance, (1) des ovocytes de mauvaise qualité (dits « lunés » dès l'ovulation ou blanchissant à l'hydratation), (2) une ponte de mauvaise qualité, et (3) une gonade de génitrice à l'origine d'une ponte de mauvaise qualité.

Cette partie du travail a nécessité le développement et l'adaptation d'outils de phénotypage. L'adaptation de l'outil VisEgg a permis l'acquisition de données d'images de pontes et le traitement numérique de ces images pour obtenir des mesures précises et reproductibles (taille des ovocytes, variation de taille des ovocytes au sein des pontes, qualité des ovocytes). La mise en place d'une

méthode d'analyse par ultrason a permis d'observer le stade de maturation des ovocytes et la présence d'ovocytes aux qualités contrastées au sein de la gonade, avant ovulation.

III.1.2. Matériel et méthodes

III.1.2.1. Déclaration éthique

Les recherches ont été menées en accord avec la directive 2010/63/EU de l'Union Européenne pour les expériences animales. Le protocole expérimental enregistré sous la référence #201904021747602 a été spécifiquement approuvé par le comité Bien-Être Animal du laboratoire INRAe-LPGP. Pour le prélèvement des ovocytes et les pesées de tissus, les animaux ont été euthanasiés dans un bain de mésylate de tricaine (MS222) à une concentration de 300 mg/litre, pendant 10 minutes après arrêt complet des mouvements operculaires.

III.1.2.2. Elevage des génitrices

Les génitrices utilisées au cours de cette expérience sont des animaux de 4 ans (troisième période de reproduction, deuxième sous photopériode décalée) de la souche Viviers. La ponte des individus s'est déroulée en mai. Parmi les génitrices des bandes d'élevage de production commerciale, 80 femelles élevées sur le site de Sarrance et 40 génitrices élevées sur le site de Rébénacq ont été utilisés pour cette étude.

Les protocoles d'élevage sont similaires entre les 2 sites. Pendant les 9 mois précédant leur période de reproduction, elles ont été élevées dans des bassins de 125m³ à des densités d'élevage d'environ 60kg.m⁻³. Le renouvellement en eau de ces bassins était de 75% par heure, en circuit ouvert. Les femelles ont été nourries selon le même protocole, avec le même aliment (protéines brutes 46%, matière grasse brute 19%, phosphore 0.9%, cendres brutes 11.5%, énergie digestible 19 MJ/kg, Omega-3 4.8%, Omega-6 1.25%) et le même rationnement journalier défini selon les préconisations du fournisseur (0.6% du poids vif) (Le Gouessant, Lamballe, France).

Pendant la période de reproduction, à Sarrance, 40 génitrices, anesthésiées et vidées de leurs œufs par massage abdominal, ayant ovulé depuis moins de 7 jours, et ayant produit des pontes aux qualités contrastées (évaluation par les opérateurs de ponte habituellement chargés du tri qualité effectué par la chaîne de production ; mauvaise qualité – n=20 ; bonne qualité n=20) ont été analysées à l'échographe, pesées et isolées de la chaîne de production. Dans la même semaine, à Rébénacq, des génitrices (n=20 ; pontes évaluées comme étant de bonne qualité) ont été soumises au même traitement.

Toutes ces génitrices ont ensuite été euthanasiées et le poids de la ponte ainsi que le poids des tissus gonadiques post-stripping ont été enregistrés.

Certaines des pontes ont été pesées et recueillies dans des flacons (n=8 par condition pour les variables origine et qualité de la ponte). Leur qualité a été évaluée par imagerie numérique et par suivi de mortalité à l'incubation.

En plus des individus ovulés analysés à l'échographe (40 à Sarrance et 20 à Rébénacq), d'autres génitrices de Sarrance et de Rébénacq n'ayant pas ovulé, issues de la même bande d'élevage que les génitrices citées ci-avant, ont été analysées à l'imagerie ultrason (échographie) afin d'observer les différents stades de maturation et les pertes de qualité des ovocytes avant l'ovulation (40 à Sarrance et 20 à Rébénacq). Pour analyser les phénotypes extrêmes et valider les observations à l'échographe, une partie des génitrices a été euthanasiée (n=20 à Sarrance, n= 10 à Rébénacq) et disséquée pour pouvoir observer les gonades. Des images de ces dissections sont présentées.

III.1.2.3. Phénotypage des pontes par imagerie numérique

Pour 24 pontes (Sarrance bonne qualité- n=8, Sarrance mauvaise qualité- n=8, Rébénacq bonne qualité- n=8), deux protocoles de récupération d'œufs pour l'analyse des œufs par imagerie numérique ont été appliqués directement après stripping: (1) 400 ovocytes ont été prélevés à sec et photographiés dans l'heure suivant l'échantillonnage (conservation à 9°C entre le prélèvement et la prise d'image), (2) 400 ovocytes ont été prélevés et hydratés avec de l'eau du circuit d'élevage puis conservés à 8°C pendant 24H. Après ces 24h, une photo des œufs hydratés a été prise.

Les photos des ovocytes récupérés selon les deux protocoles ont été obtenues en utilisant le système de capture d'image VisEgg (Cardona et al., 2020). Ce système de prise d'image est composé d'une tablette lumineuse, d'un appareil photographique (canon EOS 2000D ; objectif 18-55mm ; résolution : 10.1 M pixels) et d'une commande informatique des réglages et de la capture d'image (figure 32).

Un objectif macroscopique a été ajouté à l'appareil photographique pour permettre une observation précise des changements morphologiques observables au sein d'un ovocyte dit luné (présent dans les pontes de mauvaise qualité). Ces observations ont permis d'établir un index de sévérité du phénomène, à l'échelle d'un ovocyte. Cet index a été constitué à partir d'images d'ovocytes issus des pontes de mauvaise qualité, présentant des phénotypes individuels contrastés.

Ce système de phénotypage automatisé a été développé par Jérôme Bugeon (INRAe LPGP) pour répondre à des besoins exprimés par la filière. Des analyses sur un grand nombre de pontes ont été utilisées pour démontrer la pertinence de cet outil, travail dans lequel je me suis impliqué, étant donné l'importance de cet outil pour mon projet. La description des possibilités offertes par cet outil a fait l'objet d'une publication en 2020 (Cardona et al., 2020) dont je suis co-auteur et qui est annexée à ce document.



Figure 32 : Système de capture d'image VisEgg (Cardona et al., 2020)

Les images sont ensuite traitées par un algorithme développé et codé en macro VBA sur les logiciels Visilog 7.3 (Thermo Scientific) et en IJ-macro sur le logiciel Fiji (version étendue de ImageJ, National Institute of Health). Le traitement numérique permet la détection et l'identification individualisée automatique des ovocytes, et la mesure de plusieurs paramètres pour chaque ovocyte identifié (surface, diamètre, couleur). Le résultat de cette analyse est la mesure de critères de qualité pour chaque ponte (pourcentage d'ovocytes blancs, pourcentage d'ovocytes lunés, taille moyenne des ovocytes et coefficient de variation de la taille des ovocytes au sein de la ponte), la présence d'ovocytes

lunés (avant hydratation) ou blancs (24H après hydratation) étant interprétée comme un indicateur direct de l'intégrité et donc de la viabilité des ovocytes (Gray, 1932).

III.1.2.4. Evaluation des performances de survie à l'éclosion

Pour chacune des 24 pontes analysées grâce à l'outil VisEgg, des tests de survie à l'éclosion ont été menés en parallèle. Pour chaque ponte, environ 400 ovocytes ont été recueillis et fécondés par une laitance provenant de 6 néo mâles issus des bandes de production (même laitance utilisée pour toutes les pontes), nourris *ad libitum* avec l'aliment utilisé pour les génitrices. Ces mâles de 20 mois sont placés sous la même photopériode que les génitrices et la laitance servant à la fécondation est préparée selon le protocole utilisé dans la chaîne de production. Après contrôle de la motilité du sperme, 15µL de laitance et 15mL d'activateur de mobilité du sperme (Actifish, IMV Technologies, L'Aigle, France) sont mis en contact avec les ovocytes. Les ovocytes fécondés ont été transférés dans des incubateurs individuels dans un système d'incubation en circuit ouvert (température de l'eau = $9\pm 0.3^{\circ}\text{C}$) jusqu'à éclosion. Les ovocytes morts ont été retirés régulièrement (3 fois par semaine) et une désinfection quotidienne au bronopol (Pycèze, ELANCO, Neuilly-sur-Seine, France) a été réalisée afin de prévenir les infections fongiques de *Saprolegnia spp.* Le suivi des mortalités et les comptages des ovocytes au stade œillé et à l'éclosion ont permis de définir le pourcentage de survie des individus.

III.1.2.5. Evaluation des stades de maturation des ovocytes et détection de situations anormales par imagerie ultrason

Dans un but d'observation *in vivo* et non-invasive de la maturation et plus particulièrement de la perte de qualité des ovocytes au sein du tissu folliculaire (avant ovulation), une technique de phénotypage basée sur l'observation des gonades par ultrason a été mise au point. Cette approche originale se base sur les travaux réalisés sur le saumon sauvage par l'unité de recherche Ecologie et Santé des Ecosystèmes (UMR ESE, Rennes) (Nevoux et al., 2019) et sur ceux réalisés par les professionnels de la sélection sur le saumon et l'esturgeon d'élevage (Mr Raul Benitez, caviar Pyrinea, communication personnelle ; Mr Cyril Gonzales, IMV Imaging, communication personnelle).

Deux modèles d'échographes ont été utilisés au cours de ces travaux : l'Exapad (IMV Technologies, L'Aigle, France) et le M-Turbo (Sonosite, Fujifilm, Bothel, USA).

Des descriptions (1) du matériel et des réglages et de (2) la procédure de manipulation et d'examen du poisson sont présentées ci-après selon une méthode standardisée (Novelo & Tiersch, 2012).

- (1) L'échographe a été utilisé avec une sonde linéaire 5-10MHz (émission de fréquences multiples) pour l'évaluation de la maturation des génitrices. Les réglages d'analyse musculaire par défaut ont été utilisés. Les truites arc-en-ciel présentent des écailles peu anguleuses et une peau riche

en mucus, ne rendant pas la protection ou l'immersion de la sonde nécessaire. Le mucus du poisson a été utilisé comme milieu de transmission. La sonde a été nettoyée à l'eau claire entre chaque examen. Des images ont été enregistrées pour chaque individu (identifiées par un numéro ; format .jpg) et exportées sur clé USB.

- (2) Les poissons anesthésiés ont été placés dans un casier plastique le temps de l'analyse. En alignant la sonde avec la ligne latérale de l'individu, des images sagittales de la cavité abdominale ont été réalisées.

L'article publié et présenté dans la partie II de ce document décrit la méthode d'évaluation du stade de maturation des ovocytes utilisée. La reconnaissance se base sur les changements morphologiques induits par l'hydratation des ovocytes décrits dans la littérature au moment de la maturation ovocytaire finale (Craik and Harvey, 1984; Grier et al., 2007; Lubzens et al., 2010 ; Milla et al., 2006) pour établir le stade de maturation des ovocytes non-ovulés. Ces changements se traduisent par un assombrissement central progressif de l'ovocyte observé à l'échographe, signifiant le début de la maturation ovocytaire et, dans une situation normale, une ovulation imminente (Jalabert, 1978; Jalabert and Szöllösi, 1975).

Les résultats d'observations faites avant stripping, à l'échographe, ont été croisés aux résultats VisEgg et aux mesures post-stripping pour valider les interprétations des observations échographiques. L'imagerie ultrason a été utilisée pour observer les ovocytes qui présentent un défaut de qualité dans les tissus folliculaires et dans la cavité abdominale, avant et après ovulation.

III.1.2.6. Ovocytes recueillis et poids des gonades après stripping

Les dissections préliminaires sur des génitrices à différents stades de vitellogenèse et après ovulation ont été réalisées (données non présentées). Les pondeuses présentant de mauvaises qualités de pontes exhibaient une rétention des ovocytes matures au sein des tissus folliculaires, parfois malgré l'ovulation évidente de plus de 50% des ovocytes de la gonade, et ce plusieurs semaines après la ponte. Pour valider ces observations sur les génitrices de cette expérience, le poids de chaque individu ainsi que le poids total d'ovocyte prélevés par stripping ont été mesurés. Le poids des ovaires après stripping (tissus folliculaires, ovocytes 1 et ovocytes matures non-libérés pendant l'ovulation) a ensuite été mesuré. Ces mesures ont permis de mesurer pour chaque individu :

$$(1) \text{ L'index ovo-somatique (IOS) : } IOS = \frac{\text{Poids total des ovocytes recueillis au stripping}}{\text{Poids total du poisson avant stripping}}$$

$$(2) \text{ L'index folliculaire-somatique (IFS) : } IFS = \frac{\text{Poids total des ovaires}}{\text{Poids total du poisson avant stripping}}$$

Ces mesures ont été illustrées par des photographies des gonades après stripping (canon EOS 2000D ; objectif 18-55mm ; résolution : 10.1 M pixels) afin d'étayer les observations préalables.

III.1.2.7. Analyse des données

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel R (R Core Team, 2014) et l'environnement Rstudio (Racine, 2012). Les figures ont été produites en utilisant le package ggplot2 (Wickham, 2009). Les résultats des analyses VisEgg, d'IOS et d'IFS ont été traités par U-test.

III.1.3. Résultats et discussion

III.1.3.1. Phénotypage des pontes de mauvaise qualité

III.1.3.1.1. La perte de qualité à l'échelle d'un ovocyte

Les observations morphologiques réalisées avec l'objectif macroscopique 100 mm sur des pontes de mauvaise qualité ont permis d'établir un index de sévérité du phénomène à l'échelle d'un ovocyte (figure 33.A). Cet index a été couplé avec les observations faites dans la littérature dans le cas d'une perte d'homéostasie des ovocytes de truite fario (figure 33.B) (Gray, 1932). Composé d'images issues de plusieurs pontes, cet index montre les différences morphologiques observables à l'œil nu sur des ovocytes aux qualités contrastées.

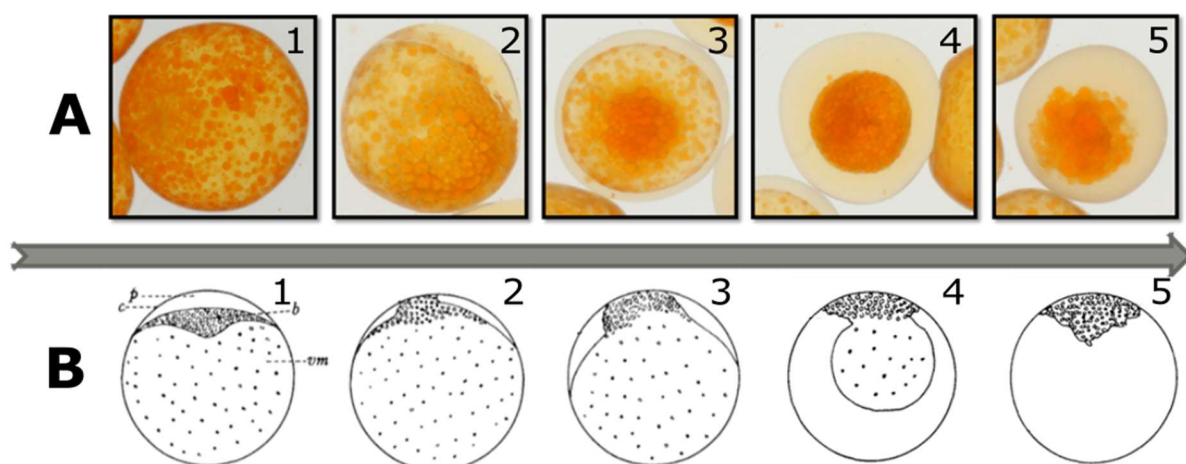


Figure 33: Index de sévérité de la perte d'homéostasie des ovocytes observée à (A) Sarrance avec un objectif macroscopique 100mm et (B) dans la littérature (Gray, 1932)

p désigne l'espace périvitellin, *b* le blastodisque, *c* le chorion et *vm* la membrane vitelline

La première image (figure 33.A.1) présente un ovocyte sans espace périvitellin observable (annoté p en figure 33.B.1). Les gouttelettes lipidiques, plus foncées, sont de petites tailles et distribuées au sein de la cellule. En se basant uniquement sur ces critères morphologiques, cet ovocyte peut être considéré comme viable et de bonne qualité. Sur la seconde image (figure 33.A.2), l'espace périvitellin est observable à l'œil nu, et les gouttelettes lipidiques sont distribuées de manière polarisée au sein de la cellule. Les gouttelettes lipidiques sont de taille plus importante en 2A.1. Cette tendance est

marquée sur les autres images, avec un élargissement de l'espace périvitellin et l'agréation croissante des gouttelettes lipidiques qui forment à terme deux phases au sein de l'ovocyte : une phase centrale opaque et une phase périphérique dans l'espace périvitellin, bien observables dans les dernières images (figure 33.A.4 & 2A.5) et décrites dans la littérature (Mansour, 2007). L'aspect de l'agrégat lipidique central, sphérique et avec des gouttelettes pouvant faire penser à des cratères, est à l'origine de l'appellation commune de « luné », utilisée pour désigner les ovocytes de mauvaise qualité.

Les figures de la littérature présentées (figure 33.B) illustrent les changements morphologiques entraînés par une perte d'homéostasie chez des ovocytes suite à l'endommagement de la membrane vitelline (Gray, 1932). La similitude entre les observations de Sarrance et celles de la littérature force à penser que le défaut de qualité observé à Sarrance sur les ovocytes est dû à une perte d'intégrité membranaire. Des échanges non-maîtrisés se produisent alors entre l'ovocyte et le milieu extérieur et créent un déséquilibre au sein de l'ovocyte (entrée d'eau, différence d'osmolarité) (Lahnsteiner & Patzner, 2002). Ces changements vont impacter la distribution des lipides hydrophobes dans le vitellus. Pour une modification modérée de la composition intra cellulaire, les gouttelettes lipidiques sont distribuées au sein de la cellule mais forment des agrégats plus importants (Mansour, 2007). La taille des gouttelettes est un premier indicateur de qualité de l'ovocyte. Lorsque le phénomène est plus sévère (Figure 33.A.4 & 33.A.5 & 33.B.4 & 33.B.5), on observe une fuite de la phase protéique dans l'espace périvitellin néoformé. L'importance et l'irrégularité de la largeur de l'espace périvitellin sont considérés comme des indicateurs robustes de mauvaise qualité de l'ovocyte (Lahnsteiner, 2000 ; Nomura et al, 1974). Une agrégation de la phase lipidique hydrophobe se forme au centre de l'ovocyte. A ce stade, les ovocytes ont perdu toute capacité à être fécondés (0% de survie au stade œillé) (Mansour, 2007). Le pourcentage d'ovocytes lunés au sein d'une ponte est un marqueur de qualité de la ponte.

La perte d'homéostasie observée implique une rupture de la membrane de l'ovocyte, qui n'assure plus l'imperméabilité du milieu intracellulaire. Lorsque des ovocytes de mauvaise qualité sont transférés dans l'eau, l'entrée d'eau et la dilution des sels au sein de l'ovocyte entraînent la précipitation de la vitellogénine et de la globuline (Van Heerden, 1996). Cette précipitation se manifeste par une coloration blanche opaque de l'ovocyte. Le choc osmotique de l'hydratation permet d'exacerber les défauts de qualité des membranes de certains ovocytes qui ne sont pas encore lunés. Le pourcentage d'ovocytes blancs au sein d'une ponte 24 heures après hydratation est considéré comme un indicateur robuste de la qualité de la ponte (Cardona et al, 2020).

A Sarrance, le tri qualité visuel se base sur la morphologie des gouttelettes lipidiques et sur la présence d'ovocytes lunés à partir du stade II (figure 33.A.2). La section suivante va décrire la quantité d'ovocytes

lunés et blancs au sein des pontes déclarées de mauvaise qualité et écartées de la chaîne de production.

III.1.3.1.2. Présence d'ovocytes lunés et d'ovocytes blancs dans les pontes de mauvaise qualité et lien avec la survie à l'éclosion

L'analyse VisEgg a permis de définir le pourcentage d'ovocytes lunés au sein des pontes (figure 34.A). Pour les pontes de bonne qualité (figure 34.A.1), le taux d'œufs lunés et le coefficient de variation de ce taux sont faibles ($2.3 \pm 1.9\%$). Les valeurs prises pour les pontes dites de mauvaise qualité (figure 34.A.3) sont significativement plus importantes ($6.5 \pm 7.1\%$).

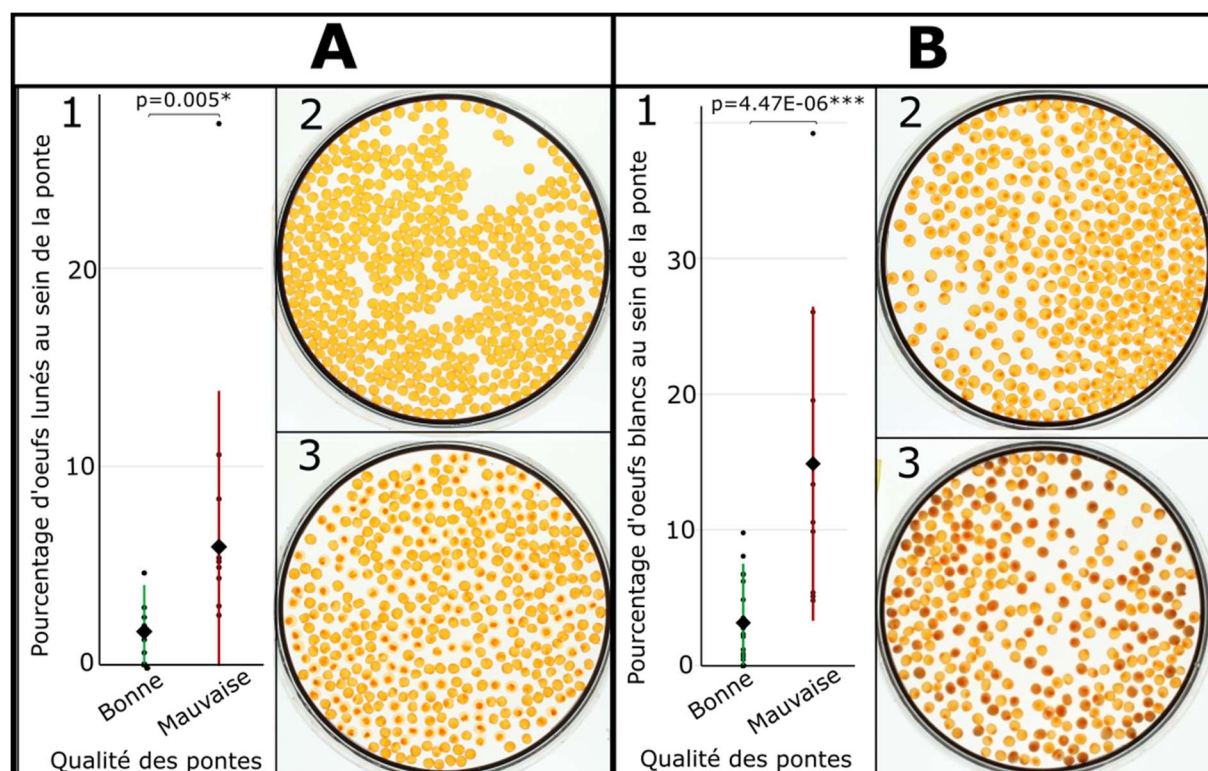


Figure 34 : (A) Pourcentage (1) d'œufs lunés au sein des pontes à Sarrance, en fonction de leur qualité et photographies utilisées dans l'analyse VisEgg pour des pontes (2) de bonne qualité et (3) de mauvaise qualité après stripping

(B) Pourcentage (1) d'œufs blanc au sein des pontes à Sarrance, en fonction de leur qualité et photographies utilisées dans l'analyse VisEgg pour des pontes (2) de bonne qualité et (3) de mauvaise qualité après 24H d'hydratation

Les résultats et observations sont les mêmes pour les résultats VisEgg de pourcentage d'œufs blancs au sein de la ponte (figure 34.B). Les pontes de bonne qualité (figure 34.B.1) présentent peu d'ovocytes qui blanchissent après hydratation ($3.6 \pm 4.7\%$) alors que les ovocytes des pontes de mauvaise qualité (figure 34.B.3) blanchissent plus ($14.2 \pm 11.4\%$).

Cette différence de pourcentage d'ovocytes lunés et blancs est attendue, toutefois il est étonnant d'observer des pontes dites de mauvaise qualité présentant dans certaines situations des taux

d'ovocytes lunés moins importants que les pontes de bonne qualité. Ce résultat pourrait illustrer l'imprécision du tri visuel. Cependant le phénotypage VisEgg ne prend pas en compte l'état des gouttelettes lipidiques au sein de la ponte et ne repère que les phénotypes lunés les plus contrastés (0% de survie au stade œillé chez la truite fario selon la littérature) (Mansour, 2007) alors que les phénotypes moins marqués, repérable par un opérateur exercé mais pas par l'outil VisEgg, présentent des taux de survie au stade œillé eux-aussi très faibles (entre $3.3 \pm 2.9\%$ et $40.6 \pm 15.2\%$ de survie à l'incubation).

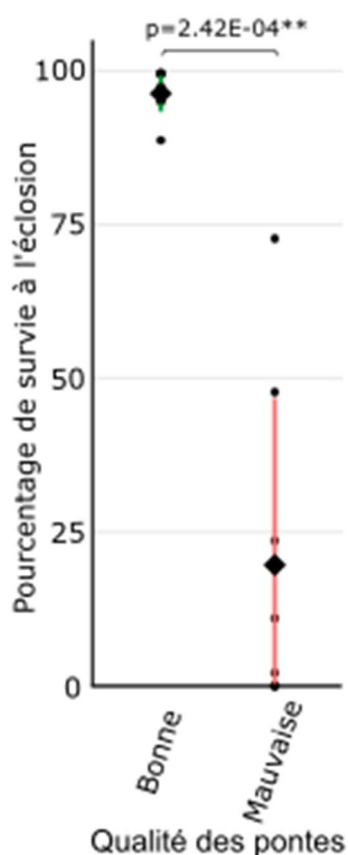


Figure 35: Pourcentage de survie des œufs de Sarrance à l'éclosion en fonction de la qualité des pontes selon les critères des techniciens de production

Ces considérations sont corroborées par les résultats de survie à l'incubation des pontes étudiées (figure 35). Les résultats de survie à l'éclosion démontrent que le tri visuel par les opérateurs est très discriminant pour ce caractère : les pontes déclarées de mauvaise qualité présentent des taux de survie très faibles ($21.2 \pm 24.1\%$) à l'éclosion alors que les pontes dites de bonne qualité présentent des performances de survie à l'éclosion élevées et stables ($93.2\% \pm 3.2\%$).

L'étude démontre à ce stade que les pontes de mauvaise qualité observées à Sarrance sont composées d'une proportion importante mais très variable d'ovocytes ayant perdu ou perdant leur homéostasie (14.2% d'ovocytes blancs en moyenne après hydratation contre 3.6% dans les pontes de bonne qualité)

et dont les mortalités à l'éclosion sont extrêmement élevées (78.8% de mortalités à l'éclosion en moyenne contre 6.8% dans les pontes de bonne qualité). L'observation de telles morphologies et de telles proportions d'ovocytes non-viables dès l'ovulation nous pousse à nous intéresser aux mécanismes menant à de tels défauts avant l'ovulation, au sein de l'ovaire.

III.1.3.2. Phénotypage des génitrices aux pontes de mauvaise qualité

III.1.3.2.1. Phénotypage non-invasif de l'état de maturation des ovocytes

L'utilisation de l'échographe et la validation par dissection a permis d'observer différents stades de la vitellogenèse (figure 36). Les indicateurs morphologiques permettant de reconnaître les stades de maturation des ovocytes sont bien renseignés dans la littérature (Grier et al., 2007 ; Jalabert & Fostier, 1984 ; Milla et al., 2006 ; Patiño & Sullivan, 2002 ; Hurk & Peute, 1979 ; Wallace & Selman, 1990).

Sur les 40 génitrices examinées à Sarrance et qui n'ont pas encore ovulé :

- 22 génitrices présentent des gonades en fin de vitellogenèse, mais dont la maturation ovocytaire n'a pas débuté (Fin vitellogenèse - FV). A l'échographie les ovocytes apparaissent petits et très clairs tandis que l'observation à l'œil nu permet de voir des ovocytes petits, opaques, sans organite discernable. A ce stade, aucune anomalie morphologique des gonades, pouvant laisser supposer un défaut de qualité, n'a été observée.
- 5 génitrices présentent des ovocytes dont la vitellogenèse était terminée et en cours de reprise de méiose (post-vitellogenèse - PV). A ce stade, l'ovocyte commence à s'hydrater, on observe à l'œil nu un éclaircissement central de la cellule et on devine un réseau de gouttelettes lipidiques très petites pas encore clairement formé. A l'échographe, le centre des ovocytes s'assombrit (signe de l'hydratation) et les diamètres moyens des ovocytes augmentent. A ce stade encore, aucune anomalie morphologique des ovocytes n'a pu être observée.
- 10 individus présentent des gonades en maturation (MAT). A l'œil nu les ovocytes apparaissent clairs et présentent un réseau de gouttelettes lipidiques bien marquées et bien découpées. Cette étape précède de quelques heures l'ovulation. A l'échographe les ovocytes en maturation présentent un aspect très sombre avec une membrane claire nettement dessinée (les lipides apparaissent clairs en imagerie ultrason). Chez ces individus non plus, aucune anomalie morphologique n'a pu être observée.

- 3 individus présentent des ovocytes lunés au sein des tissus folliculaires (DEF pour défaut). Tous les ovocytes de la gonade présentaient le phénotype décrit plus haut dans cette partie, malgré la présence du tissu folliculaire. A l'échographe, les amas noirs informes mal découpés indiquent la présence d'ovocytes hydratés (ayant probablement maturé) mais subissant une perte de l'intégrité de leur membrane (membrane indiscernables).

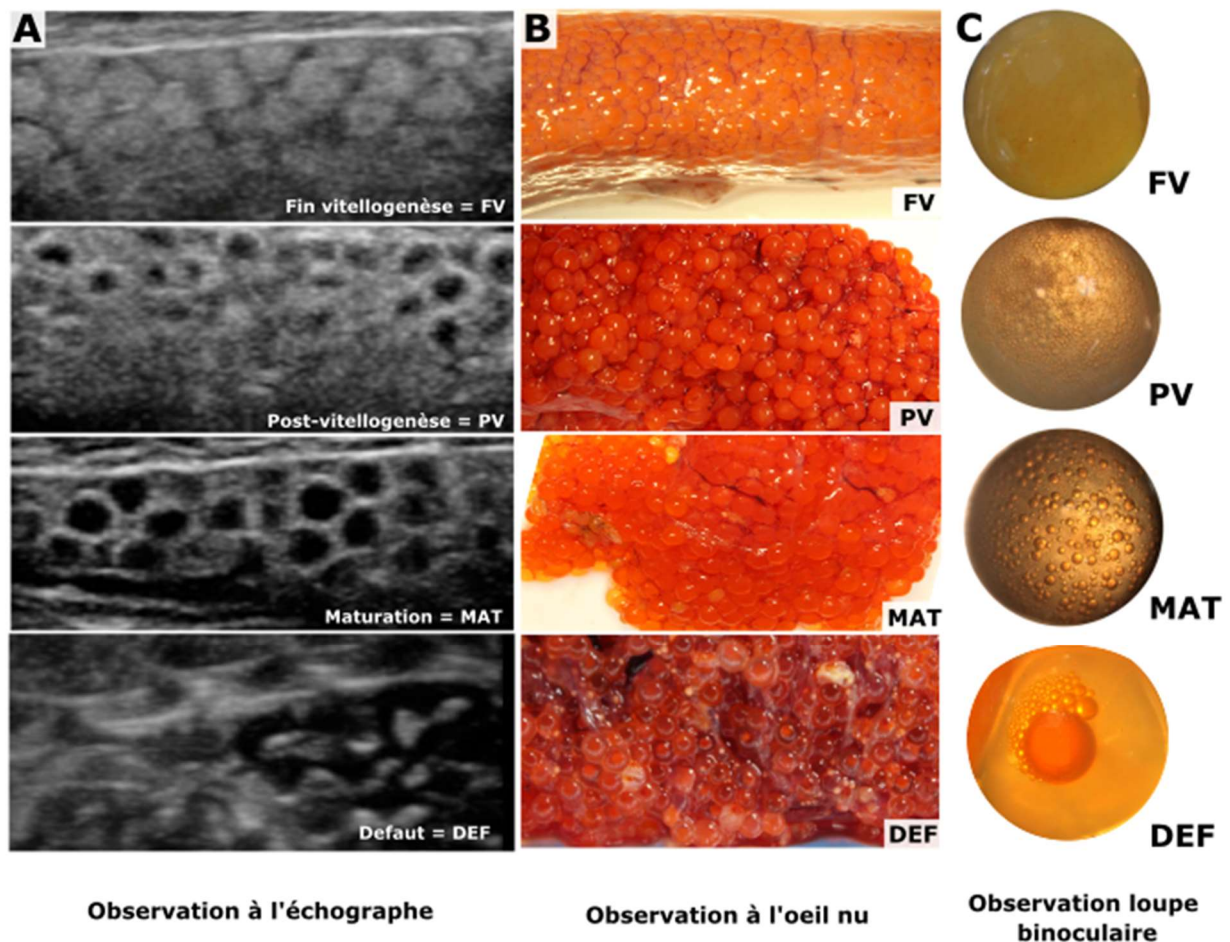


Figure 36 : Observations (A) à l'échographe et photographies (B) à l'objectif 18-55mm et (C) à l'objectif macroscopique 100mm de gonades et d'ovocytes en fin de vitellogenèse (FV), en reprise de méiose (post-vitellogenèse - PV), en maturation (MAT) et présentant un défaut de qualité (DEF)

Les observations faites à Rébénacq sont les mêmes pour les 3 premiers stades repérés. Aucun individu ne présentant d'ovocytes lunés au sein de la gonade n'a été trouvé. Ces observations démontrent qu'il est possible d'utiliser l'échographe pour évaluer le stade de maturation des ovocytes au sein de la gonade.

Aussi, l'observation d'ovocytes lunés au sein des tissus folliculaires confirme l'apparition du défaut de qualité avant l'ovulation. Or l'hydratation des ovocytes, observable à l'échographe, indique que la maturation des ovocytes a été engagée. Ces observations étayent la piste d'une diminution de la qualité des ovocytes en fin de gamétogenèse, pouvant être liée à l'ovulation. Ces observations et celles du paragraphe suivant sont discutées plus tard dans cette partie.

III.1.3.2.2. Observation d'un défaut de libération des ovocytes

Pour étudier les dernières phases de maturation et la qualité de l'ovulation, des génitrices dont les pontes ont présenté des qualités contrastées ont été disséquées.

L'IOS (rapport entre poids des ovocytes recueillis au stripping et poids total du poisson avant stripping) (figure 37.A) renseigne sur la masse d'ovocytes extraite de la cavité abdominale, en fonction de l'origine et de la qualité des pontes. Normalisé par le poids des génitrices, le poids des pontes de mauvaise qualité à Sarrance est moins important que celui des pontes de bonne qualité de Sarrance et de Rébénacq ($IOS_{Moy|Défaut} = 6.9 \pm 2.6\%$; $IOS_{Moy|Bonne} = 11.7 \pm 1.8\%$). De plus l'IOS des génitrices ayant des pontes de bonne qualité à Sarrance est moins important qu'à Rébénacq. A poids de la génitrice et qualité de la ponte identique, on recueille moins d'ovocytes à Sarrance qu'à Rébénacq ($IOS_{Moy|Sarrance|Bonne} = 11.0 \pm 1.6\%$; $IOS_{Moy|Rébénacq|Bonne} = 12.5 \pm 2.0\%$).

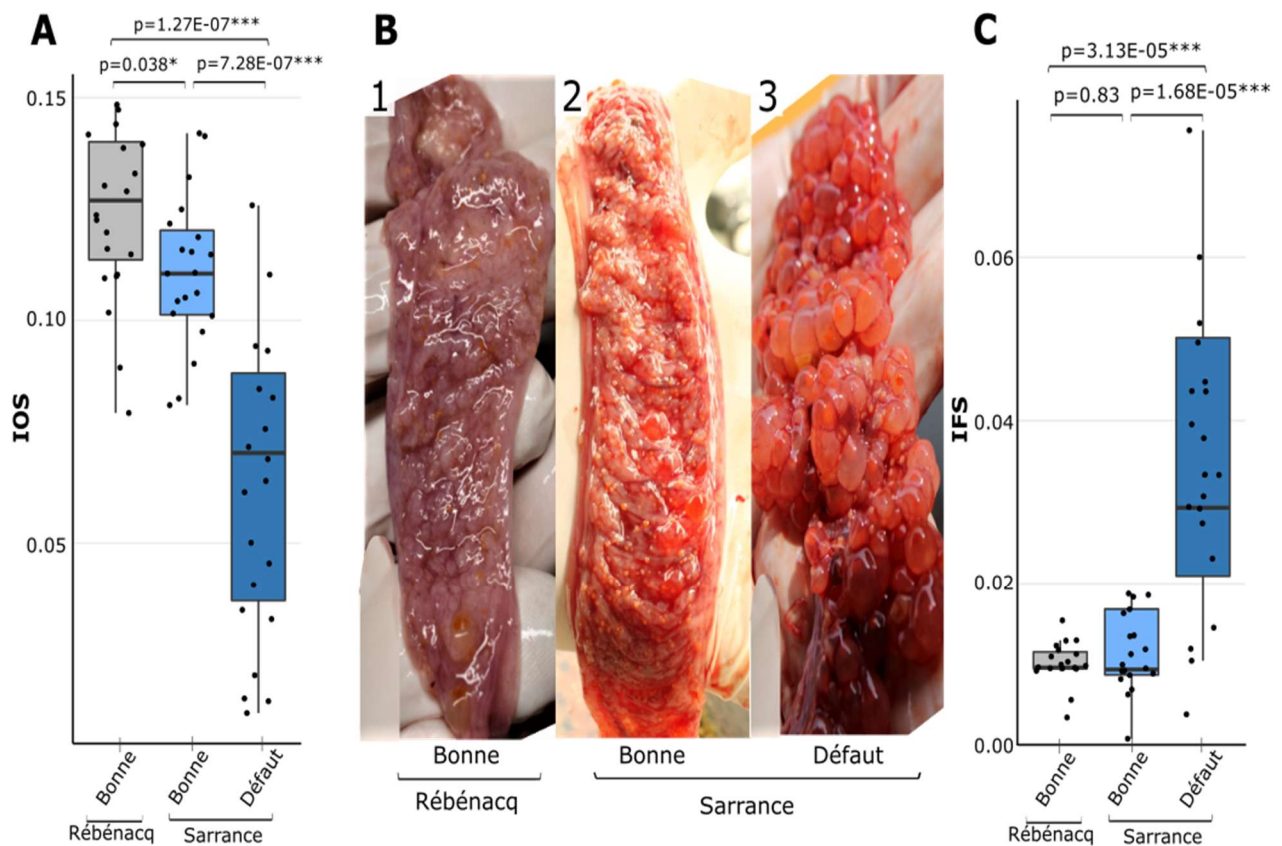


Figure 37 : (A) rapport entre poids des ovocytes recueillis au stripping et poids total du poisson avant stripping (IOS) en fonction de l'origine et de la qualité des pontes

(B) observations de gonades extraites après stripping pour des génitrices d'origines et de qualités de pontes contrastées

(C) rapport entre poids des tissus folliculaires après stripping et poids total de la génitrice avant stripping (IFS) en fonction de l'origine et de la qualité des pontes

On note pour l'IFS (rapport entre poids des tissus folliculaires après stripping et poids total de la génitrice avant stripping) une tendance inverse (figure 37.C). La masse de tissus folliculaires et d'ovocytes restant emprisonnés dans ces tissus est plus importante pour les génitrices ayant une ponte de mauvaise qualité (IFS_{Moy|Sarrance|Défaut} = $3.5 \pm 2.0\%$) que pour les génitrices ayant eu des pontes de bonne qualité à Sarrance (IFS_{Moy|Sarrance|Bonne} = $1.1 \pm 0.6\%$) et à Rébénacq (IFS_{Moy|Rébénacq|Bonne} = $1.0 \pm 0.3\%$). Ces résultats sont illustrés par les photographies des différents profils de tissus post-stripping (figure 37.B). Au sein des tissus folliculaires ayant libéré des ovocytes de mauvaise qualité, on remarque un nombre important d'ovocytes encore emprisonnés dans les tissus. Cette observation n'est pas valable à Rébénacq, où les ovocytes ont été parfaitement expulsés des tissus, mais il est remarquable que même chez les pondeuses de bonne qualité à Sarrance, des ovocytes ne sont pas libérés des tissus.

Comme évoqué précédemment, des défauts ou retards d'ovulation ont déjà été décrits dans la littérature dans des situations de stress chroniques (Contreras-Sanchez, 1998 ; Schreck, 2001) ou encore pour des températures d'élevage trop élevées ou trop basses (Beacham & Murray, 1988 ; Güner et al, 2012 ; King & Pankhurst, 2000 ; Pankhurst et al., 1996 ; Pankhurst & Thomas, 1998 ; Taranger et al., 1999 ; Taranger & Hansen, 1993). Dans ces situations, des ovocytes en maturation ou présentant un profil luné sont retenus dans les tissus folliculaires chez le saumon atlantique (King & Pankhurst, 2000) ou la truite arc-en-ciel (Pankhurst et al., 1996), comme ce qui a été décrit dans les deux dernières sections. Ces ovocytes ne sont pas fécondables lorsque l'ovulation a finalement lieu. Les causes de ce « blocage » d'ovulation ne sont pas clairement définies dans ces études, toutefois la démonstration de la réduction des capacités de synthèse de stéroïde par les follicules de truite arc-en-ciel au-dessus de 16°C (Pankhurst et al., 1996) nous pousse à soupçonner un dérèglement de l'induction endocrinienne de l'ovulation et probablement de la maturation ovocytaire. Toutefois aucun éclairage sur les raisons de la perte de qualité des ovocytes observée n'est apporté. Cette perte pourrait être due à un vieillissement intra-folliculaire trop important à température élevée, à l'atrophie des ovocytes par l'organisme réagissant à un stress ou encore à une perte d'homéostasie remarquable dès la maturation et l'hydratation des ovocytes, due à une mauvaise qualité de la membrane. L'exploration de ces pistes et la discussion des causes possible de perte de qualité nécessite des informations complémentaires sur la maturation des ovocytes à Sarrance, le délai observé entre le début de la maturation et l'ovulation, et l'exécution des mécanismes d'ovulation.

III.1.4. Conclusion

Ainsi cette partie de l'étude a nécessité le développement et l'utilisation de deux techniques innovantes de phénotypage. Dans le but de caractériser les ovocytes et les pontes en fonction de leur qualité, l'outil VisEgg a été utilisé. Cet outil de prise d'image standardisée et de traitement numérique

de l'image a permis de démontrer que les pontes de mauvaise qualité observées à Sarrance sont composées dès l'ovulation d'une proportion importante mais très variable d'ovocytes de mauvaise qualité, qui se traduit par des mortalités extrêmement élevées à l'éclosion de ces pontes. Ces ovocytes, observés à l'objectif macroscopique, présentent tous les signes de perte d'homéostasie (rupture de la membrane vitelline) habituellement observés après un long vieillissement post-ovulatoire ou une atteinte physique à l'intégrité de la membrane (Gray, 1932). L'observation de telles morphologies et de telles proportions d'ovocytes non-viables dès l'ovulation nous a amené à nous intéresser aux mécanismes pré-ovulatoires impliqués dans le phénomène. Les dissections et l'utilisation de l'imagerie ultrason ont permis d'établir deux constats : (1) aucun signe avant-coureur du défaut de qualité n'est observable dans les gonades au cours de la vitellogenèse, le défaut apparaît au cours des phases finales de la gamétogenèse (maturation ovocytaire et ovulation) et (2) la maturation ovocytaire est engagée pour les ovocytes de mauvaise qualité (hydratation avérée) mais l'ovulation est partielle (même pour certaines pontes de bonne qualité à Sarrance).

A ce stade de l'étude, le phénomène est mieux compris. Il est maintenant nécessaire de savoir si les observations faites ci-dessus sont dues à un vieillissement post-maturation sans ovulation, à une mauvaise qualité de la membrane de l'ovocyte dès la maturation ou même à une situation d'atrésie folliculaire, où les ovocytes sont dégradés activement par l'organisme de la génitrice. Une meilleure compréhension du phénomène nécessite donc des études plus approfondies (1) du synchronisme de la maturation et de l'ovulation et (2) de la qualité du déroulement de la maturation et de l'ovulation chez les individus de Sarrance. Ainsi la partie suivante, constituée d'un article publié dans *aquaculture*, propose donc une analyse approfondie de certains mécanismes de la maturation ovocytaire. La cinétique de maturation ovocytaire y est mesurée afin de déceler une éventuelle anomalie (on soupçonne à ce stade une maturation anormalement longue). L'hydratation des ovocytes au moment de la maturation, partiellement responsable de la pression hydrostatique aboutissant au déchirement des tissus folliculaires, est contrôlée. Enfin, l'expression de certains gènes, acteurs clés des mécanismes de maturation et d'ovulation, est mesurée en comparant les génitrices de Sarrance et celles de Rébénacq.

