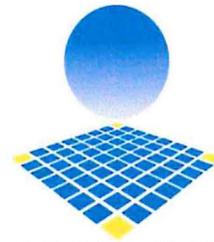


DK 536442

BA-TH 1383



Cirad-Département Emvt  
Campus de Baillarguet  
TA 30/B  
34 398 MONTPELLIER Cedex 5



UNIVERSITÉ MONTPELLIER II

Université Montpellier II  
UFR Sciences  
Place Eugène Bataillon  
34 095 MONTPELLIER Cedex 5

**MASTER 2EME ANNEE**  
**BIOLOGIE GEOSCIENCES AGRORESSOURCES**  
**ET ENVIRONNEMENT SPECIALITE**  
**PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES**

---

**RAPPORT DE STAGE**  
**Domestication et étude sur la**  
**reproduction de poissons**  
**indigènes du Mékong au Laos**

**Présenté par**  
Thomas RAYNAUD

Réalisé sous la direction de : Mr Philippe CACOT

Organisme et pays : Unité de Recherche Aquaculture du CIRAD-EMVT au Laos

Période du stage : Avril – Août 2006

Année universitaire 2005-2006

**CIRAD-Dist**  
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE  
Baillarguet



\*000081902\*

## Résumé

Les activités au cours de cette étude ont été réalisées dans le cadre d'un programme de collaboration entre l'unité Aquaculture du CIRAD-EMVT et le NAFRI-LARReC. Elles ont été conduites avec des partenaires locaux de la province de Champassak et du LARReC, dans le sud du Laos, dans la région dite des « 4 000 îles ». Ce projet dont le thème est la domestication d'espèces indigènes de poissons au Laos, existe depuis mai 2005. Mais avant de pouvoir domestiquer une espèce, il faut d'abord maîtriser le cycle de vie en captivité dont les clés sont le contrôle de la reproduction et l'élevage larvaire. Ainsi les recherches se sont portées cette année essentiellement sur la reproduction et puis sur l'élevage larvaire de cinq espèces endémiques qui sont un cyprinidé *Cirrhinus microlepis* et quatre espèces de poissons-chats *Hemibagrus wyckioides*, *Pangasius hypophthalmus*, *Pangasius conchophilus* et surtout *Pangasius krempfi*.

Les différents travaux ont été effectués à la station aquacole de Ban Hat puis sur l'île de Don Nokassoun, lieux spécialement aménagés cette année pour recevoir des géniteurs et tenter des reproductions artificielles. Dans un premier temps, il a fallu établir un réseau avec des pêcheurs locaux pour nous procurer des géniteurs sauvages issus du milieu naturel. Après la capture, le transport et le stockage de ces géniteurs à la station aquacole ou à Don Nokassoun, des travaux, particulièrement orientés sur des traitements hormonaux d'induction de l'ovulation, ont été tentés.

Ces traitements hormonaux ont été réalisés avec deux types d'hormones : une GnRH (la LHRH) et une hormone gonadotrope (l'hCG). L'hCG a toujours été administrée sous forme liquide tandis que la LHRH a été administrée soit sous forme liquide avec du dompéridone, un anti-dopaminergique, soit sous forme d'implant solide. Ces implants hormonaux représentaient pour nous une nouvelle approche intéressante pour traiter des femelles en diminuant le nombre d'injections et le nombre de manipulations.