III.1.5. Récapitulatif

Chapitre 1 : Méta-analyse & caractérisation des facteurs environnementaux et zootechniques impliqués dans l'apparition du défaut de qualité

Objectifs principaux :

- Caractériser les conditions d'apparition du phénomène de perte de qualité des ovocytes
- Identifier les facteurs environnementaux et zootechniques impliqués dans l'apparition du phénomène

Résultats principaux :

- L'apparition du défaut de qualité et la conductivité de l'eau sont corrélés
- Les concentrations en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ à Sarrance sont fortement corrélées à la conductivité
- Les concentrations en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ discriminent l'eau de Sar. de celle de Rébénacq



Les concentrations faibles en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ dans l'eau de Sarrance sont retenues comme facteurs impliqués dans l'apparition du défaut de qualité

Chapitre 2 : Mécanismes physiologiques entraînant le défaut de qualité des pontes

Objectifs principaux :

- Identifier la période sensible d'apparition du défaut
- Identifier les mécanismes touchés par le défaut de qualité, à l'échelle de la génitrice, de l'ovocyte, et des tissus folliculaires

Résultats principaux :

Partie 1

- Le défaut de qualité est dû à une perte d'homéostasie des ovocytes
- Aucun défaut évident n'est observé en cours de vitellogenèse
- La maturation ovocytaire est engagée pour tout les ovocytes, quelle que soit la qualité
- L'ovulation est **partielle** à Sarrance



Le défaut de qualité apparaît tardivement, lors des phases de maturation ovocytaire et d'ovulation

III.2. Effect of a low water concentration in chloride, sodium and potassium on oocyte maturation, oocyte hydration, ovulation and egg quality in rainbow trout.

Emilien Segret^{1,2*}, Emilie Cardona^{1,3}, Sandrine Skiba-Cassy³, Frédéric Cachelou², Julien Bobe^{1*}.

¹INRAE, LPGP, Fish Physiology and Genomics, F-35000 Rennes, France.

²Viviers de Sarrance, 64490 Sarrance, France.

³INRAE, Univ. Pau & Pays Adour, E2S UPPA, NUMEA, 64310, Saint-Pée-sur-Nivelle, France.

*corresponding authors: Emilien Segret : emilien.segret@inrae.fr

_____Julien Bobe : julien.bobe@inrae.fr

Key words: ultrasound staging; non-invasive phenotyping; egg viability; VisEgg; ion and water transport.

Highlights:

- **Low water salinity impairs final oocyte maturation and egg quality in rainbow trout**
- **Low water salinity induces delayed ovulation and impaired oocyte hydration**
- **Low water salinity induces a dysregulation of several key ovulatory genes**
- **Monitoring of final oocyte maturation can be performed using ultrasound staging**

III.2.1. Abstract

Water salinity is an important environmental factor known to have detrimental effects on salmonid reproduction, mostly when migrating female broodfish are held in sea water. In contrast, data obtained in freshwater are scarce and the impact of low water salinity, and more specifically of low water concentrations in sodium, chloride and potassium, during reproduction in freshwater is currently unknown. For this reason, and because ion and water fluxes are critical for the final steps of the female gamete formation, including oocyte hydration and ovulation, the aim of the present study was to investigate the impact of low salinity water on final oocyte maturation, ovulation and, ultimately, on egg quality, using rainbow trout as a physiological model and relevant aquaculture species.

Fish from the same commercial strain were raised either in a site characterized by low concentrations of Na⁺, K⁺, and Cl⁻ ions in the water or in a closely located control site exhibiting higher concentration in these elements. Egg quality and duration of final oocyte maturation were investigated using innovative phenotyping tools such as automatic assessment of egg viability using the VisEgg system and non-invasive echograph-based monitoring of final oocyte maturation duration, respectively. Oocyte hydration during final oocyte maturation and after ovulation was also investigated. Finally, molecular phenotyping was performed using real-time PCR-based monitoring of several key players of final oocyte maturation and ovulation associated with ion and water transport, inflammation, proteolytic activity, and coagulation. Oocyte hydration and gene expression data were analyzed in the light of the duration of final oocyte maturation.

Here we show that low water salinity (i.e., low water concentration in chloride, sodium and potassium) negatively influences final oocyte maturation, ovulation and, ultimately, egg quality. Low water salinity triggered delayed ovulation and lower oocyte viability. When investigating the impact of low water salinity on final oocyte maturation duration, individuals presenting the most severe phenotypes exhibited impaired oocyte hydration and abnormally reduced gene expression levels of several key players of the ovulatory process. While the under expression of water (i.e., aquaporins) and ion (i.e., solute carriers) transporters is consistent with impaired oocyte hydration, our observations also indicate that the overall ovulatory gene expression program is disrupted. Our results raise the question of the mechanisms underlying the negative influence of low salinity water on the dynamics of the preovulatory phase, on the control of the oocyte homeostasis, including hydration, and on the overall success of the maturation-ovulation process.

III.2.2. Introduction

Fish egg quality is defined as the egg ability to be fertilized and to subsequently develop into a normal embryo (Bobe and Labbé, 2010). Egg quality can be highly variable in fish under both natural and aquaculture conditions. In most species, a lack of knowledge of mechanisms influencing egg quality is a limiting factor for the mass production of fry (Migaud et al. 2013). Many external factors such as broodstock nutrition, temperature and photoperiod, to name just a few, are known to have a major impact on egg quality in various fish species (Aegerter and Jalabert, 2004; Bonnet et al., 2007; Carrillo et al., 1989; Izquierdo et al., 2001; Pankhurst et al., 1996). In contrast, other factors such as composition and physico-chemical parameters of the water have received far less attention (Brooks et al., 1997; Bobe and Labbe, 2010). Ionic composition of the water is however likely to influence the final steps of oogenesis (i.e., final oocyte maturation - FOM) given the importance of water exchange during this critical period (Dolomatov, 2012). Among mineral elements, chloride, sodium and potassium are of specific interest because (i) they are the most abundant electrolytes in the body of living organisms and (ii) they serve a vital function in controlling osmotic pressure and acid-base equilibrium (Lall, 2003). It is commonly accepted that deficiencies in chloride, sodium and potassium are difficult to trigger because fish derive these mineral elements from surrounding water (Lall, 2003). To our knowledge, the impact of a low ionic composition in these three key mineral elements on female reproduction was never investigated.

Several concomitants, yet distinct, events take place in the full-grown ovarian follicle during FOM. The follicle-enclosed oocyte progressively acquires the ability to resume meiosis whereas the follicle is preparing the release of oocyte from surrounding somatic layers at ovulation (Grier et al., 2007; Lubzens et al., 2010). In fish, as in other vertebrates, the mechanisms involved in the ovulatory process are described as inflammatory-like (Espey, 1994; Thibault and Levasseur, 1988). In contrast to meiosis resumption and ovulation that are common to all vertebrates, FOM in fish is associated with a significant hydration of the oocyte. This phenomenon results in a dramatic increase of oocyte volume in marine species and is triggered by water entry due to the increase in free amino acid content resulting from yolk protein processing (Finn et al., 2002). In the saltmarsh species, *Fundulus heteroclitus*, the influx in potassium and sodium is a major cause of the uptake of osmotically obligated water and subsequent volume increase experienced by maturing oocytes (Wallace et al., 1992). In fresh water species, a more limited, yet significant, increase in water content is observed during FOM that could contribute mechanically to the ovulatory process, ultimately leading to oocyte release from surrounding somatic follicular layers (Craig and Harvey, 1984; Milla et al., 2006).

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is a major aquaculture species that produces eggs every year starting at age 2 (Bromage et al., 1992). In this specie oocyte maturation, ovulation (Cerdà et al., 2007;

Grier et al., 2007; Jalabert and Fostier, 1984 ; Lubzens et al., 2010), and egg quality (Bobe, 2015; Bobe and Labbé, 2010; Bromage and Jones, 1992; Brooks et al., 1997) have been extensively studied, including at the molecular level (Bobe et al., 2004, 2006, 2009; Yamashita et al., 2000). As previously documented, exposition to stress factors (e.g., temperature) during FOM can alter the quality of unfertilized eggs released from the ovary at ovulation (Aegerter and Jalabert, 2004; Bobe and Labbé, 2010; Colson et al., 2019).

For these reasons, and because water and ion fluxes are important for several key steps of oocyte development during FOM, the aim of the present study was to investigate the impact of water ionic composition, and more specifically low concentrations of sodium, chloride and potassium on FOM, ovulation and, ultimately, on egg quality, using rainbow trout as a physiological model and relevant aquaculture species. To achieve this objective, we used two closely located production sites in the French Pyrenees where the stream water exhibits dramatically different concentrations of chloride, sodium and potassium all year round, including during the reproductive period.

III.2.3. Material and methods

III.2.3.1. Ethical statement

Investigations were conducted in compliance with EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. The experimental protocol registered under the reference #201904021747602 was specifically approved by INRAE-LPGP Animal Care and Use Committee. For oocyte sampling, echograph-based monitoring and ovulation detection, fish were anaesthetized in tricaine metanesulfonate (MS222) at a concentration of 130 mg/liter. For gonad sampling, fish were euthanized in MS222 at a concentration of 300mg/liter, until 10 minutes after cessation of opercular movement.

III.2.3.2. Experimental sites and water characterization

Two experimental sites located in Rébénacq [43.155948,-0.405067] and Sarrance [43.049999,-0.6014075] (French Pyrenees), and presenting similar water temperature [9°-10°C] and oxygen conditions were used in the present study. The two sites are close (<20 km) but located in different valleys (i.e., hydrogeologic systems) differing mostly by ionic abundance in Sodium (Na⁺), Chloride (Cl⁻) and Potassium (K⁺) in the water (figure 38.A, Supplemental datafiles 3 and 4). The site presenting significantly lower abundance of these 3 mineral elements will be referred to hereafter as “Low Salinity Water (LSW)”, whereas the other site, for which water ionic composition was significantly higher, will be referred to as “Control”.

For both sites, water composition analyses were performed monthly throughout the year, from the water flowing into the experimental raceways using a dedicated water sampling flask to avoid any

contamination. Samples were analyzed by a specialized analytical laboratory (Ultra Traces Analyses Aquitaine, Pau, France) that provided the sampling flasks. Ionic abundance analysis was performed using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) technique for Na⁺ and K⁺ and by ionic chromatography for Cl⁻. Data obtained were not normally-distributed (Shapiro-Wilk test, $p > 0.05$). Ionic concentration in the 2 sites was compared using non parametric U-tests. A comprehensive water analysis of both sites is available in supplemental data files 1 and 2.

III.2.3.3. Fish rearing

Three years old female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from the same commercial strain (Viviers SA Company strain, France) were used in this study. After rearing in a nursery site, fish were transferred to either Rébénacq (control site) or Sarrance (LSW site) locations at 6 months post-fertilization. On both sites, fish were reared under natural photoperiod in 125m³ raceways at a 60kg.m⁻³ density, with a water renewal of 75% per hour until the beginning of the experiment. Stream water was used in an open circulation system without any recirculation. Similar feeding protocols, including feeding rate and diet composition, were applied for both sites throughout their lifecycle. Fish were fed at an identical daily rate (0.6% of the live weight) with the same commercial diet (46% crude protein, 19% crude fat, 0.9% phosphorus, 11.5% ash, 19 MJ/kg gross energy, Omega-3 4.8%, Omega-6 1.25%) (Le Gouessant, Lamballe, France). Following a first reproduction at age 2, fish were held under natural photoperiod during their second reproductive cycle. Spawning naturally occurred during November-December.

III.2.3.4. Experimental design

Approximately two weeks before expected ovulation (estimated based on previous ovulation dates), fish were transferred into an 8 m³ raceway to facilitate manipulations. Experimental raceways on both sites were of similar dimensions (8 m in length, 1 m in width and 1 m in depth) with a water renewal of 200% per hour originating directly from the stream water. Ovulation was monitored three times a week. Feeding was stopped when first ovulations were detected. On the control site, a total of 32 fish were used including 18 for egg quality assessment using the VisEgg system (Cardona et al. 2020) (4 of them being also used for the oocyte hydration study and 11 of them being also used for blood sampling) and 14 for the molecular analysis. On the LSW site, a total of 46 fish were used including 30 for egg quality assessment using the VisEgg system (4 of them being also used for the oocyte hydration study and 9 of them being also used for blood sampling) and 16 for the molecular analysis.

III.2.3.5. Egg quality assessment using VisEgg

In both groups, specific fish (control, n=18; LSW, n=30) were individually monitored until ovulation. Ovulations were checked every 2-3 days, under anesthesia, by gentle pressure on the abdomen. Oocyte viability evaluation was systematically performed using the VisEgg protocol when ovulation

occurred. This recently developed tool allows a robust assessment of different egg features including egg viability (Cardona et al., 2020). The process uses a standardized image-based batch analysis method of 24h-hydrated unfertilized eggs and an image processing algorithm. Outputs are the presence and percentage of whitening (i.e., non-viable) eggs within the batch. These features can be used to reliably assess egg integrity and viability. Analyze of presence of white eggs depending on rearing sites or the maturation duration yielded contingency tables analyzed using Khi-2 tests. Data obtained from VisEgg were not normally distributed (Shapiro-Wilk test, $p < 0.001$). Comparison of two groups were performed using non parametric U-tests.

III.2.3.6. Oocyte development staging during FOM

A non-invasive ultrasound-based staging was used to estimate progress into FOM. This approach, previously described for assessing reproductive stages in wild salmon (Nevoux et al., 2019), was used here for the first time to assess progression into FOM in rainbow trout. An ultrasound scanner M-Turbo (Sonosite) with a 5-10MHz linear transducer (multiple frequency) was used. Anesthetized fish were placed in a plastic tray for a short duration (<30 sec) and sagittal images of the abdominal cavity were obtained by aligning the transducer with the lateral line of the fish. Late vitellogenic oocytes appeared white on the screen, while a dark area progressively appeared at the center of the oocyte as the oocytes progressed into FOM (figure 40.A).

In order to validate echograph-based staging, direct brightfield observation was performed. In rainbow trout, late-vitellogenic (LV) oocytes observed with the naked eye appear opaque and no noticeable changes in yolk structure or any sign of meiosis resumption can be observed. Post-vitellogenesis (PV) oocytes exhibit a central yolk clarification as meiosis progressively resumes. Germinal vesicle is still visible and lipid droplets remain relatively small. During oocyte maturation (Mat), germinal vesicle breakdown (GVBD) progressively occurs and oocytes become totally clear with well-defined lipid droplets (Grier et al., 2007; Jalabert and Fostier, 1984; Milla et al., 2006; Patiño and Sullivan, 2002; Hurk and Peute, 1979; Wallace and Selman, 1990). The above description of phenotypic changes occurring in the rainbow trout oocyte during FOM was used to validate the echograph-based staging. In 100% of the cases ($n = 57$ fish) the direct observation confirmed the echograph-based staging of the oocyte during FOM. Echograph-based oocyte staging was preferred due to its non-invasive nature and was thus subsequently used to measure the duration of the oocyte maturation phase (i.e., between fully transparent oocyte (Mat) stage and detected ovulation) in the present study. The duration of the maturation phase was temperature-normalized using the actual temperature recorded on both sites during experiments and expressed in hours at 10°C in both experimental groups. Comparisons of the two groups were performed using non-parametric U-tests.

III.2.3.7. Plasma sampling and analysis

Blood was sampled during oocyte maturation on both sites (control, n=9; LSW, n=11). Blood samples were centrifuged (1000 g, 10 min, 4°C), and plasma were sampled and stored at -20 °C until further analysis. Plasma samples were analyzed by a specialized analytical laboratory (Ultra Traces Analyses Aquitaine, Pau, France). Ionic abundance analysis was performed using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) technique for Na⁺ and K⁺ and by ionic chromatography for Cl⁻. Comparison of two groups were performed using non parametric U-tests.

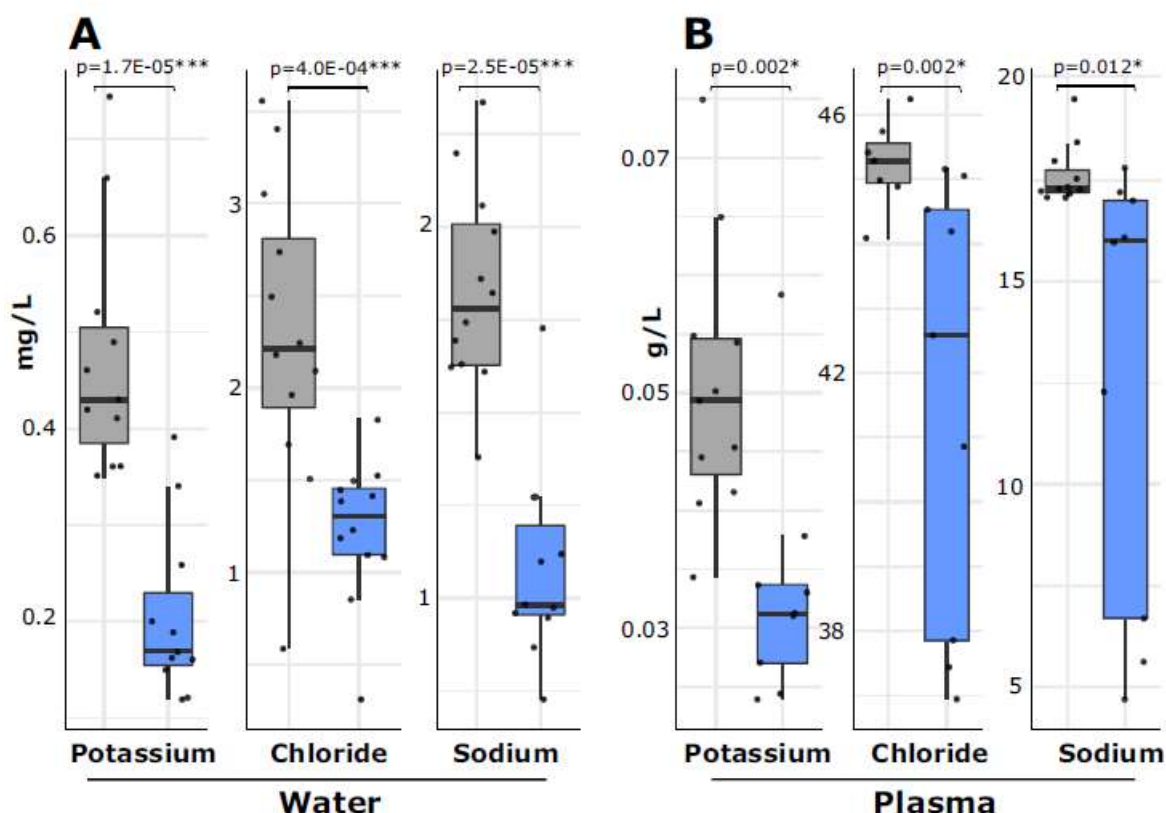


Figure 38: Water and plasma composition on both experimental sites

A: Distribution of Potassium, Chloride and Sodium concentration (mg/L) in Control (in grey, n=12) and Low Salinity Water (in blue, n=12) sites.

B: Distribution of Potassium, Chloride and Sodium concentration (g/L) in fish blood plasma reared in Control (in grey, n=11) and Low Salinity Water (in blue, n=9) sites.

III.2.3.7. Hydration measurement

For analytical purposes, individual fish originating from the LSW site were separated in two groups, based on the duration of the maturation phase [Mat<64H at 10°C (n=10), Mat≥64H at 10°C (n=21)]. Oocyte hydration was measured (n=4 individuals of each group) and monitored from late vitellogenesis stage until ovulation. The method used has previously been described (Milla et al., 2006). Briefly, gentle manual stripping was performed under anesthesia to collect oocytes, from late vitellogenesis

stage until ovulation. As previously described (Finet et al., 1988), non-ovulated oocytes were expelled from the follicle layers using two fine tip tweezers. Oocyte development staging was performed under a binocular microscope. A total of 60 to 80 oocytes per female were obtained and rapidly weighted to obtain wet mass (WM). After heating these oocytes 24 h at 105°C in a drying oven (Memmert, Buechenbach, Germany), dry mass (DM) was measured. The water content (WC) was measured from subtracting DM from WM. For each individual, WC was measured (n=4 individuals of each group) and monitored from late vitellogenesis stage until ovulation. Analysis of the increase in water content (WC) in the two experimental groups (Mat <64H; Mat ≥ 64H) was performed using non parametric U-test.

III.2.3.8. Molecular analysis

III.2.3.8.1. Tissue collection

Ovaries from control (n=4 late-vitellogenesis stage and n=10 oocyte maturation stage) and LSW (n=5 late-vitellogenesis stage and n=11 oocyte maturation stage) groups were sampled for RNA extraction. After euthanasia, ovaries were dissected out of the abdominal cavity. Oocyte staging was performed using ultrasound images prior to euthanasia followed by macroscopic validation of oocyte stage under microscope after dissection. Ovarian follicles were devolged as previously described (Bobe and Goetz, 2000) by pressing the entire tissue between two stainless steel screens while continuously applying ice-cold Cortland medium with a squirt bottle, then immediately frozen in liquid Nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

III.2.3.8.2. Total RNA extraction and reverse transcription

Ovarian tissue was homogenized in Trizol reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) at a ratio of 1ml per 100mg of tissue. Tissue was grinded using bead beating technology (Precellys Evolution, Bertin Technologies, Saint-Quentin en Yvelines, France). Total RNA extraction was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, 2 µg of total RNA were reverse transcribed using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Maxima Reverse Transcriptase enzyme, derived from Moloney murine Leukemia virus enzyme). Reverse transcription was performed by 10 minutes of incubation at 25°C followed by a 15 minutes step at 60°C and a 5-minute step at 75°C. Control reactions were run without Maxima reverse transcriptase and used as negative controls in the real-time polymerase chain reaction study.

III.2.3.8.3. Real-time PCR analysis

Real-time PCR was performed using a LightCycler480 (Roche, Switzerland). Reverse transcription products were diluted to 1/30. Technical replicates of each biological sample were run. Runs were performed in 5µL reactions containing 2µL of RT product, 250 nM of each primer and 1X PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). The program used was: 50°C for 2 minutes, then 95°C

for 2 minutes for initial denaturation, 40 cycles of 95°C for 3 seconds and 60°C for 30 seconds. After amplification, a fusion curve was obtained by 15-second step followed by a 0.5°C increase, repeated 70 times, and starting at 60°C

III.2.3.8.4. Gene expression analysis

Several concomitant events occur in the ovary during FOM that involve distinct biological processes including ovulation, an inflammatory-like process characterized by major tissue rearrangements, blood coagulation, detachment of somatic follicular cells from the oocyte, and oocyte hydration which involves specific water and ion transports. Genes used for the molecular analysis were thus selected for their putative role in inflammation, proteolytic activity, or water and ion transport and were previously reported to be markedly differentially up-regulated during FOM in rainbow trout (Bobe et al., 2006). Primers used in this prior study (Bobe et al., 2006) were used here to specifically monitor the expression of the following genes. *aquaporin 4* (*aqp4*, GenBank accession # [BX885214](#)), *vasotocin-neurophysin VT 1* (*vt1*, GenBank accession # [CA375992](#)) and *solute carrier family 26* (*slc26a4*, GenBank accession # [BX873066](#)) are involved in ion and water transport processes whereas *A Disintegrin And Metalloproteinases 22* (*adam22*, GenBank accession # [CA363158](#)), *CXC chemokine L14* (*cxcl14*, GenBank accession # [BX868653](#)) and *coagulation factor V* (*f5*, GenBank accession # [BX879767](#)) are inflammation-related genes. 18S RNA level was measured in each sample and used for messenger RNA abundance normalization. Expression levels at the late-vitellogenic (LV) stage are not presented but were not significantly different between groups and were arbitrarily set to 1 for each group. Expression data at the oocyte maturation stage were expressed as a percentage of the transcript abundance at the LV stage. Difference between LSW and control groups at oocyte maturation stage were analyzed using non-parametric U-tests.

III.2.4. Results and discussion

III.2.4.1. Low water salinity results in lower egg viability

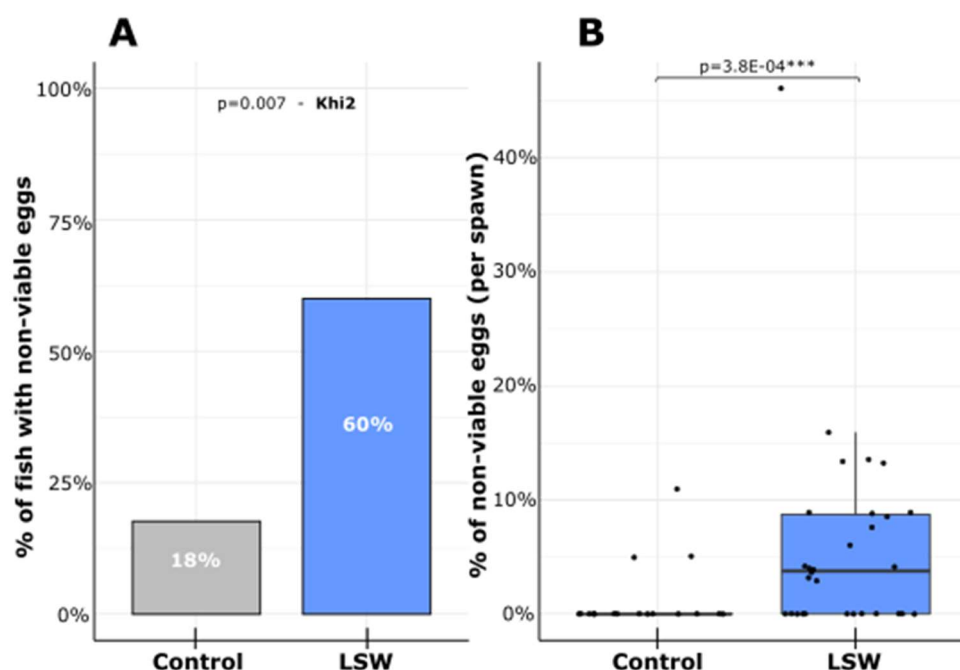


Figure 39 : Egg quality in the two experimental sites

A: Occurrence of non-viable eggs in batches evaluated using the VisEgg system in Control (n=18) and LSW (n=30) groups. Khi-2 test ($p = 0.007$).

B: Rate (percent) of non-viable eggs evaluated using the VisEgg system in Control (n=18) and LSW (n=30) groups.

The automatic phenotyping of egg viability using the VisEgg system (figure 39.A) revealed that 60% of the females exhibited non-viable eggs at the time of ovulation in the LSW group in sharp contrast with the control group in which only 18% of the females exhibited at least one non-viable egg at ovulation. More specifically, the percentage of non-viable eggs was dramatically increased (+378%) in the LSW group in comparison to the control group (figure 39.B). Salinity is known to have an impact on reproduction in fish, including in salmonids. In Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), whole-life breeding in freshwater can result in the production of poor quality gametes including poor semen production for males and presence of atretic follicles in females (Valdebenito et al., 2015). Similarly, other studies reported that rearing of Atlantic salmon in sea water induces delays and variability in the timing of ovulation (Haffray, 1995) and poor gamete quality (Maise et al., 1998). In Arctic charr (*Salvelinus alpinus*), gamete quality is improved for broodstock transferred in saltwater during their gametogenesis (Atse et al., 2002). Together, these studies indicate that water salinity is a key factor for the reproduction success of salmonids that all reproduce in freshwater even though a part of their life cycle occurs in sea water in some species. Most studies have however focused on the impact of high water salinity during final oocyte maturation. In contrast, data

on low salinity water remain scarce. In addition, most studies have focused on migrating species that return to freshwater to reproduce. In the present study, we confirm that water salinity is a key factor of reproductive success and show that, similarly to high salinity, low salinity can also have a detrimental effect on reproductive success.

III.2.4.2. Low water salinity triggers delayed ovulation

Together, our results indicate that low water concentration in chloride, sodium and potassium triggers a significant decrease in egg viability at ovulation. In order to shed light on underlying mechanisms, we aimed at investigating the preovulatory period that is known to be critical for egg quality. Given the favorable temperature range (i.e., 9-10°C) and similar feeding regime throughout the reproductive cycle, we reasoned that LSW could perturbate FOM and investigated the duration of the maturation phase from meiosis resumption to ovulation. Using non-invasive echograph-based analysis we could measure the duration of the oocyte maturation phase. After monitoring the first signs of intra-oocyte clearing (i.e., post-vitellogenic stage) (figure 40.A and 40.B), oocytes became fully transparent (i.e., maturation stage) until they were released from the ovary at ovulation. The duration of the maturation phase was calculated in each group after normalization by the daily temperature on site. We observed (figure 40.C) that the maturation phase was significantly longer in the LSW group in comparison to the

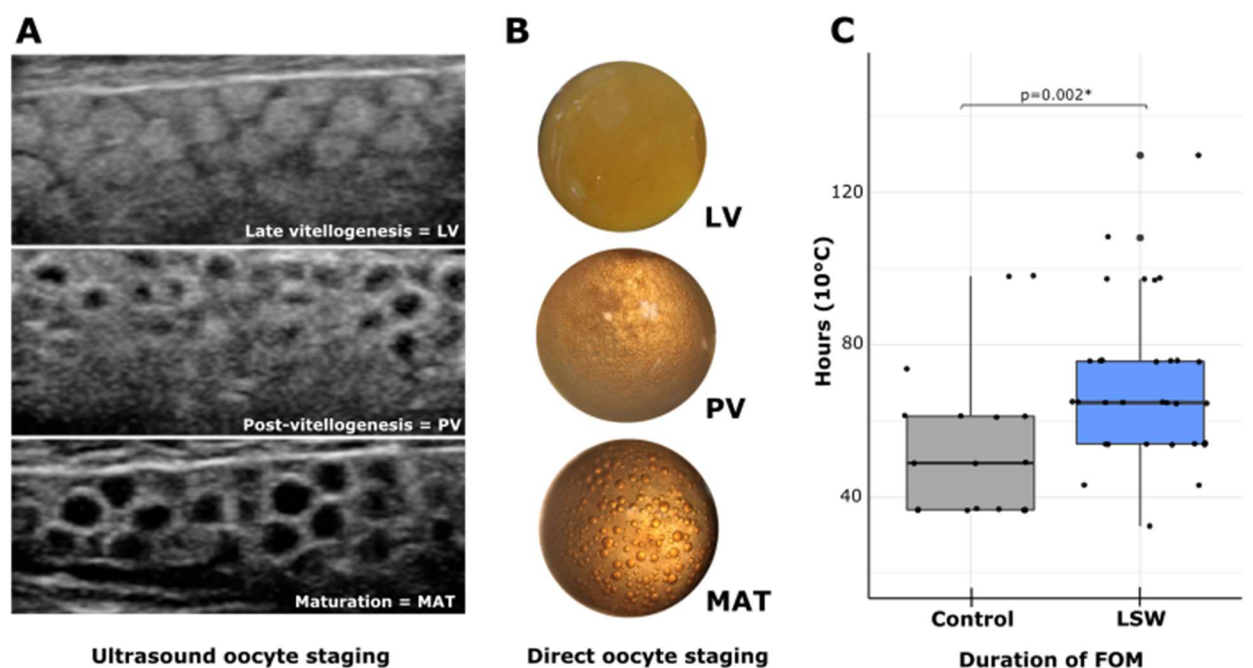


Figure 40: Ultrasound staging for measure of maturation duration

A: Echograph-based observation of oocyte changes during final oocyte maturation. Changes in oocyte aspect from LV to MAT is illustrated by a progressive central darkening, with brightening of peripheral layer before ovulation.

B: Pictures of direct observation of oocytes classified by stage. Oocyte were obtained by stripping and defolliculation (Finet et al., 1988). Yolk clarification and lipid droplet formation are observable.

C: Distribution of maturation duration evaluated by ultrasound in Control (n=18) and LSW (n=30) from central oocyte clarification and ovulation.

control group. The duration of oocyte maturation was on average 53 hours (at 10°C) in the LSW group while it was 70 hours (at 10°C) in the control group, which corresponds to a 32% increase in FOM duration in the LSW group.

Several studies described the temporal aspects of final oocyte maturation in rainbow trout. The *in vivo* duration of FOM, including progressive central clearing of the oocyte, ranged from 48 to 72 hours at 13°C (Bry, 1981). The detachment of the mature oocyte from surrounding somatic follicular layers was reported to occur between 72 and 96 hours after the first observable signs of oocyte maturation (i.e., central clarification) at 10°C (Jalabert, 1978; Jalabert and Szöllösi, 1975). Other authors showed that ovulation occurs generally 48-96 hours at 14°C after the peak concentration of maturation-inducing steroid (Fostier, 1981). Another study shown a duration of 48-72 hours at 12°C between maturation and detected ovulation for rainbow trout (Breton et al., 1998).

The duration of oocyte maturation, from full oocyte cytoplasm clearing to ovulation, reported here for the control group, is therefore fully consistent with the duration of FOM reported in these prior studies that usually included the post-vitellogenic phase (i.e., germinal vesicle migration towards the periphery of the oocyte). Our observations however suggest that the duration of FOM in the LSW group is higher or in the upper range of what is classically observed in rainbow trout at 10°C. In addition, the LSW group exhibits a strong interindividual variability with individuals that ovulated 97 hours (2 individuals) and 130 hours (1 individual) after detected oocyte maturation (figure 40.C). These individuals presented the usual phenotypic traits of maturation (i.e., color pattern and body shape), but ovulation occurred drastically later. Heterogeneity in FOM duration and, in some cases, absence of ovulation has often been reported in trout and other fish. This heterogeneity has however systematically always been associated with premature induction of FOM and ovulation, typically when FOM was triggered in maturationally incompetent (i.e., vitellogenic) follicles *in vivo* or *in vitro*. This is for instance the case for hormonally injected fish (Bry, 1981; Goetz and Bergman, 1978; Jalabert, 1978). Using non-invasive ultrasound-based FOM monitoring, we were able to demonstrate here that oocyte maturation (i.e., oocyte clearing) occurred but that ovulation was delayed. Previous studies have demonstrated that oocyte maturation and ovulation, while being interconnected, were two independent processes. In rainbow trout it is possible to trigger ovulation without oocyte maturation (Jalabert, 1972). Together, our results show that low salinity (i.e., low water concentration in chloride, sodium and potassium) during FOM triggers delayed ovulation, sometimes by several days. Our observations also indicate that, while oocyte maturation occurs normally, the ovulatory process appears impaired or inhibited, ultimately leading to abnormally long FOM.

III.2.4.3. Reduced egg viability in low salinity water is linked with delayed ovulation

Together our results show that low water concentration in chloride, sodium and potassium triggered reduced egg viability and delayed ovulation. We also noticed a high inter-individual variability in both egg viability and maturation phase duration in the LSW group (figure 39.B & 40.C). We reasoned that delayed ovulation could be at the origin of lower egg viability in the LSW group and investigated further any link between egg viability and maturation phase duration. For data analysis, LSW fish were separated in two groups, based on the duration of the maturation phase. We observed a dramatic and highly significant difference in egg viability in the LSW group depending on the duration of the maturation phase (figure 41). A very high proportion (85%) of the fish exhibiting a maturation phase duration of 64 hours or more exhibited non-viable eggs at ovulation, while only 10% of the fish that underwent oocyte maturation in less than 64 hours exhibited this feature (figure 41.A). In addition, the percentage of non-viable eggs was dramatically increased in the $\geq 64\text{h}$ group in comparison to the $< 64\text{h}$ group (figure 41.B).

These results strongly support our hypothesis of a significant loss of egg quality after delayed ovulation. A possible explanation for the higher rate of non-viable eggs would be the ageing of the oocytes. This well-known phenomenon has been extensively described (Aegerter and Jalabert, 2004; Billard, 1981; Craik and Harvey, 1984; Escaffre, 1976; Lahnsteiner, 2000; Samarin et al., 2015, 2008; Springate et al., 1984) and is known to trigger major egg quality defects. All existing studies on oocyte ageing prior to fertilization were however conducted after post-ovulatory ageing. To our knowledge, oocyte ageing prior to ovulation (i.e., within the ovarian follicle) is reported here for the first time in a fish species. In salmonids, in contrast to other fish species, post-ovulatory ageing does not induce a rapid decrease of egg quality. In rainbow trout, ovulated eggs can be held in the body cavity for 5 days at 12°C without any significant decrease of their developmental success (Aegerter et al., 2005). It is therefore unlikely that the modest intra follicular post-meiotic ageing observed here in the LSW group, in which ovulation is delayed, on average, by 17 hours, is sufficient to trigger alone the drop of egg quality observed in LSW. The osmotic properties of the rainbow trout egg have been thoroughly investigated in rainbow trout (Gray, 1932) and another explanation for the increase in whitening egg occurrence could be a loss of the oocyte homeostasis in LSW ultimately leading to non-viable eggs. In brook trout, a diminution of ionic concentration (Cl^-) in surrounding medium has as direct negative effect of membrane resistance (Marshall et al., 1985). Disruption of the oocyte homeostasis could therefore originate from a fragile oocyte vitelline membrane. In addition, the loss in oocyte homeostasis could originate from difficulties (i.e., high energetic cost) in maintaining the osmotic difference across oocyte membrane in a hypotonic external medium.

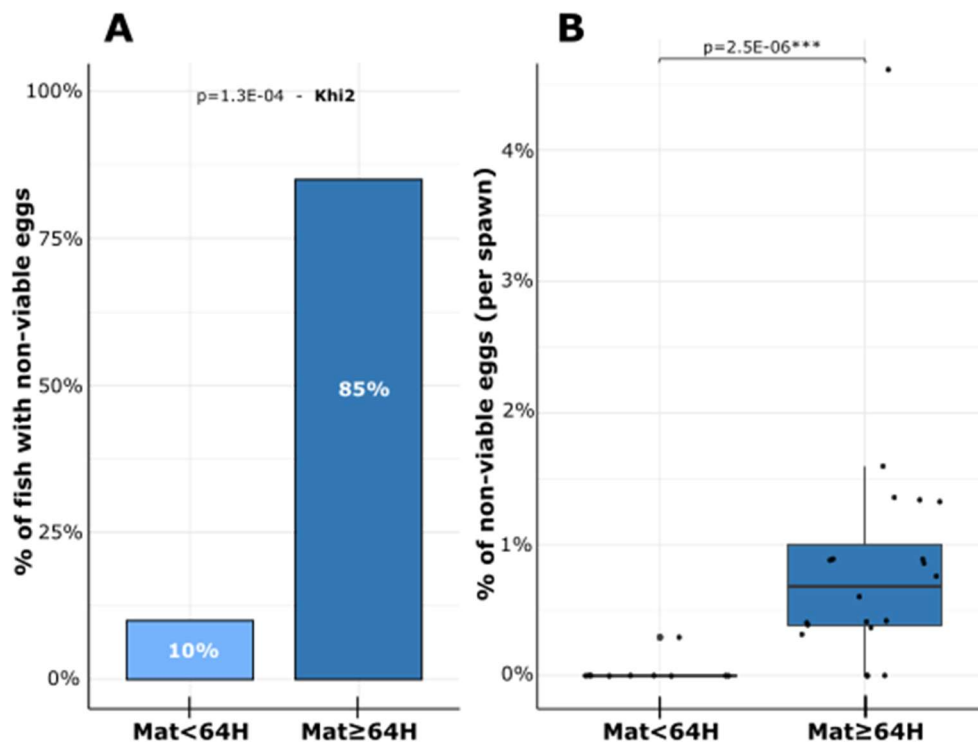


Figure 41 : Egg quality depending on the duration of oocyte maturation

A: Percentage of females exhibiting non-viable eggs in low salinity water, evaluated using the VisEgg system. Individuals are separated in two groups depending on the duration of oocyte maturation (Mat<64H, n=10; Mat≥64H, n=20). Khi-2 test ($p = 1.34E-04$).

B: Percentage of non-viable eggs depending on the duration of oocyte maturation (Mat<64H, n=10; Mat≥64H, n=20).

Together, our results show that the reduced egg viability observed in LSW is linked to delayed ovulation. This reduced egg viability can be due, at least in part, to intra-follicular oocyte ageing. We cannot, however, rule out the possibility that LSW also affects egg viability through other mechanisms that could disrupt the maintenance of oocyte homeostasis and ultimately decrease egg viability. Further investigations are needed to unravel the mechanisms triggering decreased egg viability when FOM is occurring in LSW.

III.2.4.4. Low water concentration in chloride, sodium and potassium results in reduced oocyte hydration during FOM

The release of the oocyte from surrounding follicular layers at the time of ovulation results from the ovulatory process that has originally been described in mammals as an inflammatory-like reaction. In fish, in which the oocyte is directly in contact with surrounding follicular layers, a prerequisite is the separation of the oocyte from surrounding granulosa layers (Jalabert, 1976; Lubzens et al., 2010). This phenomenon has been thoroughly described in rainbow trout in which suppression of tight junctions between granulosa cells and the oocyte results in the apparition of a thin periplasmic space separating the oocyte from surrounding somatic layers (Lubzens et al., 2010). Many observations, including direct

brightfield *in vitro* follicle observation, have shown that preovulatory rainbow trout oocyte exhibits a significant mechanical pressure onto surrounding somatic layers (Lubzens et al., 2010). Somatic follicular layers appear to be stretched around the oocyte at that stage. Because of the angiotensin-like nature of the ovulatory process and the contractile actions of theca layers during ovulation (Hajnik and Goetz, 1998; Hsu et al., 1992), postovulatory follicles appear shrunk after ovulation. It was hypothesized that the modest (i.e., 20%), yet significant, increase in water content observed during rainbow trout FOM would contribute to the increasing pressure applied by the oocyte onto surrounding somatic layers and would ultimately mechanically facilitate the exit of the oocyte through a hole in somatic layers (Milla et al., 2006). Mechanic pressure applied by the oocyte swelling is one cause of follicle rupture and the completeness of hydration facilitates the complete liberation of unfertilized eggs into the abdominal cavity. We reasoned that a lower hydration would decrease the efficiency of ovulation and investigated hydration in the two above defined sub-groups exhibiting respectively $<64\text{h}$ and $\geq 64\text{h}$ maturation phase duration. Oocyte water content (WC) was monitored throughout FOM in both groups. In the $<64\text{h}$ group, WC progressively increased throughout FOM in comparison to the late vitellogenic (LV) stage, with a 15% increase during oocyte maturation and a 27% increase at ovulation to reach 36% during the post-ovulatory period (figure 42, light blue).

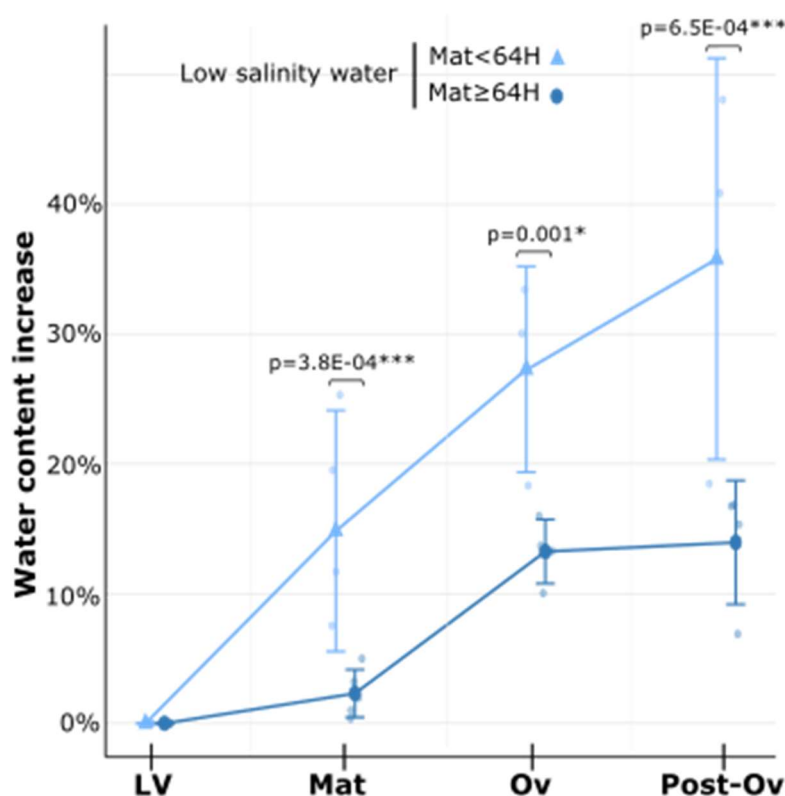


Figure 42 : Hydration of oocytes during final oocyte maturation

Increase of oocyte water content (WC), in comparison to late vitellogenic stage, for oocytes sampled at four ovarian stages: Late-Vitellogenesis (LV), oocyte maturation (Mat), ovulation (Ov) and 3 days post-ovulation (Post-Ov). Individuals are separated in two groups based on the duration of oocyte maturation (Mat<64H, n=4; Mat≥64H, n=4).

In contrast, a much more limited increase in water content was observed in the ≥ 64 h group. In comparison to the LV stage, a 2% increase in water content was observed during oocyte maturation while a 13% increase was monitored at ovulation that did not further increase during the post-ovulatory period. Observations in the < 64 h group are fully consistent with existing data in rainbow trout that were obtained using the same methodology (Milla et al., 2006). In contrast the hydration in the ≥ 64 h appears to be drastically reduced. At all stages, the water increase was significantly lower in the ≥ 64 h group in comparison to the < 64 h group. Together these results indicate that oocyte hydration is impaired during FOM occurring in low salinity water.

Oocyte hydration has been described for several species (Finn et al., 2002; LaFleur and Thomas, 1991; Milla et al., 2006; Watanabe and Kuo, 1986). Liberation of free amino acids and an uptake of inorganic ions occur during maturation. These events create a change in osmotic equilibrium, resulting in the passive transport of water molecule into the oocyte. This transport mechanism uses several proteins activity such as solute carriers, Na⁺/K⁺ ATPases, Aquaporins, and demonstration was made that protein activity and hydration were closely dependent on K⁺ concentration in the medium (Ecker and Dennis Smith, 1971; LaFleur and Thomas, 1991). K⁺ and Na⁺ accumulation in the oocyte during maturation plays an important role in the oocyte hydration process. For *Fundulus heteroclitus*, oocytes Na⁺ and K⁺ uptakes by gap junctions (Lubzens et al., 2010) are main responsible of osmolality increase (Greeley et al., 1991; Wallace et al., 1992). For Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, Cl⁻ uptakes also contributes to the increase of oocyte osmolality (Finn et al., 2002). Together these studies demonstrate the importance of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ ions for the oocyte hydration process during FOM. In contrast, the impact of low water salinity was never investigated, mostly because these experiments were often conducted in marine species. We hypothesize that FOM in low salinity water is associated in reduced ions uptake during maturation ultimately leading to incomplete oocyte hydration and thereby causing a large variability in the timing of ovulation. Further investigations are needed to elucidate underlying mechanisms.