D'ailleurs, au niveau de la reproduction et des traitements hormonaux, de bons résultats ont été obtenus. Chez *Cirrhinus microlepis*, le traitement hormonal appliqué avec deux injections, une sous forme d'implant LHRHa (70 µg.kg<sup>-1</sup>) et une sous forme liquide (30 µg.kg<sup>-1</sup> de LHRH + 10 mg.kg<sup>-1</sup> de dompéridone), espacées de 16 heures, a permis d'obtenir très fréquemment l'ovulation (7 femelles sur 12 tentées). Chez *Hemibagrus wyckioides*, plusieurs traitements hormonaux ont été tentés mais celui qui fut le plus efficace est un traitement de finition fait avec plusieurs injections d'hCG à 500 UI.kg<sup>-1</sup>, suivi d'un traitement ovulatoire en deux injections réalisées avec un mélange d'hCG et de LHRH. Au total six femelles sur 17 ont ovulé et ont permis d'obtenir des larves. En ce qui concerne *Pangasius hypophthalmus*, nous nous sommes servis de cette espèce pour améliorer nos traitements hormonaux avec implants dans le but de connaître les doses suffisantes et nécessaires pour obtenir l'ovulation des femelles. Ce qui en résulte est que des implants de 100 ou 50 µg.kg<sup>-1</sup> semblent efficaces. D'ailleurs, *P. hypophthalmus* étant un pangasidé comme *P. krempfi*, nous nous sommes servis de ces résultats pour les appliquer sur *P. krempfi*. Malgré de nombreuses tentatives sans succès, une femelle *P. krempfi* a pondu et donné des larves ce qui représente néanmoins une première dans le domaine de l'aquaculture mondiale. Pour *P. conchophilus*, trois femelles sur cinq ont donné des larves avec un traitement hormonal semblable à celui de *H. wyckioides*.

Ainsi, les résultats de cette année, nous ont permis de faire de grand progrès au niveau de la reproduction artificielle de ces cinq espèces endémiques du Laos.

**Mots Clés :** Aquaculture, reproduction, traitement hormonal, implant GnRHa, domestication, poisson, Laos.

## SOMMAIRE

<b>Résumé</b> .....	<b>2</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des acronymes</b> .....	<b>6</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Contexte et enjeux de l'étude</b> .....	<b>8</b>
1.1. HISTORIQUE DU PROJET CIRAD AU LAOS ET PARTENARIAT.....	8
1.2. LE LAOS.....	8
1.3. LES SITES DE L'ETUDE.....	9
1.4. L'ORGANISATION DE L'EQUIPE DE RECHERCHE.....	10
1.5. PRESENTATION DES ESPECES ETUDIEES.....	11
1.5.1. <i>Cirrhinus microlepis</i> .....	11
1.5.2. <i>Hemibagrus wyckioides</i> .....	12
1.5.3. <i>Les Pangasiidae</i> .....	12
1.5.3.1. Présentation générale.....	12
1.5.3.2. Présentation des espèces étudiées.....	13
<b>2. Conditions expérimentales</b> .....	<b>15</b>
2.1. LES STRUCTURES.....	15
2.1.1. <i>Les cages flottantes</i> .....	15
2.1.2. <i>Le circuit de bacs principal</i> .....	16
2.1.3. <i>Le circuit de bacs provisoire</i> .....	17
2.1.4. <i>Le laboratoire</i> .....	17
2.2. LES TECHNIQUES DE LA REPRODUCTION ARTIFICIELLE.....	17
2.2.1. <i>Les traitements hormonaux classiques</i> .....	17
2.2.2. <i>Les implants hormonaux</i> .....	18
2.2.3. <i>La gestion des gamètes</i> .....	18
2.2.3.1. Collecte et conservation du sperme.....	18
2.2.3.2. Collecte des ovules.....	19
2.2.3.3. Fécondation et mise en incubation.....	19
2.2.3.4. Mesure des diamètres ovocytaires.....	19
2.3. NOURRISSAGE ET FABRICATION DE L'ALIMENT.....	20
2.3.1. <i>Méthode de nourrissage</i> .....	20
2.3.2. <i>Capture et maintien en vie du zooplancton</i> .....	20
2.3.3. <i>Fabrication de l'aliment sec</i> .....	21
<b>3. La collecte et le stockage des poissons géniteurs</b> .....	<b>22</b>
3.1. ACQUISITION DE CIRRHINUS MICROLEPIS ET HEMIBAGRUS WYCKIOIDES.....	22
3.1.1. <i>Lieux et date de capture</i> .....	22
3.1.2. <i>Méthodes de capture</i> .....	22
3.1.3. <i>Transport des géniteurs</i> .....	24
3.1.4. <i>Stockage des géniteurs sur la station</i> .....	25
3.2. ACQUISITION DE PANGASIUS KREMPFI ET PANGASIUS CONCHOPHILUS.....	25
3.2.1. <i>Lieux et date de capture</i> .....	25
3.2.2. <i>Méthodes de capture</i> .....	25
3.2.3. <i>Stockage des géniteurs à Don Nokassoun</i> .....	26
3.2.4. <i>Transport des géniteurs</i> .....	27
<b>4. Résultats</b> .....	<b>29</b>
4.1. LA REPRODUCTION.....	29
4.1.1. <i>Cirrhinus microlepis</i> .....	29
4.1.1.1. Matériels et méthodes.....	29
4.1.1.2. Résultats.....	31
4.1.1.3. Discussion.....	32
4.1.2. <i>Hemibagrus wyckioides</i> .....	33
4.1.2.1. Matériels et méthodes.....	33

4.1.2.2.	Résultats .....	35
4.1.2.3.	Discussion.....	41
4.1.3.	<i>Pangasius hypophthalmus</i> .....	41
4.1.3.1.	Première expérimentation .....	41
4.1.3.2.	Deuxième expérimentation .....	44
4.2.3.3.	Bilan des deux expérimentations sur <i>P. hypophthalmus</i> .....	49
4.1.4.	<i>Pangasius conchophilus</i> .....	50
4.1.4.1.	Matériels et méthodes .....	50
4.1.4.2.	Résultats .....	51
4.1.4.3.	Discussion.....	51
4.1.5.	<i>Pangasius krempfi</i> .....	52
4.1.5.1.	Matériels et méthodes.....	52
4.1.5.2.	Résultats.....	53
4.1.5.3.	Discussion.....	55
4.2	ELEVAGE LARVAIRE .....	55
4.2.1.	<i>Cirrhinus microlepis</i> .....	56
4.2.1.1.	Obtention des larves et lieu de stockage.....	56
4.2.1.2.	Alimentation.....	56
4.2.1.3.	Suivi des larves .....	56
4.2.2.	<i>Hemibagrus wyckioides</i> .....	56
4.2.2.1.	Obtention des larves et lieu de stockage.....	56
4.2.2.2.	Alimentation.....	57
4.2.2.3.	Suivi des larves (poids et survie) .....	57
4.2.3.	<i>Pangasius hypophthalmus</i> .....	58
4.2.3.1.	Obtention des larves et lieux de stockage .....	58
4.2.3.2.	Alimentation.....	58
4.2.3.3.	Survie larvaire.....	58
4.2.4.	<i>Pangasius conchophilus</i> .....	59
4.2.5.	<i>Pangasius krempfi</i> .....	59
	<b>Conclusion .....</b>	<b>60</b>
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>61</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>63</b>

## Remerciements

Je remercie particulièrement le Docteur Philippe Cacot, maître de stage et chercheur dans l'unité de recherche Aquaculture du CIRAD-EMVT qui, à travers son expérience et ses enseignements, a su me guider tout au long des expérimentations et m'aider à la rédaction de ce rapport.

Je témoigne ma gratitude au Docteur Jérôme Lazard, directeur de l'unité de recherche Aquaculture du CIRAD-EMVT (UR 2) qui a accepté la mise en place de cette étude.

Je tiens aussi à remercier les autres membres du projet et les partenaires:

Tout d'abord, Frédéric Clota, ingénieur de l'INRA spécialisé en aquaculture, avec qui j'ai travaillé quotidiennement au Laos. Merci pour son soutien, son entraide, ses conseils expérimentés et sa bonne humeur.

Somphanh Philavong, technicien aquacole laotien avec qui j'ai travaillé tous les jours et qui m'a permis de mieux comprendre la culture et la langue lao.

Mr Charoun, responsable du secteur pêche et aquaculture du district, toujours accueillant et de bonne humeur.

Lankeo Phenaloun, directeur de la station du km8, qui m'a toujours accueilli chaleureusement sur la station à Paksé.

Les différents stagiaires laotiens, Chansak, Bounglieng, Nang et tous les autres qui m'ont aidé dans mes expérimentations.