III.2.4.5. Low water concentration in chloride, sodium and potassium induces dysregulated expression of ovulation genes

The ovulatory process involves the activation of a specific gene expression program that has been extensively documented in mammals (Richards et al., 2002) and in fish (Bobe et al., 2009, 2006; Cerdà et al., 2007; Fabra et al., 2005; Hajnik and Goetz, 1998; Knoll-Gellida, 2006). The inflammatory-like nature of the ovulatory process has been well characterized and the expression of many inflammation-related genes have been reported in various fish species (Hagiwara, 2020; Ohnishi, 2005; Takahashi, 2019) including in rainbow trout (Bobe et al., 2006). A subset of these previously identified genes

related to inflammation, proteolytic activity, or ion and water transport was monitored to characterize the ovulatory process in low salinity water.

Solute transporters and hydration-related genes are under-expressed in low salinity water

Aquaporin are molecular channels responsible of passive water transport across membranes. The role of aquaporins during fish oocyte hydration has been described by several studies. The up-regulation of *aquaporin 4 (aqp4)* was reported during rainbow trout follicular maturation (Bobe et al., 2006), suggesting that oocyte hydration of fresh water fish is aquaporin mediated, in consistency with the demonstrated role of *aquaporin1-like* in oocyte hydration of saltwater fish (Cerdà, 2009; Fabra, 2005).

The *solute carrier family 26 member 4* gene (*slc26a4*), previously known as *pendrin*, codes for a transmembrane anion exchanger and is involved in osmoregulation mechanisms (Nakada et al., 2005). Identified as dramatically up-regulated in the rainbow trout ovary during maturation, *slc26a4* is believed to play an important role in the osmotic regulation, causing water influx into oocyte during meiotic maturation. In the present study, a marked under expression of *slc26a4* and *aqp4* is observed in the ovary when FOM occurs in LSW (figure 43). Given the role of both genes in ion and water transport, this under expression is fully consistent with the impaired oocyte hydration observed in LSW, in comparison to the control group.

Vasotocin-neurophysin VT 1 (*vt1* gene) has two key roles in FOM-ovulation in catfish (Joy and Chaube, 2015). It is an important link in the gonadotropin cascade controlling FOM and ovulation. By a common action with maturation inductions hormones, VT 1 is a regulator of germinal vesicle breakdown and meiosis resumption. VT 1 also plays a key role in follicular hydration by regulating the aquaporin action (Balment et al., 2006). Here we show a marked under expression of *vt1* observed in the LSW group in comparison to the control group (figure 43). This profile is fully consistent with both the observed impaired ovulatory process and the under expression of *aquaporin 4*. In addition, the position of *vt1* in the gonadotropin-dependent regulatory cascade controlling oocyte maturation and ovulation suggests that it could be a relay in mediating the inhibitory effect of LSW.

Inflammation-related genes are under-expressed in low salinity water

Ovulation is accompanied by a broad-spectrum proteolysis within follicular layers that involves a large number of proteases. Members of A Disintegrin and Metalloproteinase gene family are dramatically up-regulated during trout FOM-ovulation phases (Berndtson and Goetz, 1988; 1990; Bobe et al., 2006). Adam22 plays an important role in cell-to-cell and cell-to-matrix interaction regulation (White, 2003).

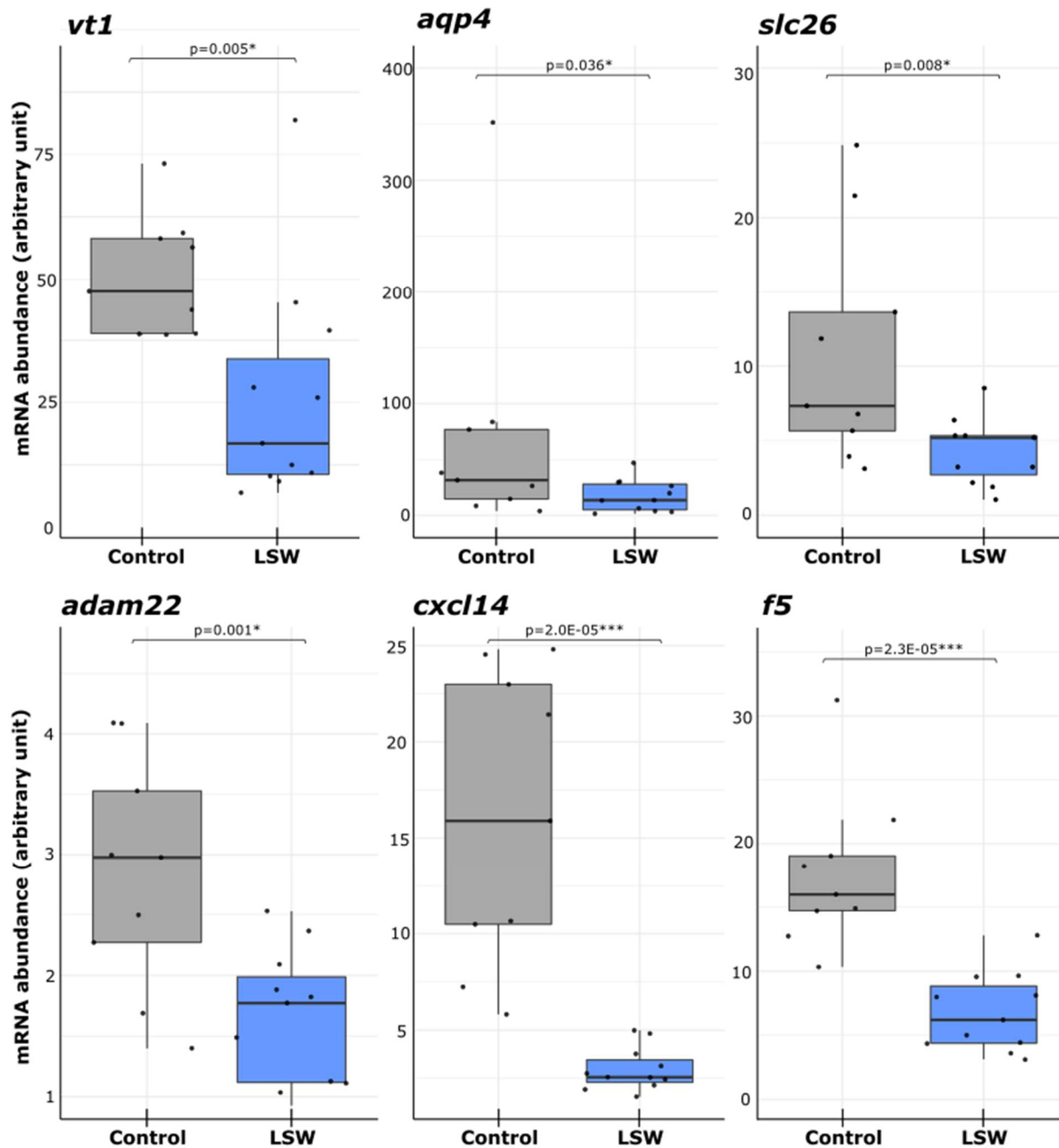


Figure 43 : Ovarian expression profiles of genes involved in FOM and ovulation

Ovarian expression profiles of *aqp4*, *slc26*, *cf5*, *adam22*, *cxcl14* and *vt5* during oocyte maturation in control ($n = 10$) and low salinity water (LSW, $n = 11$) groups. Messenger RNA abundance was measured using real-time PCR and normalized using the abundance of 18S. Abundance was arbitrarily set to 1 in the LV stage in each group.

By regulating or processing the deposit of the collagen fibrils, ADAMs proteases cause the extra-cellular matrix proteolysis (Ohnishi et al., 2005).

CXC chemokines stimulate recruitment of leukocytes and play a role of pro-inflammatory mediators. Cxcl14 implication in immune-related functions has been described in fish (Baoprasertkul et al., 2005).

The over-expression of *cxc/14* during FOM-ovulation phases is fully in line with the inflammatory-like nature of the ovulatory process.

Coagulation factor V (*f5* gene) is involved in synthesis of blood coagulant factors and has been characterized in mammals and fish (Hanumanthaiah et al., 2002; Rothberger, 1984). It was speculated that synthesis of coagulation factor V prevents bleeding caused by rupture of follicle layers during ovulation.

Here we show that *cxc/14*, *adam22*, and *f5* are dramatically under expressed during oocyte maturation in the LSW group in comparison to the control group (figure 43). These expression profiles are consistent with the delayed ovulation observed in LSW and suggest that the inflammatory nature of ovulation is affected. This is especially true for *cxc/14* for which a 5-fold decrease in gene expression is observed in the LSW group in comparison to the control group. Together, these results show that several important components of the ovulatory process are toned down when FOM occurs in low salinity water. It is noteworthy that most, if not all, aspects of the ovulatory process including inflammation, coagulation, swelling, water and ion transport as well and proteolysis are under activated. Even if previous studies have shown gene expression changes when fish adapt to water salinity change (e.g. migration, precipitation) for salmonids (Morro, 2020; Norman et al., 2014) and other species (Fiol, 2006; Pujante, 2018), evidence of such an impact of low water salinity on the overall ovulatory process were, to our knowledge, previously unreported. This raises the question of how low water salinity can inhibit the overall ovulatory process and not only osmotic exchanges.

III.2.4.6. Lower blood plasma levels of sodium, chloride and potassium are observed in the LSW site

In order to assess the impact of water concentration in chloride, sodium and potassium on fish homeostasis, we measured blood plasma concentration in these three elements in both control and LSW sites. We observed a significantly lower plasmatic concentration of these three mineral elements in fish of the LSW site in comparison to the control site (figure 38.B). This indicates that the water composition can lead to significant differences in plasma concentration in these elements. This also further supports our hypothesis that reproduction in fresh water exhibiting low sodium, chloride and potassium concentration perturbs the fish oocyte osmolarity and the hydration process during final oocyte maturation and ovulation.

III.2.4.7. Role of other water components

While marked and highly significant differences in water concentration of chloride, sodium and potassium are found between the two experimental sites, other differences exist in water composition that could also contribute, at least in part, to the impaired FOM and ovulation and reduced egg quality

phenotype observed in the LSW site. A lower concentration in Iron (Fe) and Manganese (Mn) is observed in the LSW site in comparison to the control site. For Iron, the difference is however not significant when only the reproductive period is considered (Supplemental datafile 2). Manganese (Mn) is known to inhibit ovulation in rainbow trout (Jalabert and Szollosi, 1975) and inhibit meiotic maturation in terrestrial animals (Bilodeau-Goeseels, 2001). It is therefore difficult to link low Mn concentration with impaired FOM and ovulation. In addition, it is commonly accepted that the diet is considered to be the major source of Manganese and Iron (Lall, 2002). It is therefore extremely unlikely that the lower water concentration in Mn and Fe found in the LSW site is responsible for the impaired reproductive phenotype observed in the LSW site. Similarly, a lower nitrate concentration was observed in the LSW site. While we cannot rule out that this could contribute to the abnormal reproductive phenotype observed in the LSW site, this seems however, to our knowledge and in the light of previous studies led on salmonids and others fish species (Dolomatov, 2011; Tripathi and Krishna, 2008), extremely unlikely.

III.2.5. Conclusion

Here we show that low water concentration in chloride, sodium and potassium negatively influences final oocyte maturation, ovulation and, ultimately, egg quality. Low salinity water triggers delayed ovulation and lower oocyte viability. When investigating the impact of LSW on FOM duration, individuals presenting the most severe phenotypes exhibited impaired oocyte hydration and abnormally reduced gene expression levels of several key players of the ovulatory process. While the under expression of water (i.e., aquaporins) and ion (i.e., solute carriers) transporters is consistent with impaired oocyte hydration, our observations also indicate that the entire ovulatory gene expression sequence is disrupted. Our results raise the question of the mechanisms underlying the negative influence of low water concentration in chloride, sodium and potassium on the dynamics of the preovulatory phase, on the control of the oocyte homeostasis, including hydration, and on the overall success of the maturation-ovulatory process. A global analysis of differentially regulated genes in LSW during final oocyte maturation is needed to unravel these mechanisms.

III.2.6. Additional Files

Supplemental data file 1:

Table 6: Water composition in control (Rébénacq) and LSW (Sarrance) sites

Mean (N= 12) yearly (2020-2021) values and standard deviation are shown. Difference between LSW and control water were analyzed using non-parametric U-tests.

	CONTROL		LSW	
	Mean	SD	Mean	SD
Conductivity (µS/cm)	264,00	41,64	248,92	34,07
Major ions, in milligrams per liter				
Bicarbonate	145,50	17,77	140,00	17,04
Calcium	44,79	8,57	43,60	5,78
Chloride	2,29	0,84	1,24	0,39
Magnesium	4,29	0,51	5,16	2,41
Potassium	0,47	0,13	0,21	0,09
Sodium	1,83	0,28	1,09	0,27
Sulfur	3,03	0,79	5,08	3,32
Sulfate	8,33	2,06	13,05	9,54
Nutrients, in milligrams per liter				
Nitrate	2,92	1,28	1,03	0,27
Trace elements, in micrograms per liter				
Copper	0,22	0,09	0,14	0,07
Iron	14,99	14,12	3,00	4,58
Manganese	1,47	1,28	0,15	0,18
Selenium	0,13	0,02	0,15	0,05
Iode	1,35	0,53	1,04	0,18
Zinc	1,37	0,70	1,35	0,83

* denotes significant differences.

Supplemental data file 2:

Table 7: Water composition in control (Rébénacq) and LSW (Sarrance) sites during reproduction period (October-November-December).

Mean (N= 3) values (from 2020-10-15 to 2020-12-15) and standard deviation are shown. Difference between LSW and control water were analyzed using non-parametric U-tests.

	CONTROL		LSW	
	Mean	SD	Mean	SD
Conductivity (μS/cm)	282.00	20.785	242.67	29.48
Major ions, in milligrams per liter				
Bicarbonate	154.50	25.05	143.67	10.97
Calcium	48.97	5.11	42.43	4.66
Chloride	2.98	0.45	1.47	0.06
Magnesium	4.59	0.32	3.51	2.66
Potassium	0.60	0.19	0.18	0.04
Sodium	2.02	0.17	0.99	0.18
Sulfur	3.60	0.09	3.10	2.82
Sulfate	9.70	0.65	9.5	8.37
Nutrients, in milligrams per liter				
Nitrate	4.09	1.79	1.11	0.09
Trace elements, in micrograms per liter				
Copper	0.26	0.15	0.16	0.13
Iron	8.07	6.72	2.00	0.44
Manganese	0.70	0.33	0.12	0.07
Selenium	0.13	0.01	0.17	-
Iode	1.45	0.50	1.15	0.08
Zinc	1.26	0.56	1.44	0.54

* denotes significant differences.

III.2.7. Récapitulatif

Chapitre 1 : Méta-analyse & caractérisation des facteurs environnementaux et zootechniques impliqués dans l'apparition du défaut de qualité

Objectifs principaux :

- Caractériser les conditions d'apparition du phénomène de perte de qualité des ovocytes
- Identifier les facteurs environnementaux et zootechniques impliqués dans l'apparition du phénomène

Résultats principaux :

- L'apparition du défaut de qualité et la conductivité de l'eau sont corrélés
- Les concentrations en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ à Sarrance sont fortement corrélées à la conductivité
- Les concentrations en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ discriminent l'eau de Sar. de celle de Rébénacq



Les concentrations faibles en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ à Sarrance sont retenues comme facteurs impliqués dans l'apparition du défaut de qualité

Chapitre 2 : Mécanismes physiologiques entraînant le défaut de qualité des pontes

Objectifs principaux :

- Identifier la période sensible d'apparition du défaut
- Identifier les mécanismes touchés par le défaut de qualité, à l'échelle de la génitrice, de l'ovocyte, et des tissus folliculaires

Résultats principaux :

- | | |
|-----------------|--|
| Partie 1 | <ul style="list-style-type: none">• Le défaut de qualité est dû à une perte d'homéostasie des ovocytes• Pas de défaut observé en cours de vitellogenèse• La maturation ovocytaire est engagée pour tout les ovocytes, quelle que soit la qualité• L'ovulation est <u>partielle</u> à Sarrance |
| Partie 2 | <ul style="list-style-type: none">• Le temps de maturation ovocytaire est anormalement long à Sarrance• L'hydratation des ovocytes est altérée en phase de maturation• Perturbation de l'expression de certains gènes liés à FOM (Hydratation, inflammation) |



Le défaut de qualité est lié à une mauvaise réalisation des mécanismes finaux de maturation ovocytaire et d'ovulation

III.3. Effect of a low water concentration in chloride, sodium and potassium on final oocyte maturation, oocyte hydration, and ovulation in rainbow trout: A transcriptomic approach.

Emilien Segret^{1,2*}, Aurélie Le Cam¹, Emilie Cardona^{1,3}, Sandrine Skiba-Cassy³, Frédéric Cachelou², Julien Bobe^{1*}.

¹INRAE, LPGP, Fish Physiology and Genomics, F-35000 Rennes, France.

²Viviers de Sarrance, 64490 Sarrance, France.

³INRAE, Univ. Pau & Pays Adour, E2S UPPA, NUMEA, 64310, Saint-Pée-sur-Nivelle, France.

*corresponding authors: Emilien Segret : emilien.segret@inrae.fr

_____Julien Bobe : julien.bobe@inrae.fr

III.3.1. Abstract

Water salinity is an important environmental factor known to have detrimental effects on salmonid reproduction, mostly when migrating female broodfish are held in sea water. In contrast, data obtained in freshwater are scarce and the impact of low salinity water (LSW), and more specifically of low water concentration in sodium, chloride and potassium, during reproduction in freshwater remains poorly investigated. A previous study revealed the detrimental effects of low salinity water on the dynamics of final oocyte maturation and ovulation, and, ultimately, on egg quality. These effects were associated with reduced oocyte hydration during final oocyte maturation and dysregulation of important ovulatory genes. We however lack a comprehensive view of the ovarian processes dysregulated in LSW. To fill this gap, the present study aimed at studying the ovarian transcriptome in LSW and control conditions using a comprehensive transcriptomic analysis.

Fish from the same commercial strain were raised throughout their lifecycle either in a site characterized by low concentrations of Na⁺, K⁺, and Cl⁻ ions in the water or in a closely located control site exhibiting higher concentration in these elements. Transcriptome analysis was performed using microarrays. A statistical analysis was performed followed by a gene ontology (GO) enrichment analysis.

The transcriptomic analysis reveals the reduced activation of the specific gene expression program activated during final oocyte maturation, with a lower number of activated genes, notably of known key players of the maturation-ovulation process, in LSW in comparison to control. We also observed a more modest up-regulation of many genes in LSW in comparison to control. Further observations highlighted the lack of activation of entire molecular functions. GO enrichment analysis revealed an abnormally low activation of membrane transporters during oocyte maturation whereas metalloproteases MMPs and ADAMs superfamilies members, deeply involved in inflammation mechanisms during ovulation, are not activated in LSW.

III.3.2. Introduction

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is a major aquaculture species that produce eggs every year starting at age 2 (Bromage et al., 1992). In this species oocyte maturation, ovulation (Cerdà et al., 2007; Grier et al., 2007; Jalabert and Fostier, 1984; Lubzens et al., 2010), and egg quality (Bobe, 2015; Bobe and Labbé, 2010; Bromage and Jones, 1992; Brooks et al., 1997) have been extensively studied, including at the molecular level (Bobe et al., 2004, 2006, 2009; Gioacchini et al., 2019; Liu et al., 2021; Reading et al., 2012; Yamashita et al., 2000). These studies have yielded a comprehensive characterization of gene expression profiles throughout the final steps of oogenesis (i.e., final oocyte maturation - FOM) and have identified key molecular players involved in oocyte maturation, oocyte hydration and ovulation.

Several concomitants, yet distinct, events take place in the full-grown ovarian follicle during FOM. The follicle-enclosed oocyte progressively acquires the ability to resume meiosis whereas the follicle is preparing the release of oocyte from surrounding somatic layers at ovulation (Grier et al., 2007; Lubzens et al., 2010). In fish, as in other vertebrates, the mechanisms involved in the ovulatory process are described as inflammatory-like (Espey, 1994; Thibault and Levasseur, 1988), involving the up-regulation of several inflammation-factors related genes (Hagiwara et al., 2020). FOM in fish is associated with a significant hydration of the oocyte and results in a dramatic increase of oocyte volume (Craik and Harvey, 1984; Finn et al., 2002; Milla et al., 2006), notably due to a marked up-regulation of ions and water membrane transporters (Cerdà et al., 2007; Bobe et al., 2006). The successful completion of these events during FOM will impact the ability of the produced oocytes to be fertilized and to subsequently develop into a normal embryo (i.e., the oocyte quality).

While many external factors such as broodstock nutrition, temperature and photoperiod, to name just a few, are known to have a major impact on egg quality in various fish species (Aegerter and Jalabert, 2004; Bonnet et al., 2007; Carrillo et al., 1989; Izquierdo et al., 2001; Pankhurst et al., 1996), composition and physico-chemical parameters of the water have received far less attention (Brooks et al., 1997; Bobe and Labbe, 2010). Ionic composition of the water is however likely to influence the final steps of oogenesis given the importance of water exchange during this critical period (Dolomatov, 2012). Chloride, sodium and potassium are the most abundant electrolytes in the body of living organisms and they serve a vital function in controlling osmotic pressure and acid-base equilibrium (Lall, 2003). A previous study (Segret et al., 2021) reported the dysregulation of final oocyte maturation and ovulation when female rainbow trout were held in freshwater exhibiting low water concentration in chloride, sodium and potassium (i.e., low salinity water - LSW). Low water salinity triggered delayed ovulation and lower oocyte viability. Individuals exhibited abnormally long FOM duration, impaired oocyte hydration and abnormally reduced gene expression levels of several key players of the

ovulatory process, including water (e.g., aquaporins) and ion (e.g., solute carriers) transporters. Observations of inflammatory-related genes also indicate that the overall ovulatory gene expression program could be disrupted. To our knowledge, the impact of a low ionic composition in these three key mineral elements on female FOM induction and regulation was never characterized yet.

For these reasons, the aim of the present study was to depict the dysregulation of the ovarian gene expression program during FOM in LSW in order to (1) identify dysregulated mechanisms and (2) provide new insights into dysregulated molecular processes when FOM occurs in LSW.

To achieve these objectives, we used two closely located sites exhibiting dramatically different concentrations of chloride, sodium and potassium and known to trigger differences in the dynamics of oocyte maturation and ovulation, as well as differences in egg quality. A transcriptomic analysis of ovarian tissue was carried out on both the LSW and the control groups. Comparisons of differentially expressed genes (DEG) during FOM (i.e., comparison between late-vitellogenic and oocyte maturation stages) are presented in this study for both experimental groups. A gene ontology enrichment analysis and comparison of fold-changes in expression levels of metalloproteases superfamilies were carried out.

III.3.3. Material and methods

III.3.3.1. Ethical statement

Investigations were conducted in full compliance with EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. The experimental protocol registered under the reference #201904021747602 was specifically approved by INRAE-LPGP Animal Care and Use Committee. For oocyte sampling, echograph-based monitoring and ovulation detection, fish were anaesthetized in tricaine metanesulfonate (MS222) at a concentration of 130 mg/liter. For gonad sampling, fish were euthanized in MS222 at a concentration of 300mg/liter, until 10 minutes after cessation of opercular movement.

III.3.3.2. Experimental sites and water characterization

Two experimental sites located in Rébénacq [43.155948, -0.405067] and Sarrance [43.049999, -0.6014075] (French Pyrenees), and presenting similar water temperature [9°-10°C] and oxygen conditions were used in the present study. The two sites are close (<20 km) but located in different valleys (i.e., hydrogeologic systems) differing mostly by ionic abundance in Sodium (Na⁺), Chloride (Cl⁻) and Potassium (K⁺) in the water. The site presenting significantly lower abundance of these 3 mineral elements will be referred to hereafter as “Low Salinity Water (LSW)”, whereas the other site, for which water ionic composition was significantly higher, will be referred to as “Control”.

III.3.3.3. Fish rearing

Three years old female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from the same commercial strain (Viviers SA Company strain, France) were used in this study. After rearing in a nursery site, fish were transferred to either Rébénacq (control site) or Sarrance (LSW site) locations at 6 months post-fertilization. On both sites, fish were reared under natural photoperiod in 125m³ raceways at a 60kg.m⁻³ density, with a water renewal of 75% per hour until the beginning of the experiment. Stream water was used in an open circulation system without any recirculation. Similar feeding protocols, including feeding rate and diet composition, were applied for both sites throughout their lifecycle. Fish were fed at an identical daily rate (0.6% of the live weight) with the same commercial diet (46% crude protein, 19% crude fat, 0.9% phosphorus, 11.5% ash, 19 MJ/kg gross energy, Omega-3 4.8%, Omega-6 1.25%) (Le Gouessant, Lamballe, France). Following a first reproduction at age 2, fish were held under natural photoperiod during their second reproductive cycle. Spawning naturally occurred during November-December.

III.3.3.4. Experimental design

Approximately two weeks before expected ovulation (estimated based on previous ovulation dates), fish were transferred into an 8 m³ raceway to facilitate manipulations. Experimental raceways on both sites were of similar dimensions (8 m in length, 1 m in width and 1 m in depth) with a water renewal of 200% per hour originating directly from the stream water. 23 fish were used for the molecular analysis. Some of them have also been used for blood sampling.

III.3.3.5. Molecular analysis

III.3.3.5.1. Tissue collection

Ovaries from control (n=3 late-vitellogenesis stage and n=10 oocyte maturation stage) and LSW (n=4 late-vitellogenesis stage and n=10 oocyte maturation stage) groups were sampled for RNA extraction. After euthanasia, ovaries were dissected out of the abdominal cavity. Oocyte staging was performed using ultrasound images prior to euthanasia followed by macroscopic validation of oocyte stage under microscope after dissection. Ovarian follicles were deyolked as previously described (Bobe and Goetz, 2000) by pressing the entire tissue between two stainless steel screens while continuously applying ice-cold Cortland medium with a squirt bottle, then immediately frozen in liquid Nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

III.3.3.5.2. Total RNA extraction

Ovarian tissue was homogenized in Trizol reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) at a ratio of 1ml per 100mg of tissue. Tissue was grinded using bead beating technology (Precellys Evolution, Bertin Technologies, Saint-Quentin en Yvelines, France). Total RNA extraction was performed following the manufacturer's instructions.

III.3.3.5.3. Microarray slides

An Agilent-based microarray platform with 8 × 60 K probes per slide was used (GEO platform record: GPL24910).

III.3.3.5.4. RNA labeling and hybridization

RNA samples from LSW site and Control site were used for labelling and hybridization. For each sample, 150ng of RNA was Cy3-labelled according to the manufacturer's instructions (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis - Low Input Quick Amp Labeling - Agilent protocol). Briefly, RNA was first reverse transcribed, using a polydT-T7 primer, Cy3 was incorporated by a T7 polymerase-mediated transcription and excess dye was washed using a RNeasy kit (Quiagen). The level of dye incorporation was evaluated using a spectrophotometer (Nanodrop ND1000, LabTech). 600 ng of labelled cRNA was then fragmented in the appropriate buffer (Agilent) for 30 min at 60 °C before dilution (v/v) in hybridization buffer. Hybridizations were performed in a microarray hybridization oven (Agilent) for 17 h at 65 °C, using two Agilent 8 × 60 K high-density oligonucleotide microarray slides. Following hybridization, the slides were rinsed in gene expression wash buffers 1 and 2 (Agilent).

III.3.3.5.5. Data acquisition and analysis

Hybridized slides were scanned at a 3-μm resolution using the Agilent DNA microarray Scanner. Data were extracted using the standard procedures contained in the Agilent Feature Extraction (FE) software version 10.7.3.1. Arrays were normalized using GeneSpring software version 14.5. For subsequent clustering, stages profiles were compared by ANOVA and T-test analysis (Benjamini-Hochberg (BH) corrected p.value < 0.01) to determine the differentially expressed genes (DEG) between late-vitellogenesis stage and maturation stage (i.e. meiosis resumption), and to compare these genes regulation, depending on the water composition.

For clustering analysis, log transformed values were median-centered and an average linkage clustering was carried out using CLUSTER 3.0 software and the results were visualized with TreeView software ([https:// sourceforge.net/projects/jtreeview/files/](https://sourceforge.net/projects/jtreeview/files/)). This clustering allowed a further comparison of activated genes during FOM, regarding the rearing site.

III.3.3.5.6. Gene ontology

Gene ontology (GO) enrichment analysis were performed using ShinyGO tool (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>). In order to obtain a larger list of genes, ontology was performed on DEG list obtained from GeneSpring software, with a T-test analysis (Benjamini-Hochberg (BH); corrected p.value < 0.05), only with candidates exhibiting expression fold changes superiors to 3. Genes differentially expressed in one or both of the site during FOM were used.

III.3.3.5.7. Whole gene family fold-changes comparisons

In order to validate the previous observations, an expression comparison of all ADAMs and MMPs families member genes (respectively $n=157$ and $n=58$) annotated for trout genome were performed. In order to evaluate expression variation of family members, absolute values of log-transformed fold-changes (FC) observed during meiosis resumption were compared, regarding rearing site, using U-test.

III.3.4. Results and discussion

III.3.4.1. Low water concentration in chloride, sodium and potassium has no notable influence on gene expression during late vitellogenesis stage

The statistical analysis did not yield any differentially expressed genes between the two experimental groups at the late vitellogenic stage. The use of additional sampling points throughout vitellogenesis would however be beneficial to get a better view of the impact of LSW on ovarian function during vitellogenesis. These results however suggest that the low concentration of chloride, sodium and potassium did not interfere with the molecular processes occurring in the ovary during vitellogenesis.

III.3.4.2. A limited number of genes are differentially expressed for LSW females during final oocyte maturation

A total of 145 genes were found to exhibit a differential expression between late-vitellogenesis and maturation (supplemental data 1). Among these genes, 129 were found differentially expressed only in the Control site, whereas 14 genes were differentially expressed in both site and 2 genes were differentially expressed in the LSW site only (figure 44.A).

In the control site, 73 genes were down regulated and 56 were up regulated during oocyte maturation. Thirteen genes were up regulated in both sites and the 2 differentially expressed genes in LSW site were up-regulated (figure 44.B et 44.C).

The number of DEG in the control site (i.e., 143 DEG) is consistent with previous studies showing a wide range of gene expression modifications during oocyte maturation and ovulation of fish (Klangnurak and Tokumoto, 2017; Villeneuve et al., 2010), notably with 310 DEG observed on nylon microarray in rainbow trout (Bobe, 2006) and 3569 DEG in Zebrafish analyzed by RNA sequencing to compare gonads activated and non-activated by maturation inducing steroid (MIS) (Liu et al., 2017). With only 16 DEG in LSW site (14 Inter genes and 2 LSW genes regardless sense of expression) which represents only a 11% ratio compared to control site, LSW females present a low number of differentially expressed genes.

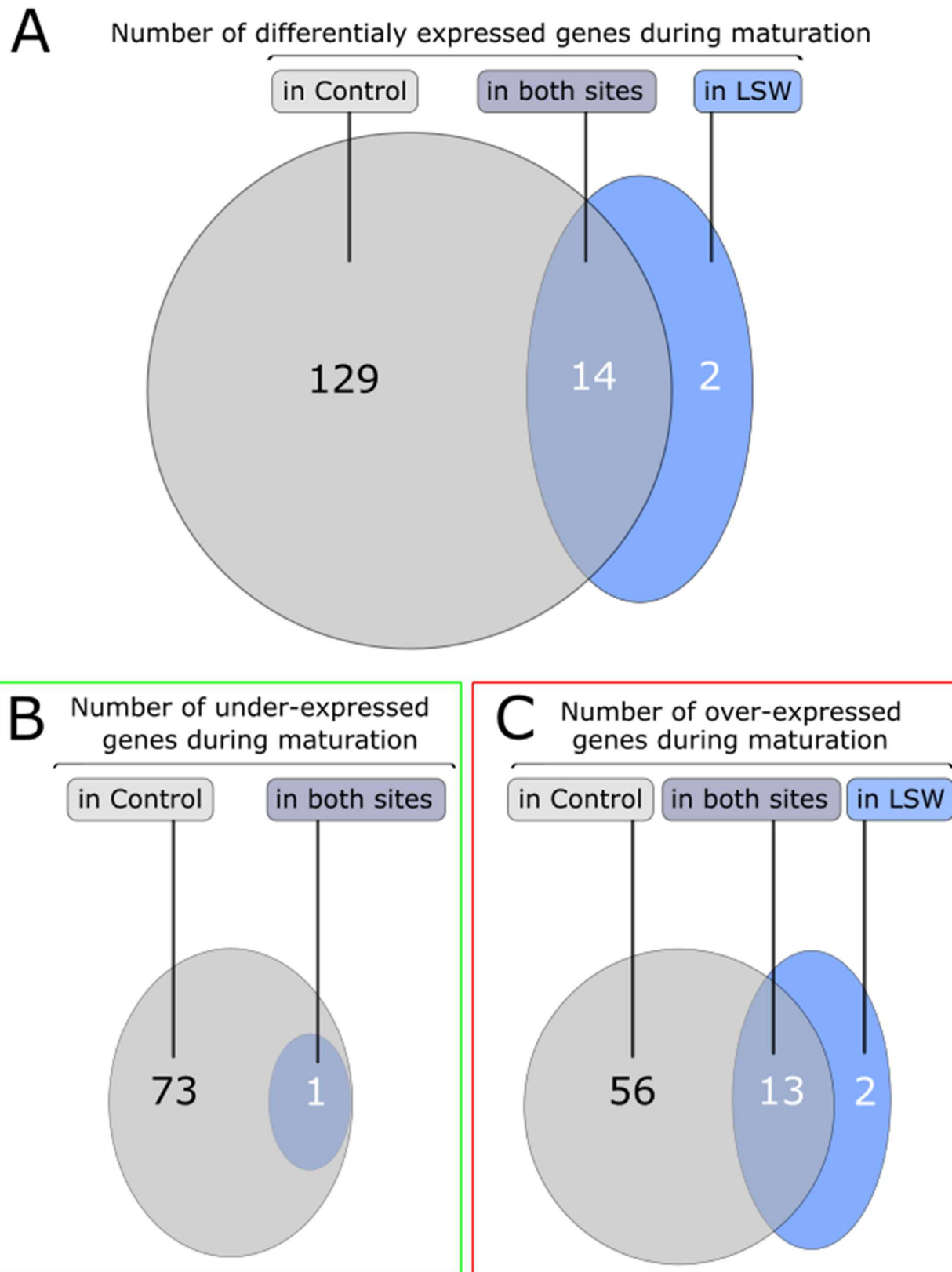


Figure 44 : Venn diagram showing the number of differentially expressed genes (DEG) between late-vitellogenesis and maturation stages regarding the rearing site (LSW or Control)

(A) for all DEG

(B) For under-expressed genes

(C) For over-expressed genes

Together these observations suggest that the specific gene expression program required for proper final oocyte maturation and ovulation, which has been extensively documented in mammals (Richards et al., 2002) and in fish (Bobe et al., 2006, 2009; Cerdà et al., 2007; Hajnik et al., 1998; Klangnarak and Tokumoto, 2017; Knoll-Gellida, 2006; Liu et al., 2017; Takahashi, 2019) is not fully activated in the LSW situation.

In order to identify the mechanisms that are not fully activated in low salinity water, we investigated further the identity and functions of the over- and under-expressed genes in comparison to the control.

III.3.4.3. Low water concentration in chloride, sodium and potassium induces low expression of key maturation and ovulation genes during FOM

III.3.4.3.1. Known ovulation genes are not fully activated during FOM in LSW

Clustering analysis results separated the over from the under expressed genes (figure 45). Amongst genes up-regulated in both sites, already documented inflammatory or ovulation related genes are presents: Coagulation factor V (*f5* gene) is involved in synthesis of blood coagulant factors and supposed to prevent bleeding caused by rupture of follicle layers during ovulation (Hanumanthaiah et al., 2002; Rothberger, 1984). Vasotocin-neurophysin VT 1 (*avp* gene) is involved in both the gonadotropin cascade controlling FOM-ovulation for channel catfish (Joy and Chaube, 2015) and the follicular hydration regulation (Balment et al., 2006). The *solute carrier family 26 member 4* gene (*slc26a4*), previously known as *pendrin*, codes for a transmembrane anion exchanger and is involved in osmoregulation mechanisms (Nakada et al., 2005). Identified as dramatically up-regulated in the rainbow trout ovary during maturation, *slc26a4* is believed to play an important role in the osmotic regulation, causing water influx into oocyte during meiotic maturation.

Previously cited genes are over expressed in both sites, but important FOM key players, presented hereafter, are over-expressed only in control site.

A solute carrier related gene, *slc6a3*, is over-expressed only in control females. This gene is member of the solute carrier family 6, which produce amino acid and oligopeptide transporters (He et al., 2008). This particular gene was identified as involved in dopamine transporter production in Zebrafish (Wang et al., 2019) and were over-expressed in Zebrafish brain inflammation situations (Moriya et al., 2019). CXC chemokines stimulate recruitment of leukocytes and play a role of pro-inflammatory mediators. Cxcl14 implication in immune-related functions has been described in fish (Baoprasertkul et al., 2005). The over-expression of *cxcl14* during FOM-ovulation, already described for rainbow trout (Bobe et al., 2006) is only observable in the control site, whereas LSW does not exhibit detectable up-regulation of these related genes. The same results are obtained for another inflammatory-related gene, *adam8b*.

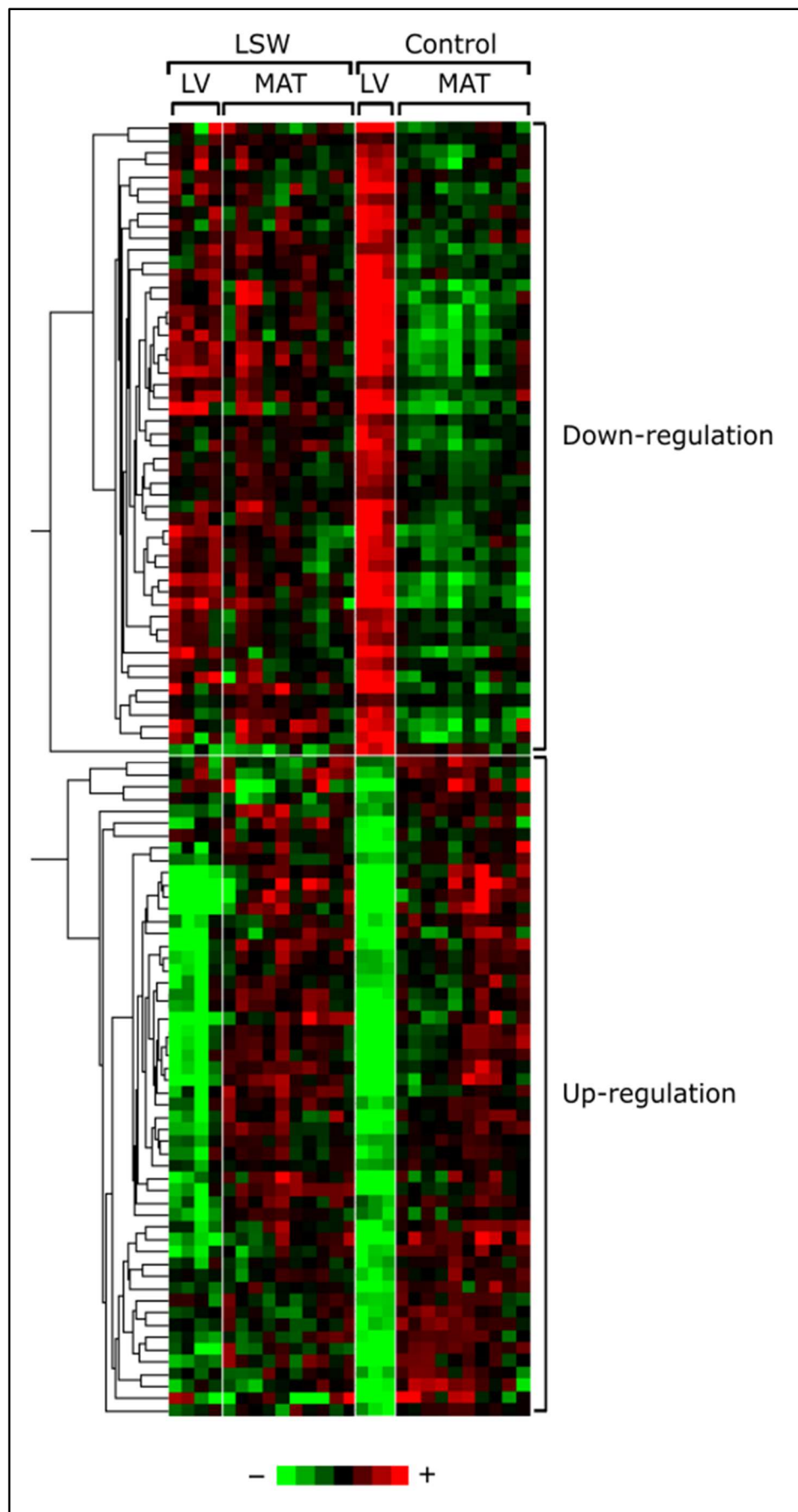


Figure 45 : Supervised hierarchical clustering analysis of the 129 DEG ($p < 0.01$) between late-vitellogenesis and maturation stages for the two sites. The dendrogram on the left represents correlation distance between the genes expression pattern.

Members of A Disintegrin and Metalloproteinase gene families are usually dramatically up-regulated during fish FOM-ovulation phases (Berndtson and Goetz, 1990; Bobe et al., 2006; Liu et al., 2018) and involved in broad-spectrum proteolysis within follicular layers (Berndtson and Goetz, 1988). Gene *adam8b* expression increases in zebrafish during oocyte maturation and ovulation (Liu et al., 2018), which made him a supposed key player of the inflammatory mechanisms activated during these physiological process. In LSW site, over expression of *adam8b* gene is not observed whereas it was reported in the control site.

Some member of aquaporin family (molecular channels responsible of passive water transport across membranes) are up-regulated during rainbow trout follicular maturation (*aqp4*) (Bobe et al., 2006), suggesting that oocyte hydration of fresh water fish is aquaporin mediated, in consistency with the demonstrated role of *aquaporin1-like* in oocyte hydration of saltwater fish (Cerdà, 2009; Fabra, 2005). *aqp4* expression is notably increased during meiosis resumption in Control females gonads but not in LSW.

Relative mRNA abundances of the discussed genes are presented in this study (figure 46). Even for genes up-regulated in both sites (fold-changes observed during FOM are systematically superiors in control females).

These over-expressions observed are consistent with previous observations relating the hydration and inflammatory-like mechanisms during final oocyte maturation and ovulation. The lack of regulation for part of these genes, observed in LSW site, underlines the impairment accompanying these physiological processes.

III.3.4.3.2. Endocrine pathways are not activated in LSW site during FOM induction

Some genes related to endocrine regulatory mechanisms are present in DEG lists. A nuclear progesterone receptor gene (*pgr*) and a prostaglandin D2 synthase family member (*ptgdsb*) are over-expressed in the control site but not in the LSW site (figure 47).

Progesterone receptor and steroid genes are activated in follicular layers of the preovulatory follicles, in response to a luteinizing hormone (LH) surge (Bahr, 1978; Goff and Henderson, 1979; Hubbard and Greenwald, 1982). Common action of progesterone and receptors regulates a large range of oocyte maturation and ovulatory related genes (Li and O'Malley, 2003; Robker et al., 2009). The progestin 17,20 β -P acts as a maturation-inducing steroid and is a known mediator of oocyte maturation and ovulation (Jalabert, 1976).

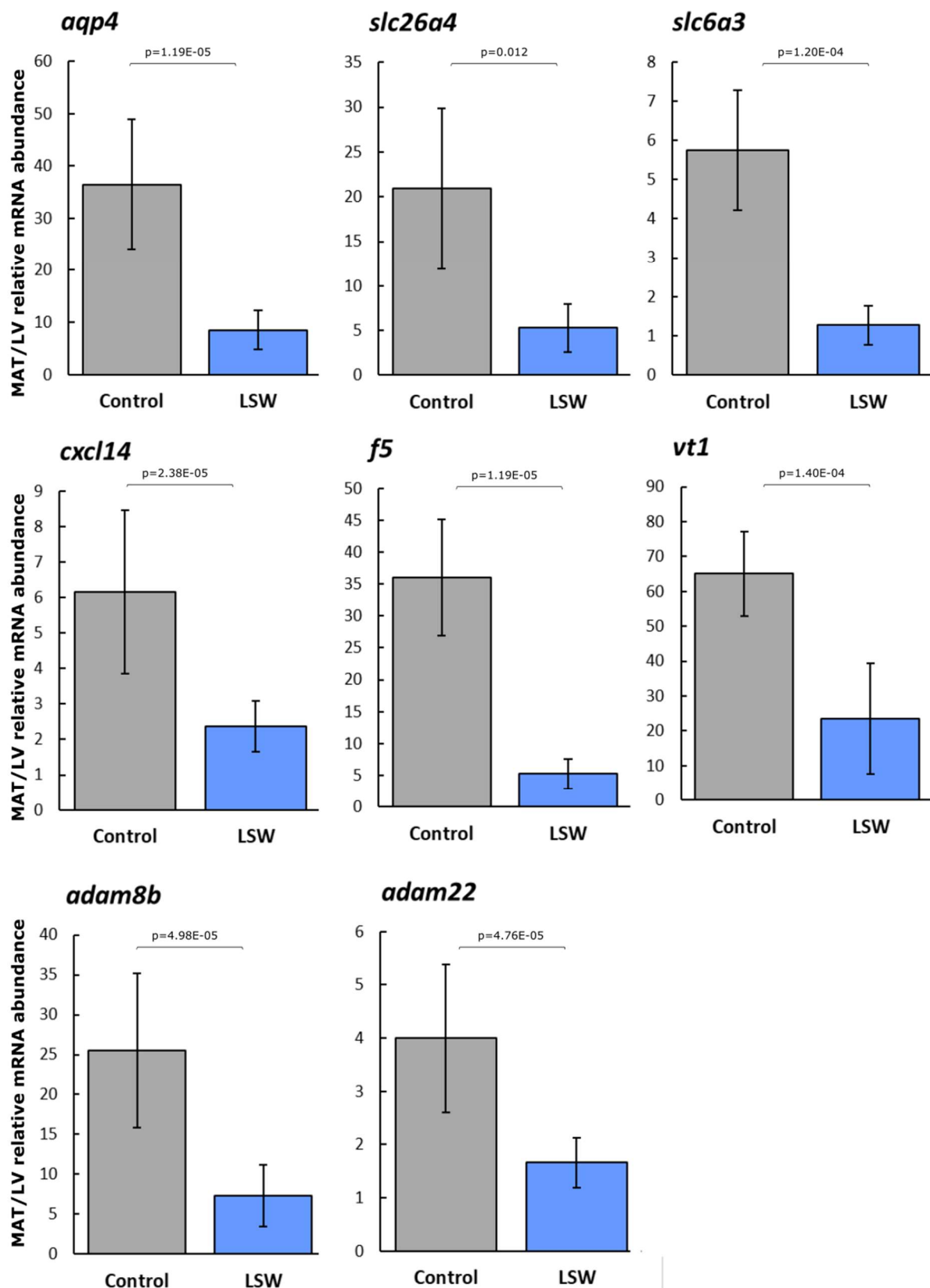


Figure 46 : Ovarian expression profiles of interests genes.

Ovarian expression profiles of *aqp4*, *slc26a4*, *slc6a3*, *cxcl14*, *f5*, *vt1*, *adam8b* and *adam22* during oocyte maturation in control ($n = 10$) and low salinity water (LSW, $n = 11$) groups. Abundance was arbitrarily set to 1 in the LV stage in each group. Comparisons were performed by U-test.

Studies have shown that the nuclear progesterone receptor PGR activated by progestin plays an important role in the expression of various factors and protein required for ovulation, notably by activating protease participating to the destruction of follicular wall (Hagiwara et al., 2014; Liu et al., 2017; Ogiwara & Takahashi., 2017; Zhu et al., 2015). Several works underlined the essential action of the progestin-activated PGR complex for prostaglandins synthesis and receptor activation in fish species (Baker et al., 2021; Berndtson et al., 1989; Goetz et al., 1989). For zebrafish, a knock-out of the *pgr* gene prevents ovulation (Tang et al., 2016).

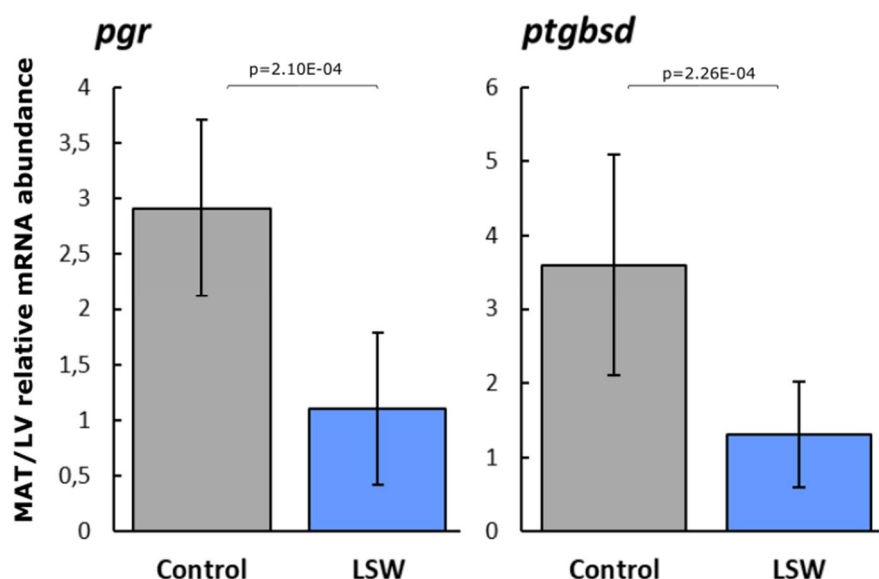


Figure 47 : Ovarian expression profiles of *pgr* and *ptgbsd* genes.

Ovarian expression profiles during oocyte maturation in control ($n = 10$) and low salinity water (LSW, $n = 11$) groups. Abundance was arbitrarily set to 1 in the LV stage in each group. Comparisons were performed by U-test;

Prostaglandins (PGs) play a major role in a large range of physiological processes (Simmons et al., 2004; Sugimoto and Narumiya, 2007). PGs are notably known to have a fundamental role in the mechanisms of ovulation (Espey and Richards, 2006; Takahashi et al., 2013). Investigations reported that PGs induce *in vitro* and *in vivo* ovulation for rainbow trout and other fish species (Goetz and Theofan, 1979; Goetz and Nagahama, 1985; Jalabert and Szollosi, 1975; Kagawa and Nagahama, 1981; Kagawa et al., 2003; Pankhurst, 1985; Stacey and Pandey, 1975), whereas inhibition of PGs precursors synthesis blocks ovulation (Cetta and Goetz, 1982; Lister and Van Der Kraak, 2008; Patino et al., 2003). PGs receptors and precursors related genes are over expressed in theca and granulosa cells of medaka before ovulation (Takahashi et al., 2013) and evidences were brought that they initiate a cascade of events resulting to follicle rupture (Hagiwara et al., 2014; Takashi, 2019). It is noteworthy that studies usually report the involvement of $PGF_{2\alpha}$ for salmonids ovulation (Goetz et al, 1982; Jalabert and Szöllösi, 1975) and of PGE_2 in yellow perch and medaka ovulation (Fujimori et al., 2011; 2012; Goetz and Theofan, 1979) but that the PGD_2 has not been cited for its ovulation mechanisms involvement. Even if it is

known that PGF and PGE can be synthesized from other PGs forms (Takahashi et al., 2018), further investigation would be needed to know the exact role of PGD₂ into maturation and ovulation process.

In the light of these results and of the exposed knowledges, the non-activation of *pgr* in LSW site, whereas its activation is observed in controlled conditions, could be the cause of the impaired ovulation. This impairment could be due either to a local dysregulation or to a deficient LH surge for fish. It is noteworthy that progesterone receptors are either nuclear receptor or membrane receptor and that activation has different effects regarding the receptors form: while the membrane receptor activation acts mainly on the ovulation mechanisms (proteolysis and follicle wall rupture), the membrane receptor activation induces the oocyte maturation (Nagahama & Yamashita, 2008; Senthilkumaran, 2011; Takahashi, 2019; Thomas, 2012; Tokumoto et al., 2006; Zhu et al., 2003). In our case, the maturation is engaged when ovulation defects are observed. This observation suggests that the LH surge actually occurs, at least partially, pleading for a local impairment.

III.3.4.4. Broad inflammation and membrane transports key mechanisms are not activated

III.3.4.4.1. Gene ontology reveals a general non-activation of membrane transports in LSW site compared to control site

Gene ontology enrichment analysis were performed on DEG list obtained from T-test analysis (Benjamini-Hochberg (BH); corrected p.value<0.05). Only genes presenting expression fold changes superiors to 3 between late-vitellogenesis and maturation were used in GO. DEG list obtained presents 24 DEG in both sites (Inter genes), whereas 1345 genes are differentially expressed only in control site (Control genes) and only 37 candidates genes are differentially expressed in LSW site (LSW genes).

The GO enrichment analysis did not give any molecular function or biological process grouping results for Inter genes, due to the low number of concerned genes. For LSW genes, the analysis only indicated a common negative regulation of vasculature development and blood vessel morphogenesis (supplemental datafile 1). The low number of genes in this functional category (n=2) is statistically significant because of the very low number of genes in the initial list of DEG, but the relevance of this result is debatable.

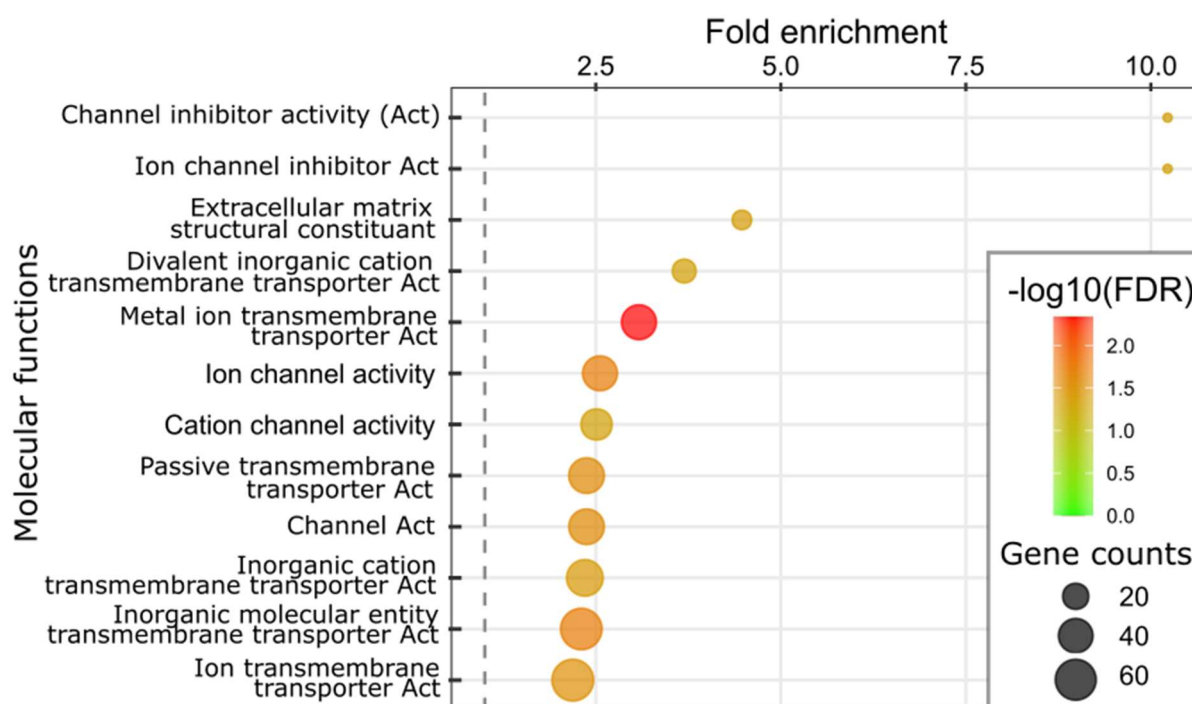


Figure 48 : Gene ontology analysis of molecular functions using the ShinyGO online tool. Analysis performed exclusively on DEG from Control site (fold change>3; p.value<0.05) between late-vitellogenesis and maturation stages.

The enriched terms are shown on the y-axis and the fold enrichment is on the x-axis. Statistical significance [$-\log_{10}(\text{False Discovery Rate})$] is represented by the color of the circle

The GO enrichment analysis performed for the control site indicates that molecular functions related to transmembrane transport activity are strongly represented in Control DEG (table 8, figure 48). One of these functional categories, the ion transmembrane transporter category, is represented by 61 DEG genes. The solute-carrier superfamily is overrepresented in this functional category, with 15 genes presents. This superfamily encodes membrane bound-transporters and comprises 55 genes families, producing passive transporters, symporters and antiporters. Transported substrates are various, including amino acids and oligopeptides, glucose and other sugars, inorganic cations and anions, bile salts, essential metals, biogenic amines, vitamins, fatty acids and lipids, thyroid hormone and urea (He et al., 2008; Hediger et al., 2004). In the present situation, natures of transport families represented indicate a regulation of transported inorganics protons, cations, amino acid and glucose occurring after meiosis resumption. These results are fully in line with the hypothesis of the osmotic regulation driven by solute carriers superfamily transporters. Over-expression of members of this family during fish oocyte maturation and hydration have already been reported (Bobe, 2006; Klangnurak and Tokumoto, 2017; Liu, 2017) and the non-activation of these genes in LSW situation contributes to the understanding of the studied impairment.

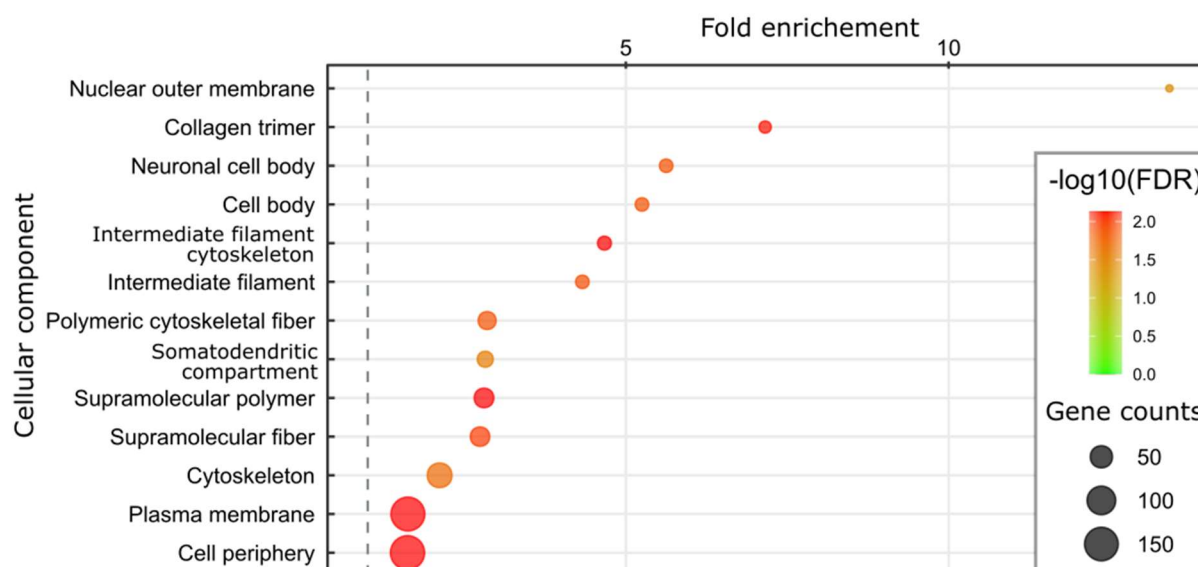


Figure 49 : Gene ontology analysis of cellular components using the ShinyGO online tool. Analysis performed exclusively on DEG from Control site (fold change>3; p.value<0.05) between late-vitellogenesis and maturation stages.

The enriched terms are shown on the y-axis and the fold enrichment is on the x-axis. Statistical significance [$\log_{10}(\text{FDR})$] is represented by the color of the circle

Genes involved in molecular functions concerning extracellular matrix structure are also represented in this list (table 9, figure 49), with 9 out of 10 genes being collagen or laminin related, down regulated after meiosis resumption. Whereas proteolytic enzymes degrade the collagenous tissue in the follicle layer of periovulatory follicles, the collagen synthesis ceases, enabling the necessary follicle rupture for ovulation.

Two functional groups involved into ion channel inhibitor activities are represented in the GO enrichment analysis. These two groups contain the same 4 DEGs, but exhibits the most significant fold enrichment. One of this gene is a member of the SLC superfamily, whereas another one is *wnk1b*, member of the With No K (lysine) (WNK) family of protein kinase (4 members). WNK-related regulate ion channels and cotransporters activities by modulating their trafficking and surface expression, as well as by influencing their signaling pathways. This family ability to indirectly regulate salt retention and ion balance in the kidney and in nervous tissues suggests diverse functional roles un the organism (Hoorn et al., 2011; McCormick and Ellison, 2011). The *scn1b* gene is also present in the ion channel inhibitor related group (figure 50). This gene expression is responsible for voltage-gated Na^+ channel $\beta 1$ subunit synthesis. In mammals, these multi-functional proteins participate in inter- and intra-cellular communication via modulation of electrical signal transduction and cell adhesion (Isom, 2002; Meadows and Isom, 2005). Deeply involved in Na^+ flux regulation, $\beta 1$ subunits notably modulate Na^+ currents and regulate the level of Na^+ channel cell surface expression (Isom et al., 1992; 1995). It also participates in cell adhesive interactions that lead to changes in cell migration (Xiao et al., 1999) and in cytoskeletal recruitment (Malhotra et al., 2000; 2002). To our knowledge, action of these genes

products during fish FOM has not been described but their implication in membrane ionic transports regulation is coherent with previous observations.

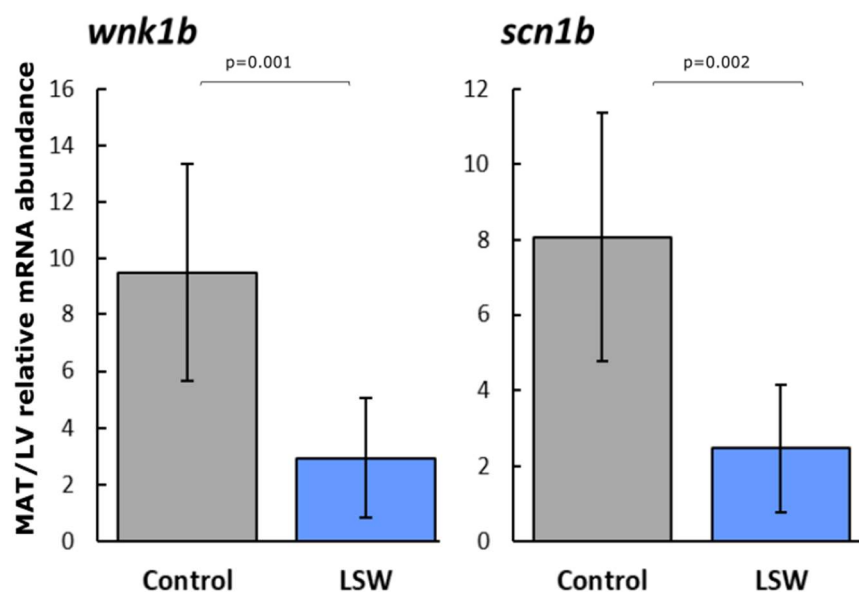


Figure 50 : Ovarian expression profiles of *wnk1b* and *scn1b* related genes.

Ovarian expression profiles during oocyte maturation in control (n = 10) and low salinity water (LSW, n = 11) groups. Abundance was arbitrarily set to 1 in the LV stage in each group. Comparisons were performed by U-test.

Finally, to further support these results, the enrichment analysis of relevant cellular components concerned by these genes expressions are mainly plasma membrane, intermediate filament cytoskeleton, cell periphery, supramolecular polymer and collagen trimer (figure 49). These results are consistent with the deep cellular and extra cellular rearrangements of follicular cells during the oocyte maturation (Lubzens, 2010; Takahashi et al., 2019). Absence of regulation of these genes in LSW sites means an under engagement of cellular and tissular modifications involved in oocyte maturation mechanisms.

III.3.4.4.2. Inflammation-related genes expressions are not regulated in LSW site during FOM

We also focused on expression variations of all genes of metalloproteases ADAMs and MMPs superfamilies. A Disintegrin and Metalloproteinase related proteins have been well-described for mammals (Reiss and Saftig, 2009; Yamamoto et al., 1999). They are unique transmembrane proteins, capable of mediating cell adhesion via their disintegrin rich domain as well as the proteolytic release of cell surface molecules. These proteases are implicated in diverse physiologic processes including fertilisation, neurogenesis, inflammatory diseases or cancer. Notably, ADAMs metalloprotease domain cleaves efficiently type IV collagen, a major extracellular matrix constituent. As already mentioned, members of ADAMs gene families are involved in broad-spectrum proteolysis within follicular layers

and these genes are usually dramatically up-regulated during FOM-ovulation phases of fish (Berndtson and Goetz, 1988; 1990; Bobe et al., 2006; Liu et al., 2018) and mammals (Sriraman et al., 2008).

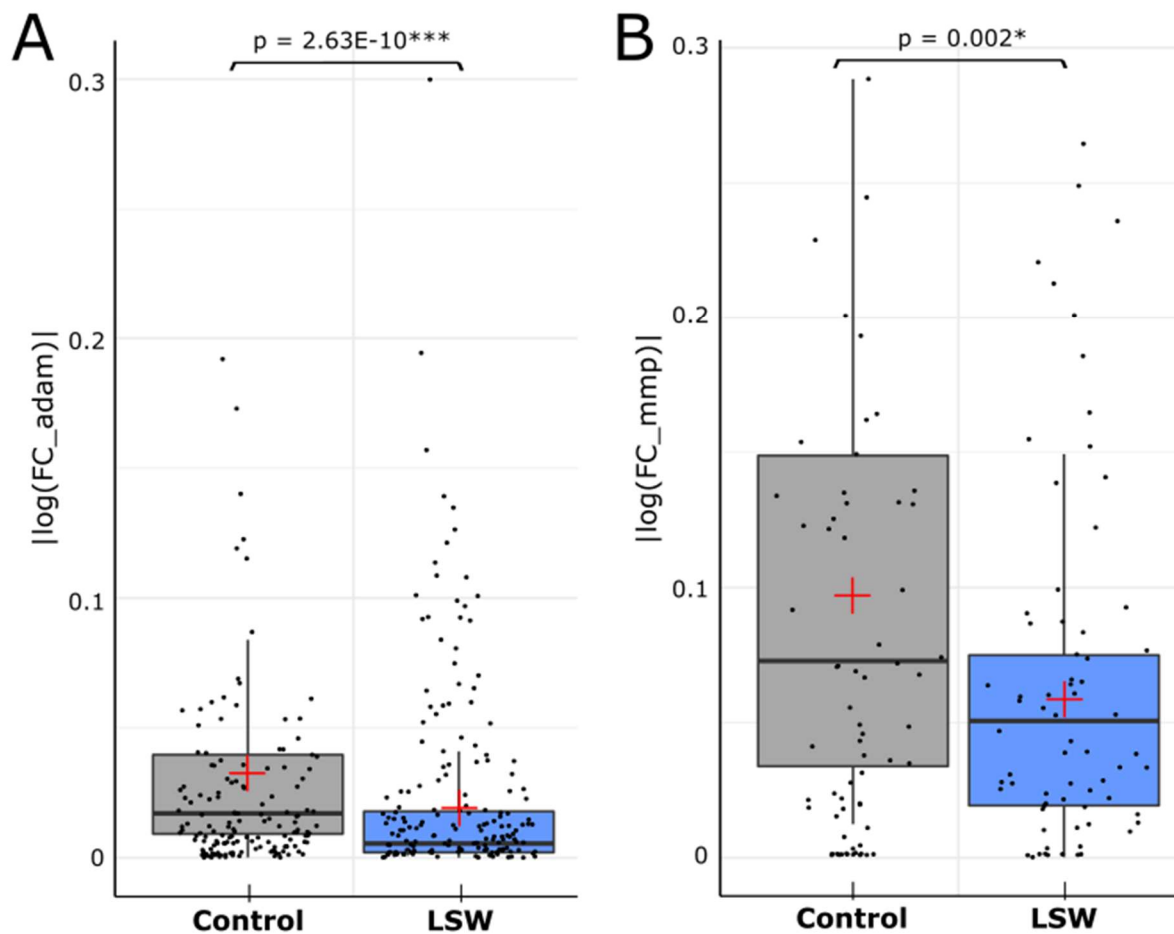


Figure 51 : Absolute values of log-transformed expression fold-changes of (A) ADAMs and (B) MMPs superfamilies genes members regarding rearing site.

Fold-changes values are calculated between late-vitellogenesis and maturation stages. Comparisons were performed by U-test

The Matrix MetalloProteinase (MMP) superfamily is divided in four broad families including a collagenase family. MMPs proteolytic enzymes regulate the extracellular matrix by their ability to bind as well extracellular domains or membrane proteins (Curry and Osteen, 2003; Curry and Smith, 2006). Demonstrations were made that MMPs enzymes are induced by LH surge for mammals during ovulation (Bakke et al., 2002; Jo et al., 2004) and trout (Crespo et al., 2010; 2013). MMPs superfamily, with ADAMs, ADAMTs and plasmin superfamilies, are considered as key players of the inflammation process occurring during maturation and ovulation (Curry and Smith, 2006; Hagiwara et al., 2020; Takahashi et al., 2019).

We observed that ADAMs and MMPs family members present statistically lower absolute values of fold-changes (figure 51). Significant lower absolute values of log-transformed FC indicate lower variation (either up or down) of genes expression during FOM engagement. Regardless the up- or

down-regulation of ADAM family genes, regulation of these genes by level expression modification, as observed in control site during oocyte maturation, is not effective in LSW site. Inflammation-related families present low expression variations in LSW site, compared to the control females. As an illustration of this result, mRNA abundance fold-change between late-vitellogenesis and maturation stages are presented for three members of studied superfamilies (figure 52). The *adam12* overexpression has never been described during mammals or fish FOM, but expression products of the ADAM superfamily are richly described for their disintegrin-like domain, playing a role in apoptic process (Brochet et al., 2012). The *mmp11* gene is expressed in mammalian and fish follicles (McCord et al., 2012; Ogiwara et al., 2002) whereas *mmp2* over expression was reported before ovulation in bird (Hrabia et al., 2019) and brook trout *Salvelinus fontinalis* follicle tissues (Crespo et al., 2013). Overexpression of these genes are significantly higher in the control group than in the LSW group.

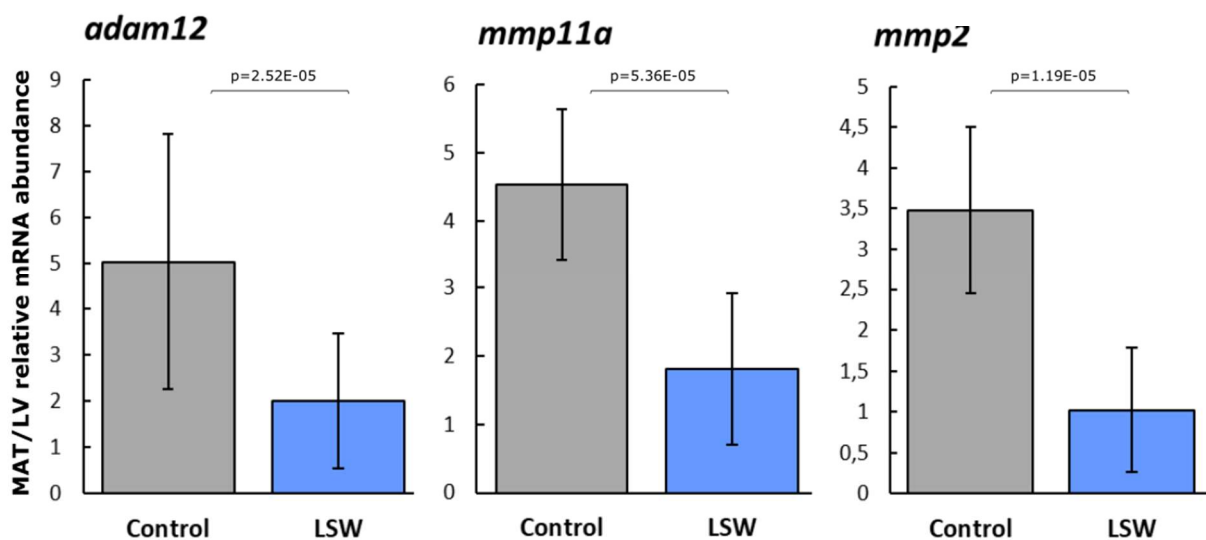


Figure 52: Ovarian expression profiles of ADAM and MMP related genes.

Ovarian expression profiles of adam12, mmp11 and mmp2 during oocyte maturation in control (n = 10) and low salinity water (LSW, n = 11) groups. Abundance was arbitrarily set to 1 in the LV stage in each group. Comparisons were performed by U-test

Statistical approach by an entire superfamily is uncommon but underlines the broad range of non-regulations observed on LSW site. Together with the gene ontology enrichment analysis, these results clearly demonstrate that the FOM and ovulation sequence is deeply affected by LSW and that all components of the process, including mechanisms associated with inflammation, hydration, and hormonal regulation are affected.

III.3.5. Conclusion

Objectives of the study were to depict the rainbow trout FOM program dysregulation induced by low salinity water (LSW) and more specifically to comprehensively describe underlying mechanisms.

Results shown that in LSW reared females, an abnormally low number of genes is activated and some of the key players are not as over expressed as they should be, suggesting that the inflammation and hydration phenomenon are not fully induced. The non-activation of the progesterone receptor *pgr* in LSW site, whereas its activation is observed in controlled conditions, is noteworthy. Regarding the maturation inducing role of the progesterone/receptor couple, this result is a serious indication of an upstream impairment of the FOM and ovulation engagement.

The broad approach by GO enrichment analysis performed on LSW and control DEGs shown abnormally low activations of membrane transporters during oocyte maturation in LSW fish. Moreover, the two metalloproteases superfamilies members (ADAM and MMP), usually involved in inflammation mechanisms during ovulation, are not regulated in LSW: expression levels variations are drastically lower for all these genes in LSW site. Altogether these results confirm the non-activation of entire superfamilies and functional categories of genes.

To conclude, this study addresses objectives by confirming the regulation impairment of keys functional categories of genes, whereas new insights indicate a potential follicular insensitivity to maturation inducing steroid, caused by the low minerals concentration in the rearing water.

III.3.6. Additional files

Table 8: Over-represented terms in the exclusively DEG from Control site. The term represents molecular functions concerned. For each term, number of genes represented and corrected p.values are shown

Functional Category Molecular function	Genes count	Corrected p.value
Metal ion transmembrane transporter activity	41	4,55E-03
Ion channel activity	41	1,99E-02
Inorganic molecular entity transmembrane transporter activity	62	1,99E-02
Channel activity	43	2,73E-02
Passive transmembrane transporter activity	43	2,73E-02
Ion transmembrane transporter activity	63	3,00E-02
Inorganic cation transmembrane transporter activity	46	3,85E-02
Extracellular matrix structural constituent	10	4,24E-02
Cation channel activity	31	4,50E-02
Ion channel inhibitor activity	4	4,50E-02
Channel inhibitor activity	4	4,50E-02
Divalent inorganic cation transmembrane transporter activity	16	4,50E-02

Table 9: Over-represented terms in the exclusively DEG from Control site. The term represents cellular components concerned. For each term, number of genes represented and corrected p.values are shown

Functional Category Cellular component	Genes count	Corrected p.value
Plasma membrane	153	7,33E-03
Intermediate filament cytoskeleton	12	7,33E-03
Cell periphery	156	7,33E-03
Supramolecular polymer	35	7,33E-03
Collagen trimer	8	7,67E-03
Supramolecular fiber	34	1,02E-02
Intermediate filament	11	1,25E-02
Neuronal cell body	11	1,31E-02
Cell body	11	1,31E-02
Polymeric cytoskeletal fiber	27	1,31E-02
Cytoskeleton	67	1,84E-02
Somatodendritic compartment	19	2,78E-02
Nuclear outer membrane	3	4,10E-02

III.4. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, les mécanismes physiologiques liés au défaut de qualité ont été décrits. Le phénotypage des pontes et génitrices touchées par le phénomène a été réalisé et a permis de décrire précisément l'impact du défaut de qualité sur une ponte et sur un ovocyte. La dissection des génitrices touchées a permis de constater un défaut d'ovulation chez des individus aux gonades matures. La seconde partie du chapitre a souligné l'apparition d'un défaut de qualité des ovocytes principalement chez des femelles dont la maturation ovocytaire a été anormalement longue. De plus les ovocytes dont les temps de maturation sont anormalement longs présentent des taux d'hydratation plus faibles. Ces défauts ont été étudiés par analyse transcriptomique, ce qui a permis de mettre en évidence l'altération des modèles d'expression géniques liés aux mécanismes de maturation ovocytaire, d'hydratation et d'ovulation. L'analyse indique de plus une altération des voies d'induction endocrinienne de ces mécanismes.

III.5. Récapitulatif

Chapitre 1 : Méta-analyse & caractérisation des facteurs environnementaux et zootechniques impliqués dans l'apparition du défaut de qualité

Objectifs principaux :

- Caractériser les conditions d'apparition du phénomène de perte de qualité des ovocytes
- Identifier les facteurs environnementaux et zootechniques impliqués dans l'apparition du phénomène

Résultats principaux :

- L'apparition du défaut de qualité et la conductivité de l'eau sont corrélés
- Les concentrations en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ à Sarrance sont fortement corrélées à la conductivité
- Les concentrations en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ discriminent l'eau de Sar. de celle de Rébénacq



Les concentrations faibles en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ à Sarrance sont retenues comme facteurs impliqués dans l'apparition du défaut de qualité

Chapitre 2 : Mécanismes physiologiques entraînant le défaut de qualité des pontes

Objectifs principaux :

- Identifier la période sensible d'apparition du défaut
- Identifier les mécanismes touchés par le défaut de qualité, à l'échelle de la génitrice, de l'ovocyte, et des tissus folliculaires

Résultats principaux :

- | | |
|-----------------|---|
| Partie 1 | <ul style="list-style-type: none">• Le défaut de qualité est dû à une perte d'homéostasie des ovocytes• Pas de défaut observé en cours de vitellogenèse• La maturation ovocytaire est engagée pour tout les ovocytes, quelle que soit la qualité• L'ovulation est <u>partielle</u> à Sarrance |
| Partie 2 | <ul style="list-style-type: none">• Le temps de maturation ovocytaire est anormalement long à Sarrance• L'hydratation des ovocytes est altérée en phase de maturation• Perturbation de l'expression de certains gènes liés à FOM (Hydratation, inflammation) |
| Partie 3 | <ul style="list-style-type: none">• Défaut d'activation des récepteurs aux hormones induisant la maturation ovocytaire et l'ovulation• Défaut global d'activation du programme génétique de maturation ovocytaire et d'ovulation (transporteurs membranaires, facteurs inflammatoires) |



Les mécanismes de maturation ovocytaire et d'ovulation sont altérés par le dérèglement global du programme d'expression génique associé

IV. Chapitre 3: Effect of salt supplementation in commercial diet on reproduction of female rainbow trout.

La partie présentée dans ce chapitre explore les résultats d'une expérience de correction du défaut de qualité grâce à un aliment enrichi en NaCl. Cette partie est présentée sous la forme d'un article, qui devrait être soumis prochainement.

IV.1. Abstract

Water salinity is an important environmental factor known to have detrimental effects on salmonid reproduction, mostly when migrating female broodfish are held in sea water. In contrast, data obtained in freshwater are scarce and the impact of low water salinity, and more specifically of low water concentrations in sodium, chloride and potassium, during reproduction in freshwater is poorly documented. Ion and water fluxes are critical for the final steps of the female gamete formation, including oocyte hydration and ovulation. In a previous study, we showed a negative impact of low water concentration in chloride, sodium and potassium on the dynamics of oocyte hydration and ovulation in rainbow trout.

The aim of the present study was to investigate the mitigation potential of salt (NaCl) supplementation in commercial diet on reproduction of female rainbow trout. The study aims to evaluate the feasibility of a remediation of previously detected oocyte maturation and ovulation impairments, caused by low water concentration of chloride, sodium and potassium.

Fish from the same commercial strain were raised throughout their second reproduction period in a site characterized by low concentrations of Na⁺, K⁺, and Cl⁻ ions in the water and fed either with a commercial diet or by the same commercial diet supplemented with salt (NaCl). Female growth and mortality, gonado-somatic index, egg quality and a duration of final oocyte maturation were investigated using classical or innovative phenotyping tools such as automatic assessment of oocyte viability using the VisEgg system and non-invasive echograph-based monitoring of final oocyte maturation duration. Chloride, sodium and potassium abundance in the female blood plasma was measured during the experiment.

We observed that blood plasma was enriched in Na⁺ and Cl⁻ when salt supplementation was provided through the diet. This supplementation had no impact on growth and mortality but gonado-somatic index and oocyte quality were improved by a salt supplemented diet. These results address the initial question by exhibiting a positive effect of salt supplementation on reproductive performances of rainbow trout females in a low salinity rearing water context.

IV.2. Introduction

A previous study (Segret et al., 2021) reported the dysregulation of final oocyte maturation and ovulation when female rainbow trout were held in freshwater exhibiting low water concentration in chloride, sodium and potassium. These low concentrations in the rearing water markedly affected the plasma concentration of spawning females and triggered abnormal oocyte hydration during final oocyte maturation as well as delayed ovulation and, ultimately, poor egg quality.

Fish have the ability to absorb inorganic elements from the diet as well as from their external environment in both freshwater and marine water (Lall, 2002; Segner & Storch, 1985; Spray et al., 1988). The sum of absorbable minerals from these two sources (diet and rearing water) constitutes the mineral budget of the fish (Phillips et al., 1956; Prabhu et al., 2016), and changes in the dietary composition or in mineral concentration of rearing water could have an impact on the mineral balance in fish (Prabhu et al., 2014). The absorbability of minerals however varies depending on several factors, such as absorption ability, form of the nutrient (Bury & Grosell, 2003), particle size and digestibility of the diet, nutrient interactions existing (Hill & Matron, 1970) or competition for favorable binding site (Ojo et al., 2009).

Mineral (i.e., inorganic elements) requirements are well documented and reviewed for various fish species (Davis and Gatlin, 1996; Hilton, 1989; Lall, 1989; Prabhu et al., 2016; Schwarz, 1995; Shearer, 1995; Watanabe et al., 1997). Mineral regulation (uptake or desorption) occurs through gills, kidney, epithelia and gut cells (Gatlin et al. 1992; Karnaky, 1998). Chelated or inorganic elements can be absorbed, using different cellular pathways and are involved in very wide range of functions, as the formation of skeletal structure, the electron transfer, the regulation of acid-base equilibrium or the osmoregulation, to cite the most important. Given the variety of tasks in which minerals are involved, requirements are specific to a given age, sex and sexual maturation state. The variety of mineral species needed is wide, with more than 28 different mineral components identified as essential for fish survival and reproduction (Lall & Milley, 2008).

Mineral deficiencies effects have been described for fish (Chanda et al., 2015). Micro-minerals (i.e., trace elements – Fe, Zn, Mn, Cu, Se, I, F, Cr) and macro-minerals (Na, Cl, K, Ca, HCO₃, Mg, P) deficiencies can cause biochemical, structural and functional pathologies which depend on several factors, including the duration and degree of mineral deprivation (Watanabe, 1997). The absolute scarcity of micro-minerals causes pathologic symptoms when imbalance occurs in breeding situation. Even though the need for each individual fish is low, the water resource is sometimes too limited for aquaculture fish in high density rearing situations. If the diet does not provide sufficient trace elements, or if the delicate balance of absorbed trace elements is disturbed, abnormal symptoms are

observed. Such situations of micro-minerals deficiencies are well described for salmonids (Chanda et al., 2015). Growth depression and dwarfism are commonly described under Iodine (Higgs & Eales, 1982), Selenium (Potson et al., 1976), Manganese or Zinc deprivation situations (Satoh et al., 1983; Ishak & Dollar, 1968; Ogino & Yang, 1980). Reproductive performances are also impacted by low availability of micro-minerals causing poor eggs hatching rates described for rainbow trout in situations of Iron (Desjardins, 1985), Manganese or Zinc (Takeuchi et al., 1981) deficiencies, whereas other study showed that a deletion of trace elements in the female diet causes a direct variation of mineral composition of gonads in rainbow trout (Satoh et al., 1987). Physiological events occurring in gonads and involving trace elements can be impacted by deficiencies in the diet.

Even though impacts of micro-minerals deprivation are well described, only a few studies have focused on macro-minerals deficiency situations, as the one suspected in our situation. These mineral species are rarely deficient in fish diets and rearing water, making it difficult to study (Oliva-Teles, 2012). Because of its scarcity in freshwater and its importance in fish physiology, phosphorous has been extensively studied and deprivation effects have been described (Sugiura et al., 2004). Moreover, the lack of potassium is known for causing anorexia, convulsion and mortality for juvenile chinook salmon (Shearer, 1988) but very few studies have focused on the influence of other macro-elements in salmonids (Fontagne et al., 2009; Sakamoto & Yone, 1978; Watanabe, 1980).

This lack of knowledge is prejudicial. Indeed, ionic species such as sodium, potassium and chloride along with phosphates and bicarbonates maintain homeostasis and acid-base balance equilibrium, while sodium and potassium are also the major intra- and extra-cellular cations involved in ionic balance (Lall, 2002). It can be hypothesized that a deficiency in one or several of these elements could impair physiological mechanisms.

One of the remediation methods to mineral deficiency consists in supplementing female diet with minerals. That type of remediation has previously been tested to investigate the benefits of mineral supplementation on salmonids growth (Ketola, 1985; Desjardins, 1985; Fontagne-Dicharry et al., 2015; Wekell et al., 1983) or reproductive performances (Hardy et al., 1984; Wischhusen et al., 2019).

In the present study we used a salt supplemented (SS) diet for broodstock. The objective of the presented work was to evaluate the impact of a salt supplemented diet on trout female reproductive performances in a context of low ionic abundance in Sodium, Chloride and Potassium in the rearing water.

In order to address these objectives, rainbow trout females reared in low salinity (i.e., low water concentration of Na, Cl and K) were fed with and without salt supplementation in the diet throughout a whole vitellogenesis cycle. Plasma concentration in these minerals (Na, K, Cl) were analyzed and

female reproductive performances (egg quantity and quality) were assessed in both experimental groups.

IV.3. Material and methods

IV.3.2. Ethical statement

Investigations were conducted in compliance with EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. The experimental protocol registered under the reference #201904021747602 was specifically approved by INRAE-LPGP Animal Care and Use Committee. For blood sampling, echograph-based monitoring, ovulation detection and stripping, fish were anaesthetized in tricaine metanesulfonate (MS222) at a concentration of 130 mg/liter. Fish were fasted 36 hours before and after any manipulation (72 hours of total fasting). After experiment, fish were reintroduced in commercial batches for oocyte production.

IV.3.3. Broodstock diet and feeding rate

The experiment was conducted with two different diets, based on the same formulation:

- A commercial broodstock diet designated as Control (46% crude protein, 19% crude fat, 0.9% phosphorus, 11.5% ash, 19 MJ/kg gross energy, Omega-3 4.8%, Omega-6 1.25%) (Le Gouessant, Lamballe, France), containing a mix of fishmeal, fish and plant ingredients.
- A salt supplemented (SS) diet, based on the same diet formulation as the Control diet, with a 5% supplementation of NaCl salt (4.85% of NaCl in the SS aliment). The salt rate is based on literature, indicating that a detrimental effect is observed for growth of rainbow trout when NaCl supplementation rate is above 5% (Salman and Eddy, 1988).

The feeding rate used in the experimental design was established according to a conventional feeding table provided by the food manufacturer (Le Gouessant, Lamballe, France) according to fish weight and water temperature. During the eight months of the experiment, fish were fed at a daily rate of 0.55% of the live weight during the 6 first months, then the daily rate was re-evaluated during the maturation period (*ad libitum* for non-ovulated fish, approx. 0.30% of the live weight, 4 days a week because of weekly manipulations fasting) when a marked loss of appetite was observed.

It should be noted that feeding rates presented here do not include salt mass (4.85% of the SS aliment weight). For adjustment, the daily ration of salt aliment was 104.85% of the basic ration presented above, to prevent an unequal distribution of non-salt nutrients.

IV.3.3. Broodstock breeding and experimental design

The experimental site is located in Sarrance [43.049999,-0.6014075] (French Pyrenees), and presents constant water temperature [9°C] and oxygen conditions. This site was previously characterized by a low ionic abundance in Sodium (Na⁺), Chloride (Cl⁻) and Potassium (K⁺) in the water (Segret et al., 2021).

Female (N= 272) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of the same autumn-spawning commercial strain (Viviers SA Company, France) were used in this study. Approximately one month after their first reproduction and stripping, 2-year-old fish were individually weighted and identified with a RFID Pit-tag (Biolog-ID, Bernay, France) and transferred into 4 raceways (4 m³ biomass; 68 fish by raceway; density of 50kg.m⁻³). The 4 experimental raceways were of similar dimensions (4 m in length, 1 m in width and 1 m in depth) with a water renewal of 200% per hour.

Female were fed with either the SS diet (68 fish held per raceway, in two raceways) or with the Control diet (68 fish held per raceway, in two raceways) after their transfer in experimental tanks to monitor spawning.

During the experiment, an artificial photoperiod regime was applied to trigger a second reproduction during summer. In order to monitor individual growth and adjust the distribution of feed, fish were individually weighted every 7 weeks.

IV.3.4. Oocyte development staging

A non-invasive to the female ultrasound-based staging was used to estimate progress into FOM. An ultrasound scanner M-Turbo (Sonosite) with a 5-10 MHz linear transducer (multiple frequency) was used. Anesthetized fish were placed in a plastic tray for a short duration (<30 s) and sagittal images of the abdominal cavity were obtained by aligning the transducer with the lateral line of the fish. Late vitellogenic oocytes appeared white on the screen, while a dark area progressively appeared at the center of the oocyte as the oocytes progressed into FOM.

IV.3.5. Plasma sampling and analysis

Blood sampling were performed for 6 individuals, randomly chosen, by tank. Samplings were performed 163 days before ovulation (1 month after experiment kick-off) and 31 days before ovulation peak. Blood samples were centrifuged (1000 g, 10 min, 4°C), and plasma were stored at -20 °C until further analysis. Plasma samples were analyzed by two specialized analytical laboratories (for chloride: Ultra Traces Analyses Aquitaine, Pau, France; for sodium and potassium: Unit of Services and Research for Plant and Environmental Analysis – INRAe USRAVE). Ionic abundance analysis was performed using

inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) technique (for Na⁺ and K⁺) and by ionic chromatography (for Cl⁻).

IV.3.6. Oocyte quality assessment using VisEgg

In both groups, ovulations were checked once a week, under anesthesia, by gentle pressure on the abdomen. Oocyte viability was systematically evaluated using the VisEgg system when ovulation occurred. Outputs are the presence and percentage of whitening (i.e., non-viable) oocytes within the spawn, the mean oocytes surface and the coefficient of variation of the oocytes surface in the same spawn. These features can be used to reliably assess oocyte integrity and viability. The total number of ovulated oocytes per females could be back calculated using the number of measured oocytes and the total weight of the oocyte batch analyzed.

IV.3.7. Statistical analysis

Data analysis were treated using R software (R Core Team, 2014) and Rstudio environment (Racine, 2012). Figures were obtained using ggplot2 package (Wickham, 2009).