Rachel, étudiante américaine qui est venue nous aider pendant plus d'un mois.

Enfin merci à tous les membres du LARReC : Sola Simmalavong, Somphan Phanousith et tous les autres sans qui je n'aurais jamais pu effectuer ce stage.

## Liste des acronymes

CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.

EMVT : Elevage et Médecine Vétérinaire.

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

LARReC : Living Aquatic Resources Research Center

MAE : Ministère français des Affaires Etrangères

MAF : Ministère de l'Agriculture et des Forêts du Laos

MRC-AIMS : Mekong River Commission – Aquaculture of the Indigenous Mekong Species

NAFRI : National Agriculture and Forestry Research Institute

## Introduction

Le continent asiatique est le plus gros producteur aquacole du monde, surtout en ce qui concerne les ressources continentales. Cette tendance persiste même en excluant la Chine (essentiellement en zone tempérée), ce qui souligne l'importance des espèces tropicales tant au plan des pêcheries qu'à celui de l'aquaculture, dont la production est aujourd'hui comparable voire légèrement supérieure à celle des pêches continentales (FAO, 2002). En ce qui concerne le Laos, la production aquacole (65 000 tonnes en 2004) reste encore faible comparée à ces pays voisins malgré un très grand potentiel et ne dépasse pas celle apportée par la pêche. Cette production aquacole laotienne n'est basée que sur quelques espèces (tilapias et divers cyprinidés) et qui sont en fait des espèces exotiques d'où l'importance de diversifier les espèces élevées au Laos. De plus, les stocks de poissons dans le fleuve Mékong diminuent de plus en plus au Laos notamment les poissons-chats de la famille des pangasiidés ce qui a conduit à une diminution spectaculaire du stock sauvage au début des années 1990 (Van Zalinge *et al*, 2002).

Face à cette nécessité de diversification des espèces élevées et ce problème de surpêche, il semble essentiel de développer l'aquaculture au Laos en domestiquant des espèces indigènes de poissons du Mékong. Le gouvernement laotien et le CIRAD ont pris en compte cette problématique et c'est pourquoi une collaboration entre ces deux acteurs et un projet de développement de l'aquaculture sont nés en 2005. Mais la diversification de la production aquacole, et plus particulièrement l'utilisation d'espèces locales à haut potentiel, requièrent une maîtrise de l'ensemble du cycle de vie en captivité. Les deux clés de cette maîtrise du cycle de vie en captivité sont le contrôle (environnemental ou hormonal) de la reproduction et l'élevage larvaire.

L'essentiel du travail de cette année avait pour but de faire une approche exploratoire sur la première phase d'une démarche de domestication de nouvelles espèces indigènes. Pour cela, les trois objectifs à atteindre étaient de premièrement se procurer des géniteurs sauvages, deuxièmement tenter de les reproduire et troisièmement contrôler l'élevage larvaire. Ces objectifs ont été tentés sur cinq espèces autochtones qui sont un cyprinidé *Cirrhinus microlepis* et quatre espèces de poissons-chats *Hemibagrus wyckioides*, *Pangasius hypophthalmus*, *Pangasius conchophilus* et surtout *Pangasius krempfi*.

Afin de répondre à ces objectifs, il a fallu tout d'abord améliorer le lieu de travail et d'élevage à la station aquacole laotienne puis ensuite, établir un réseau pour capturer des géniteurs sauvages dans le milieu naturel. Après l'acquisition et le stockage des géniteurs capturés, diverses expérimentations ont pu être réalisées dans le but de reproduire artificiellement chaque espèce en appliquant divers traitements hormonaux et afin d'obtenir un grand nombre de larves de chaque espèce pour créer un stock de descendants. Ce stock de descendants permettra dans l'avenir d'effectuer de nouvelles expérimentations afin d'améliorer les protocoles de reproduction et d'optimiser l'élevage larvaire.

Ainsi, après la présentation du contexte et des enjeux de l'étude ainsi que des conditions expérimentales, nous présenterons les résultats obtenus sur la capture des géniteurs, leur reproduction et l'élevage larvaire. Enfin, nous essaierons d'analyser ces résultats dans une discussion afin de déterminer quelles sont les perspectives d'avenir pour l'aquaculture au Laos et comment améliorer l'élevage de ces nouvelles espèces.

# 1. Contexte et enjeux de l'étude

## 1.1. Historique du projet CIRAD au Laos et partenariat

Ce projet d'une durée de trois ans a débuté en mai 2005 suite à la mise en place d'une collaboration entre l'unité de recherche Aquaculture du CIRAD-EMVT (UR 2) et le NAFRI-LARReC. L'objectif est de contribuer à la domestication de plusieurs espèces indigènes de poissons. Ce projet de domestication des poissons concerne à la fois le développement de l'aquaculture et la préservation de la diversité des poissons. D'ailleurs, le CIRAD travaille dans la région du Sud-Est asiatique depuis 1993 sur la domestication des poissons-chats Pangasiidae et l'étude des systèmes de production. De 1993 à 2005, les actions étaient basées au Viêt Nam dans le delta du Mékong et elles le sont maintenant au Laos.

Le principal partenaire du projet est le LARReC (Living Aquatic Resources Research Center) appartenant au NAFRI (National Agriculture and Forestry Research Institute) qui est un département du Ministère de l'Agriculture et des Forêts du Laos (MAF). Ce projet est financé par le CIRAD et le Ministère français des Affaires Etrangères. Certains financements sont versés par le programme du MRC-AIMS (Mekong River Commission – Aquaculture of the Indigenous Mekong Species).

Dans ce projet, la province de Champassak et ses responsables dans le secteur aquacole jouent aussi un grand rôle puisqu'ils nous aident dans toutes nos activités de recherche en appuyant notre projet et en nous laissant parfois travailler sur deux de leurs stations aquacoles : la station du km 8 près de Paksé et la station de Ban Na sur l'île de Kong.

## 1.2. Le Laos

Ce stage s'est déroulé au Laos ou encore officiellement appelé République Populaire Démocratique Lao (Figure 1), pays d'Asie du Sud-Est, enclavé entre le Myanmar, la Thaïlande, le Cambodge, le Viêt Nam et la République populaire de Chine. Sa superficie est de 236 800 km<sup>2</sup>. Les montagnes et les plateaux occupent plus de 70 % du pays. La forêt (très dégradée) recouvre 52,8 % du pays. Le pays est arrosé par le Mékong (1898 km au Laos sur un parcours total de 4200 km), navigable malgré son débit irrégulier et qui forme en grande partie la frontière naturelle avec la Thaïlande. Le climat est chaud et humide, c'est donc un climat tropical caractérisé par les moussons avec deux saisons : une saison sèche d'octobre à avril et une saison des pluies de mai à septembre.

Le Laos est peuplé de 5,3 millions d'habitants, dont 85 % vivent dans les zones rurales. Le secteur agricole est le plus important et représente 52 % du PIB. Principale source de revenus du pays, il occupe 85 % de la population active. Les terres cultivables sont essentiellement vouées à la riziculture. En ce qui concerne l'élevage, le Laos élève comme bétail des chèvres, des buffles, des porcs et des volailles. En revanche, l'aquaculture est une activité encore peu importante et sous-exploitée. En 2004 (source FAO), le Laos a produit environ 65 000 tonnes de poissons d'eau douce dont la moitié de cette production est réalisée grâce à des carpes et autres cyprinidés et l'autre moitié grâce aux tilapias ; rares sont les espèces indigènes à être élevées à grande échelle à l'exception du « silver barb » (*Barbodes gonionotus*).