Results presented in different tables are expressed as means and standard deviations. For biometric parameters, the normality of data distribution and homogeneity of variance were tested (Shapiro-Wilk test) and t-test were performed to assess the effect of dietary treatment. Effect of salt supplementation on plasma composition were analyzed by u-test, as were data obtained from VisEgg.

IV.4. Results and discussion

IV.4.1. Salt supplementation does not influence females mean weight

Data on biometric parameters and reproductive performances are reported in table 10.

No difference was found between treatments in terms of survival rate after broodstock rearing (i.e., survival rate above 95%- in both experimental groups, 6 fish died a few weeks before ovulation). Fish weights evolved similarly in both groups during the experiment ($156.2 \pm 0.5\%$ after 5 months - no significant difference) (figure 53).

The analysis of biometric parameters show that salt supplementation does not cause any weight loss or death that could have been indicative of pathological states.

During the last month before ovulation, mean weight stopped increasing. It is known that:

(1) Gonadal maturation and ovulation are energy demanding (sex hormones production, behavioral changes) and require the mobilization of assimilated nutrients and body stores (Luquet & Watanabe, 1986). Commonly, energy expenditures of fish can be split into three items: maintenance (i.e. basal metabolism), growth and reproduction (Dabrowski, 1985; Cho et al., 1982).

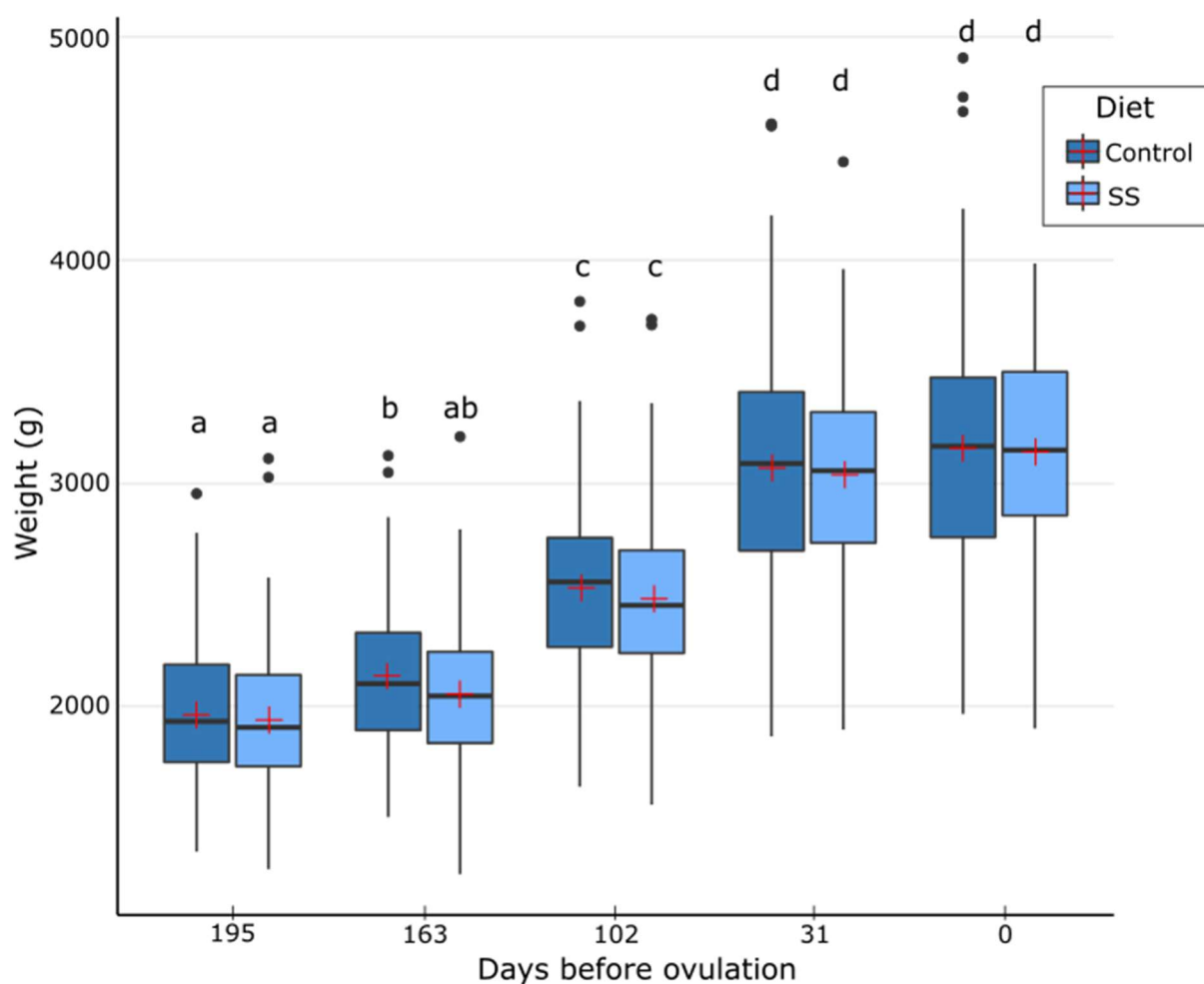


Figure 53 : Female mean weights during experiment regarding diet quality (data compared by U-test)

Table 10: Biometric parameters and reproductive performances of females, egg features.

	Control	SS	n (per treatment)	Stat
Female biometric parameters				
Survival rate (%)	95.58	95.58	136 (experiment kick-off)	n.s
Fish weight 195 days before ovulation (g)	1967±322	1944±317	136	n.s
Fish weight 31 days before ovulation (g)	3076±540	3046±442	130	n.s
Reproductive performances and egg quality				
Spawning rate of fish alive at maturation stage (%)	88.46	89.23	Control = 115 / SS = 116	n.s
Egg spawn weight (g)	324.14 ± 86.85	359.12 ± 83.54	Control = 115 / SS = 116	**
Absolute fecundity (egg/female)	5728 ± 654	5865 ± 398	Control = 115 / SS = 116	n.s
Gonado Somatic Index (%)	10.36 ± 2.45	11.56 ± 1.99	Control = 115 / SS = 116	**
Egg surface (mm ²)	15.94 ± 1.29	16.59 ± 2.04	Control = 115 / SS = 116	*
Variation coefficient of egg diameter	10.07 ± 2.56	9.06 ± 2.37	Control = 115 / SS = 116	**
Egg white 24h after spawning (%)	3.16 ± 4.61	1.29 ± 1.48	Control = 115 / SS = 116	**

*p.value <0.05

** p.value <0.005

During gonadal maturation period, fish sustains only reproduction expenditures, whereas growth is stopped and maintenance expenditures can be reduced (muscle depletion observed in migrating salmon) (Fontaine & Olivereau, 1962).

(2) The feeding behavior changes during spawning period. This is traduced by a gradual loss of appetite and decrease of food intake (Kato, 1975; 1978; Luquet & Watanabe, 1986) occurring few weeks before ovulation. In our situation, reduced nutrition continued *ad libitum* for non-ovulated fish (approx. 0.3% of fish weight 3 days a week) which never totally stopped intakes. This method maintains minimal nutrients intake, all during the maturation period.

The weight steadiness observed in our experiment is fully in line with the two points raised. During the last month before ovulation, experimental fish progressively reduced their food intake, whereas their energy expenditure is high because of their reproductive physiology.

IV.4.2. Salt supplementation influences plasma abundance of chloride and sodium

Plasma abundance were analyzed for Na⁺, K⁺ and Cl⁻ concentration (figure 54). Results are presented in table 11.

Table 11: Plasma composition for Na⁺, Cl⁻ and K⁺ at two points of the experiment

	Control	SS	n (per treatment)
Plasma composition			
[Na ⁺] 163 days before ovulation (mg/L)	1971±166	2113±180	Control = 115 / SS = 116
[Na ⁺] 31 days before ovulation (mg/L)	1875±75	1978±26	Control = 115 / SS = 116
[Cl ⁻] 163 days before ovulation (mg/L)	4672±38	4695±41	Control = 115 / SS = 116
[Cl ⁻] 31 days before ovulation (mg/L)	4473±44	4806±17	Control = 115 / SS = 116
[K ⁺] 163 days before ovulation (mg/L)	50±7	44±13	Control = 115 / SS = 116
[K ⁺] 31 days before ovulation (mg/L)	25±7	29±14	Control = 115 / SS = 116

We observed that salt supplementation induced a higher plasmatic concentration of Cl [SS: 4742±60mg/L; Control: 4588±91mg/L - p.value = 4.14E-07] and Na [SS: 2004±140mg/L; Control: 1915±131mg/L - p.value = 1.21E-04] compared to control diet. In contrast, K⁺ mean plasma levels are not impacted by salt supplementation. Whole experiment data of K⁺ concentration [SS: 33.77±15.61mg/L; Control: 33.85±14.30mg/L - p.value = 0.98] exhibit no difference or effect according to the diet. The Salt Supplemented diet does not include K⁺ in its composition, then the absence of diet effect is not a surprise.

However, there is a noteworthy difference of K⁺ abundance in plasma according to the reproductive stage [SS: 163 days before ovulation: 47.52±10.50mg/L; 31 days before ovulation: 28.71±12.14mg/L - p.value = 0.028]. The pattern is similar for other minerals in control or SS fish plasma [7.2% decrease for Na concentration under SS diet - p.value = 0.002; 4.3% decrease for Cl concentration under control diet - p.value = 0.02] but with less extremes differences.

For rainbow trout, mineral composition of the plasma and of the whole body is dependent on water environment (Kopp, 2014) and on diet (Prabhu et al., 2014) but also on the age, the size and the reproductive stage of the animal. Observations of mineral concentration variation in tissues during gametogenesis cycle has already been reported in fish (Fletcher & King, 1978; Miramand et al., 1991; Shearer, 1984). These changes were interpreted as special needs during this period. Our observation of such decrease of potassium abundance (~42% between the beginning of the vitellogenesis and the month prior to ovulation) raises interrogation about mobilization of minerals during reproductive cycle. Potassium appears to be the most fluctuating mineral in plasma concentration with high levels during early vitellogenesis followed by a progressive decline at the end of the reproductive cycle.

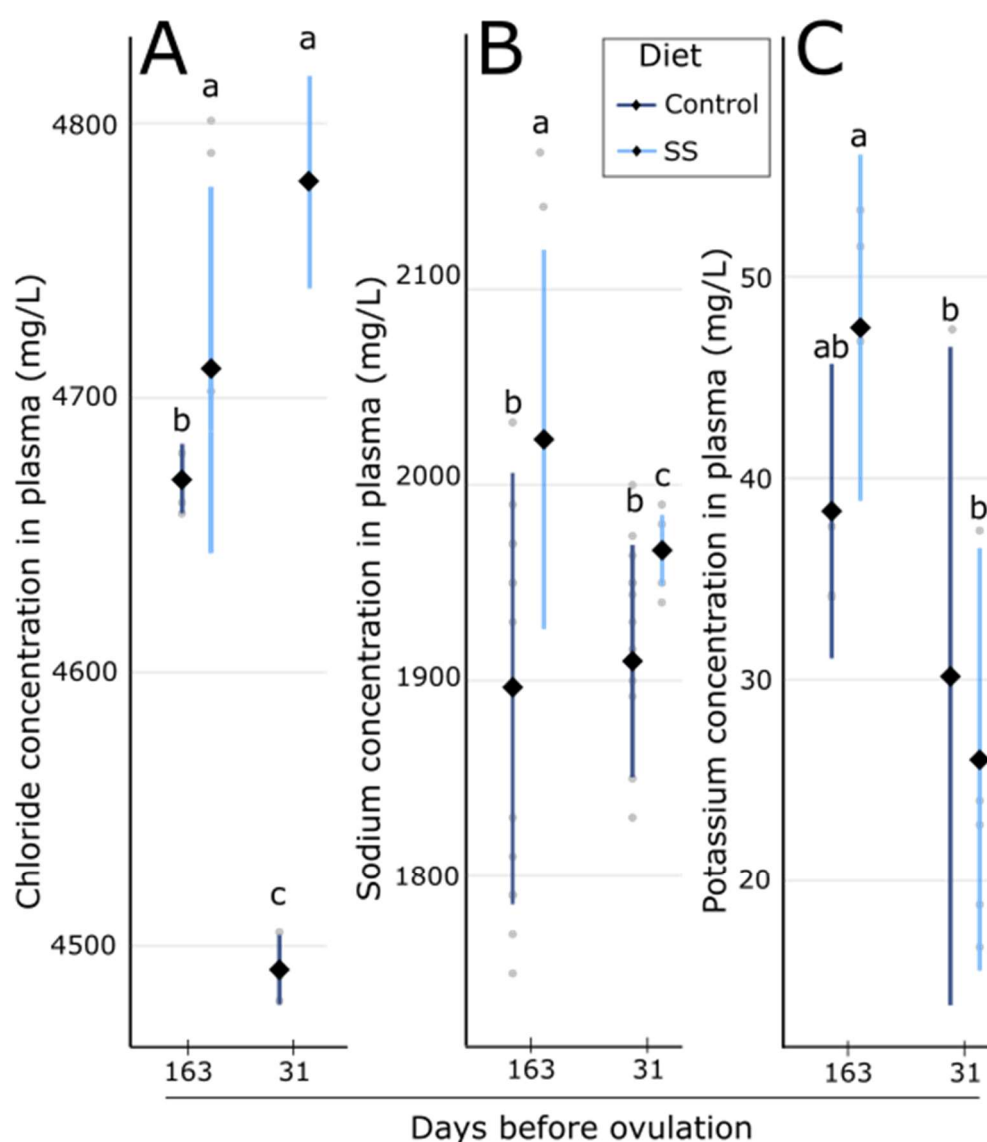


Figure 54 : Plasma concentration of (A) Chloride, (B) Sodium and (C) Potassium regarding diet (control = dark blue; SS= light-blue) for two sampling dates

Together, our results of the plasma analysis reveal that plasma transported a higher amount of chloride and sodium in the SS group than in control group. We can assume that the higher richness of these minerals in diet make Na and Cl more absorbed by the female. It validates the efficiency of the supplementation for increasing minerals uptakes. Our results also suggest the importance of salt supplementation to stabilize internal mineral concentrations throughout the sexual cycle. Finally, these observations tend to confirm that plasma can serve as an indicator of absorption through dietary intake and bio-availability (Navarro & Wood, 2003), notably for minerals species.

IV.4.3. Salt supplementation positively influences reproductive performances

Spawning rate is similar for both treatments with 9 and 8 unspawned fish at the end of the experiment for Control and SS, respectively. According to the ultrasound-based analysis (size and color of oocytes), these fish would probably have spawned few days after the last test of the experiment. This result suggests that salt supplementation does not have any detrimental effect on vitellogenesis and spawning rate.

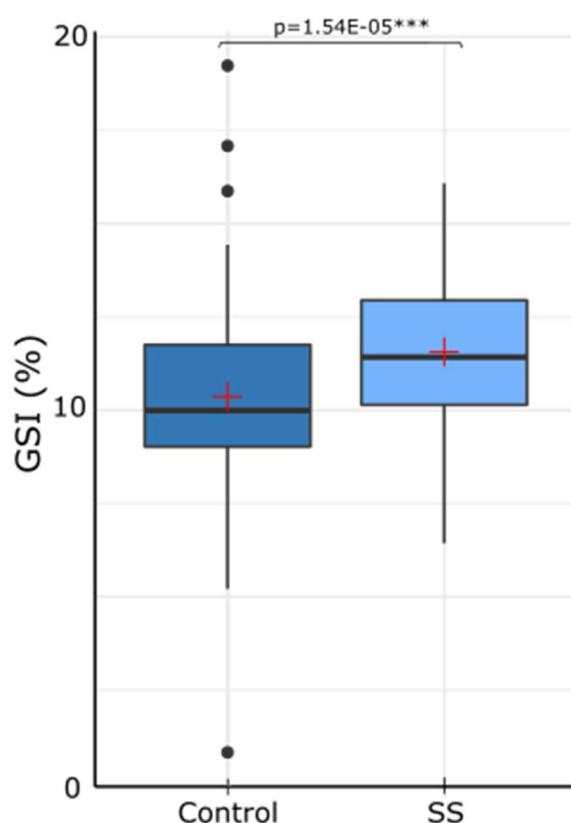


Figure 55: Gonadosomatic index regarding control or SS diet

Gonado-somatic index (figure 55) study shown a significantly higher GSI in the SS group compared to the control group (+1.2% - p.value = 1.54E-05). The absolute fecundity data indicates similar results for the two treatments (5728±654 eggs per female for control group and 6865±398 eggs/female for SS

group). The image analysis performed on approximately 400 oocytes per female revealed that salt supplementation led to the production of larger oocytes (mean surface: +4.14%- p.value = 0.024), (figure 56). Moreover, within SS spawns, oocytes size varies very little, eggs from a same female have very similar surfaces [Variation coefficient: 8.24 ± 3.12 for SS eggs; 10.37 ± 4.21 for control eggs; p.value = 0.006].

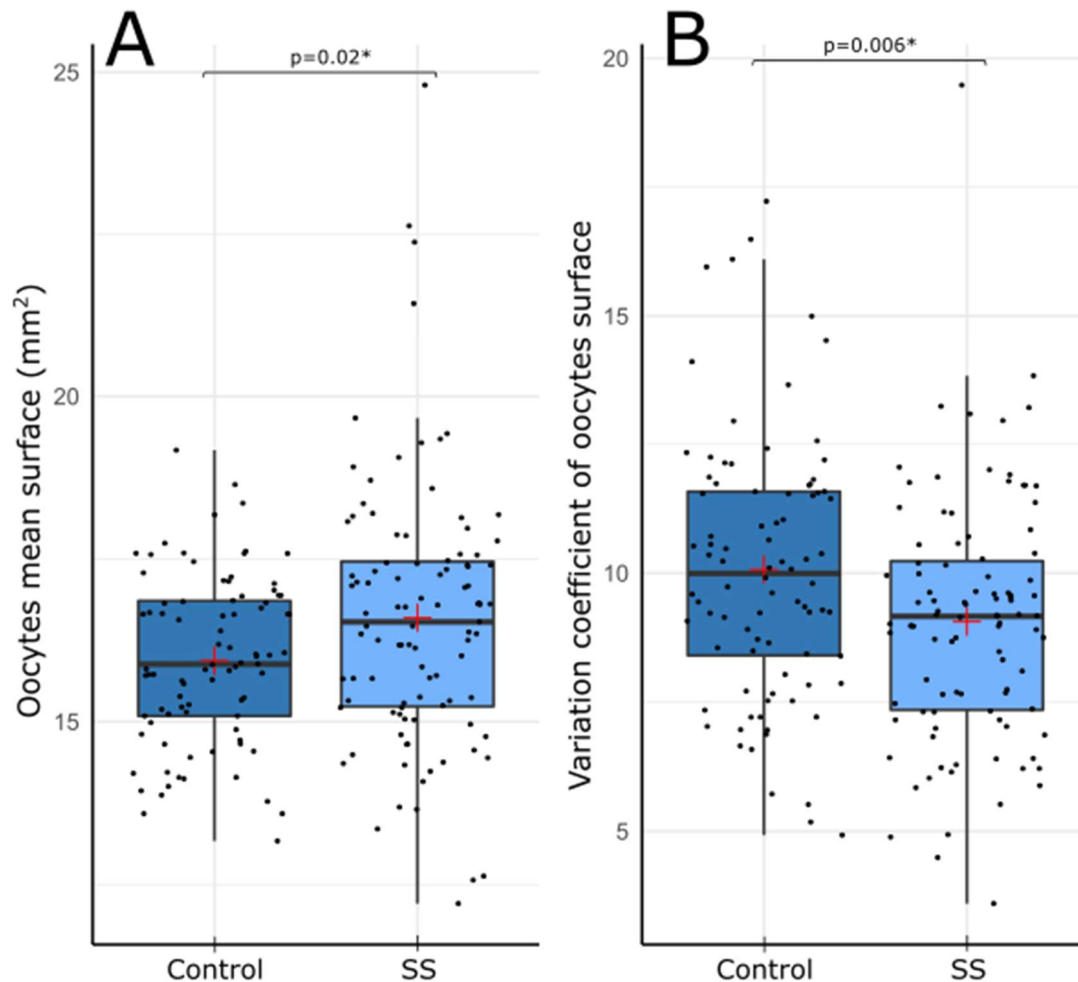


Figure 56: Oocytes features of (A) mean surface and (B) variation coefficient of surface regarding the diet

Together, all these results demonstrate that females produce a similar number of gametes, but oocytes are bigger and heavier for SS females, with low variation of eggs size within batches.

Whereas the benefit effect of oocyte size on fry survival is still debated (Bobe & Labbé, 2010; Bromage et al. 1992; Campbell et al. 1992; Jastrebski & Morbey 2009; Migaud et al. 2013; Springate & Bromage 1985), several studies demonstrated that larger oocytes produce larger juveniles (Springate & Bromage, 1985) with substantial fitness advantages over small fry in the wild (Heath et al., 2003).

While oocyte size is very often measured in studies on fish reproductive performance, it is unusual to use oocyte size variability within the spawn as an indicator of quality. This is most likely due to the

difficulty of assessing this parameter. Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* is a group-synchronous species which produces a single spawn each year and in which a synchronous cohort of oocytes develop and is ovulated at the same time (Lubzens et al. 2010). Under normal conditions, oocytes from a single spawn are of homogeneous size; the presence of large oocyte size intra-spawn variability in salmonid can be the consequence of a disruption of the physiological processes underlying oogenesis (Jastrebski and Morbey 2009). A low-quality spawn will present some low-quality oocytes presenting variable degrees of hydration and size (Gray, 1932; Lahnsteiner, 2000), causing a high intra-spawn variability of oocyte sizes. The low variability of size observed for SS spawns can be interpreted as an indicator of good oocyte quality.

IV.4.4. Salt supplementation positively influences oocyte quality

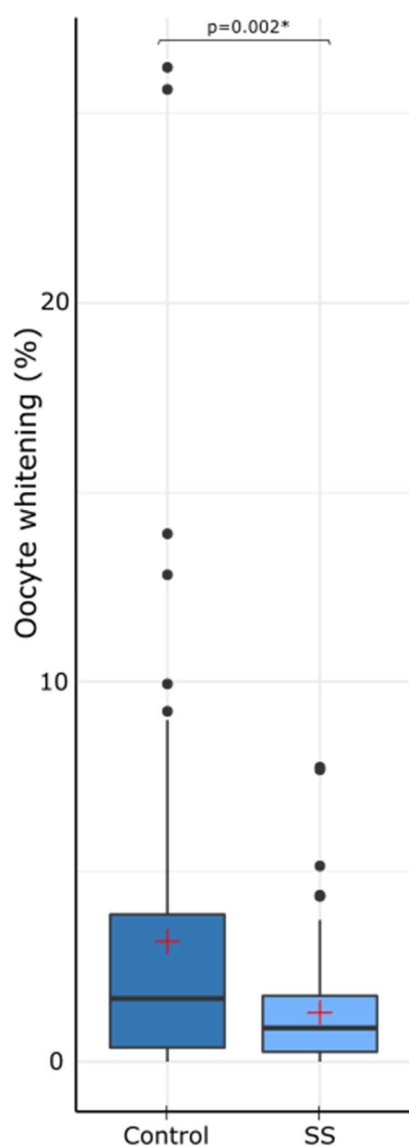


Figure 57 : Oocyte whitening rate according to the diet

The VisEgg tool revealed that the percentage of white oocytes 24 h after hydration, used as a proxy of oocyte viability, is significantly lower in the SS group in comparison to the control group (SS: $1.29 \pm 1.48\%$; Control: $3.16 \pm 4.61\%$; $p\text{-value}=0.002$) (figure 57). Oocytes produced by SS females are of better quality and will be more likely to develop normally as a healthy fish after fertilization.

To our knowledge, no study has focused on the effect of a salt supplementation on reproductive performances of rainbow trout.

Several studies tested effect of a salt supplemented diet on fish growth, survival rate and seawater adaptation, in a scope of few weeks trials. A moderate sodium and chloride supplementation (1-5% of the ratio) had no significant effect on growth of channel catfish *Ictalurus punctatus* (Murray and Andrews, 1979), of rainbow trout (Salman and Eddy, 1988), of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Zaugg, 1969 and of Atlantic salmon *Salmo salar* (Basulto, 1976). These results are in conflict with previous work which exhibited better survival rate, weight gain and feed

efficiency for rainbow trout and carp *Cyprinus carpio* with a 2-4% salted diet, compared to fish fed with a lower salt rate (Ogino and Kamizono, 1975).

Other studies showed that salt supplementation of the diet from 7 to 15 weeks before a seawater transfer prepared salmonids for marine adaptation (Perry et al., 2006; Salman & Eddy, 1987; Zaugg and McLain, 1969). This adaptation is allowed by gill modification for salmonids. This phenomenon ensures growth continuity during this period.

Finally, several works report that a high supplementation of salt (5-11.6%) adversely affected growth and feed efficiency of coho salmon and rainbow trout (Zaug, 1969; Salman and Eddy, 1988) and ultimately has detrimental effect on breeding performances. These findings suggested an existing threshold rate of salt in the diet, above which the salt supplementation has a detrimental effect on fish performances.

Here we show that a NaCl supplementation, through the diet, allows production of better-quality oocytes in a context of low sodium, potassium and chloride concentration in rearing water.

IV.4.5. No abnormally long FOM duration observed

The previous study showed that FOM duration could be longer under LSW rearing conditions (Segret et al., 2021). This work notably exhibited one extreme case of long FOM duration (130 hours at 10°C). In the present study, weekly oocyte staging did not reveal any disproportionally long FOM duration in any of the group. Each time a female exhibited meiosis resumption (PV) or oocyte maturation (Mat) signs, ovulation was completed 7 days later. However, the 7-days control frequency is probably unsuitable for the observations required. Extreme case of long FOM duration presented in the previous study represents approximatively 6 days of FOM (9°C). Even this case would not have been detected. This experiment would gain precision by staging FOM 2 or 3-times a week to control if the salt supplementation stabilizes or reduces the FOM duration.

IV.5. Conclusion

The objective of the present work was to evaluate the impact of a salt supplemented diet on reproductive performance of rainbow trout females in a low salinity rearing water (low chloride, sodium and potassium concentrations).

Feeding trials with a moderate (5%) salt supplementation showed no impact on growth and mortality. Salt supplementation in diet causes the increase and stability of sodium and chloride abundances in plasma. Females fed with SS diet produced better quality oocytes, presenting more important size and weight.

These results address the initial question by exhibiting a positive effect of salt supplementation on reproductive performances of rainbow trout females in a low salinity rearing water context.

V.6. Récapitulatif

Chapitre 1 : Méta-analyse & caractérisation des facteurs environnementaux et zootechniques impliqués dans l'apparition du défaut de qualité

Objectifs principaux :

- Caractériser les conditions d'apparition du phénomène de perte de qualité des ovocytes
- Identifier les facteurs environnementaux et zootechniques impliqués dans l'apparition du phénomène

Résultats principaux :

- L'apparition du défaut de qualité et la conductivité de l'eau sont corrélés
- Les concentrations en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ à Sarrance sont fortement corrélées à la conductivité
- Les concentrations en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ discriminent l'eau de Sar. de celle de Rébénacq



Les concentrations faibles en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ à Sarrance sont retenues comme facteurs impliqués dans l'apparition du défaut de qualité

Chapitre 2 : Mécanismes physiologiques entraînant le défaut de qualité des pontes

Objectifs principaux :

- Identifier la période sensible d'apparition du défaut les mécanismes touchés par le défaut de qualité, à l'échelle de la génitrice, de l'ovocyte, et des tissus folliculaires

Résultats principaux :

- L'ovulation est partielle à Sarrance
- Le temps de maturation ovocytaire est anormalement long à Sarrance
- L'hydratation des ovocytes est altérée en phase de maturation
- Défaut d'activation des récepteurs aux hormones induisant la maturation ovocytaire et l'ovulation
- Défaut global d'activation du programme génétique de maturation ovocytaire et d'ovulation (transporteurs membranaires, facteurs inflammatoires)



Les mécanismes de maturation ovocytaire et d'ovulation sont altérés par le dérèglement global du programme d'expression génique associé

Chapitre 3 : Effet d'une supplémentation à l'aliment salé sur les performances de reproduction dans une eau à faible concentration en Na⁺, K⁺ et Cl⁻

Objectifs principaux :

- Mettre en place des mesures correctives pour palier aux faibles concentrations en Na⁺ et Cl⁻ dans l'eau d'élevage
- Evaluer le potentiel de remédiation de l'aliment salé sur le défaut de qualité en étudiant l'effet de cet aliment sur les qualités des pontes

Résultats principaux :

- Amélioration de la fécondité relative (GSI)
- Amélioration de la qualité des ovocytes (diminution du blanchiment à l'hydratation)
- **Effet positif de la supplémentation de l'aliment en sel sur la qualité de la reproduction**



La supplémentation au NaCl entraîne une augmentation de la viabilité des ovocytes produits :

Correction du défaut?

V. Conclusion générale, discussion et perspectives

V.1. Conclusion sur la nature du phénomène observé

Les baisses de qualité étudiées sont aujourd'hui mieux comprises. La méta-analyse des données montre que les faibles concentrations en sodium, potassium et chlorure dans l'eau d'élevage de Sarrance sont à l'origine de ce phénomène. Ces faibles concentrations dans le milieu de vie ont un impact démontré sur la richesse minérale du milieu intérieur de la génitrice, et sur les mécanismes cellulaires et moléculaire liés à la maturation ovocytaire. Cette particularité environnementale provoque une diminution marquée de la qualité des œufs. L'homéostasie des ovocytes est déficiente dans cet environnement. L'hydratation des ovocytes en maturation, basée sur la création d'un déséquilibre osmotique de part et d'autre de la membrane de l'ovocyte, est réduite. On peut imaginer que l'osmolarité du milieu intérieur et la disponibilité en ions inorganiques ont un impact sur la qualité de ces mécanismes. De plus la durée de maturation est anormalement longue chez les génitrices de Sarrance. Enfin, les faibles concentrations en Na^+ , K^+ et Cl^- dans le milieu d'élevage provoquent une dérégulation de l'expression du programme génétique intervenant en fin de vitellogenèse. L'exécution de ce programme aboutit à l'engagement de la maturation ovocytaire et à l'ovulation. L'expression de certains de ces gènes (sur-/sous-exprimés) n'est pas régulée à Sarrance comme elle l'est à Rébénacq, ou comme elle devrait l'être selon la littérature. Cette dérégulation implique une part importante de la cascade d'activations ayant lieu au moment de la maturation finale de l'ovocyte. Les gènes liés à l'induction de la maturation, à l'inflammation des tissus folliculaire ou encore à l'entrée d'effecteurs osmotiques dans l'ovocyte ne sont pas correctement activés. Les mécanismes associés ne peuvent donc vraisemblablement pas se dérouler convenablement. Ces observations sont à notre connaissance inédites pour deux raisons. La première tient au fait qu'aucune démonstration d'un impact de la concentration du milieu d'élevage en espèces ioniques Na^+ , K^+ et Cl^- sur la maturation et l'ovulation des femelles de truite arc-en-ciel n'ait jamais été apportée. La seconde est liée au fait que dans mon cas la génitrice engage la maturation ovocytaire (au contraire de certaines situations de stress où ces mécanismes ne sont pas engagés) mais semble incapable de la réaliser correctement. Les mécanismes ovulatoires sont eux aussi incomplets. Les observations de la littérature laissaient penser que la maturation ovocytaire et l'ovulation étaient des phénomènes à activation « binomiale » : si la maturation et l'ovulation sont induites, elles ont lieu « jusqu'au bout ». Mes travaux démontrent ici que ce n'est pas le cas, et qu'il existe des situations de déséquilibre où la maturation méiotique et l'ovulation sont plus difficilement réalisées. Quand la génitrice subit un stress extérieur (densité, choc osmotique.), les mécanismes sont insuffisamment exécutés pour obtenir un ovocyte mature, libéré des enveloppes folliculaires, capable de mener à bien un cycle de développement post-fécondation.

V.2. L'exploration des facteurs pouvant être impliqués dans l'apparition du phénomène

V.2.1. Identification des espèces minérales en défaut dans l'eau de Sarrance

Cette étude m'a amené sur des terrains divers tels que l'hydrogéologie, la nutrition des génitrices et la physiologie de la reproduction. Je n'ai certainement pas une connaissance et une compréhension exhaustive de tous les facteurs impliqués, et de nombreuses questions restent en suspens. Toutefois le mécanisme en présence a été plutôt bien cerné au fil des chapitres. Je reviens ici au départ du projet pour expliquer et discuter la démarche suivie.

Avant le lancement du projet, la situation est la suivante. Les génitrices de Sarrance vivent dans des situations de stress multifactoriel. La diminution des périodes de repos sexuel et les décalages photopériodiques sont éprouvants pour leur métabolisme. Les femelles réalisent jusqu'à 5 cycles sexuels, dont 4 sont décalés par manipulation de la photopériode. Pendant les pontes, les génitrices sont pêchées et anesthésiées une fois par semaine, jusqu'à ovulation. Leurs ovocytes sont alors extraits par massage abdominal, et les poissons doivent rapidement engager un nouveau cycle sexuel. Certains individus atteignent leur 3^{ème} ou 4^{ème} ponte dans un mauvais état sanitaire (discuté ci-après). Ces animaux vivent parfois en densité élevée et sont soumis aux stress des attaques de prédateurs. La sélection des individus au fil des générations sur des critères de croissance a permis d'obtenir des individus atteignant des tailles et des rendements élevés mais certaines études tendent à démontrer que cette sélection sur critères de croissance s'est faite au détriment des performances de ponte (discuté ci-après). De plus, l'eau dans laquelle évoluent les animaux provoque, semble-t-il, un inconfort chez les génitrices.

Cette situation aboutit à des défauts de qualité des ovocytes pondus. Les techniciens d'élevage écartent toutes les semaines un certain nombre de ponte de la chaîne de production. Le phénomène est plus ou moins marqué selon l'âge des génitrices et le décalage photopériodique, mais aucune logique ne ressort des observations faites sur le terrain. D'une semaine à l'autre, au sein d'une même bande d'élevage, le défaut de qualité peut toucher deux fois plus de géniteurs que la semaine précédente. Certaines génitrices n'ovulent jamais alors qu'elles présentent le phénotype maturant, d'autres ovulent très peu d'ovocytes. Les résultats de ponte sont enregistrés au cours des années, sans qu'aucun facteur ne semble expliquer ces situations. Des tentatives de correction sont mises en place, jouant sur les densités, la photopériode ou la formulation de l'aliment, mais aucune n'apporte d'amélioration.

Les échanges entre professionnels apprennent à la société Viviers que le phénomène se produirait aussi dans la pisciculture voisine de l'INRAE Lees-Athas, sans que toutefois aucune donnée n'ait été enregistrée. Les génitrices de cette pisciculture sont issues de lignées génétiques complètement différentes, l'aliment distribué est différent, les densités d'élevage y sont réduites et aucun décalage photopériodique n'est imposé aux poissons. La qualité de l'eau semble être le seul point commun dans ces deux phénomènes : une eau claire et froide toute l'année, issue de résurgences situées à moins de 10 kilomètres l'une de l'autre, avec un profil hydrogéologique similaire. Au contraire, les génitrices de la même souche génétique, nourries avec le même aliment, selon les mêmes protocoles de décalage photopériodique, produisent des ovocytes sans défaut de qualité sur le site de Rébénacq.

Au lancement de ce projet, la première action réalisée est l'étude des données à disposition afin d'isoler les facteurs pouvant être impliqués dans l'apparition de ce défaut, sans *a priori* sur les causes possibles. La densité d'élevage est aggravante, sans toutefois provoquer le phénomène. Les variables d'âge des génitrices, de bassin d'élevage ou de décalage photopériodique sont extrêmement colinéaires (conduite d'élevage reproduite de génération en génération) et aucune n'est statistiquement liée avec la variable de défaut de qualité. Certains facteurs, ne présentant aucune corrélation avec le défaut de qualité, sont écartés (température, pH de l'eau). Les données d'autres facteurs manquent, telles que l'état sanitaire des individus ou la composition minérale de l'eau.

La conductivité est la seule variable présentant une corrélation forte avec l'apparition du défaut de qualité. Quand la conductivité augmente, le défaut de qualité diminue. Or l'observation de niveaux de conductivité similaires à Rébénacq implique que le phénomène ne soit pas dû à la valeur absolue de la conductivité. La conductivité de l'eau reflétant la somme des concentrations de toutes les espèces ioniques présentes dans cette eau, je me suis intéressé aux différents éléments ioniques présents. Les concentrations en Na^+ , K^+ et Cl^- sont les plus discriminantes entre les sites, et sont les plus corrélées à la conductivité. Je choisis de m'intéresser à ces éléments dans la suite de l'étude. Pour ce faire, j'essaye de reproduire des conditions expérimentales réduisant au maximum les biais pouvant être induits par d'autres facteurs : densités similaires dans les expériences, pas de décalage photopériodique quand c'est possible, et travail sur des individus en premier ou second cycle de reproduction. Lorsque c'est nécessaire, des individus sont élevés dans les mêmes conditions sur le site de Rébénacq. Cette approche permet de travailler sur des individus dont le seul « stress » est environnemental et vient de l'eau d'élevage. Cette approche est perfectible et j'en discute après, mais vu les données en ma possession et les résultats probants de la méta-analyse, elle m'apparaît alors comme la meilleure. Les résultats obtenus par la suite, notamment dans l'expérience de remédiation à l'aliment salé, m'ont d'ailleurs plutôt conforté dans cette idée.

Certains facteurs ont été écartés de l'étude car aucune donnée confondante ne permettait de les incriminer (données insuffisantes) et ne justifiait un tel effort. Je discute ci-après de ces facteurs qui ont eu le « bénéfice du doute » dans l'enquête menée.

V.2.2. Le patrimoine génétique et la consanguinité, facteurs possibles d'aggravation du phénomène

Les multiplicatrices de Sarrance sont les sœurs et les cousines des multiplicatrices de Rébénacq, où le défaut de qualité des pontes n'est pas observable. Les animaux de Lees-Athas sont issus de plusieurs lignées INRAe originales, parfois isogéniques, et pourtant le phénomène de perte de qualité serait observé sur le site de Lees-Athas. Ces considérations m'ont poussé à écarter assez rapidement la piste du patrimoine génétique de la souche étudiée comme facteur explicatif. Une étude récente (Paul et al., 2021) sur l'effet de la consanguinité sur plusieurs paramètres de reproduction, menée sur les individus de la souche Viviers, a toutefois démontré un effet significatif du coefficient de consanguinité sur la date de ponte des femelles. Les femelles à forte consanguinité auront des pontes tardives. Cette étude n'a pas pris en compte la qualité des ovocytes produits, ce qui aurait pu me renseigner sur la nature de ce retard de ponte (maturation ovocytaire longue ?). Toutefois avec un effectif efficace de seulement 40 individus dans son noyau de sélection (D'Ambrosio, 2019) et une gestion approximative du renouvellement des multiplicateurs, la société Viviers aurait certainement un intérêt particulier à rester vigilante sur les coefficients de consanguinité au sein de ses cohortes de génitrices.

De plus la sélection de la souche a été historiquement basée sur des critères de croissance et de morphologie. L'anti-corrélation entre critères croissance et performances de ponte a été démontrée tardivement (D'Ambrosio, communication personnelle). La sélection sur critères de croissance de plus de 8 générations de génitrices pourrait avoir eu un effet antagoniste sur la capacité des génitrices de la lignée à réaliser une gamétogenèse correcte dans l'eau décrite à Sarrance. La sélection de plusieurs générations de géniteurs sur la base de critères de croissance pourrait avoir provoqué la sélection d'individus privilégiant leur métabolisme de croissance à la production de gamètes de qualité.

Enfin, la sélection et l'entretien du noyau de sélection se font principalement sur le site d'Escot, voisin, qui jouit d'une résurgence d'eau au profil minéral différent de celui de Sarrance. L'adaptation à l'environnement d'élevage de Sarrance, dans lequel les génitrices du noyau de sélection n'évoluent que très peu, peut provoquer un stress pour les multiplicatrices issues du noyau de sélection, notamment comme celui décrit dans les dernières phases de la gamétogenèse.

V.2.3. L'état sanitaire des individus de Sarrance

L'état sanitaire des génitrices est un facteur qui n'a pas été étudié. Le site de Sarrance est historiquement indemne d'infection virale de septicémie hémorragique (SHV- virus Egtved) et de nécrose pancréatique infectieuse (IPN virus), pouvant causer des mortalités chez les individus juvéniles et les génitrices pendant leur cycle de reproduction (Smail, 1992 ; Poppe, 1989 ; Sano, 1995). Ces infections virales se transmettent de manière verticale au sein des générations, rendant l'éradication de ces virus complexes en élevage. Toutefois les génitrices de Sarrance sont confrontées de manière récurrente à des infections bactériennes de *Carnobacterium piscicola* et de *Vagococcus salmoninarum* (Wallbanks et al., 1990), dont les épisodes infectieux provoquent des mortalités fortes chez les salmonidés en période péri-ovulatoires (Herman et al., 1985 ; Schmidtke et al., 1994).

Le stress physiologique induit par ces infections bactériennes, pendant des périodes sensibles du cycle sexuel (Milla et al., 2011 ; Yada & Nakanishi, 2002), pourrait provoquer des phénomènes d'atrésie des ovocytes (discutés plus bas) au cours desquels l'organisme de la génitrice privilégie sa survie.

A noter que la gestion des multiplicateurs à Sarrance implique la réalisation de plus de 4 cycles sexuels pour chaque individu, dont trois sous photopériode décalée (réduction du repos sexuel). Les génitrices ayant réalisé leur 4^{ème} voir 5^{ème} cycle sont généralement très fragilisées et plus sujettes aux infections bactériennes décrites précédemment, causant chez ces individus fragiles des symptômes pathologiques marqués. Toutefois le phénomène de perte de qualité est observé aussi chez des génitrices plus jeunes, saines et ne présentant pas de symptômes infectieux ce qui ne plaide pas en faveur d'une origine sanitaire (ou liée à un état dégradé des animaux) du phénomène de qualité observé.

L'état sanitaire des poissons n'a malheureusement pas pu être intégré dans la méta-analyse, faute de données sur chaque bande de ponte. L'approche adoptée a consisté à travailler sur des individus jeunes et sains (1^{er} ou 2^{ème} cycle sexuel, phénotype externe sain, organes sains lors des dissections post-expérimentales) avec des décalages de ponte modérés (photopériode naturelle ou 1^{er} décalage photopériodique), afin de réduire au maximum l'éventuel biais que pourrait induire une infection bactérienne.

V.2.4. Les interactions non-considérées entre espèces minérales dans le milieu d'élevage et le rôle individuel des espèces identifiées

L'analyse environnementale proposée au cours de mon étude est monospécifique. Si ce n'est l'approche par la conductivité, l'identification des éléments minéraux potentiellement impliqués dans le phénomène considère chaque espèce ionique individuellement. Or cette approche, bien que

satisfaisante dans ma situation où les données de compositions minérales étaient assez limitées et où la période du cycle à étudier n'était pas clairement identifiée, ne considère pas les interactions entre les différentes espèces ioniques présentes dans l'eau d'élevage.

Chez le poisson, les espèces ioniques sont incorporées par des transporteurs membranaires au niveau des branchies ou des intestins (Bury & Grossel, 2003). L'existence de différentes interactions entre éléments minéraux a été décrite (Lall & Milley, 2008). Différentes espèces ioniques pouvant posséder un transporteur commun, une saturation de ces transporteurs par une espèce présente en majorité peut provoquer l'incapacité des individus à absorber des ions agonistes. Cette situation est observable dans certaines expériences de supplémentation par les aliments. Un aliment fortement enrichi en phosphate de calcium ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) et en zinc provoque une non-absorption du zinc, tandis que cette absorption a lieu lorsque l'aliment présente des teneurs en ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) moins importantes (Hardy & Shearer, 1985). Une autre étude a démontré l'action antagoniste réciproque du zinc et du cuivre dans l'absorption gastro-intestinale chez la truite arc-en-ciel (Ojo et al., 2009).

Faute de temps, mon étude n'a, dans un premier temps, pas pris en compte les possibles interactions entre les différentes espèces ioniques présentes dans l'eau de Sarrance. On remarquera que le calcium et les bicarbonates sont très abondants dans l'eau d'élevage, relativement aux autres espèces ioniques. Si un effet agoniste de ces espèces avec d'autres éléments minéraux existe, il serait intéressant de l'étudier dans la situation décrite à Sarrance.

Enfin il faut préciser que parmi les trois espèces identifiées comme en « défaut » de concentration dans l'eau d'élevage de Sarrance, l'effet individuel de chacune d'entre elles n'a pas été démontré. Il est possible que ce soit la somme de ces trois « carences » qui soit à l'origine des effets remarqués, ce qui tendrait à démontrer que le problème ici observé est plutôt provoqué par des défauts d'osmolarité (somme des concentrations des ions inorganiques en présence). L'approfondissement de ce travail de recherche consisterait à identifier si une des espèces ioniques caractérisées lors de l'étude a un impact dominant dans le phénomène observé. Une implication spécifique d'une de ces espèces dans les mécanismes de régulation d'expression des gènes, bien que non renseignée dans la littérature, n'est pas à exclure.

V.3. La compréhension des mécanismes impliqués et les pistes d'exploration

V.3.1. L'observation de la dérégulation des mécanismes moléculaires de FOM et d'ovulation en milieu appauvri en K⁺, Na⁺, Cl⁻

En plus de souligner les concentrations faibles en Na⁺, K⁺ et Cl⁻ dans l'eau d'élevage, la méta-analyse des données m'a appris que les individus touchés par le défaut de qualité sont principalement les pondeuses tardives de la bande. Cette observation va de pair avec les observations des employés de Viviers (malheureusement non-chiffrées) relatant un nombre non-négligeable de génitrices n'ovulant pas au sein des bandes, alors qu'elles présentent un assombrissement de la robe et une évolution morphologique significative de la maturation sexuelle. La possibilité d'un défaut d'ovulation est évoquée pour la première fois. La dissection de génitrices n'ayant pas pondu en fin de bande me démontre que dans certains cas, les ovocytes sont produits mais ne sont jamais libérés des tissus folliculaires. La dissection de génitrices ayant eu des pontes fausses m'apprend elle que l'ovulation est de mauvaise qualité (beaucoup d'ovocytes « lunés » restent dans les tissus). Cette observation vient contraster les dissections réalisées sur les génitrices en cours de vitellogenèse : aucune de ces femelles ne présente quelque anomalie de la gonade qui puisse laisser présager un futur défaut de la ponte. Les ovocytes formés semblent tout à fait normaux jusqu'à ce qu'ils entrent en maturation. Le défaut apparaît au moment des phases finales de la gamétogenèse.

En parallèle la caractérisation des pontes de mauvaise qualité m'apprend que les ovocytes lunés sont des ovocytes ayant perdu leur homéostasie et que la plupart des ovocytes présents au sein des pontes de mauvaise qualité sont incapable de se développer normalement.

La première hypothèse est donc celle d'un vieillissement *in folliculo* des ovocytes matures, provoquant un défaut d'homéostasie similaire à celui observé dans les situations de vieillissement post-ovulatoire dans la cavité abdominale. Un blocage de l'ovulation causé par un stress, tel que ceux renseignés dans la littérature dans les situations de température ou de densité élevée, est envisagé. Toutefois je ne me trouve dans aucune des situations décrites par la littérature, et les génitrices observées sont issues des bandes de production commerciale, avec tous les biais induits par leurs conditions d'élevage et leur historique.

C'est ainsi que je commence à m'intéresser aux mécanismes de maturation ovocytaire et d'ovulation sur des individus élevés en conditions expérimentales. C'est à ce moment-là que l'utilisation de l'échographe comme moyen d'observation non-invasif s'avère indispensable pour mon étude. La mise au point de la technique et la validation par dissection sont faites rapidement, et la question d'une

publication sur la méthode mise au point est évoquée, puis évacuée faute de temps. Les résultats de cette étude me démontrent que le phénomène est plus fin que celui observé dans la production. Là où certaines génitrices des bandes commerciales exhibent une ovulation partielle ou une absence d'ovulation, on observe chez les animaux expérimentaux un temps de maturation plus long et un dérèglement de certains mécanismes.

Le défaut d'hydratation observé au préalable est validé par l'expérience ayant mené à la publication de l'article. Ces défauts et anormalités des mécanismes de maturation et d'ovulation sont couplés à des baisses de qualité des ovocytes. Bien que ces baisses ne soient pas aussi importantes que dans la production (discuté ci-après), elles me poussent à aller voir plus loin dans le déroulement des mécanismes en partant du principe que ce que j'observe en conditions expérimentale est un reflet atténué de ce qu'il se passe dans les bandes commerciales.

V.3.2. Une maturation incomplète expliquerait les pertes d'homéostasie des ovocytes

Je comprends que cette dérégulation a un impact sur la qualité de l'ovulation mais certainement aussi sur l'acquisition des compétences maturationnelles de l'ovocyte. De plus la réalisation partielle des mécanismes de maturation implique une acquisition elle aussi partielle de la capacité de l'ovocyte à se développer, et donc un mauvais déroulement de la méiose et des réarrangement cellulaires profonds qui préparent l'ovocyte à la fécondation. Cette possibilité est cohérente avec les observations d'hydratation partielle des ovocytes. L'hydratation de l'ovocyte implique en effet des mécanismes de protéolyse dans le milieu cellulaire, vraisemblablement activés par l'induction des récepteurs membranaires à MIS.

Jalabert (1976) suggère l'existence d'un signal de fin de maturation ovocytaire, induisant le début de la maturation folliculaire et l'ovulation quand l'ovocyte est prêt. On soupçonne alors ce signal d'agir en activant la synthèse de prostaglandine. L'observation dans ma situation d'un temps particulièrement long entre le début de la maturation ovocytaire et l'ovulation plaide pour une maturation ovocytaire incomplète, avec un défaut du signal de fin de maturation ovocytaire. On peut émettre l'hypothèse que la maturation est incomplète ou de mauvaise qualité, et que l'ovocyte alors obtenu est incapable de maintenir son homéostasie cellulaire, et perd rapidement son intégrité cellulaire et sa capacité à être fécondé.

V.3.3. La régulation des gènes par l'osmolarité du milieu comme piste de travail

Les ions Na^+ , Cl^- et K^+ sont considérés comme les principaux électrolytes du milieu intérieur des poissons et sont impliqués dans les fonctions vitales de contrôle de la pression osmotique et de l'équilibre acide-base (Lall, 2003). Leur faible concentration dans l'eau d'élevage, observable aussi dans le plasma des génitrices, pourrait être à l'origine d'un défaut d'osmolarité dans le milieu intérieur. Je discute ci-après du possible impact de l'osmolarité du milieu sur la régulation des gènes. L'exploration de cette piste, purement spéculative, pourrait permettre d'avoir une meilleure compréhension des phénomènes exposés dans ce travail.

L'osmolarité du milieu intérieur peut avoir un impact sur l'expression des gènes. L'impact de l'hyperosmolarité des organes sur la régulation des gènes a été étudié chez le mammifère, démontrant assez tôt l'inhibition de la croissance cellulaire et de la synthèse d'ADN dans les situations d'hyperosmolarité marquée (Stubblefield & Mueller, 1960), tandis qu'une augmentation d'osmolarité modérée entraîne au contraire une activation de la croissance des cellules épithéliales rénales (Toback, 1980) et l'activation spécifique de l'expression de certains gènes (Tramacere et al., 1984 ; Petronini et al., 1987). D'autres études ont décrit l'inhibition sélective de la synthèse protéique par l'hyperosmolarité cellulaire (Saborio et al., 1974), et l'impact de la tonicité du milieu sur le maintien de la structure des ARN messagers, pouvant compromettre la traduction de certains d'entre eux (Kozak, 1988). L'hypo-osmolarité du milieu peut aussi agir sur la modification de l'expression des gènes, en agissant notamment sur le remodelage de la chromatine, provoquant l'inhibition de la transcription (Zhao et al., 2016). Ces démonstrations suggèrent que l'osmolarité du milieu est un régulateur biphasique de l'expression de certains gènes, pouvant entraîner dans certaines situations des inhibitions de transcription de certains gènes chez le mammifère.

L'approfondissement de mon travail pourrait s'attacher à l'étude du lien entre osmolarité du milieu et induction du programme de maturation ovocytaire et d'ovulation.

V.3.4. Mise en cause d'un défaut d'induction hormonale dans le phénomène observé

Les résultats de l'analyse transcriptomique montrent que l'activation des récepteurs à la progestérone observée à Rébénacq n'a pas lieu à Sarrance. Ces récepteurs à l'origine de la cascade d'activation induisent la maturation ovocytaire et le réarrangement des tissus folliculaires. Cette non-activation peut s'avérer bloquante pour l'ensemble de la cascade d'événements conduisant à la libération d'un ovocyte prêt à être fécondé. L'inactivation des récepteurs nucléaires à la progestérone provoque chez

le médaka une inhibition de l'ovulation (Zhu et al. 2015). La non-activation à Sarrance de gène *ptgdsb*, dont l'expression participe à la synthèse de prostaglandines, étaye la théorie de la non-activation globale des mécanismes découlant de l'activation du couple progestérone/récepteur membranaire.

Toutefois, bien que ce dérèglement puisse être effectivement dû à une inhibition locale de la régulation de ces gènes (éventuellement par un stress osmotique comme décrit ci-avant), ce dérèglement pourrait aussi être dû à un phénomène plus global. En effet, aucun dosage hormonal n'a été réalisé pendant le travail de description des phénomènes. La comparaison de l'intensité des signaux hormonaux tout au long du cycle de vitellogenèse, avec une attention particulière pour l'intensité de la décharge ponctuelle en LH, serait informative. Le pic de LH plasmatique est considéré comme le principal message activateur de la maturation ovocytaire et de l'ovulation. Un défaut de synthèse de gonadotropines pourrait entraîner un message trop faible ou diffus vers les tissus folliculaires et une activation incomplète des mécanismes.

Des investigations supplémentaires permettraient de déterminer la nature de ce dérèglement.

V.3.5. L'implication possible de l'atrésie

L'atrésie ovarienne est un phénomène commun chez les vertébrés, au cours duquel une partie ou la totalité des ovocytes en cours de vitellogenèse échouent à accomplir la maturation et l'ovulation, et sont dégradés et résorbés par l'organisme (Saidapur, 1978). Ce phénomène est finement régulé et considéré comme essentiel pour la maintenance de l'homéostasie des ovocytes. Il est assez communément observé chez le poisson d'élevage (Guraya, 1986 ; Krysko et al., 2008 ; Miranda et al., 1999 ; Rizzo & Bazzoli, 1995), et est provoqué par certains facteurs comme la restriction alimentaire, les photopériodes inadaptées, les pollutions aux métaux lourds et aux organochlorés (Lam, 1983), les stress (Unver & Unver Saraydin, 2004), notamment thermiques (Linares-Casenave et al., 2002 ; Smith et al., 1983 ; Zanuy & Carrilo, 1987) ou la salinité du milieu d'élevage ne respectant pas le cycle naturel (Guraya, 1986 ; Valdebenito et al., 2015). Il peut être la conséquence de déséquilibres hormonaux, d'inhibitions de la FOM ou de blocage d'ovulation (Valdebenito, 2011).

Les mécanismes qui initient et régulent l'atrésie ovocytaire sont peu documentés chez le poisson téléostéen, particulièrement à l'échelle moléculaire. Certaines études suggèrent que l'atrésie est d'abord un processus d'apoptose des cellules de la granulosa ou de la thèque (Drummond et al., 2000 ; Wood & Van Der Kraak, 2001 ; 2002), suivi de protéolyses au sein du vitellus de l'ovocyte (Wood & Van Der Kraak, 2003). La gonadolibérine (GnRH) est considérée comme l'hormone initiatrice de ce phénomène de mort cellulaire, notamment dans les situations de défaut d'induction de l'ovulation due à une libération insuffisante de LH (Habibi & Andreu-Vieyra, 2007). Dans la majorité des situations, l'atrésie touche les ovocytes à leur entrée en maturation ovocytaire (Berlinsky et al., 1997 ; Larsson et

al., 1997, Mylonas et al., 1997a,b ; 2010 ; Tucker, 1994 ; Zanuy & Carrillo, 1987). Ce phénomène se manifeste dans un premier temps par une hypertrophie de l'ovocyte et des cellules de la granulosa, consécutive à la désintégration du nucléus et de ses organites cellulaires, puis par une dégradation progressive du follicule par phagocytose et réabsorption dans le système sanguin pour restockage (Besseau and Faliex, 1994 ; Miranda et al., 1999 ; Saidapur, 1978).

Ma situation semble résulter de situations proches de celles observées pendant les phénomènes d'atrésie (ovocytes non-viables au sein du tissu folliculaire) et on pourrait envisager que le défaut d'ovulation résulte à une initiation de l'atrésie ovocytaire. Toutefois cette théorie semble difficile à justifier, aucune dégradation des cellules folliculaires n'ayant été observée dans ce travail.

V.4. Mérites et limites de la supplémentation par l'aliment

Quels que soient les mécanismes agissant sur l'expression des gènes à Sarrance, j'ai tenté de corriger ce phénomène par une supplémentation de l'aliment en sel, avec pour objectif de proposer une solution corrective à la société Viviers, mais aussi de valider la piste de l'implication des éléments ioniques Na^+ et Cl^- dans le phénomène observé. L'expérience mise en place en fin de projet apporte des informations importantes et aboutit à une amélioration de la qualité des pontes de génitrices supplémentées en sel. Toutefois l'amélioration de qualité observée, les mécanismes pouvant être impliqués dans cette amélioration, et la méthodologie utilisée dans l'expérience sont discutables et perfectibles.

V.4.1. Une amélioration notable de la qualité mais des défauts de qualité peu marqués

Ce paragraphe se base sur les résultats de qualité des œufs observés au cours de l'expérience de supplémentation mais ces discussions sont applicables à l'ensemble des résultats obtenus en conditions expérimentales tout au long du projet.

Les résultats de l'expérience de remédiation par l'aliment ont démontré que la supplémentation en NaCl propose une piste de travail sérieuse pour améliorer la qualité des ovocytes produits par les femelles de truite arc-en-ciel dans un contexte de faible concentration en sodium, potassium et chlorure dans l'eau d'élevage. A noter que cette diminution observée de 1.87% du taux d'ovocytes blanchissant à l'hydratation, extrapolée à l'échelle du groupe Viviers, qui commercialise en moyenne 120 millions d'œufs par an, représente potentiellement plus de 2 244 000 millions d'œufs supplémentaires produits par an. On remarque toutefois qu'au cours de l'étude menée ici, que ce soit pour les génitrices nourries à l'aliment commercial ou pour celles nourries à l'aliment supplémenté en sel, le nombre de génitrices ayant eu des pontes de mauvaise qualité au sens de la production est minime. On a vu que ces pontes de mauvaise qualité, au sens des techniciens de production, contiennent en moyenne 14.2% d'œufs qui blanchissent à l'hydratation (chapitre 2, partie 1). Dans notre expérience de remédiation, seules deux pontes présentaient des taux similaires [12.8% ; 13.9%], sur les 231 pontes évaluées. Ces deux pontes sont issues de génitrices nourries à l'aliment commercial. Ce taux, qu'il soit ramené au nombre total de pontes évaluées (0.86%) ou au nombre total de pontes « contrôles » (1.74%), reste bien inférieur aux taux de pontes de mauvaise qualité observés en routine dans la chaîne de production (taux minimum enregistré sur une bande pour l'année 2015 : 18.1% ; chapitre 1, partie 1). Il semble donc que le défaut de qualité soit moins observable en conditions expérimentales. Cette observation est valable pour les données présentées dans l'article (chapitre 2, partie 2), où les pourcentages de blanchiment à l'hydratation sont similaires à ceux observés au cours

de l'expérience discutée ici. Cette « non-observation » du défaut de qualité s'explique certainement par un biais expérimental, les génitrices étant moins stressées dans ces conditions. Malgré les tentatives de reproduction des conditions de densité et de manipulation, l'emplacement des bassins expérimentaux sur la pisciculture (moins exposés aux prédateurs et aux passages des techniciens piscicoles) et l'homogénéité du traitement appliqué à toutes les génitrices (interactions sociales entre individus réduites, pêche rapide des animaux, aucun risque d'erreur sur le repérage des ovulations, éclairage photopériodique homogène) gommait l'aggravation du phénomène par des facteurs non-environnementaux.

V.4.2. Les mécanismes en jeu

La principale conclusion de l'expérience de supplémentation de l'aliment au sel est que cette supplémentation permet l'obtention d'ovocytes plus gros (poids et volumes plus importants) et qui blanchissent moins (meilleure viabilité liée à un meilleur maintien de l'homéostasie cellulaire).

La cause de cette amélioration n'est pas définie mais on peut spéculer sur le fait qu'une meilleure hydratation des ovocytes permettrait d'exercer une pression hydrostatique accrue sur les enveloppes folliculaires pour provoquer la libération des ovocytes. La phase liquide représente en moyenne 61.3% du poids total des ovocytes (données issues des calculs d'hydratation, chapitre 2, partie 2) au moment de l'ovulation, et « explique » donc plus de 61.3% du volume de l'ovocyte. Une hydratation plus élevée et plus régulière des ovocytes aurait un impact sur le volume de la cellule. Dans le chapitre 2, partie 2, les taux d'hydratation contrastés observés (à Sarrance, +13% d'eau dans les ovocytes pendant la maturation chez les femelles à durée de FOM courte par rapport aux femelles à longue durée de FOM) impliquent une différence potentielle de plus de 8.0% du volume total de l'ovocyte. Une telle différence a probablement un impact sur la capacité de l'ovocyte à exercer une pression mécanique suffisante sur l'enveloppe folliculaire, contribuant à provoquer son déchirement pour permettre la sortie de l'ovocyte (ovulation). Cette hypothèse est cohérente avec les observations d'augmentation et d'homogénéité de taille et de poids des ovocytes des génitrices nourries à l'aliment salé. De plus, le défaut d'hydratation observé dans le chapitre IV est synonyme d'œufs de moins bonne qualité. La mesure de la teneur en eau et en éléments minéraux des ovocytes issus des génitrices nourries avec les deux régimes testés permettrait d'apporter un éclairage intéressant sur les phénomènes concernés. Si l'alimentation salée permet une meilleure hydratation des ovocytes, on observera peut-être un rapport poids humide sur poids sec plus élevé. Il n'est toutefois pas exclu que la matière sèche soit elle aussi plus présente dans l'ovocyte produit sous-alimentation salée. En effet l'appel osmotique en partie responsable de l'ampleur de l'hydratation de la cellule est créé par les éléments minéraux stockés au sein de l'ovocyte, ainsi que par les acides aminés libres issus du clivage de Vtg-A au moment de la maturation (Fabra, 2006). Si la supplémentation salée permet un meilleur stockage d'ions

inorganiques facilement mobilisables (sodium et potassium par exemple) tout au long de la gamétogenèse, et particulièrement au moment de la maturation ovocytaire, la création de l'appel osmotique est facilitée par un gradient osmotique plus marqué.

Néanmoins, la meilleure qualité des ovocytes ne s'explique pas uniquement par une meilleure ovulation puisqu'on a déjà vu que les durées de maturation extrêmes enregistrées à Sarrance restent inférieures aux durées habituellement enregistrées dans les situations de vieillissement post-ovulatoire. L'amélioration de la résistance de l'ovocyte à l'entrée d'eau post-ovulatoire peut s'expliquer par une qualité accrue de la membrane, la rendant résistante au déséquilibre osmotique transmembranaire. La supplémentation salée permettrait alors la constitution d'une membrane plus solide. Les mécanismes en jeu sont divers et peuvent impliquer notamment la régulation des cascades d'événements participants aux transports membranaires et à la création de la membrane. Là encore l'étude comparative des compositions des ovocytes (profils en phospholipides, acide-gras, protéines membranaires) permettrait d'avoir une vision plus claire des conséquences de la supplémentation salée.

L'hypothèse d'une meilleure hydratation, évoquée précédemment, n'est envisageable que si le programme génétique lié aux mécanismes d'hydratation et de maturation est exécuté efficacement. L'expression des gènes liés aux aquaporines, aux transporteurs actifs et passifs de solutés et aux mécanismes de dégradation des Vtg-A sont indispensables à la création d'un appel osmotique mais aussi à l'entrée d'eau au sein de la cellule. Une étude moléculaire comparative des profils d'expression géniques des tissus folliculaires des génitrices en fonction des deux modalités d'alimentation serait très instructive dans la compréhension du phénomène. Si le modèle d'expression des gènes liés à la maturation ovocytaire est corrigé par la supplémentation, les ovocytes produits par les femelles nourries à l'aliment salé possèderaient les compétences nécessaires au maintien de leur homéostasie comme ovocytes non-fécondés puis comme œufs embryonnés (qualité de la membrane, gestion des échanges transmembranaires, équilibres osmotiques transmembranaires).

Enfin il n'est pas exclu que la supplémentation salée agisse sur d'autres fonctions physiologiques de la génitrice. Certaines études ont démontré l'effet bénéfique d'une supplémentation sur les paramètres biométriques standards telles que la survie, la croissance et l'efficacité alimentaire, chez la jeune truite et la jeune carpe (Ogino & Kamizono, 1974). Bien qu'aucun effet n'ait été perçu dans le cadre de notre étude (pas de différence de mortalité ni de croissance), on peut noter que la plupart des résultats de la littérature sont obtenus sur des individus juvéniles. Notre cas d'étude se porte sur des femelles pendant un cycle sexuel accéléré, avec des mortalités déjà importantes et une croissance faible. On peut imaginer que l'impact de la gamétogenèse sur la physiologie du poisson supprime les variations

moins perceptibles dues à l'aliment. Mais l'augmentation des performances de reproduction (GSI et qualité des ovocytes produits) est généralement synonyme d'une meilleure santé des génitrices.

V.4.3. La formulation de l'aliment et la stratégie d'alimentation

La formulation de l'aliment a été réfléchi et décidée en fonction des informations de la bibliographie et des capacités expérimentales du site. Le site de Sarrance ne dispose que de 4 bassins expérimentaux similaires. Les modalités possibles sont donc réduites (deux bassins « contrôle » et deux bassins « supplémentés »). L'enrichissement de l'aliment en NaCl, à hauteur de 5%, a été décidé afin d'avoir un compromis entre un enrichissement marqué permettant l'observation de résultats contrastés, et une limite haute acceptable pour l'organisme de l'animal. L'étude de différents niveaux de supplémentation aurait permis une évaluation plus fine du taux optimal de NaCl.

De plus la stratégie alimentaire mise en place est originale par rapport à ce qui a pu être observé dans la production. En effet le maintien du nourrissage *ad libitum* pour les génitrices en maturation permet de maintenir un apport en nutriment et une disponibilité en éléments minéraux mobilisables via l'alimentation (maintien du budget minéral). On observe que malgré la diminution des prises alimentaires, certaines génitrices continuent de se nourrir durant ces périodes. Une investigation plus poussée permettrait d'étudier les mérites comparés de cette stratégie d'alimentation et du pur arrêt de l'alimentation (protocole suivi en général dans la production) sur la tonicité du milieu intérieur et la qualité de l'ovulation et des ovocytes.

V.4.4. Durée de la maturation folliculaire

Le protocole mis en place lors de l'expérience à l'aliment salé est perfectible. Comme évoqué précédemment, les vérifications des états de maturation des ovocytes par échographe sont trop espacées (7 jours entre chaque contrôle) pour permettre de mesurer et de comparer les temps de maturation ovocytaire. L'étude a montré que les femelles à temps de maturation ovocytaire long produisent des pontes de moins bonne qualité. Dans le cadre de la remédiation à l'aliment salé, une mesure plus précise de la durée de FOM permettrait de savoir si l'aliment agit sur les mécanismes de maturation et d'ovulation pour permettre une libération plus rapide des ovocytes. Cela permettrait d'apporter plus d'informations sur les mécanismes possibles de remédiation évoqués précédemment dans ce chapitre.

V.4.5. L'intérêt d'une supplémentation en potassium

Malgré son identification comme espèce ionique impliquée dans le phénomène, le potassium n'a pas été intégré dans la formulation de l'aliment. Les suivis plasmatiques ont démontré (1) la faible abondance en potassium dans le plasma ([33.77 ; 33.85]mgK⁺/L) relativement aux autres espèces

minérales étudiées ([4473 ; 4806]mgCl⁻/L et [1875; 2113]mgNa⁺/L dans le plasma) et (2) la variation importante de l'abondance de potassium dans le milieu intérieur circulant au cours de la vitellogenèse (diminution de 42% entre le début de la vitellogenèse et le mois précédant l'ovulation). Les variations de teneur minérale dans les tissus en fonction de la phase du cycle sexuel sont généralement interprétées comme le reflet d'un besoin physiologique particulier de l'organisme (Fletcher & King, 1978; Miramand et al., 1991; Shackley et al., 1981; Shearer, 1984). Une variation si importante de l'abondance de potassium dans le plasma sanguin suggère un besoin particulier mobilisant le potassium en début de cycle, ou une carence en potassium mobilisable en fin de cycle. Quelle qu'en soit la raison, le potassium pourrait être impliqué dans la réalisation de fonctions physiologiques pendant la vitellogenèse. Pour compléter l'expérience réalisée sur l'alimentation, un régime supplémenté en potassium permettrait d'observer les effets de cette espèce ionique sur la reproduction.

Références

- Abdi, H., and Lynne, J. W., 2010. Principal Component Analysis. John Wiley and Sons, Inc. WIREs Comp Stat 2: 433–59. <http://staff.ustc.edu.cn/~zwp/teach/MVA/abdi-awPCA2010.pdf>.
- Aegerter, S., Jalabert, B., & 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: Incorporating Gamete Research*, 72(3), 377-385. <https://doi.org/10.1002/mrd.20361>
- Aegerter, S., 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.019>
- Aegerter, S., 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.019>
- Amiard, J. C., & Amiard-Triquet, C., 2008. Les Biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques.
- Amiard, J. C., & Amiard-Triquet, C., 2008. Les Biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques.
- Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun, Z., Townsend, K., Hopkins, N., 1999. A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes & development*, 13(20), 2713-2724. 10.1101/gad.13.20.2713
- Arabacı, M., Nursoy, H., & Diler, I., 2010. The influence of changing dietary cation-anion differences and dietary Na/K ratios on growth and feed efficiency in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(11), 1607-1613. 10.3923/javaa.2010.1607.1613
- Atse, C.B., Audet, C., De La Noüe, J., 2002. Effects of temperature and salinity on the reproductive success of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): Egg composition, milt characteristics and fry survival. *Aquac. Res.* 33, 299–309. <https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2002.00674.x>
- Aulsebrook, L. C., Bertram, M. G., Martin, J. M., Aulsebrook, A. E., Brodin, T., Evans, J. P., Wong, B. B. 2020. Reproduction in a polluted world: implications for wildlife. *Reproduction*, 160(2), R13-R23. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0154>
- Auly, T., 1999. La région d'Arudy : les relations glacio-karstiques, élément fondamental de l'organisation morphologique. *Travaux du Laboratoire de Géographie Physique Appliquée*, 18(1), 33-61. <https://doi.org/10.3406/tlgpa.1999.966>
- Babin, P.J., Carnevali, O., Lubzens, E., Schneider, W.J., 2007. Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish. In: Babin, P.J., Cerdà, J., Lubzens, E. (Eds.), *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Springer, Dordrecht, pp. 39–76. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6235-3_2
- Bahr, J. M., 1978. Simultaneous measurement of steroids in follicular fluid and ovarian venous blood in the rabbit. *Biology of reproduction*, 18(2), 193-197. <https://doi.org/10.1095/biolreprod18.2.193>
- Baker, J. A., Gilron, G., Chalmers, B. A., & Elphick, J. R., 2017. Evaluation of the effect of water type on the toxicity of nitrate to aquatic organisms. *Chemosphere*, 168, 435-440. 10.1016/j.chemosphere.2016.10.059
- Baker, S., 2021. The role and regulation of prostaglandins and their receptors in ovulation in the zebrafish, *Danio rerio* (Doctoral dissertation, *Journal of General and Comparative Endocrinology*). <https://hdl.handle.net/10214/25732>
- Bakke, L. J., Dow, M. P., Cassar, C. A., Peters, M. W., Pursley, J. R., & Smith, G. W., 2002. Effect of the preovulatory gonadotropin surge on matrix metalloproteinase (MMP)-14, MMP-2, and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression within bovine periovulatory follicular and luteal tissue. *Biology of Reproduction*, 66(6), 1627-1634. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1627>
- Ballard, W., 1973. Normal embryonic stages for salmonid fishes, based on *Salmo gairdneri* Richardson and *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Journal of Experimental Zoology*, 184(1), 7-25. <https://doi.org/10.1002/jez.1401840103>
- Balment, R.J., Lu, W., Weybourne, E., Warne, J.M., 2006. Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behaviour : A review with insights from mammalian models. *General and comparative endocrinology*. 147, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.022>

- Baltzegar, D.A., Reading, B.J., Douros, J.D., Borski, R.J., 2013. Role for leptin in promoting glucose mobilization during acute hyperosmotic stress in teleost fishes. *J Endocrinol.* 2013 Nov 28;220(1):61-72. doi: 10.1530/JOE-13-0292
- Baoprasertkul, P., He, C., Peatman, E., Zhang, S., Li, P., Liu, Z., 2005. Constitutive expression of three novel catfish CXC chemokines: Homeostatic chemokines in teleost fish. *Mol. Immunol.* 42, 1355–1366. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.12.012>
- Barton, B. A., & Iwama, G. K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of fish diseases*, 1, 3-26. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- Basulto, S., 1976. Induced saltwater tolerance in connection with inorganic salts in the feeding of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 8(1), 45-55. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(76\)90018-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(76)90018-1)
- Bauer, J., Oller, G., & Sabrier, R., 1992. Pertes du Gave d'Ossau et naissance du Neez (Vallée d'Ossau, Pyrénées-Atlantiques). *Karstologia*, 19(1), 19-22. https://www.persee.fr/doc/karst_0751-7688_1992_num_19_1_2279
- Beacham, T. D., & Murray, C. B., 1988. Influence of photoperiod and temperature on timing of sexual maturity of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Canadian Journal of Zoology*, 66(8), 1729-1732. <https://doi.org/10.1139/z88-249>
- Behnke, R. J., 1979. Monograph of the native trouts of the genus *Salmo* of western North America.
- Berghahn, R., & Karakiri, M., 1990. Experimental induction of biological tags in otoliths of 0-group plaice *Pleuronectes platessa* by starvation, temperature, and UV-B radiation. *Marine Ecology Progress Series*, 227-233. <https://www.jstor.org/stable/24816780>
- Berglund, I., Antonopoulou, E., Mayer, I., & Borg, B., 1995. Stimulatory and inhibitory effects of testosterone on testes in Atlantic salmon male parr. *Journal of fish biology*, 47(4), 586-598. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb01925.x>
- Berlinsky, D., William, K., Hodson, R., Sullivan, C., 1997. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *J World Aquacult Soc* 28, 79-86. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1997.tb00964.x>
- Berndtson, A. K., Goetz, F. W., & Duman, P., 1989. In vitro ovulation, prostaglandin synthesis, and proteolysis in isolated ovarian components of yellow perch (*Perca flavescens*): effects of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and phorbol ester. *General and comparative endocrinology*, 75(3), 454-465. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(89\)90181-0](https://doi.org/10.1016/0016-6480(89)90181-0)
- Berndtson, A.K., Goetz, F.W., 1990. Metallo-protease activity increases prior to ovulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and yellow perch (*Perca flavescens*) follicle walls. *Biol. Reprod.* 42, 391–398
- Berndtson, K., Goetz, W., 1988. Protease activity in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) follicle walls demonstrated by substrate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biol. Reprod.* 38 (2), 511–516. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.2.511>
- Besseau, L., & Faliex, E., 1994. Resorption of unemitted gametes in *Lithognathus mormyrus* (Sparidae, Teleostei): a possible synergic action of somatic and immune cells. *Cell and tissue research*, 276(1), 123-132. <https://doi.org/10.1007/BF00354791>
- Bik, E., Ishigaki, M., Blat, A., Jasztal, A., Ozaki, Y., Malek, K., & Baranska, M., 2020. Lipid Droplet Composition Varies Based on Medaka Fish Eggs Development as Revealed by NIR-, MIR-, and Raman Imaging. *Molecules*, 25(4), 817. <https://doi.org/10.3390/molecules25040817>
- Billard, R., 1978. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture*, 14(3), 187-198. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(78\)90094-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(78)90094-7)
- Billard, R., 1992. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture*, 100(1-3), 263-298. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90385-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90385-X)
- Billard, R., Bry, C., Gillet, C., 1981. Stress, environment and reproduction in teleost fish. *Stress and fish*, Academic Press, 0-12-554550-9. hal-01600274
- Billard, R., & De Montalembert, G., 1976. Effets des iodophores sur les gamètes et les œufs de truite arc-en-ciel. *Bulletin Français de Pisciculture*, (263), 41-44. <https://doi.org/10.1051/kmae:1976002>
- Billard, R., Escaffre, A., Reinaud, P., 1975. L'insémination artificielle de la truite *Salmo gairdneri* Richardson.-IV-Effets des ions K⁺ et Na⁺ sur la conservation du pouvoir fécondant des gamètes. *Bulletin Français de Pisciculture*, (256), 88-100. <https://doi.org/10.1051/kmae:1975013>

- Billard, R., Jalabert, B., 1974. L'insémination artificielle de la truite (*Salmo gairdneri* Richardson). II. Comparaison des effets de différents dilueurs sur la conservation de la fertilité, des gamètes avant et après insémination. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 14, No. 4A, pp. 601-610). EDP Sciences. https://rnd.edpsciences.org/articles/rnd/pdf/1974/04/ABABB_0003-388X_1974_14_4A_ART0003.pdf
- Bilodeau-Goeseels, S., 2001. Manganese inhibits spontaneous nuclear maturation in bovine cumulus-enclosed oocytes. *Can. J. Anim. Sci.* 81, 223–228. <https://doi.org/10.4141/A00-074>
- Blom, J.H., Dabrowski, K., 1995. Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *Biol. Reprod.* 1995 May;52(5):1073-80. doi: 10.1095/biolreprod52.5.1073.
- Bobe, J., & Goetz, F. W., 2001b. Cysteine protease inhibitor is specifically expressed in pre-and early-vitellogenic oocytes from the brook trout periovulatory ovary. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 60(3), 312-318. <https://doi.org/10.1002/mrd.1093>
- Bobe, J., & Goetz, F.W., 2001a. An ovarian progastresin is present in the trout coelomic fluid after ovulation. *Biology of reproduction*, 64(4), 1048-1055. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.4.1048>
- Bobe, J., 2015. Egg quality in fish: Present and future challenges. *Anim. Front.* 5, 66–72. <https://doi.org/10.2527/af.2015-0010>
- Bobe, J., Goetz, F.W., 2000. A tumor necrosis factor decoy receptor homologue is up-regulated in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary at the completion of ovulation. *Biol. Reprod.* 62(2):420-6. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.420>
- Bobe, J., Jalabert, B., & Fostier, A., 2008. Oogenesis: post-vitellogenic events leading to a fertilizable oocyte. *Fish reproduction*, 1-36.
- Bobe, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 535–548. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>
- Bobe, J., Maugars, G., Nguyen, T., Rime, H., & Jalabert, B., 2003. Rainbow trout follicular maturational competence acquisition is associated with an increased expression of follicle stimulating hormone receptor and insulin-like growth factor 2 messenger RNAs. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 66(1), 46-53. <https://doi.org/10.1002/mrd.10334>
- Bobe, J., Montfort, J., Nguyen, T., Fostier, A., 2006. Identification of new participants in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocyte maturation and ovulation processes using cDNA microarrays. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-39>
- Bobe, J., Nguyen, T., Fostier, A., 2009. Ovarian function of the trout preovulatory ovary: New insights from recent gene expression studies. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 153, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.10.021>
- Bobe, J., Nguyen, T., Jalabert, B., 2004. Targeted gene expression profiling in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary during maturational competence acquisition and oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 71, 73–82. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.025205>
- Bonnet, E., Montfort, J., Esquerre, D., Hugot, K., Fostier, A., Bobe, J., 2007. Effect of photoperiod manipulation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg quality: A genomic study. *Aquaculture* 268, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.027>
- Bousset, L., Ermel, M., Soglonou, B., & Husson, O., 2019. A method to measure redox potential (Eh) and pH in agar media and plants shows that fungal growth is affected by and affects pH and Eh. *Fungal biology*, 123(2), 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.11.008>
- Brauner, C. J., Gonzalez, R. J., & Wilson, J. M., 2013. Extreme environments: Hypersaline, alkaline and ion-poor waters. In S. D. McCormic, A. P. Farrell, & C. J. Brauner (Eds.), *Euryhaline fishes, Fish physiology*, 32, 435–476 (pp. 436–478). Elsevier, Amsterdam: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396951-4.00009-8>
- Breton, B., Govoroun, M., Mikolajczyk, T., 1998. GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: Relationship with pituitary responsiveness to GnRH-a stimulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111, 38–50. <https://doi.org/10.1006/gcen.1998.7088>
- Breton, B., Maisse, G., & Lemenn, E., 1983. Contrôle photopériodique de la saison de reproduction en salmoniculture : une expérience pilote en Bretagne. *Bulletin Français de Pisciculture*, (288), 35-45. <https://doi.org/10.1051/kmae:1983013>

- Brivio, M. F., Bassi, R., Cotelli, F., 1991. Identification and characterization of the major components of the *Oncorhynchus mykiss* egg chorion. *Molecular reproduction and development*, 28(1), 85-93. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080280114>
- Brochet, C., Henquet, S., & Bernard, M., 2012. Une désintégrine et métalloprotéase 12 (ADAM12). *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 27(4), 195-204. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2012.02.010>
- Brock, J. A., & Bullis, R., 2001. Disease prevention and control for gametes and embryos of fish and marine shrimp. *Aquaculture*, 197(1-4), 137-159. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00585-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00585-3)
- Bromage, N., & Cumaranatunga, R., 1988. Egg production in the rainbow trout. In *Recent advances in aquaculture* (pp. 63-138). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-9743-4_2
- Bromage, N., Bruce, M., Basavaraja, N., Rana, K., Shields, R., Young, C., Gamble, J., 1994. Egg quality determinants in finfish the role of over ripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(1), 13-21. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00799.x>
- Bromage, N., Elliot, J.A.K., Springate, J.R.C., Whitehead, C., 1984. The effects of constant photoperiods on the timing of spawning in the rainbow trout. *Aquaculture*, 43, 213-223. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90023-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90023-1)
- Bromage, N., Jones, J., 1992. The effects of seasonal alterations in ration on fecundity and maturation in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Proc. Br. Soc. Anim. Prod.* 1992, 81–81. <https://doi.org/10.1017/s03082296000219422>
- Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J., Barker, G., 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100: 141–166. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90355-o](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90355-o)
- Bromage, N., Porter, M., & Randall, C., 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of. *Reproductive biotechnology in finfish aquaculture*, 197, 63-98.
- Bromage, N., Randall, C., Davies, B., Thrush, M., Duston, J., Carillo, M., & Zanuy, S., 1993. Photoperiodism and the control of reproduction and development in farmed fish. *Aquaculture: fundamental and applied research*, 43, 81-102. <https://doi.org/10.1029/CE043p0081>
- Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1997. Egg quality in fish: What makes a good egg? *Rev. Fish Biol. Fish.* 7, 387–416. <https://doi.org/10.1023/A:1018400130692>
- Brown, A. R., Owen, S. F., Peters, J., Zhang, Y., Soffker, M., Paull, G. C., Tyler, C. R., 2015. Climate change and pollution speed declines in zebrafish populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), E1237-E1246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416269112>
- Brown, L. L., Cox, W. T., & Levine, R. P. 1997. Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29(3), 213-218. 10.3354/dao029213
- Bry, C., 1981. Temporal aspects of macroscopic changes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) oocytes before ovulation and of ova fertility during the post-ovulation period; effect of treatment with 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone. *Aquaculture* 24, 153–160. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(81\)90052-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(81)90052-1)
- Burg, M. B., & Garcia-Perez, A., 1992. How tonicity regulates gene expression. *Journal of the American Society of Nephrology*, 3(2), 121-127. <https://doi.org/10.1681/ASN.V32121>
- Bury, N., & Grosell, M., 2003. Iron acquisition by teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135(2), 97-105. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00021-8)
- Campbell, P.M., Pottinger, T.G., Sumpter, J.P., 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biol. Reprod.* 47, 1140–1150. <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.6.1140>
- Campbell, P.M., Pottinger, T.G., Sumpter, J.P., 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture* 120, 151–169. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90230-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90230-5)
- Cardona E., Bugeon J., Segret E., Bobe J., 2020. VisEgg : a robust phenotyping tool to assess rainbow trout egg features and viability. *Fish Physiol Biochem.* Epub ahead of print. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00844-2>

- Cardona, E., Bugeon, J., Guivarc'h, F., Goardon, L., Panserat, S., Labbé, L., Bobe, J., 2019. Positive impact of moderate food restriction on reproductive success of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 502, 280-288. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.057>
- Carnevali, O., Cionna, C., Tosti, L., Lubzens, E., & Maradonna, F., 2006. Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *General and comparative endocrinology*, 146(3), 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.007>
- Carrillo, M., Bromage, N., Zanuy, S., Serrano, R., Prat, F., 1989. The effect of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 81, 351–365. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90159-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90159-2)
- Castany, G., 1982. *Principes et méthodes de l'hydrogéologie*. Dunod Université, Editions Bordas, Paris.
- Cerdà, J., 2009. Molecular pathways during marine fish egg hydration: The role of aquaporins. *J. Fish Biol.* 75, 2175–2196. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02397.x>
- Cerdà, J., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., & de la Higuera, M., 1994. Influence of nutritional composition of diet on sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reproductive performance and egg and larval quality. *Aquaculture*, 128(3-4), 345-361. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90322-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90322-0)
- Cerdà, J., Fabra, M., Raldúa, D., 2007. Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration. *Fish Oocyte From Basic Stud. to Biotechnol. Appl.* 349–396. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6235-3-12>
- Cerda, J., Reidenbach, S., Prätzel, S., & Franke, W. W., 1999. Cadherin-catenin complexes during zebrafish oogenesis: heterotypic junctions between oocytes and follicle cells. *Biology of reproduction*, 61(3), 692-704. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.3.692>
- Cetta, F., & Goetz, F. W., 1982. Ovarian and plasma prostaglandin E and F levels in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) during pituitary-induced ovulation. *Biology of reproduction*, 27(5), 1216-1221. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.5.1216>
- Chanda, S., Paul, B. N., Ghosh, K., Giri, S. S., 2015. Dietary essentiality of trace minerals in aquaculture-A Review. *Agricultural Reviews*, 36(2), 100-112. <http://dx.doi.org/10.5958/0976-0741.2015.00012.4>
- Chen, Y. N., Hsieh, S. L., & Kuo, C. M., 2003. Changes in oocyte and blood plasma osmotic components of ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck & Schlegel during oocyte maturation. *Aquaculture Research*, 34(10), 859-867. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00893.x>
- Cho, C. Y., Slinger, S. J., Bayley, H. S., 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 73(1), 25-41. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90198-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90198-5)
- Clelland, E. S., Tan, Q., Balofsky, A., Lacivita, R., & Peng, C., 2007. Inhibition of premature oocyte maturation: a role for bone morphogenetic protein 15 in zebrafish ovarian follicles. *Endocrinology*, 148(11), 5451-5458. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0674>
- Clelland, E., Kohli, G., Campbell, R. K., Sharma, S., Shimasaki, S., & Peng, C., 2006. Bone morphogenetic protein-15 in the zebrafish ovary: complementary deoxyribonucleic acid cloning, genomic organization, tissue distribution, and role in oocyte maturation. *Endocrinology*, 147(1), 201-209. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1017>
- Colson V, Cousture M, Damasceno D, Valotaire C, Nguyen T, Le Cam A, Bobe J. Maternal temperature exposure impairs emotional and cognitive responses and triggers dysregulation of neurodevelopment genes in fish. *PeerJ*. 2019 Jan 31;7:e6338. doi: 10.7717/peerj.6338. PMID: 30723624; PMCID: PMC6360074.
- Conceição, L. E. C., Dersjant-Li, Y., & Verreth, J. A. J., 1998. Cost of growth in larval and juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) in relation to growth rate, food intake and oxygen consumption. *Aquaculture*, 161(1-4), 95-106. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00260-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00260-3)
- Contreras Sánchez, W. M., 1995. Effects of stress on the reproductive performance and physiology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). https://ir.library.oregonstate.edu/concern/parent/5138jh31h/file_sets/jh343v70t
- Contreras-Sanchez, W. M., Schreck, C. B., Fitzpatrick, M. S., & Pereira, C. B., 1998. Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction*, 58(2), 439-447. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.2.439>

Coste, M., 1856. Instructions pratiques sur la pisciculture. Librairie de Victor Masson.

Craik, J., 1985. Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture*, 47(1), 61-88. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90008-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90008-0)

Craik, J.C.A., Harvey, S.M., 1984. Biochemical changes occurring during final maturation of eggs of some marine and freshwater teleosts. *J. Fish Biol.* 24, 599–610. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04830.x>

Crespel, A., Rime, H., Fraboulet, E., Bobe, J., & Fauvel, C., 2008. Egg quality in domesticated and wild seabass (*Dicentrarchus labrax*): a proteomic analysis. *Cybio, Revue Internationale d'Ichtyologie*, 32(2). <https://archimer.ifremer.fr/doc/2008/publication-6555.pdf>

Crespo, D., Bonnet, E., Roher, N., 2010. Cellular and molecular evidence for a role of tumor necrosis factor alpha in the ovulatory mechanism of trout. *Reprod Biol Endocrinol* 8, 34. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-34>

Crespo, D., Pramanick, K., Goetz, F. W., Planas, J. V., 2013. Luteinizing hormone stimulation of in vitro ovulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) involves follicle contraction and activation of proteolytic genes. *General and comparative endocrinology*, 188, 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.02.031>

Curry Jr, T. E., & Osteen, K. G., 2003. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine reviews*, 24(4), 428-465. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0005>

Curry, T. E., & Smith, M. F., 2006. Impact of extracellular matrix remodeling on ovulation and the folliculo-luteal transition. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 24, No. 04, pp. 228-241). 10.1055/s-2006-948552

D'Ambrosio J, Morvezen R, Brard-Fudulea S, Bestin A, Acin Perez A, Guéméné D, Poncet C., Haffray P., Dupont-Nivet M., Phocas, F., 2020. Genetic architecture and genomic selection of female reproduction traits in rainbow trout. *BMC Genomics*. 21(1):558. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06955-7>

D'ambrosio, J., Phocas, F., Haffray, P., Bestin, A., Brard-Fudulea, S., Poncet, C., Dupont-Nivet, M., 2019. Genome-wide estimates of genetic diversity, inbreeding and effective size of experimental and commercial rainbow trout lines undergoing selective breeding. *Genetics Selection Evolution*, 51(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12711-019-0468-4>

Dabrowski, K. R., 1986. Ontogenetical aspects of nutritional requirements in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 85(4), 639-655. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90272-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90272-0)

Dams, L., 1987. Poissons et contours de type pisciforme dans l'art pariétal paléolithique. *Bulletin de la Société Royale Belge d'Anthropologie et de Préhistoire*, 98, 81-132. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=12019720>

Daniels, W. L., Zipper, C. E., Orndorff, Z. W., Skousen, J., Barton, C. D., McDonald, L. M., & Beck, M. A., 2016. Predicting total dissolved solids release from central Appalachian coal mine spoils. *Environmental Pollution*, 216, 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.044>

Davidson, J., Good, C., Welsh, C., & Summerfelt, S. T., 2014. Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health, performance, and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 59, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.01.003>

Davies, B., & Bromage, N., 2002. The effects of fluctuating seasonal and constant water temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 205(1-2), 183-200. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00665-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00665-2)

Davis, D. A., & Gatlin III, D. M., 1996. Dietary mineral requirements of fish and marine crustaceans. *Reviews in Fisheries Science*, 4(1), 75-99. <https://doi.org/10.1080/10641269609388579>

Delfaud, J., 1973. Typologie des faciès dolomitiques du Jurassique sud-aquitain. *Bull. Soc. Lin., Bordeaux*, t. III, n° 10, 12.