Figure 1: Carte du Laos

### 1.3. Les sites de l'étude

L'essentiel du travail durant ce stage s'est effectué à la station aquacole de Ban Hat, petit village au bord du Mékong (rive gauche) situé dans la province de Champassak au sud du pays, à une trentaine de kilomètres au nord de la frontière cambodgienne et 120 km au sud de Paksé, dans la région des "Siphandone" appelée aussi les "4 000 îles". Cette région est appelée 4 000 îles car le Mékong se divise à cet endroit en plusieurs bras formant ainsi de nombreux îles et îlots. Elle est aussi très réputée pour ces eaux poissonneuses et sa forte activité de pêche liée à *fortiori* à ces nombreuses îles qui se retrouvent immergées en saison des pluies et servant ainsi de zones de frai pour de nombreuses espèces migratrices. De plus, la présence d'importantes chutes d'eau dans la zone, appelée les chutes de Khône, crée une barrière physique et écologique qui concentre d'importants stocks de géniteurs facilement accessibles en amont et en aval des chutes. C'est donc pour cela que le site de Ban Hat a été choisi comme lieu principal car il est situé près des stocks de géniteurs et des lieux de pêche.

D'autres sites ont été fréquentés pour le projet et sont présentés dans la Figure 2. A 5 km au sud de Ban Hat, Khina est le lieu de ravitaillement ; en effet, grâce à son marché local et ses commerces, nous pouvons nous y procurer les vivres et le petit matériel de base (quincaillerie, essence...). Sur la carte, d'autres sites comme Don Som, Ban Thako, Don Sadam et Don Nokassoun sont présentés et constituent les lieux de pêche qui seront présentés par la suite (§ 3).

Enfin, deux autres sites, qui sont les stations aquacoles de nos partenaires, nous ont permis de travailler en collaboration et partager nos recherches. La station de Ban Na, sur l'île de Don Khong, en face de la station de Ban Hat, nous a permis de nous procurer du zooplancton dans ses étangs pour nourrir nos larves mais aussi de stocker quelques larves dans leurs étangs. Enfin, la station du km 8, située à 8 km au sud de Paksé et non représentée

sur la carte, nous permettait d'effectuer certaines recherches avec l'espèce *C. microlepis* mais aussi de stocker un grand nombre de géniteurs (une trentaine) d'*H. wyckioides* après nos expérimentations.



Figure 2 : carte de la région des 4000 îles et localisation des sites de travail

#### 1.4. L'organisation de l'équipe de recherche

Plusieurs personnes ont travaillé sur ce projet cette année. Du côté CIRAD, le responsable au Laos, qui est aussi mon maître de stage, est le Dr Philippe Cacot. C'est lui qui est chargé de diriger les recherches et d'établir la communication entre les divers acteurs du LARReC et de la province de Champassak. Mais cette année, le projet a aussi été appuyé par ma venue et celle d'un ingénieur spécialisé en aquaculture, Frédéric Clota, employé par l'INRA mais travaillant pour le CIRAD.

Du côté lao, nous étions assisté sur la station de Ban Hat par Somphanh Philavong, technicien aquacole du LARReC, Sola Simmalavong, directeur de la station et Mr Charoun, responsable du secteur pêche et aquaculture du district. Mr Somphan Phanousith, chercheur au LARReC, nous a aussi aidé et appuyé tout au long du projet. Certains étudiants stagiaires ont aussi apporté leur aide lors de nos recherches.

Enfin, au niveau de la province de Champassak, le directeur responsable du secteur pêche et aquaculture Mr Prachit, nous a appuyé dans nos recherches ainsi que le directeur de la station du km 8, Mr Lankeo Phenaloun.

## 1.5. Présentation des espèces étudiées

Cinq espèces endémiques ont été étudiées pour être reproduites artificiellement cette année. Une espèce fait partie de la famille des Cyprinidae (carpes) : *Cirrhinus microlepis* et les autres sont des poissons-chats dont un Bagridae : *Hemibagrus wychioides* et trois Pangasiidae : *Pangasianodon hypophthalmus*, *Pangasius conchophilus* et *Pangasius krempfi*.