Dersjant-Li, Y., Verreth, J. A. J., Evers, F., Tijssen, P. A. T., Booms, R., & Verstegen, M. W. A., 1999. The influence of dietary cation-anion differences on acid-base balance, food intake, growth and nutrient utilisation of juvenile African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *Fish Physiology and Biochemistry*, 20(4), 305-311. <https://doi.org/10.1023/A:1007707507228>

Desjardins, L. M., 1986. The effect of iron supplementation on diet rancidity and on the growth and physiological response of rainbow trout. National Library of Canada, Ottawa.

- Devauchelle, N., Alexandre, J. C., Le Corre, N., & Letty, Y., 1987. Spawning of sole (*Solea solea*) in captivity. *Aquaculture*, 66(2), 125-147. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90227-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90227-4)
- Dollar, A. M., & Katz, M., 1964. Rainbow trout brood stocks and strains in American hatcheries as factors in the occurrence of hepatoma. *The Progressive Fish-Culturist*, 26(4), 167-174. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1964\)26\[167:RTBSAS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1964)26[167:RTBSAS]2.0.CO;2)
- Dolomatov, S.I., Shekk, P. V., Zukow, W., Kryukova, M.I., 2011. Features of nitrogen metabolism in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 21, 733–737. <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9212-z>
- Dolomatov, S.I., Zukow, W., Novikov, N.Y., Muszkieta, R., Bulatowicz, I., Dzierzanowski, M., Kazmierczak, U., Strojek, K., 2012. The regulation of osmotic and ionic balance in fish reproduction and in the early stages of ontogeny. *Russ. J. Mar. Biol.* 38, 365–374. <https://doi.org/10.1134/S1063074012050057>
- Donaldson, E.M., 1981. The pituitary–interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: Pickering, A.D. (Ed), *Stress in Fish*. Academic Press, London, pp. 11–47.
- Donato, D., Hiramatsu, N., Arey, K., 2003. Atresia in temperate basses: cloning of hatching enzyme (choriolyisin) homologues from atretic ovaries. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 329–330 (2003). <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030573.04442.19>
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Boggs, C., 1996. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 123(1), 37-46. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.37>
- Drummond, C. D., Bazzoli, N., Rizzo, E., & Sato, Y., 2000. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. *Journal of Experimental Zoology*, 287(2), 176-182. [https://doi.org/10.1002/1097-010X\(20000701\)287:2<176::AID-JEZ8>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-010X(20000701)287:2<176::AID-JEZ8>3.0.CO;2-2)
- Du Monceau, M., 1772. *Traité Général des Pêches, et Histoire des Poissons* (General treatise of Fisheries, and History of Fishes). Vol I-III, Paris.
- Dunn, O.J., 1959. Confidence intervals for the means of dependent, normally distributed variables, *Journal of the American Statistical Association*, vol. 54, no 287, 1959, p. 613–621. [10.1080/01621459.1959.10501524](https://doi.org/10.1080/01621459.1959.10501524)
- Duston, J., & Bromage, N., 1988. The entrainment and gating of the endogenous circannual rhythm of reproduction in the female rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Comparative Physiology A*, 164(2), 259-268. doi: [10.1007/BF00603956](https://doi.org/10.1007/BF00603956).pdf
- Ecker, R.E., Dennis Smith, L., 1971. Influence of exogenous ions on the events of maturation in *Rana pipiens* oocytes. *J. Cell. Physiol.* 77, 61–70. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040770108>
- Engé, E., & Hesthagen, T., 2016. Ion deficit restricts the distribution of brown trout (*Salmo trutta*) in very dilute mountain lakes. *Limnologia*, 57, 23-26. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2015.12.004>
- Engé, E., Hesthagen, T., Auestad, B.H., 2021. Low Recruitment in a Population of Brook Trout in a Norwegian Watershed—Is It Due to Dilution of the Water Chemistry? *Water, Air, Soil Pollut.* 232. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04969-1>
- Escaffre, A. M., Billard, R., 1979. Évolution de la fécondabilité des ovules de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) laissés dans la cavité abdominale au cours de la période post-ovulatoire. *Bulletin Français de Pisciculture*. 272, 56-70. <https://doi.org/10.1051/kmae:1979012>
- Escaffre, A. M., Petit, J., & Billard, R., 1977. Evolution de la quantité d'ovules récoltés et conservation de leur aptitude à être fécondés au cours de la période post ovulatoire chez la truite arc-en-ciel. *Bulletin français de Pisciculture*, (265), 134-142. <https://doi.org/10.1051/kmae:1977008>
- Espey LL, Richards JS, 2006. Ovulation. In “Physiology of Reproduction, Vol 1” 3rd ed, Ed by JD Neil et al., Academic Press, Amsterdam, pp 425–474
- Espey, L.L., 1980. Ovulation as an inflammatory reaction—a hypothesis. *Biology of reproduction*, 22(1), 73-106. <https://doi.org/10.1095/biolreprod22.1.73>
- Espey, L.L., 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol. Reprod.* 50, 233–238. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.2.233>
- Estay, F., Díaz, N. F., Neira, R., & Fernandez, X., 1994. Analysis of reproductive performance of rainbow trout in a hatchery in Chile. *The progressive fish-culturist*, 56(4), 244-249. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1994\)056<0244:AORPOR>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1994)056<0244:AORPOR>2.3.CO;2)

- Fabra, M., Raldúa, D., Bozzo, M. G., Deen, P. M., Lubzens, E., & Cerdà, J., 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-10 play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption. *Developmental biology*, 295(1), 250-262. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.034>
- Fabra, M., Raldúa, D., Power, D. M., Deen, P. M., & Cerdà, J., 2005. Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated. *Science*. 307(5709), 545-545. <https://doi.org/10.1126/science.1106305>
- Fagerlund, U.H.M., McBride, J.R., & Stone, E.T., 1981. Stress-related effects of hatchery rearing density on coho salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 110(5), 644-649. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1981\)110<644:SEOHRD>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1981)110<644:SEOHRD>2.0.CO;2)
- FAO, 2019. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017. Rome. <http://www.fao.org/3/ca5495t/CA5495T.pdf>
- FAO, 2021. Cultured and aquatic species information programme : *Oncorhynchus Mykiss*. Cultured Aquatic Species Information Programme . Text by Cowx, I. G. In: FAO Fisheries Division [online]. Rome. Updated. [Cited 5 October 2021]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en#tcNA0064
- Fetter, C. W., 2018. Applied hydrogeology. Waveland Press.
- Finet, B., Jalabert, B., & Garg, S. K., 1988. Effect of defolliculation and 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone on cyclic AMP level in full-grown oocytes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gamete research*, 19(3), 241-252. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120190304>
- Finn, R.N., Østby, G.C., Norberg, B., Fyhn, H.J., 2002. In vivo oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*); proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx. *J. Exp. Biol.* 205, 211–224. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.2.211>
- Fiol, D.F., Chan, S.Y., Kültz, D., 2006. Regulation of osmotic stress transcription factor 1 (Ostf1) in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gill epithelium during salinity stress. *J Exp Biol Aug*;209(Pt 16):3257-65. doi: 10.1242/jeb.02352. PMID: 16888073.
- Fitzpatrick, M. S., Schreck, C. B., Ratti, F., & Chitwood, R., 1987. Viabilities of eggs stripped from coho salmon at various times after ovulation. *The Progressive Fish-Culturist*, 49(3), 177-180. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1987\)49<177:VOESFC>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1987)49<177:VOESFC>2.0.CO;2)
- Fletcher, G. L., & King, M. J., 1978. Seasonal dynamics of Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, and Mg²⁺ in gonads and liver of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): evidence for summer storage of Zn²⁺ for winter gonad development in females. *Canadian Journal of Zoology* 56.2: 284-290. <https://doi.org/10.1139/z78-038>
- Fontagné, S., Silva, N., Bazin, D., Ramos, A., Aguirre, P., Surget, A., Power, D. M., 2009. Effects of dietary phosphorus and calcium level on growth and skeletal development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquaculture*, 297(1-4), 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.09.022>
- Fontagne-Dicharry, S., Godin, S., Liu, H., Prabhu, P. A. J., Bouyssiére, B., Bueno, M., Kaushik, S. J., 2015. Influence of the forms and levels of dietary selenium on antioxidant status and oxidative stress-related parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *British journal of nutrition*, 113(12), 1876-1887. doi:10.1017/S0007114515001300
- Fontagné-Dicharry, S., Lataillade, E., Surget, A., Brèque, J., Zambonino-Infante, J. L., & Kaushik, S. J., 2010. Effects of dietary vitamin A on broodstock performance, egg quality, early growth and retinoid nuclear receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 303(1-4), 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.009>
- Fontaine, M., and Olivereau, M., 1962. Nutrition et sexualité chez les poissons. *Annales de la nutrition et de l'alimentation*. CNRS. <https://www.jstor.org/stable/45124676>
- Fontaine, P., Pereira, C., Wang, N., Marie, M., 2006. Influence of pre-inductive photoperiod variations on Eurasian perch *Perca fluviatilis* broodstock response to an inductive photothermal program. *Aquaculture* 255: 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.025>
- Ford, D., & Williams, P. D., 2013. Karst hydrogeology and geomorphology. John Wiley & Sons.
- Fostier A, Breton B, Jalabert B, Marcuzzi O, 1981. Evolution des niveaux plasmatiques de la gonadotropine glycoprotéique et de la 17 alpha hydroxy-20 beta dihydroprogestérone au cours de la maturation et de l'ovulation chez la Truite arc-en-ciel. *Salmo gairdnerii*. *CR Seances Acad. Sci. III*. 293(15):817-20. French. PMID: 6804018.

- Fostier, A., Jalabert, B., & Terqui, M., 1973. Predominant action of a hydroxylated derivative of progesterone on the in vitro maturation of oocytes of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles, 277(4), 421-424. PMID: 4206628
- Fox, J., Friendly, G. G., Graves, S., Heiberger, R., Monette, G., Nilsson, H., 2007. The car package. R Foundation for Statistical Computing. <http://ftp.uni-bayreuth.de/math/statlib/R/CRAN/doc/packages/car.pdf>
- FranceAgriMer, 2019. Étude sur la pisciculture en circuit « recirculé » - Rapport final 2019. Édition octobre 2019. Dir. Publi.: Christine Avelin. Rédac.: direction Marchés, études et prospective. https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/62417/document/Rapport%20final_pisci%20en%20circ%20recircul%C3%A9.pdf?version=1
- Freixes, A., Monterde, M., & Ramoneda, J., 1998. Spring water temperature as a characteristics feature of karst aquifer behaviour. Examples from the Central Pyrenees (NE Spain). Hydrogéologie (Orléans), (1), 31-40. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=6206829>
- Fremont, L., & Riazi, A., 1988. Biochemical analysis of vitellogenin from rainbow trout (*Salmo gairdneri*): fatty acid composition of phospholipids. Reproduction Nutrition Développement, 28(4A), 939-952. <https://doi.org/10.1051/rnd:19880607>
- Fujimori, C., Ogiwara, K., Hagiwara, A., & Takahashi, T., 2012. New evidence for the involvement of prostaglandin receptor EP4b in ovulation of the medaka, *Oryzias latipes*. Molecular and cellular endocrinology, 362(1-2), 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.05.013>
- Fujimori, C., Ogiwara, K., Hagiwara, A., Rajapakse, S., Kimura, A., Takahashi, T., 2011. Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: possible involvement in ovulation. Molecular and cellular endocrinology, 332(1-2), 67-77. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.09.015>
- Funkhouser, L. J., & Bordenstein, S. R., 2013. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. PLoS biology, 11(8), e1001631. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001631>
- Gall, G. A. E., 1975. Genetics of reproduction in domesticated rainbow trout. Journal of animal science, 40(1), 19-28. <https://doi.org/10.2527/jas1975.40119x>
- Gall, G.A.E., Gross, S.J., 1978. A genetic analysis of the performances of three rainbow trout broodstocks. Aquaculture, 15, 113-127. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(78\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(78)90057-1)
- Gall, G.A.E., Huang, N., 1988. Heritability and selection schemes for rainbow trout: Females reproductive performances. Aquaculture, 73, 57-66. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90041-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90041-5)
- Gall, G.A.E., Neira, R., 2004. Genetic analysis of female reproduction traits of farmed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture, 1-4, 143-154. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.029>
- Garczynski, M.A., & Goetz, F. W., 1997. Molecular characterization of a ribonucleic acid transcript that is highly up-regulated at the time of ovulation in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary. Biology of reproduction, 57(4), 856-864. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.4.856>
- Gatlin III, D. M., & Wilson, R. P., 1986. Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. Aquaculture, 52(3), 191-198. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90143-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90143-2)
- Gatlin III, D. M., MacKenzie, D. S., Craig, S. R., & Neill, W. H., 1992. Effects of dietary sodium chloride on red drum juveniles in waters of various salinities. The Progressive Fish-Culturist, 54(4), 220-227. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1992\)054<0220:EODSCO>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1992)054<0220:EODSCO>2.3.CO;2)
- Gautier, A., 1995. La domestication des animaux. In Le génie de l'homme des origines à l'écriture : catalogue d'exposition (pp. 214-220). Abbaye Saint-Gérard de Brogne. <http://hdl.handle.net/1854/LU-251299>
- Ge, W., 2000. Roles of the activin regulatory system in fish reproduction. Canadian journal of physiology and pharmacology, 78(12), 1077-1085. <https://doi.org/10.1139/y00-102>
- Gioacchini, G., Marisaldi, L., Basili, D., Candelma, M., Pignalosa, P., Cigliano, R. A., Carnevali, O., 2019. A de novo transcriptome assembly approach elucidates the dynamics of ovarian maturation in the swordfish (*Xiphias gladius*). Scientific reports, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43872-6>

- Gjedrem, T., Haus, E. and Halseth, V., 1986. Genetic variation in reproductive traits in Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture* 57 (1-4), 369-369.
- Goetz, F. W., & Nagahama, Y., 1985. The in vitro effects of cyclic nucleotides on prostaglandin-induced ovulation of goldfish (*Carassius auratus*). *Zoological science*, 2(2), p225-228. NCID : AA10545874
- Goetz, F. W., & Theofan, G., 1979. In vitro stimulation of germinal vesicle breakdown and ovulation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes. Effects of 17α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone and prostaglandins. *General and Comparative Endocrinology*, 37(3), 273-285. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(79\)90001-7](https://doi.org/10.1016/0016-6480(79)90001-7)
- Goetz, F. W., Smith, D. C., & Krickl, S. P., 1982. The effects of prostaglandins, phosphodiesterase inhibitors, and cyclic AMP on ovulation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) oocytes. *General and comparative endocrinology*, 48(2), 154-160. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(82\)90012-0](https://doi.org/10.1016/0016-6480(82)90012-0)
- Goetz, F.W., Bergman, H.L., 1978. The effects of steroids on final maturation and ovulation of oocytes from brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and yellow perch (*Perca flavescens*). *Biol. Reprod.* 18, 293-298. <https://doi.org/10.1095/biolreprod18.2.293>
- Goff, A. K., & Henderson, K. M., 1979. Changes in follicular fluid and serum concentrations of steroids in PMS treated immature rats following LH administration. *Biology of reproduction*, 20(5), 1153-1157. <https://doi.org/10.1095/biolreprod20.5.1153>
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Hopkins, N., 2002. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nature genetics*, 31(2), 135-140. <https://doi.org/10.1038/ng896>
- Gonzalez, R., Wilson, R., & Wood, M., 2005. Ionoregulation in tropical fishes from ion-poor, acidic blackwaters. *Fish physiology*, 21, 397-442. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(05\)21009-9](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(05)21009-9)
- Grauman, G., & Sukhorukova, L., 1982. On the emergence of sprat and cod abnormal embryos in the open Baltic. *ICES CM*, 1, 7.
- Gray, J., 1932. The osmotic properties of the eggs of the trout (*Salmo Fario*). *Journal of Experimental Biology*. 9(3), 277-299. <https://doi.org/10.1242/jeb.9.3.277>
- Greeley Jr, M. S., Hols, H., Wallace, R. A., 1991. Changes in size, hydration and low molecular weight osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus* oocytes in vivo. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*. 100(3), 639-647. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90383-N](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90383-N)
- Grier, H.J., Uribe, M.C., Parenti, L.R., 2007. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *J Morphol.* 268(4), 293-310. <https://doi.org/10.1002/jmor.10518>
- Gunasekera, R. M., Shim, K. F., & Lam, T. J., 1996. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 146(1-2), 121-134. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01365-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01365-8)
- Güner, Y., Bayrak, H., & Güleç, F., 2012. The effect of water temperature on spawning out of season in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In *Proceedings of 3rd International Symposium on Sustainable Development* (pp. 72-82). <https://omeka.ibu.edu.ba/files/original/a58603401f1addaeb234275112b3ca55.pdf>
- Guraya, S. S., 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. *The cell and molecular biology of fish oogenesis*.
- Habibi, H. R., & Andreu-Vieyra, C. V., 2007. Hormonal regulation of follicular atresia in teleost fish. In *The fish oocyte* (pp. 235-253). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6235-3_9
- Haffray, P., Fostier, A., M., Jalabert, B., 1995. Influence du maintien en mer ou de la période de transfert en eau douce des reproducteurs de saumon atlantique *Salmo salar* sur la maturation sexuelle et la qualité des gamètes. *Aquatic Living Resources*. 8(2), 135-145. <https://doi.org/10.1051/alr:1995010>
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Nusslein-Volhard, C., 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 123(1), 1-36. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.1>

- Hagiwara A, Ogiwara K, Sugama N, Yamashita M, Takahashi T, 2020. Inhibition of medaka ovulation by gap junction blockers due to its disrupting effect on the transcriptional process of LH-induced Mmp15 expression. *Gen Comp Endocrinol.* 1;288:113373. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113373>
- Hagiwara, A., Ogiwara, K., Katsu, Y., & Takahashi, T., 2014. Luteinizing hormone-induced expression of Ptger4b, a prostaglandin E2 receptor indispensable for ovulation of the medaka *Oryzias latipes*, is regulated by a genomic mechanism involving nuclear progesterone receptor. *Biology of Reproduction*, 90(6), 126-1. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.115485>
- Hajnik, C.A., Goetz, F.W., Hsu, S.Y., Sokal, N, 1998. Characterization of a ribonucleic acid transcript from the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary with structural similarities to mammalian adiponin/complement factor D and tissue kallikrein, and the effects of kallikrein-like serine proteases on follicle contraction. *Biol Reprod.* 58(4):887-97. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.4.887>
- Hanumanthaiah, R., Day, K., Jagadeeswaran, P., 2002. Comprehensive analysis of blood coagulation pathways in teleostei: Evolution of coagulation factor genes and identification of Zebrafish factor VIII. *Blood Cells, Mol. Dis.* 29, 57–68. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0534>
- Hardy, R. W., & Shearer, K. D., 1985. Effect of dietary calcium phosphate and zinc supplementation on whole body zinc concentration of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(1), 181-184. <https://doi.org/10.1139/f85-022>
- Hardy, R. W., 2002. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture, 184-202.
- Hardy, R. W., Shearer, K. D., & King, I. B., 1984. Proximate and elemental composition of developing eggs and maternal soma of pen-reared coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed production and trace element fortified diets. *Aquaculture*, 43(1-3), 147-165. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90018-8)
- Hardy, R. W., Shearer, K. D., & King, I. B., 1984. Proximate and elemental composition of developing eggs and maternal soma of pen-reared coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed production and trace element fortified diets. *Aquaculture*, 43(1-3), 147-165. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90018-8)
- Havas, M., & Rosseland, B. O., 1995. Response of zooplankton, benthos, and fish to acidification: an overview. *Water, Air, and Soil Pollution*, 85(1), 51-62. doi : 10.1007/BF00483688
- Hayashi, M., 2004. Temperature-electrical conductivity relation of water for environmental monitoring and geophysical data inversion. *Environmental monitoring and assessment*, 96(1), 119-128. <https://doi.org/10.1023/B:EMAS.0000031719.83065.68>
- He, L., Vasiliou, K., & Nebert, D. W., 2009. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Human genomics*, 3(2), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-2-195>
- Heath, D.D., Heath, J.W., Bryden, C.A., Johnson, R.M., Fox, C.W., 2003. Rapid evolution of egg size in captive salmon. *Science*. 299: 1738–1740. <https://doi.org/10.1126/science.1079707>
- Hediger, M. A., Romero, M. F., Peng, J. B., Rolfs, A., Takanaga, H., & Bruford, E. A., 2004. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflügers Archiv*, 447(5), 465-468. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1192-y>
- Herman, R. L., McAllister, K., Bullock, G. L., & Shotts, E. B., 1985. Postspawning mortality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) associated with *Lactobacillus*. *Journal of wildlife diseases*, 21(4), 358-360. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-21.4.358>
- Higgs, D. A., Fagerlund, U. H., Eales, J. G., & McBride, J., 1982. Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 73(1), 143-176. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90206-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90206-1)
- Hill, C. H., & Matrone, G., 1970. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. In *Fed Proc.* 29, No. 4, 1474-1481. PMID : 5459894
- Hilton, J. W., 1989. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. *Aquaculture*, 79(1-4), 223-244. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90463-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90463-8)
- Historique de l'aquaculture, 2011. IFREMER. <https://aquaculture.ifremer.fr/Statistiques-mondiales/Presentation-generale/Historique>

- Hoorn, E. J., Nelson, J. H., McCormick, J. A., & Ellison, D. H., 2011. The WNK kinase network regulating sodium, potassium, and blood pressure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(4), 605-614. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010080827>
- Hrabia, A., Wolak, D., Kwaśniewska, M., Kieronska, A., Socha, J. K., & Sechman, A., 2019. Expression of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-2 and TIMP-3) in the chicken ovary in relation to follicle development and atresia. *Theriogenology*, 125, 268-276. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.017>
- Hsu, S., Goetz, F.W., Sciences, B., Dame, N., Dame, N., 1992. Angiotensins stimulate in vitro ovulation and contraction of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) follicles. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 277–282. <https://doi.org/10.1007/BF00004476>
- Hubbard, C. J., & Greenwald, G. S., 1982. Cyclic nucleotides, DNA, and steroid levels in ovarian follicles and corpora lutea of the cyclic hamster. *Biology of reproduction*, 26(2), 230-240. <https://doi.org/10.1095/biolreprod26.2.230>
- Hurk, R. van den, Peute, J., 1979. Cyclic changes in the ovary of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, with special reference to sites of steroidogenesis. *Cell Tissue Res.* 199, 289–306. <https://doi.org/10.1007/BF00236140>
- Husson, F., Josse, J., and Pagès, J., 2010. Principal Component Methods - Hierarchical Clustering - Partitional Clustering: Why Would We Need to Choose for Visualizing Data? Unpublished Data. http://www.sthda.com/english/upload/hcpc_husson_josse.pdf.
- Husson, F., Le, S., and Pagès, J., 2017. Exploratory Multivariate Analysis by Example Using R. 2nd ed. Boca Raton, Florida: Chapman; Hall/CRC. <http://factominer.free.fr/bookV2/index.html>.
- Ikuta, K., & Kitamura, S., 1995. Effects of low pH exposure of adult salmonids on gametogenesis and embryo development. *Water, Air, and Soil Pollution*, 85(2), 327-332. <https://doi.org/10.1007/BF00476850>
- Ikuta, K., Suzuki, Y., & Kitamura, S., 2003. Effects of low pH on the reproductive behavior of salmonid fishes. *Fish physiology and biochemistry*, 28(1), 407-410. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030607.75565.74>
- Ikuta, K., Suzuki, Y., & Kitamura, S., 2003. Effects of low pH on the reproductive behavior of salmonid fishes. *Fish physiology and biochemistry*, 28(1), 407-410. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030607.75565.74>
- Ishac, M. M., & Dollar, A. M., 1968. Studies on manganese uptake in *Tilapia mossambica* and *Salmo gairdnerii*. *Hydrobiologia*, 31(3), 572-584.
- Ishigaki, M., Nishii, T., Puangchit, P., Yasui, Y., Huck, C. W., & Ozaki, Y., 2018. Noninvasive, high-speed, near-infrared imaging of the biomolecular distribution and molecular mechanism of embryonic development in fertilized fish eggs. *Journal of biophotonics*, 11(4), e201700115. <https://doi.org/10.1002/jbio.201700115>
- Isom, L. L., 2002. The role of sodium channels in cell adhesion. *Front Biosci*, 7(1), 12-23. <https://www.fbscience.com/Landmark/articles/pdf/LandmarkA765.pdf>
- Isom, L. L., De Jongh, K. S., Patton, D. E., Reber, B. F., Offord, J., Charbonneau, H., Catterall, W. A., 1992. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*, 256(5058), 839-842. [10.1126/science.256.5058.839](https://doi.org/10.1126/science.256.5058.839)
- Isom, L. L., Scheuer, T., Brownstein, A. B., Ragsdale, D. S., Murphy, B. J., & Catterall, W. A., 1995. Functional Co-expression of the $\beta 1$ and Type IIA α Subunits of Sodium Channels in a Mammalian Cell Line (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(7), 3306-3312. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.7.3306>
- Izquierdo, M. S., Fernandez-Palacios, H., & Tacon, A. G. J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197(1-4), 25-42. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00581-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00581-6)
- Jalabert B, Breton B, Bry C., 1972. Maturation et ovulation in vitro des ovocytes de la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri*. *CR Acad Hebd Seances Acad Sci D.* 11;275(11):1139-42. French. PMID: 4196379.
- Jalabert, B., & Fostier, A., 2010. La truite arc-en-ciel: De la biologie à l'élevage. Editions Quae. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01205013>
- Jalabert, B., 1976. In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*), Northern Pike (*Esox lucius*), and Goldfish (*Carassius auratus*). *J. Fish. Res. Board Canada.* 33, 974–988. <https://doi.org/10.1139/f76-124>
- Jalabert, B., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutrition Development*, 45(3), 261-279. [10.1051/rnd:2005019](https://doi.org/10.1051/rnd:2005019)

- Jalabert, B., Fostier, A., 1984. The follicular sensitivity in vitro to maturation-inducing hormones in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*: role of oestradiol-17 β . *Aquaculture*, 43(1-3), 1-11. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90004-8)
- Jalabert, B., Szöllösi, D., 1975. In vitro ovulation of trout oocytes : Effect of prostaglandins on smooth muscle-like cells of the theca. *Prostaglandins*, 765–778. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(75\)90113-6](https://doi.org/10.1016/0090-6980(75)90113-6)
- Jalabert, B., Theron, M. C., Heydorff, M., 1978. Production of fertilizable oocytes from follicles of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) following in vitro maturation and ovulation. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 18, No. 2B, pp. 461-470). EDP Sciences.
- Jastrebski, C. J., & Morbey, Y. E., 2009. Egg size variation in lake trout: phenotype–habitat correlations show an effect of rearing environment. *Transactions of the American Fisheries Society*, 138(6), 1342-1351. <https://doi.org/10.1577/T08-175.1>
- Jezierska, B., Ługowska, K. & Witeska, M., 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol Biochem* 35, 625–640. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9284-4>
- Jo, M., Thomas, L., Wheeler, S., Curry Jr, T., 2004. Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP)-associated MMP-2 activation increases in the rat ovary in response to an ovulatory dose of human chorionic gonadotropin. *Biology of reproduction*, 70(4), 1024-1032. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023499>
- Johnson, D. D. Webster. 1977. Avoidance of low pH in the selection of spawning sites by brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish. Res. Board Can*, 34, 2215-2218.
- Johnston, C. E., Hambrook, M. J., Gray, R. W., & Davidson, K. G., 1992. Manipulation of reproductive function in Atlantic salmon (*Salmo salar*) kelts with controlled photoperiod and temperature. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(10), 2055-2061. <https://doi.org/10.1139/f92-228>
- Jolliffe, I.T., 2002. *Principal Component Analysis*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag. <https://goo.gl/SB86SR>
- Jones, K. A., Hara, T. J., & Scherer, E., 1985. Behavioral modifications in arctic char (*Salvelinus alpinus*) chronically exposed to sublethal pH. *Physiological Zoology*, 58(4), 400-412. <https://www.jstor.org/stable/30156015>
- Joy, K.P., Chaube, R., 2015. General and Comparative Endocrinology Vasotocin – A new player in the control of oocyte maturation and ovulation in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.013>
- Kagawa, H., & Nagahama, Y., 1981. In vitro effects of prostaglandins on ovulation in goldfish, *Carassius auratus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* (Japan). ISSN : 0021-5392
- Kagawa, H., Tanaka, H., Unuma, T., Ohta, H., Gen, K., & Okuzawa, K., 2003. Role of prostaglandin in the control of ovulation in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries science*, 69(2), 234-241. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00613.x>
- Kaiser, H. F., 1961. A Note on Guttman's Lower Bound for the Number of Common Factors. *British Journal of Statistical Psychology* 14: 1–2.
- Kane, D. A., Hammerschmidt, M., Mullins, M. C., Maischein, H. M., Brand, M., van Eeden, F. J., Nusslein-Volhard, C., 1996. The zebrafish epiboly mutants. *Development*, 123(1), 47-55. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.47>
- Kanis, E., Refstie, T., Gjerdem, T., 1976. A genetic analysis of egg, alevin and fry mortality in salmon (*Salmo salar*), sea trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 8, 259-268. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(76\)90088-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(76)90088-0)
- Karnaky, K.J. Jr, 1998. Osmotic and ionic regulation. David, H.E. (Ed.), *The Physiology of Fish*, 2nd edition CRC Press, Boca Raton, NY, USA, pp. 159–176.
- Kato, T., 1975. The relation between the growth and reproductive characters of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bull. Fresh. Fish. Res. Lab.*, 25, 83-115.
- Kato, T., 1978. Relation of growth to maturity of age and egg characteristics in kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Bull. Fresh. Fish. Res. Lab.*, 28, 61-75.
- Ketola, H. G., 1985. Mineral supplementation of Atlantic salmon broodstock diets.
- King, H. R., & Pankhurst, N. W., 2000. Ovulation of Tasmanian Atlantic salmon maintained at elevated temperatures: implications of climate change for sustainable industry development. In *International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*.

- Kinne, O., & Kinne, E. M., 1962. Rates of development in embryos of a cyprinodont fish exposed to different temperature–salinity–oxygen combinations. *Canadian journal of zoology*, 40(2), 231-253. <https://doi.org/10.1139/z62-025>
- Kirschbaum, F., & Schugardt, C., 1995. Vergleichende Daten zur Fortpflanzungsbiologie von zwei Nilhecht-Arten (Mormyridae). *Fortpflanzungsbiologie der Aquarienfische*, 81-100.
- Klangnarak, W., & Tokumoto, T., 2017. Fine selection of up-regulated genes during ovulation by in vivo induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish. *Zoological letters*, 3(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40851-017-0065-8>
- Klarica, S., 1997. Etude pluridisciplinaire de deux aquifères du piémont pyrénéen (Béarn). Thèse de Doctorat ès Géophysique, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 263 p. <https://www.theses.fr/1997PAUU3027>
- Knoll-Gellida, A., André, M., Gattegno, T., Forgue, J., Admon, A., & Babin, P. J., 2006. Molecular phenotype of zebrafish ovarian follicle by serial analysis of gene expression and proteomic profiling, and comparison with the transcriptomes of other animals. *BMC genomics*. 7(1), 1-28. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-46>
- Knox, D., Bromage, N. R., Cowey, C. B., & Springate, J. R. C., 1988. The effect of broodstock ration size on the composition of rainbow trout eggs (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 69(1-2), 93-104. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90189-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90189-5)
- Knox, D., Cowey, C. B., & Adron, J. W., 1981. The effect of low dietary manganese intake on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 46(3), 495-501. [10.1079/bjn19810058](https://doi.org/10.1079/bjn19810058)
- Kopp, R., Lang, Š., Brabec, T., Mareš, J., 2014. The influence of physicochemical properties of water on plasma indices in brook trout (*Salvelinus fontinalis*, Mitchill) reared under conditions of intensive aquaculture. *Acta Veterinaria Brno*, 82(4), 427-433. <https://doi.org/10.2754/avb201382040427>
- Kozak, M., 1988. Leader length and secondary structure modulate mRNA function under conditions of stress. *Molecular and cellular biology* (Print), 8(7), 2737-2744. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.7.2737-2744.1988>
- Krysko, D.V., Diez-Fraile, A., Criel, G., Svistunov, A.A., Vandenabeele, P., D'Herde, K., 2008. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis* 13, 1065–1087. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0238-1>
- Kudo, S., & Yazawa, S., 1997. Binding of antibiotics to glycoproteins of the vitelline and fertilization envelopes of cherry salmon eggs. *The Histochemical Journal*, 29(8), 607-616. <https://doi.org/10.1023/A:1026436311921>
- LaFleur, G.J., Thomas, P., 1991. Evidence for a role of Na⁺,K⁺-ATPase in the hydration of Atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation. *J. Exp. Zool.* 258, 126–136. <https://doi.org/10.1002/jez.1402580114>
- Lahnsteiner, F., & Patzner, R. A., 2002. Rainbow trout egg quality determination by the relative weight increase during hardening: a practical standardization. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(1), 24-26. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00289.x>
- Lahnsteiner, F., 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. *Fish physiology and biochemistry*. 23(2), 107-118. <https://doi.org/10.1023/A:1007839023540>
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., & Weismann, T., 2005. Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta* f. *fario*. *Aquatic Toxicology*, 75(3), 213-224. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.004>
- Laidley, C. W., & Leatherland, J. F., 1988. Cohort sampling, anaesthesia and stocking-density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 33(1), 73-88. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05449.x>
- Lall, S. P., & Milley, J., 2008. Trace mineral requirements of fish and crustaceans. *Trace elements in animal production systems*, 203.
- Lall, S. P., 2003. The minerals. *Fish Nutrition*, 2nd edn. JEH Halver, Ronald W. <https://doi.org/10.1016/b978-012319652-1/50006-9>
- Lall, S. P., 2003. The minerals. *Fish Nutrition*, 2nd edn. JEH Halver, Ronald W. <https://doi.org/10.1016/b978-012319652-1/50006-9>
- Lam, T.J., 1983. Environmental influences on gonadal activity in fish. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds). *Fish Physiology*, Vol IX B. Academic Press, New York, USA, Pp 65-116. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60302-7](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60302-7)

- Larsson, D. J., Mylonas, C. C., Zohar, Y., & Crim, L. W., 1997. Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-A) induces multiple ovulations of high-quality eggs in a cold-water, batch-spawning teleost, the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(9), 1957-1964. <https://doi.org/10.1139/f97-102>
- Laudet, V., & Gronemeyer, H., 2002. The nuclear receptor factsbook (No. 964). Gulf Professional Publishing.
- Le Menn, F., Cerdà, J., & Babin, P. J., 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In *The Fish Oocyte* (pp. 1-37). Springer, Dordrecht. 229431460
- Leatherland, J. F., & Cho, C. Y., 1985. Effect of rearing density on thyroid and interrenal gland activity and plasma and hepatic metabolite levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 27(5), 583-592. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1985.tb03203.x>
- Leitritz, E., 1970. A history of California's fish hatcheries, 1870-1960 (Vol. 150). Department of Fish and Game. <https://www.noaa.gov/sites/default/files/legacy/document/2020/Oct/07354626232.pdf>
- Li, X., & O'Malley, B. W., 2003. Unfolding the action of progesterone receptors. *Journal of biological chemistry*, 278(41), 39261-39264. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300024200>
- Linares-Casenave, J., Van Eenennaam, J., Doroshov, S., 2002. Ultrastructural and histological observations on temperature-induced follicular ovarian atresia in the white sturgeon. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(4-6), 382-390. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00369.x>
- Linhart, O., Kudo, S., Billard, R., Slechta, V., & Mikodina, E. V., 1995. Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review. *Aquaculture*, 129(1-4), 75-93. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00230-L](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00230-L)
- Lister, A. L., & Van Der Kraak, G., 2008. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. *General and comparative endocrinology*, 159(1), 46-57. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.07.017>
- Liu, D. T., Carter, N. J., Wu, X. J., Hong, W. S., Chen, S. X., Zhu, Y., 2018. Progesterone and nuclear progesterone receptor are essential for upregulation of metalloproteinase in zebrafish preovulatory follicles. *Frontiers in endocrinology*, 9, 517. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00517>
- Liu, D., Brewer, S., Chen, S., Hong, W., Zhu, Y., 2017. Transcriptomic signatures for ovulation in vertebrates. *General and comparative endocrinology*, 247, 74-86. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.01.019>
- Liu, H., Wang, J., Zhang, L., Zhang, Y., Wu, L., Wang, L., Li, X., 2021. Transcriptome analysis of common carp (*Cyprinus carpio*) provides insights into the ovarian maturation related genes and pathways in response to LHRH-A and dopamine inhibitors induction. *General and Comparative Endocrinology*, 301, 113668. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113668>
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 367-389. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022>
- Luquet, P., & Watanabe, T., 1986. Interaction "nutrition-reproduction" in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2(1), 121-129. <https://doi.org/10.1007/BF02264080>
- Ma, H., Martin, K., Dixon, D. II., Hernandez, A. G., Weber, G. M., 2019. Transcriptome analysis of egg viability in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *BMC Genomics*. Apr 27;20(1):319. [10.1186/s12864-019-5690-5](https://doi.org/10.1186/s12864-019-5690-5).
- Ma, H., Weber, G. M., Hostuttler, M. A., Wei, H., Wang, L., Yao, J., 2015. MicroRNA expression profiles from eggs of different qualities associated with post-ovulatory ageing in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics*. Mar 17;16(1):201. doi: [10.1186/s12864-015-1400-0](https://doi.org/10.1186/s12864-015-1400-0).
- MacCrimmon, H. R., 1972. World distribution of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): further observations. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 29(12), 1788-1791. <https://doi.org/10.1139/f72-287>
- Maillet, E., 1906. La vidange des systèmes de réservoirs. *Annales Ponts et Chaussées, Mémoires et Documents*, 21.
- Maisse, G., Billard, R., Cosson, J., Labbé, C., Loir, M., Le Gac, F., & Fierville, F., 1998. Influence du maintien en mer des mâles de saumon atlantique (*Salmo salar*), pendant la période de reproduction, sur la qualité du sperme. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*. (350-351), 349-357. <https://doi.org/10.1051/kmae:1998010>
- Malhotra, J. D., Kazen-Gillespie, K., Hortsch, M., & Isom, L. L., 2000. Sodium channel β subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11383-11388. [10.1074/jbc.275.15.11383](https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11383)

- Malhotra, J. D., Koopmann, M. C., Kazen-Gillespie, K. A., Fettman, N., Hortsch, M., & Isom, L. L., 2002. Structural requirements for interaction of sodium channel $\beta 1$ subunits with ankyrin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26681-26688. 10.1074/jbc.M202354200.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., McNiven, M. A., Richardson, G. F., 2008. Morphological characterization of Arctic char, *Salvelinus alpinus*, eggs subjected to rapid post-ovulatory aging at 7 °C. *Aquaculture*, 279(1-4), 204-208. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.014>
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., Patzner, R. A., 2007. Distribution of lipid droplets is an indicator for egg quality in brown trout, *Salmo trutta fario*. *Aquaculture*, 273(4), 744-747. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.027>
- Marandel, L., Labbe, C., Bobe, J., & Le Bail, P. Y., 2012. nanog 5'-upstream sequence, DNA methylation, and expression in gametes and early embryo reveal striking differences between teleosts and mammals. *Gene*, 492(1), 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.037>
- Marcogliese, D. J., & Pietrock, M., 2011. Combined effects of parasites and contaminants on animal health: parasites do matter. *Trends in parasitology*, 27(3), 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.11.002>
- Marcogliese, D., Brambilla, L., Gagné, F., Gendron, A. D., 2005. Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. *Diseases of aquatic organisms*, 63(1), 77-84. 10.3354/dao063077
- Marshall, W.S., Habibi, H.R., Lessman, C.A., 1985. Electrophysiology of oocytes during meiotic maturation and after ovulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Zool.* 63, 1904-1908. <https://doi.org/10.1139/z85-283>
- Martin-Robichaud, D. J., & Berlinsky, D. L., 2004. The effects of photothermal manipulation on reproductive development in female haddock *Melanogrammus aeglefinus* L. *Aquaculture Research*, 35(5), 465-472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01040.x>
- Matsui, M., Hose, J. E., Garrahan, P., & Jordan, G. A., 1992. Developmental defects in fish embryos from Salton Sea, California. *Bulletin of Environmental Contamination and toxicology*, 48(6), 914-920. 10.1007/BF00201154
- Mauck, W.L., Hehrule, P.M. and Mayer, F.L., 1978. Effects of the polychlorinated biphenyl ArochlorTM 1254 on growth, survival and bone development in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Res. Board Can.* 35, 1084±1088.
- Mazeaud, M. M., Mazeaud, F., & Donaldson, E. M., 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106(3), 201-212. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1977\)106<201:PASEOS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1977)106<201:PASEOS>2.0.CO;2)
- McCord, L. A., Li, F., Rosewell, K. L., Brännström, M., & Curry, T. E., 2012. Ovarian expression and regulation of the stromelysins during the periovulatory period in the human and the rat. *Biology of reproduction*, 86(3), 78-1. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095588>
- McCormick, J. A., & Ellison, D. H., 2011. The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiological reviews*, 91(1), 177-219. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2010>
- Meadows, L. S., & Isom, L. L., 2005. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovascular research*, 67(3), 448-458. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.04.003>
- Migaud, H., Bell, G., Cabrita, E., Mcandrew, B., Davie, A., Bobe, J., Herráez, M.P., Carrillo, M., 2013. Gamete quality and broodstock management in temperate fish. *Rev. Aquac.* 5. <https://doi.org/10.1111/raq.12025>
- Migaud, H., Fontaine, P., Sulistyo, I., Kestemont, P., & 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(3-4), 253-267. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00675-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00675-5)
- Migaud, H., Gardeur, J. N., Kestemont, P., & Fontaine, P., 2004. Off-season spawning of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture International*, 12(1), 87-102. <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000017190.15074.6c>
- Migone, F. F., Cowan, R. G., Williams, R. M., Gorse, K. J., Zipfel, W. R., & Quirk, S. M., 2016. In vivo imaging reveals an essential role of vasoconstriction in rupture of the ovarian follicle at ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), 2294-2299. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512304113>
- Milla, S., Depiereux, S., & Kestemont, P., 2011. The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review. *Ecotoxicology*, 20(2), 305-319. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0588-7>

- Milla, S., Jalabert, B., Rime, H., Prunet, P., Bobe, J., 2006. Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and in vitro regulation by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol. *J. Exp. Biol.* 209, 1147–1156. <https://doi.org/10.1242/jeb.02094>
- Milla, S., Wang, N., Mandiki, S.N., Kestemont, P., 2009. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2009 Jul;153(3):242-51. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.02.027
- Miller, M. A., 1993. Maternal transfer of organochlorine compounds in salmonines to their eggs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(7), 1405-1413. <https://doi.org/10.1139/f93-161>
- Miramand, P., Lafaurie, M., Fowler, S. W., Lemaire, P., Guary, J. C., Bentley, D., 1991. Reproductive cycle and heavy metals in the organs of red mullet, *Mullus barbatus* (L.), from the northwestern Mediterranean. *Science of the total environment*, 103(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(91\)90352-F](https://doi.org/10.1016/0048-9697(91)90352-F)
- Miranda, A. C. L., Bazzoli, N., Rizzo, E., & Sato, Y., 1999. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue and Cell*, 31(5), 480-488. <https://doi.org/10.1054/tice.1999.0045>
- Monteverdi, G. H., & Di Giulio, R. T., 2000. Vitellogenin association and oocytic accumulation of thyroxine and 3, 5, 3'-triiodothyronine in gravid *Fundulus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology*, 120(2), 198-211. <https://doi.org/10.1006/gcen.2000.7551>
- Moriya, S., Tan, V., Yee, A., & Parhar, I., 2019. pink1, atp13a2 and uchl1 expressions are affected by inflammation in the brain. *Neuroscience letters*, 708, 134330. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134330>
- Morro, B., Doherty, M.K., Balseiro, P., Handeland, S.O., Albalat, A., 2020. Plasma proteome profiling of freshwater and seawater life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One.* 2020 Jan 3;15(1):e0227003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227003>
- Murray, W., & Andrews, W., 1979. Channel catfish: the absence of an effect of dietary salt on growth. *The Progressive Fish-Culturist*, 41(3), 155-156. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1979\)41\[155:CC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1979)41[155:CC]2.0.CO;2)
- Mylonas, C. C., Fostier, A., & Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 516-534. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.007>
- Mylonas, C. C., Hinshaw, J. M., & Sullivan, C. V., 1992. GnRH α -induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture*, 106(3-4), 379-392. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90268-P](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90268-P)
- Mylonas, C. C., Magnus, Y., Klebanov, Y., Gissis, A., & Zohar, Y., 1997b. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. *Journal of Fish Biology*, 51(2), 234-250. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb01662.x>
- Mylonas, C., Woods, L., Zohar, Y., 1997a. Cyto-histological examination post-vitellogenesis and final oocyte aduration in captive-reared striped bass. *J Fish Biol* 50, 34-49. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb01338.x>
- Nagahama, Y., & Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, growth & differentiation*, 50, S195-S219. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x>
- Nagler, J. J., Parsons, J. E., & Cloud, J. G., 2000. Single pair mating indicates maternal effects on embryo survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 184(1-2), 177-183. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00309-9)
- Nakada, T., Zandi-Nejad, K., Kurita, Y., Kudo, H., Broumand, V., Kwon, C.Y., Mercado, A., Mount, B., Hirose, S., 2005. Roles of Slc13a1 and Slc26a1 sulfate transporters of eel kidney in sulfate homeostasis and osmoregulation in freshwater. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Aug;289(2):R575-R585. doi: 10.1152/ajpregu.00725.2004
- Nakamura, I., Evans, J. C., Kusakabe, M., Nagahama, Y., & Young, G., 2005. Changes in steroidogenic enzyme and steroidogenic acute regulatory protein messenger RNAs in ovarian follicles during ovarian development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 144(3), 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.06.004>
- Nakari, T., Soivio, A., & Pesonen, S., 1987. Effects of an advanced photoperiod cycle on the gonadal development and spawning time of 2-year-old *Salmo gairdneri* R. reared in earth ponds under extreme annual water temperatures. *Aquaculture*, 67(3-4), 369-384. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90220-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90220-1)
- Nakari, T., Soivio, A., & Pesonen, S., 1988. The ovarian development and spawning time of *Salmo gairdneri* R. reared in advanced and delayed annual photoperiod cycles at naturally fluctuating water temperature in Finland. In *Annales Zoologici*

Fennici (pp. 335-340). Finnish Academy of Sciences, Societas Scientiarum Fennica, Societas pro Fauna et Flora Fennica and Societas Biologica Fennica Vanamo. www.jstor.org/stable/23734641

Navarro, M., & Wood, R. J., 2003. Plasma changes in micronutrients following a multivitamin and mineral supplement in healthy adults. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(2), 124-132. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719285>

Nevoux, M., Marchand, F., Forget, G., Huteau, D., Tremblay, J., & Destouches, J. P., 2019. Field assessment of precocious maturation in salmon parr using ultrasound imaging. *Peer Community in Ecology*, 1101/425561.