### 1.5.1. *Cirrhinus microlepis*

Sous-classe des Actinoptérygiens

Ordre des Cypriniformes

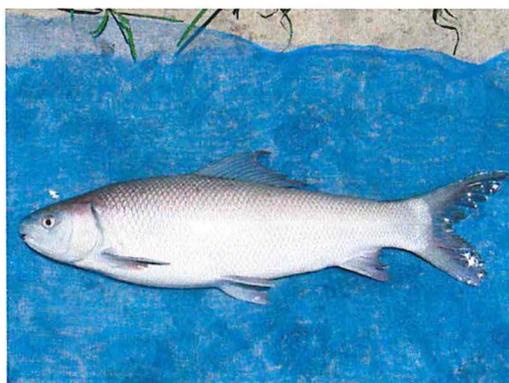
Famille des *Cyprinidae*

Nom anglais : Small scale mud carp

Nom lao : Pa Phone

Taille max : 65 cm LS

Poids max : 5 kg



*Cirrhinus microlepis* est une carpe avec de petites écailles, qui est dépourvue de barbillion, au corps peu comprimé et à la coloration bien distincte. Les juvéniles sont argentés avec la nageoire caudale rouge et les adultes ont le dos violacé voire rose et la nageoire caudale sombre.

Originaire du bassin du Mékong, cette espèce vit dans les grands fleuves et dans les zones inondées où elle se nourrit de phytoplancton, de végétaux et d'insectes. La migration de *C. microlepis* est différente selon qu'il s'agisse d'un individu qui vit en amont ou aval des chutes de Khône. En aval des chutes, une migration ascendante s'effectue de Phnom Penh aux chutes de Khône entre novembre et février. D'avril à juillet la migration s'inverse et devient descendante. En amont des chutes, la migration est moins connue car observée à différents moments de l'année selon le site. Pour certaines régions, la migration ascendante s'effectue de mars à avril, pour d'autres de mai à juillet. Au Laos, dans la province de Champassak, la migration commence avec le début de la saison des pluies dès le mois de mai. Cependant, au vu de mes observations sur le site des chutes de Khône, on peut se poser la question de l'existence réelle de deux populations distinctes de part et d'autre des chutes car la capture de ces poissons dans les ly traps (§ 3.1.2) suggère que ces poissons passent cette prétendue barrière.

La principale zone de pêche de cette espèce au Laos n'est toutefois pas les chutes de Khône mais les zones de "deep pool" et forêt inondée située 20-50 km en aval des chutes (Warren et al, 1998 ; Baird, 1998). En effet, cette zone de "deep pool" sert de refuge important en saison sèche.

### 1.5.2. *Hemibagrus wyckioides*

Sous-classe des Actinoptérygiens  
Ordre des Siluriformes  
Sous-ordre des Siluroidés  
Famille des *Bagridae*

Nom anglais : Asian redbtail catfish  
Nom lao : Pa Kheung

Taille max : 130 cm LS  
Poids max : 80 kg



Morphologiquement, les Bagridae sont reconnaissables à leur corps modérément allongé qui est comprimé postérieurement. Ils ont quatre paires de barbillons, une forte épine dorsale (excepté chez *H. wyckioides*), une nageoire dorsale adipeuse et de fortes épines pectorales (Teugels, 1996).

*Hemibagrus wyckioides* est facilement reconnaissable grâce à sa nageoire caudale rouge chez les individus mesurant plus de 15 cm de long et une absence de rayure sur le corps.

Originaire du bassin du Mékong et présent dans les grandes rivières des montagnes, *H. wyckioides* est commun dans les zones aux fonds rocailleux et à des profondeurs irrégulières. Il ne migre apparemment pas et se reproduit localement. Il entre dans la forêt inondée durant les hautes eaux (période des moussons) de juillet à octobre. Carnassier, il se nourrit d'insectes, de crevettes, de poissons et de crabes. Ce poisson est très recherché pour sa chair à haute valeur marchande et présente donc un fort intérêt aquacole.