Nomura, M., Sakai, K., Takashima, F., 1974. The over-ripening phenomenon of rainbow trout, 1: Temporal morphological changes of eggs retained in the body cavity after ovulation. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*.

Norman, J.D., Ferguson, M.M., Danzmann, R.G., 2014. Transcriptomics of salinity tolerance capacity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a comparison of gene expression profiles between divergent QTL genotypes. *Physiol Genomics*. 2014 Feb 15;46(4):123-37. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00105.2013>

Novelo, N. D., & Tiersch, T. R., 2012. A review of the use of ultrasonography in fish reproduction. *North American Journal of Aquaculture*, 74(2), 169-181. <https://doi.org/10.1080/15222055.2012.672370>

Ogino, C., & Kamizono, M., 1975. Effects of dietary salt-mixture levels on growth, mortality and body composition in rainbow trout and carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. doi:10.2331/suisan.41.429

Ogino, C., 1980. Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*.

Ogiwara, K., & Takahashi, T., 2017. Involvement of the nuclear progesterin receptor in LH-induced expression of membrane type 2-matrix metalloproteinase required for follicle rupture during ovulation in the medaka, *Oryzias latipes*. *Molecular and cellular endocrinology*, 450, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.016>

Ogiwara, K., Hagiwara, A., Rajapakse, S., & Takahashi, T., 2015. The role of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in follicle rupture during ovulation in the teleost medaka. *Biology of reproduction*, 92(1), 10-1. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121442>

Ogiwara, K., Matsui, H., Kimura, A., & Takahashi, T., 2002. Molecular cloning and partial characterization of medaka fish stromelysin-3 and its restricted expression in the oocytes of small growing follicles of the ovary. *Molecular reproduction and development*, 61(1), 21-31. <https://doi.org/10.1002/mrd.1127>

Ogiwara, K., Minagawa, K., Takano, N., Kageyama, T., & Takahashi, T., 2012. Apparent involvement of plasmin in early-stage follicle rupture during ovulation in medaka. *Biology of reproduction*, 86(4), 113-1. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.093880>

Ogiwara, K., Takano, N., Shinohara, M., Murakami, M., & Takahashi, T., 2005. Gelatinase A and membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 are responsible for follicle rupture during ovulation in the medaka. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8442-8447. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502423102>

Oh, N. H., & Richter Jr, D.D., 2004. Soil acidification induced by elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology*, 10(11), 1936-1946. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00864.x>

Ohnishi, J., Ohnishi, E., Shibuya, H., & Takahashi, T., 2005. Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1751(1), 95-109. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.05.002>

Ojo, A. A., Nadella, S. R., & Wood, C. M., 2009. In vitro examination of interactions between copper and zinc uptake via the gastrointestinal tract of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 56(2), 244-252. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9190-x>

Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of fish diseases*, 35(2), 83-108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>

Palace, V. P., & Werner, J., 2006. Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review. *Scientia Marina*, 70(S2), 41-57. <https://doi.org/10.3989/scimar.2006.70s241>

- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., & Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.). *Science of the total environment*, 309(1-3), 105-115. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00006-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00006-8)
- Pang, Y., & Ge, W., 1999. Activin stimulation of zebrafish oocyte maturation in vitro and its potential role in mediating gonadotropin-induced oocyte maturation. *Biology of reproduction*, 61(4), 987-992. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.4.987>
- Pang, Y., & Ge, W., 2002. Epidermal growth factor and TGF α promote zebrafish oocyte maturation in vitro: potential role of the ovarian activin regulatory system. *Endocrinology*, 143(1), 47-54. <https://doi.org/10.1210/endo.143.1.8579>
- Pankhurst, N. W., & Thomas, P. M., 1998. Maintenance at elevated temperature delays the steroidogenic and ovulatory responsiveness of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to luteinizing hormone releasing hormone analogue. *Aquaculture*, 166(1-2), 163-177. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00284-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00284-1)
- Pankhurst, N. W., 1985. Final maturation and ovulation of oocytes of the goldeye, *Hiodon alosoides* (Rafinesque), in vitro. *Canadian Journal of Zoology*, 63(5), 1003-1009. <https://doi.org/10.1139/z85-149>
- Pankhurst, N.W., Purser, G.J., Van Der Kraak, G., Thomas, P.M., Forteath, G.N.R., 1996. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 146, 277-290. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01374-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01374-9)
- Patiño, R., Sullivan, C. V., 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 26(1), 57-70. <https://doi.org/10.1023/A:1023311613987>
- Patiño, R., Thomas, P., & Yoshizaki, G., 2003. Ovarian follicle maturation and ovulation: an integrated perspective. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1), 305-308. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030565.74702.0a>
- Paul, K., D'Ambrosio, J., & Phocas, F., 2021. Temporal and region-specific variations in genome-wide inbreeding effects on female size and reproduction traits of rainbow trout. *Evolutionary Applications*. <https://doi.org/10.1111/eva.13308>
- Peres-Neto, P.R., Jackson, D.A., Somers, K.M., 2005. How Many Principal Components? Stopping Rules for Determining the Number of Non-Trivial Axes Revisited. *British Journal of Statistical Psychology* 49: 974-97. <https://doi.org/10.1016/j.csa.2004.06.015>
- Perry, S. F., Rivero-Lopez, L., McNeill, B., & Wilson, J., 2006. Fooling a freshwater fish: how dietary salt transforms the rainbow trout gill into a seawater gill phenotype. *Journal of Experimental Biology*, 209(23), 4591-4596. <https://doi.org/10.1242/jeb.02558>
- Peterson, R. H., Coombs, K., Power, J., & Paim, U., 1989. Responses of several fish species to pH gradients. *Canadian journal of zoology*, 67(6), 1566-1572. <https://doi.org/10.1139/z89-222>
- Petronini, P.G., Tramacere, M., Mazzini, A., Piedimonte, G., Silvotti, L., & Borghetti, A.F., 1987. Hyperosmolarity-induced stress proteins in chick embryo fibroblasts. *Experimental cell research*, 172(2), 450-462. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(87\)90403-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(87)90403-4)
- Phillips, A. M., Lovelace, F. E., Podoliak, H. A., Brockway, D. R., & Baizer, G. C., 1956. The absorption of minerals from water and food by brook trout. *Fish. Res. Bull. NY*, 19, 6-37.
- Pickering, A., 1981. Introduction: the concept of biological stress. *Stress and fish*.
- Pickova, J., Kiessling, A., Pettersson, A., & Dutta, P. C., 1999. Fatty acid and carotenoid composition of eggs from two nonanadromous Atlantic salmon stocks of cultured and wild origin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21(2), 147-156. <https://doi.org/10.1023/A:1007860908911>
- Plagnes, V., 1997. Structure et fonctionnement des aquifères karstiques. Caractérisation par la géochimie des eaux. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 372 p. <https://www.theses.fr/1997MON20193>
- Poppe, T., Rimstad, E., & Hyllseth, B., 1989. Pancreas disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolts infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 9(4), 83-85.
- Poston, H. A., Combs Jr, G. F., & Leibovitz, L., 1976. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical deficiency signs. *The Journal of nutrition*, 106(7), 892-904. <https://doi.org/10.1093/jn/106.7.892>

- Prabhu, P. A. J., Schrama, J. W., Mariojous, C., Godin, S., Fontagne-Dicharry, S., Geurden, I., Kaushik, S. J., 2014. Post-prandial changes in plasma mineral levels in rainbow trout fed a complete plant ingredient based diet and the effect of supplemental di-calcium phosphate. *Aquaculture*, 430, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.038>
- Prabhu, P., Schrama, J. W., & Kaushik, S. J., 2016. Mineral requirements of fish: a systematic review. *Reviews in Aquaculture*, 8(2), 172-219. <https://doi.org/10.1111/raq.12090>
- PSNPDA, 2015. Plan stratégique National : Développement des aquacultures durables 2020. Ministère de l'écologie du développement durable et de l'énergie. https://www.europe-en-france.gouv.fr/sites/default/files/psnpda_redaction_vf_actu_dec_20152_0.pdf
- Pujante, I. M., Moyano, F. J., Martos-Sitcha, J. A., Mancera, J. M., & Martínez-Rodríguez, G., 2018. Effect of different salinities on gene expression and activity of digestive enzymes in the thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*). *Fish physiology and biochemistry*, 44(1), 349-373. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0440-6>
- Racine, J. S., 2012. RStudio: a platform-independent IDE for R and Sweave. 10.1002/jae.1278
- Randall, C. F., & Bromage, N. R., 1998. Photoperiodic history determines the reproductive response of rainbow trout to changes in daylength. *Journal of Comparative Physiology A*, 183(5), 651-660. 10.1007/s003590050288
- Reading, B. J., Andersen, L. K., Ryu, Y. W., Mushirobira, Y., Todo, T., & Hiramatsu, N., 2018. Oogenesis and egg quality in finfish: yolk formation and other factors influencing female fertility. *Fishes*, 3(4), 45. <https://doi.org/10.3390/fishes3040045>
- Reading, B. J., Chapman, R. W., Schaff, J. E., Scholl, E. H., Opperman, C. H., & Sullivan, C. V., 2012. An ovary transcriptome for all maturational stages of the striped bass (*Morone saxatilis*), a highly advanced perciform fish. *BMC research notes*, 5(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-111>
- Reiss, K., Saftig, P., 2009. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol*. 2009 Apr;20(2):126-37. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.11.002.
- Rey, F., 2007. Ressources en eau souterraine dans les chaînons béarnais (Pyrénées-Atlantiques, France): géométrie et fonctionnement hydrogéologique de quatre aquifères carbonatés (Doctoral dissertation, Bordeaux 1). <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00258960/>
- Richards, J.A.S., Russell, D.L., Ochsner, S., Espey, L.L., 2002. Ovulation: New dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 69-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.131029>
- Richardson, N. L., Higgs, D. A., Beames, R. M., McBride, J. R., 1985. Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth and histopathology in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *The Journal of nutrition*, 115(5), 553-567. <https://doi.org/10.1093/jn/115.5.553>
- Richter, D. D., & Markewitz, D., 1995. How deep is soil?. *BioScience*, 45(9), 600-609. <https://doi.org/10.2307/1312764>
- Rizzo, E., & Bazzoli, N., 1995. Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes). *Rev. Brasil. Biol*, 55(4), 697-703. <http://www.sfrancisco.bio.br/arquivos/Rizzo%20E001.pdf>
- Robker, R. L., Akison, L. K., & Russell, D. L., 2009. Control of oocyte release by progesterone receptor-regulated gene expression. *Nuclear receptor signaling*, 7(1), nrs-07012. <https://doi.org/10.1621/nrs.07012>
- Rojek, A., Praetorius, J., Frøkiaer, J., Nielsen, S., & Fenton, R. A., 2008. A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu. Rev. Physiol.*, 70, 301-327. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100452>
- Rothberger, H., McGee, M. P., 1984. Generation of coagulation factor V activity by cultured rabbit alveolar macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 160(6), 1880-1890. <https://doi.org/10.1084/jem.160.6.1880>
- Rusydi, A. F., 2018. Correlation between conductivity and total dissolved solid in various type of water: A review. In IOP conference series: earth and environmental science (Vol. 118, No. 1, p. 012019). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/118/1/012019>
- Saborio, J. L., Pong, S. S., & Koch, G., 1974. Selective and reversible inhibition of initiation of protein synthesis in mammalian cells. *Journal of molecular biology*, 85(2), 195-211. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90360-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90360-X)
- Saidapur, S. K., 1978. Follicular atresia in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *International review of cytology*, 54, 225-244. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60169-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60169-2)

- Sakai, K., Nomura, M., Takasima, F., & Oto, H., 1975. The over-ripening phenomenon of rainbow trout, 2: Changes in the percentage of eyed eggs, hatching rate and incidence of abnormal alevins during the process of over-ripening. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*.
- Sakamoto, S., & Yone, Y., 1978. Requirement of red sea bream for dietary iron-II. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 44(3), 223-225. <https://doi.org/10.2331/suisan.44.223>
- Salman, N. A., & Eddy, F. B., 1987. Response of chloride cell numbers and gill Na⁺ K⁺ ATPase activity of freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to salt feeding. *Aquaculture*, 61(1), 41-48. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90336-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90336-X)
- Salman, N. A., & Eddy, F. B., 1988. Effect of dietary sodium chloride on growth, food intake and conversion efficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*, 70(1-2), 131-144. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90012-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90012-9)
- Samarin, A.M., Ahmadi, M.R., Azuma, T., Rafiee, G.R., Amiri, B.M., Naghavi, M.R., 2008. Influence of the time to egg stripping on eyeing and hatching rates in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under cold temperatures. *Aquaculture*. 278, 195–198. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.034>
- Samarin, A.M., Policar, T., Lahnsteiner, F., 2015. Fish oocyte ageing and its effect on egg quality. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 23, 302–314. <https://doi.org/10.1080/23308249.2015.1053560>
- Sampath-Kumar, R., Munro, A. D., Lee, J., & Lam, T. J., 1993. Exogenous cortisol promotes survival of Asian seabass (*Lates calcarifer*) hatchlings exposed to hypersalinity but not hyposalinity shock. *Aquaculture*, 116(2-3), 247-255. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90012-N](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90012-N)
- Sano, T., 1995. Viruses and viral diseases of salmonids. *Aquaculture*, 132(1-2), 43-52. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00372-U](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00372-U)
- Sargent, J. R., Tocher, D. R., & Bell, J. G., 2002. The lipids. In: Halver, JE, Hardy, RW (Eds.), *Fish Nutrition*.
- Satoh, S., Takeuchi, T., & Watanabe, T., 1987. Effect of deletion of several trace elements from a mineral mixture in fish meal diets on mineral composition of gonads in rainbow trout and carp. *Cellulose*, 3(3). <https://doi.org/10.2331/suisan.53.281>
- Satoh, S., Yamamoto, H., Takeuchi, T., & Watanabe, T., 1983. Effects on growth and mineral composition of rainbow trout [*Salmo gairdnerii*] of deletion of trace elements [zinc, manganese, copper, cobalt] or magnesium from fish meal diet. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Schmidtke, L. M., Carson, J., 1994. Characteristics of *Vagococcus salmoninarum* isolated from diseased salmonid fish. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(2), 229-236. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03068.x>
- Schreck, C. B., 2010. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 549-556. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.004>
- Schreck, C. B., Contreras-Sanchez, W., Fitzpatrick, M. S., 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. In *Reproductive biotechnology in Finfish aquaculture* (pp. 3-24). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-50913-0.50005-9>
- Schreck, C. B., Patino, R., Pring, C. K., Winton, J. R., & Holway, J. E., 1985. Effects of rearing density on indices of smoltification and performance of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, 45(1-4), 345-358. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90280-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90280-7)
- Schugardt, C., & Kirschbaum, F., 1998. Sozial-und Fortpflanzungsverhalten von Mormyriden (Nilhechten). *Verhalten der Aquarienfische*. Bornheim, Germany: Brigit Schmettkamp. p, 87-98.
- Schugardt, C., & Kirschbaum, F., 2004. Control of gonadal maturation and regression by experimental variation of environmental factors in the mormyrid fish, *Mormyrus rume probosciostris*. *Environmental biology of fishes*, 70(3), 227-233. <https://doi.org/10.1023/B:EBFI.0000033340.49266.f3>
- Schwarz, F. J., 1995. Determination of mineral requirements of fish. *Journal of Applied Ichthyology*, 11(3-4), 164-174. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1995.tb00016.x>
- Segner, H., & Storch, V., 1985. Influence of water-borne iron on the liver of *Poecilia reticulata* (Peters 1859). *Journal of Applied Ichthyology*, 1(1), 39-47. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1985.tb00410.x>

- Selman, K., Wallace, R. A., & Cerdà, J., 2001. Bafilomycin A1 inhibits proteolytic cleavage and hydration but not yolk crystal disassembly or meiosis during maturation of sea bass oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 290(3), 265-278. <https://doi.org/10.1002/jez.1057>
- Selman, K., Wallace, R. A., Sarka, A., & Qi, X., 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of morphology*, 218(2), 203-224. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052180209>
- Senthilkumaran, B., 2011. Recent advances in meiotic maturation and ovulation: comparing mammals and pisces. *Front Biosci*, 16, 1898-1914. [10.2741/3829](https://doi.org/10.2741/3829)
- Senthilkumaran, B., Sudhakumari, C. C., Chang, X. T., Kobayashi, T., Oba, Y., Guan, G., & Nagahama, Y., 2002. Ovarian carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase shows distinct surge in messenger RNA expression during natural and gonadotropin-induced meiotic maturation in Nile tilapia. *Biology of reproduction*, 67(4), 1080-1086. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1080>
- Senthilkumaran, B., Yoshikuni, M., & Nagahama, Y., 2004. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Molecular and cellular endocrinology*, 215(1-2), 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.012>
- Shackley, S. E., King, P. E., & Gordon, S. M., 1981. Vitellogenesis and trace metals in a marine teleost. *Journal of Fish Biology*, 18(3), 349-352. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1981.tb03776.x>
- Shearer, K. D., 1984. Changes in elemental composition of hatchery-reared rainbow trout, *Salmo gairdneri*, associated with growth and reproduction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41(11), 1592-1600. <https://doi.org/10.1139/f84-197>
- Shearer, K. D., 1988. Dietary potassium requirement of juvenile chinook salmon. *Aquaculture*, 73(1-4), 119-129. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90047-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90047-6)
- Shearer, K. D., 1995. The use of factorial modeling to determine the dietary requirements for essential elements in fishes. *Aquaculture*, 133(1), 57-72. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00405-D](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00405-D)
- Shewmon, L. N., Godwin, J. R., Murashige, R. S., Daniels, H. V., & Losordo, T. M., 2007. Environmental manipulation of growth and sexual maturation in yellow perch, *Perca flavescens*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(3), 383-394. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00110.x>
- Shirafuta, Y., Tamura, I., Ohkawa, Y., Maekawa, R., Doi-Tanaka, Y., Takagi, H., Mihara, Y., Shinagawa, M., Sugino, N., 2021. Integrated Analysis of Transcriptome and Histone Modifications in Granulosa Cells During Ovulation in Female Mice. *Endocrinology*. 2021 Sep 1;162(9):bqab128. doi: 10.1210/endocr/bqab128
- Simmons, D. L., Botting, R. M., & Hla, T., 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews*, 56(3), 387-437. <https://doi.org/10.1124/pr.56.3.3>
- Singh, V., & Joy, K. P., 2010. An involvement of vasotocin in oocyte hydration in the catfish *Heteropneustes fossilis*: a comparison with effects of isotocin and hCG. *General and comparative endocrinology*, 166(3), 504-512. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.02.020>
- Siosemarde, M., Kave, F., Pazira, E., Sedghi, H., & Ghaderi, S. J., 2010. Determine of constant coefficients to relate total dissolved solids to electrical conductivity. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 46, 258-260. doi.org/10.5281/zenodo.1331859
- Smail, D., Bruno, D., Dear, G., McFarlane, L., Ross, K., 1992. Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus Sp serotype in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts associated with mortality and clinical disease. *Journal of Fish Diseases*, 15(1), 77-83. [10.1111/j.1365-2761.1992.tb00639.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1992.tb00639.x)
- Small, B. C., Davis, K. B., & Peterson, B. C., 2008. Elucidating the effects of cortisol and stress on economically important traits in channel catfish. *North American Journal of Aquaculture*, 70(2), 223-235. <https://doi.org/10.1577/A07-031.1>
- Smith, E., Dwyer, P., & Piper, G., 1983. Effect of water temperature on egg quality of cutthroat trout. *The Progressive Fish-Culturist*, 45(3), 176-178. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1983\)45\[176:EOWTOE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1983)45[176:EOWTOE]2.0.CO;2)
- Smith, R. M., & Cole, C. F., 1973. Effects of egg concentrations of DDT and dieldrin on development in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 30(12), 1894-1898. <https://doi.org/10.1139/f73-306>

- Springate, J. R. C., & Bromage, N. R., 1985. Effects of egg size on early growth and survival in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*, 47(2-3), 163-172. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90062-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90062-6)
- Springate, J.R.C., Bromage, N.R., Elliott, J.A.K., Hudson, D.L., 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* 43, 313–322. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90032-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90032-2)
- Spry, D. J., Hodson, P. V., & Wood, C. M., 1988. Relative contributions of dietary and waterborne zinc in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45(1), 32-41. <https://doi.org/10.1139/f88-005>
- Sriraman, V., Eichenlaub-Ritter, U., Bartsch, J. W., Rittger, A., Mulders, S. M., & Richards, J. S., 2008. Regulated expression of ADAM8 (a disintegrin and metalloprotease domain 8) in the mouse ovary: evidence for a regulatory role of luteinizing hormone, progesterone receptor, and epidermal growth factor-like growth factors. *Biology of reproduction*, 78(6), 1038-1048. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066340>
- Stacey, N. E., & Pandey, S., 1975. Effects of indomethacin and prostaglandins on ovulation of goldfish. *Prostaglandins*, 9(4), 597-607. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(75\)90065-9](https://doi.org/10.1016/0090-6980(75)90065-9)
- Stoddard, J.W., Parsons, J.E., Nagler, J.J., 2005. Early onset of embryonic mortality in sub-fertile families of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 785–790. <https://doi.org/10.1071/RD05087>
- Stubblefield, E., & Mueller, C., 1960. Effects of sodium chloride concentration on growth, biochemical composition, and metabolism of HeLa cells. *Cancer Research*, 20(11), 1646-1655.
- Su, G. S., Liljedahl, L. E., & Gall, G. A., 2002. Genetic correlations between body weight at different ages and with reproductive traits in rainbow trout. *Aquaculture*, 213(1-4), 85-94. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00809-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00809-2)
- Su, G.-S., Liljedahl, L.-E., Gall, G.A.E., 1997. Genetic and environmental variation of female reproductive traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 154, 115–124. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00050-1)
- Sugimoto, Y., & Narumiya, S., 2007. Prostaglandin E receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 11613-11617. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600038200>
- Sugiura, S. H., Hardy, R. W., & Roberts, R. J., 2004. The pathology of phosphorus deficiency in fish—a review. *Journal of fish diseases*, 27(5), 255-265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00527.x>
- Sullivan, C.V., Hiramatsu, N., Kennedy, A.M., 2003. Induced maturation and spawning: opportunities and applications for research on oogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 481–486 (2003). <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030635.92568.0a>
- Szöllösi, D., & Jalabert, B., 1974. La thèque du follicule ovarien de la truite. *J. Microsc.* 20, 92a.
- Szöllösi, D., Jalabert, B., & Breton, B., 1978. Postovulatory changes in the theca folliculi of the trout. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 18, No. 4, pp. 883-891). EDP Sciences. https://rnd.edpsciences.org/articles/rnd/pdf/1978/05/ABABB_0003-388X_1978_18_4_ART0020.pdf
- Takahashi, T., Fujimori, C., Hagiwara, A., & Ogiwara, K., 2013. Recent advances in the understanding of teleost medaka ovulation: the roles of proteases and prostaglandins. *Zoological science*, 30(4), 239-247. <https://doi.org/10.2108/zsj.30.239>
- Takahashi, T., Hagiwara, A., & Ogiwara, K., 2018. Prostaglandins in teleost ovulation: A review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation. *Molecular and cellular endocrinology*, 461, 236-247. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.09.019>
- Takahashi, T., Hagiwara, A., Ogiwara, K., 2019. Follicle rupture during ovulation with an emphasis on recent progress in fish models. *Reproduction*. 157(1):R1-R13. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0251>
- Takashima, F., Yamada, Y., 1984. Control of maturation in masu salmon by manipulation of photoperiod. *Aquaculture*, 43, 243-257. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90026-7)
- Takata, K., Matsuzaki, T., & Tajika, Y., 2004. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 39(1), 1-83. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2004.03.001>
- Takeuchi, T., 1981. Effects of low protein-high calory diets and deletion of trace elements from a fish meal diet on reproduction of rainbow trout. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 47(5), 645-654.

- Takeuchi, T., Shiina, Y., & Watanabe, T., 1991. Suitable protein and lipid levels in diet for fingerlings of red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(2), 291-299. <https://doi.org/10.2331/suisan.57.293>
- Tam, W. H., Fryer, J. N., Valentine, B., & Roy, R. J. J., 1990. Reduction in oocyte production and gonadotrope activity, and plasma levels of estrogens and vitellogenin, in brook trout exposed to low environmental pH. *Canadian journal of zoology*, 68(12), 2468-2476. <https://doi.org/10.1139/z90-345>
- Tanaka, M., Nakajin, S., Kobayashi, D., Fukada, S., Guan, G., Todo, T., Nagahama, Y., 2002. Teleost ovarian carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase: potential role in the production of maturation-inducing hormone during final oocyte maturation. *Biology of reproduction*, 66(5), 1498-1504. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.5.1498>
- Tang, H., Liu, Y., Li, J., Yin, Y., Li, G., Chen, Y., Cheng, C. H., 2016. Gene knockout of nuclear progesterone receptor provides insights into the regulation of ovulation by LH signaling in zebrafish. *Scientific reports*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep28545>
- Taranger, G. L., & Hansen, T., 1993. Ovulation and egg survival following exposure of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodstock to different water temperatures. *Aquaculture Research*, 24(2), 151-156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1993.tb00535.x>
- Taranger, G. L., Haux, C., Hansen, T., Stefansson, S. O., Björnsson, B. T., Walther, B. T., & Kryvi, H., 1999. Mechanisms underlying photoperiodic effects on age at sexual maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 177(1-4), 47-60. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00068-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00068-X)
- Thibault, C., Levasseur, M.C., 1988. Ovulation. *Hum Reprod.* 3(4):513-23. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136737>
- Thomas, P., 2012. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. *General and comparative endocrinology*, 175(3), 367-383. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.032>
- Toback, F., 1980. Induction of growth in kidney epithelial cells in culture by Na⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(11), 6654-6656. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6654>
- Tocher, D.R., 2003. Reviews in fisheries science metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 37–41. <https://doi.org/10.1080/713610925>.
- Tokumoto, M., Nagahama, Y., Thomas, P., Tokumoto, T., 2006. Cloning and identification of a membrane progesterin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *Gen Comp Endocrinol.* 2006;145:101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.07.002>
- Tort, L., 2011. Impact of stress in health and reproduction. In *Encyclopedia of Fish Physiology*; Farrell, A.P., Cech, J.J., Richard, J.G., Stevens, E.D., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2011
- Tramacere, M., Petronini, P. G., Severini, A., & Borghetti, A. F., 1984. Osmoregulation of amino acid transport activity in cultured fibroblasts. *Experimental cell research*, 151(1), 70-79. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(84\)90356-2](https://doi.org/10.1016/0014-4827(84)90356-2)
- Tripathi, V., Krishna, A., 2008. Changes in nitric oxide (NO) synthase isoforms and NO in the ovary of *Heteropneustes fossilis* (Bloch.) during the reproductive cycle. *J. Endocrinol.* 199, 307–316. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0509>
- Trzebiatowski, R., Filipiak, J., & Jakubowski, R., 1981. Effect of stock density on growth and survival of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.). *Aquaculture*, 22, 289-295. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(81\)90155-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(81)90155-1)
- Tucker Jr, J. W., 1994. Spawning by captive serranid fishes: a review. *Journal of the world aquaculture society*, 25(3), 345-359. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00218.x>
- Tyler, C. R., & Sumpter, J. P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in fish biology and fisheries*, 6(3), 287-318. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00122584.pdf>
- Ünver, B., Ünver-Saraydin, S., 2004. Histological examination of ovarium development of shemaya *Chalcalburnus chalcoides* living in Lake Tödürge (Sivas/Turkey). *Folia Zool* 53, 99-106. https://www.ivb.cz/wp-content/uploads/53_99-106.pdf
- Valdebenito, I., Paiva, L., & Berland, M., 2011. Atresia folicular en peces teleósteos: una revisión. *Archivos de medicina veterinaria*, 43(1), 11-25. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2011000100003>

- Valdebenito, I.I., Gallegos, P.C., Effer, B.R., 2015. Gamete quality in fish: Evaluation parameters and determining factors. *Zygote* 23, 177–197. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000506>
- Valotaire, C., & Borel, F., 2017. Table du développement embryonnaire de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à 10 C en photos. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 90, 1-6. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01551074>
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Van Heerden, E., Van Vuren, J. H., Steyn, G. J., 1996. Effect of excreta, blood and vitellus contamination on fertilisation success of *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 141(3-4), 173-182. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01228-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01228-1)
- Van Leeuwen, C. J., Espeldoorn, A., & Mol, F., 1986. Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. III. Embryolarval studies with rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic toxicology*, 9(2-3), 129-145. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(86\)90019-6](https://doi.org/10.1016/0166-445X(86)90019-6)
- Vassallo-Agius, R., Watanabe, T., Yoshizaki, G., Satoh, S., Takeuchi, Y., 2001. Quality of eggs and spermatozoa of rainbow trout fed an n-3 essential fatty acid deficient diet and its effects on the lipid and fatty acid components of eggs, semen and livers. *Fisheries Science*, 67(5), 818-827. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00328.x>
- Villeneuve, D. L., Garcia-Reyero, N., Martinović, D., Cavallin, J. E., Mueller, N. D., Wehmas, L. C., Ankley, G. T., 2010. Influence of ovarian stage on transcript profiles in fathead minnow (*Pimephales promelas*) ovary tissue. *Aquatic toxicology*, 98(4), 354-366. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.03.006>
- von Schalburg, K. R., McCarthy, S. P., Rise, M. L., Hutson, J. C., Davidson, W. S., & Koop, B. F., 2006. Expression of morphogenic genes in mature ovarian and testicular tissues: Potential stem-cell niche markers and patterning factors. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 73(2), 142-152. <https://doi.org/10.1002/mrd.20359>
- von Schalburg, K. R., Rise, M. L., Brown, G. D., Davidson, W. S., & Koop, B. F., 2005. A comprehensive survey of the genes involved in maturation and development of the rainbow trout ovary. *Biology of Reproduction*, 72(3), 687-699. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.034967>
- Von Westernhagen, H. V., Cameron, P., Dethlefsen, V., & Janssen, D., 1989. Chlorinated hydrocarbons in North Sea whiting (*Merlangius merlangus* L.), and effects on reproduction. I. Tissue burden and hatching success. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 43(1), 45-60. <https://doi.org/10.1007/BF02365549>
- Wales, J. H., 1939. General report of investigations on the McCloud River drainage in 1938. *California Fish and Game*, 25(4), 272-309.
- Wallace, R. A., & Begovac, P.C., 1985. Phosvitins in *Fundulus* oocytes and eggs. Preliminary chromatographic and electrophoretic analyses together with biological considerations. *Journal of Biological Chemistry*, 260(20), 11268-11274. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39176-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39176-7)
- Wallace, R. A., & Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American zoologist*. 21(2), 325-343. <https://doi.org/10.1093/icb/21.2.325>
- Wallace, R. A., Greeley, M. S., McPherson, R., 1992. Analytical and experimental studies on the relationship between Na⁺, K⁺, and water uptake during volume increases associated with *Fundulus* oocyte maturation in vitro. *Journal of Comparative Physiology B*. 162(3), 241-248. <https://doi.org/10.1007/BF00357530>
- Wallace, R.A., Selman, K., 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron. Microsc. Tech.* 16, 175–201. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060160302>
- Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A., Fryer, J., Phillips, B., Collins, M., 1990. 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(3), 224-230. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-3-224>
- Wang, G., Zhang, G., Thibodeaux, S.J., Zhu, P., Glass, D., Fishman, M.C., 2019. Abnormal Behavior of Zebrafish Mutant in Dopamine Transporter Is Rescued by Clozapine. *iScience*. 2019 Jul 26;17:325-333. doi: 10.1016/j.isci.2019.06.039
- Wang, N., Teletchea, F., Kestemont, P., Milla, S., & Fontaine, P., 2010. Photothermal control of the reproductive cycle in temperate fishes. *Reviews in Aquaculture*, 2(4), 209-222. doi: 10.1111/j.1753-5131.2010.01037.x

- Wang, Y., & Ge, W., 2003a. Gonadotropin regulation of follistatin expression in the cultured ovarian follicle cells of zebrafish, *Danio rerio*. *General and comparative endocrinology*, 134(3), 308-315. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00275-2)
- Wang, Y., & Ge, W., 2003b. Involvement of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in the differential regulation of activin β A and β B expression by gonadotropin in the zebrafish ovarian follicle cells. *Endocrinology*, 144(2), 491-499. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220734>
- Washburn, B.S., Frye, D.J., Hung, S.S.O., Doroshov, S.I., Conte, F.S., 1990. Dietary effects on tissue composition, oogenesis and the reproductive performance of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 90, 179-195. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90340-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90340-5)
- Watanabe, T., Itoh, A., Satoh, S., Fujita, S., & Kitajima, C., 1985. Effect of dietary protein levels and feeding period before spawning on chemical components of eggs produced by red sea bream [*Pagrus major*] broodstock. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Watanabe, T., Kiron, V. & Satoh, S., 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151(1-4): 185-207.
- Watanabe, T., Murakami, A., Takeuchi, L., Ogino, C., & Nose, T., 1980. Requirement of chum salmon held in freshwater for dietary phosphorus. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. <https://doi.org/10.2331/suisan.46.361>
- Watanabe, T., Takeuchi, T., Saito, M., & Nishimura, K., 1984. Effect of low protein-high calory or essential fatty acid deficiency diet on reproduction of rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. <https://doi.org/10.2331/suisan.50.1207>
- Watanabe, W. O., & Kuo, C. M., 1986. Water and ion balance in hydrating oocytes of the grey mullet, *Mugil cephalus* (L.), during hormone-induced final maturation. *Journal of fish biology*. 28(4), 425-437. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1986.tb05180.x>
- Weber, G.M., Birkett, J., Martin, K., 2021. Comparisons among rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, populations of maternal transcript profile associated with egg viability. *BMC Genomics* 22, 448 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07773-1>
- Weber, G.M., Moore, A.B., & Sullivan, C.V., 2007. In vitro actions of insulin-like growth factor-I on ovarian follicle maturation in white perch (*Morone americana*). *General and comparative endocrinology*, 151(2), 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.007>
- Wekell, J. C., Shearer, K. D., & Houle, C. R., 1983. High zinc supplementation of rainbow trout diets. *The Progressive Fish-Culturist*, 45(3), 144-147. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1983\)45\[144:HZSORT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1983)45[144:HZSORT]2.0.CO;2)
- Wendelaar-Bonga, S., 1997. The stress response in fish. *Phys. Rev.* 77, 591-625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>
- Wendelaar-Bonga, S.E., 2011. Hormonal responses to stress: Hormone response to stress. In *Encyclopedia of Fish Physiology*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2011; pp. 1515-1523.
- Werthemer, A.C., 1984. Maturation success of Pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) and Coho salmon (*O. kisutch*) held under three salinity regimes. *Aquaculture* 43, 195-212. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90022-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90022-X)
- Westin, D. T., Olney, C. E., & Rogers, B. A., 1985. Effects of parental and dietary organochlorines on survival and body burdens of striped bass larvae. *Transactions of the American Fisheries Society*, 114(1), 125-136. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1985\)114<125:EOPADO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1985)114<125:EOPADO>2.0.CO;2)
- White, J.M., 2003. ADAMs : modulators of cell – cell and cell – matrix interactions. *Current opinion in cell biology*. 15(5), 598-606. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.08.001>
- Wickham, H., 2009. Elegant graphics for data analysis. *Media*, 35(211), 10-1007. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-0-387-98141-3.pdf>
- Williams, G. P., 1989. Sediment concentration versus water discharge during single hydrologic events in rivers. *Journal of Hydrology*, 111(1-4), 89-106. [https://doi.org/10.1016/0022-1694\(89\)90254-0](https://doi.org/10.1016/0022-1694(89)90254-0)
- Winston, G., 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 100(1-2), 173-176. [10.1016/0742-8413\(91\)90148-m](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90148-m)

- Wischhusen, P., Parailoux, M., Geraert, P. A., Briens, M., Bueno, M., Mounicou, S., Fontagné-Dicharry, S., 2019. Effect of dietary selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock on antioxidant status, its parental transfer and oxidative status in the progeny. *Aquaculture*, 507, 126-138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.006>
- Wissing, M. L., Kristensen, S. G., Andersen, C. Y., Mikkelsen, A. L., Høst, T., Borup, R., & Grøndahl, M. L., 2014. Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle. *Human reproduction*, 29(5), 997-1010. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu008>
- Wolf, J. P., Bulwa, S., Rodrigues, D., & Jouannet, P., 1995. Human oocyte cytometry and fertilisation rate after subzonal insemination. *Zygote*, 3(2), 101-109. <https://doi.org/10.1017/S0967199400002471>
- Wood, A. W., & Van Der Kraak, G. J., 2001. Apoptosis and ovarian function: novel perspectives from the teleosts. *Biology of Reproduction*, 64(1), 264-271. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.264>
- Wood, A. W., & Van Der Kraak, G., 2002. Inhibition of apoptosis in vitellogenic ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by salmon gonadotropin, epidermal growth factor, and 17 β -estradiol. *Molecular reproduction and development*, 61(4), 511-518. <https://doi.org/10.1002/mrd.10108>
- Wood, A., Kraak, G., 2003. Yolk proteolysis in rainbow trout oocytes after serum-free culture: Evidence for a novel biochemical mechanism of atresia in oviparous vertebrates. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 65(2), 219-227. <https://doi.org/10.1002/mrd.10272>
- Xiao, Z. C., Ragsdale, D. S., Malhotra, J. D., Mattei, L. N., Braun, P. E., Schachner, M., & Isom, L. L., 1999. Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel β subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26511-26517. [10.1074/jbc.274.37.26511](https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26511).
- Yada, T., & Nakanishi, T., 2002. Interaction between endocrine and immune systems in fish. *International review of cytology*, 220, 35-92. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)20003-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)20003-0)
- Yamamoto, S., Higuchi, Y., Yoshiyama, K., Shimizu, E., Kataoka, M., Hijiya, N., & Matsuura, K., 1999. ADAM family proteins in the immune system. *Immunology today*, 20(6), 278-284. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(99\)01464-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(99)01464-4)
- Yamamoto, Y., & Yoshizaki, G., 2008. Heterologous gap junctions between granulosa cells and oocytes in ayu (*Plecoglossus altivelis*): formation and role during luteinizing hormone-dependent acquisition of oocyte maturational competence. *Journal of Reproduction and Development*, 54(1), 1-5. <https://doi.org/10.1262/jrd.19178>
- Yamashita M, Mita K, Yoshida N, Kondo T., 2000. Molecular mechanisms of the initiation of oocyte maturation: general and species-specific aspects. *Prog Cell Cycle Res*. 4:115-29. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4253-7_11
- Yao, Z. L., Wang, H., Chen, L., Zhou, K., Ying, C. Q., & Lai, Q. F., 2012. Transcriptomic profiles of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to alkalinity stress. *Genet Mol Res*, 11(3), 2200-2246. [10.4238/2012.June.15.2](https://doi.org/10.4238/2012.June.15.2)
- York, W. S., Patiño, R., & Thomas, P., 1993. Ultrastructural changes in follicle cell-oocyte associations during development and maturation of the ovarian follicle in Atlantic croaker. *General and comparative endocrinology*, 92(3), 402-418. <https://doi.org/10.1006/gcen.1993.1177>
- Young, G., Kusakabe, M., Nakamura, I., Lokman, P. M., & Goetz, F. W., 2005. Gonadal steroidogenesis in teleost fish. *Molecular aspects of fish and marine biology*, 2, 155-223.
- Yu, B., Doni Jayavelu, N., Battle, S. L., Mar, J. C., Schimmel, T., Cohen, J., & Hawkins, R. D., 2020. Single-cell analysis of transcriptome and DNA methylome in human oocyte maturation. *PLoS One*, 15(11), e0241698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241698>
- Zanuy, S., & Carrillo, M., 1987. La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. *Reproducción en Acuicultura*. Editorial CAICYT. Madrid, España, 1, 1-102.
- Zaugg, W. S., 1969. Inorganic salt effects on growth, salty water adaptation and gill ATPase of pacific salmon. *Fish in research*, 293-306.
- Zhang L, Chang X, Hu Z, Zhang L, Shi J, Gao R, 2010. Selective solid phase extraction and pre-concentration of mercury(II) from environmental and biological samples using nanometer silica functionalized by 2,6-pyridine dicarboxylic acid. *Microchim Acta* 168(1):79–85. [doi:10.1007/s00604-009-0261-0](https://doi.org/10.1007/s00604-009-0261-0)

Zhang N, Peng H, Wang S, Hu B, 2011. Fast and selective magnetic solid phase extraction of trace Cd, Mn and Pb in environmental and biological samples and their determination by ICP-MS. *Microchim Acta* 175(1):121–128. doi:10.1007/s00604-011-0659-315.

Zhao, Z., Dammert, M. A., Grummt, I., & Bierhoff, H., 2016. lncRNA-induced nucleosome repositioning reinforces transcriptional repression of rRNA genes upon hypotonic stress. *Cell reports*, 14(8), 1876-1882. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.073>

Zhu, Y., Liu, D., Shaner, Z. C., Chen, S., Hong, W., & Stellwag, E. J., 2015. Nuclear progesterin receptor (pgr) knockouts in zebrafish demonstrate role for pgr in ovulation but not in rapid non-genomic steroid mediated meiosis resumption. *Frontiers in endocrinology*, 6, 37. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00037>

Zhu, Y., Rice, C. D., Pang, Y., Pace, M., & Thomas, P., 2003. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2231-2236. <https://doi.org/10.1073/pnas.0336132100>

Ziv, T., Gattegno, T., Chapovetsky, V., Wolf, H., Barnea, E., Lubzens, E., & Admon, A., 2008. Comparative proteomics of the developing fish (zebrafish and gilthead seabream) oocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 3(1), 12-35. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2007.06.004>

Titre : Etude de l'impact de la teneur minérale de l'eau d'élevage sur les mécanismes de maturation ovocytaire et d'ovulation chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et mise en place de mesures correctives par la nutrition.

Mots clés : Qualité, reproduction, truite arc-en-ciel

Résumé : L'étude décrit les pertes de qualité des ovocytes de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* dans une situation d'élevage particulière. Une méta-analyse a d'abord démontré que l'eau d'élevage des génitrices touchées par le défaut de qualité est relativement pauvre en sodium, chlorure et potassium.

Les mécanismes physiologiques impliqués dans l'apparition du défaut de qualité ont été étudiés, notamment par l'utilisation de technologies innovantes. Cette analyse a notamment révélé une ovulation partielle voire bloquée (absence d'ovulation dans les situations extrêmes), accompagnée d'une maturation ovocytaire anormalement longue. De plus, l'hydratation des ovocytes au moment de la maturation ovocytaire finale est réduite.

L'analyse moléculaire a mis en évidence

l'altération globale des profils d'expression géniques liés aux voies endocriniennes et aux mécanismes de maturation ovocytaire, d'hydratation et d'ovulation.

Afin de tester la possibilité de corriger ce phénomène, une supplémentation en sel (NaCl) dans l'aliment pendant la vitellogenèse a été mise en place. Les performances reproductives des génitrices ont été améliorées (augmentation du rapport gonado-somatique, des tailles et des qualités des ovocytes), sans effet néfaste (survies et taux de ponte équivalents). Ces résultats originaux nécessitent un approfondissement de la compréhension des mécanismes moléculaires et endocriniens associés à une reproduction dans une eau pauvre en sodium, chlorure et potassium.

Title: Impact of mineral water composition on final oocyte maturation and ovulation mechanisms for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Implementation of correctives measures by nutrition.

Keywords: Quality, reproduction, rainbow trout

Abstract: The study aimed at deciphering the mechanisms triggering reduced oocyte quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, in a specific breeding situation.

First, a meta-analysis suggested that low quality oocytes are produced in breeding water presenting a low relative abundance of sodium, chloride and potassium.

Using innovative technologies, the study revealed an impairment of ovulation mechanism (including ovulation blockage in some extreme situations), accompanied by an abnormaly long duration of final oocyte maturation. A poor hydration of oocyte during final oocyte maturation was also reported.

Molecular analysis revealed the reduced

activation of the specific gene expression program occurring during final oocyte maturation, with a reduced number of activated genes, notably of known key players of the maturation-ovulation process.

A salt (NaCl) supplementation of the commercial diet was tested during vitellogenesis. Reproductive performance was improved (gonadosomatic index, oocyte size and viability), whitout causing any detrimental effect on fish (normal growth and survival).

These novel results are a first step toward a deeper understanding of molecular and endocrine mechanism causing oocyte quality loss when reproduction occurs in low salinity water.