### 1.5.3. Les Pangasiidae

#### 1.5.3.1. Présentation générale

Parmi les espèces que nous avons étudiées cette année, trois font partie de la famille des poissons-chats Pangasiidae qui compte 28 espèces réparties dans les pays d'Asie du Sud et du Sud-Est (Gustiano, 2003). Le Mékong compte 13 espèces de pangasidés qui présentent des caractéristiques variées, dont 8 sont des poissons de taille plutôt grande, atteignant au moins 50 cm de longueur. Les pangasidés possèdent une respiration aérienne complémentaire grâce à une vessie natatoire particulière qui joue le rôle de poumon accessoire ; cette caractéristique ne semble cependant bien développée que chez *Pangasius hypophthalmus* et *P. larnaudii*, ces deux espèces supportant bien des eaux faiblement oxygénées en étang.

La qualité de la chair justifie l'intérêt suscité par les pangasidés qui sont appréciés à la fois localement (autoconsommation, marchés locaux) et sur le marché international. Quant aux autres caractéristiques intéressantes, elles sont mises à profit pour l'aquaculture. Ainsi une grande taille maximale est généralement associée à une bonne croissance (Legendre et Albaret, 1991) ; la respiration aérienne complémentaire permet une densité de stockage élevée dans les étangs ou les cages flottantes ; le régime alimentaire omnivore permet la valorisation d'issues de céréales comme le son de riz disponible en très grande quantité dans ces régions.

## 1.5.3.2. Présentation des espèces étudiées

### 1.5.3.2.1. *Pangasius hypophthalmus*

Sous-classe des Actinoptérygiens  
Ordre des Siluriformes  
Famille des *Pangasiidae*

Nom anglais : Sutchi catfish  
Nom lao : Pa Suay mak may

Taille max : 130 cm LS  
Poids max : 44 kg



*Pangasius hypophthalmus* se distingue des autres *Pangasiidae* (excepté *Pangasianodon gigas*) par la présence de 8 (occasionnellement 9) rayons aux nageoires pelviennes. Les nageoires sont grises ou noir foncé. Les juvéniles sont pourvus d'une raie noire suivant la ligne latérale et une deuxième longue raie noire au-dessous de la ligne latérale ; les adultes ont une coloration dorsale bleue et ventrale blanche. Une raie foncée est présente sur le milieu de la nageoire anale et une raie foncée est aussi présente sur chaque lobe de la nageoire caudale. Aucun dimorphisme sexuel n'est apparent, si ce n'est au plan de la croissance, plus rapide chez les femelles que les mâles.

L'espèce est native du bassin du Mékong (fleuve, petits cours d'eau, canaux) mais a été introduite en Indonésie pour l'aquaculture en 1972. En milieu naturel, l'espèce est migratrice (potamodrome), la migration de reproduction coïncidant avec la saison des pluies (juin à octobre), alors que la dévalaison survient de juin à août (Froese & Pauly, 2005). Omnivore à tendance phytophage, *P. hypophthalmus* consomme poissons et crustacés aussi bien que fruits, débris végétaux et phytoplancton. Son nom vernaculaire laotien signifie d'ailleurs « poisson qui mange des fruits ». Il possède une vessie natatoire continue très vascularisée utilisée comme appareil respiratoire accessoire, ce qui lui permet de vivre dans des milieux pauvres en oxygène. Ces caractéristiques sont favorables au développement de l'élevage de cette espèce dont la production annuelle mondiale dépasse 500.000 tonnes (Slembrouck *et al.*, 2004). Les juvéniles de l'espèce sont également prisés en aquariophilie.

### 1.5.3.2.2. *Pangasius conchophilus*

Sous-classe des Actinoptérygiens  
Ordre des Siluriformes  
Famille des *Pangasiidae*

Nom anglais : Sharp-nosed catfish  
Nom lao : Pa Ké

Taille max : 120 cm LS  
Poids max : -



La couleur de son dos est gris terne. Quand la bouche est fermée, la rangée des dents de la mâchoire supérieure est visible.

Cette espèce est originaire du continent asiatique (bassins du Mékong, de Bangpakong et de Chao Phraya en Thaïlande). Elle est présente dans les grandes rivières et pénètre les forêts inondées. On la trouve dans des zones de rapides mais aussi dans des zones profondes et lentes. Les juvéniles se nourrissent de crevettes et d'insectes. Les adultes se nourrissent principalement de mollusques qui sont plus prédominants dans le contenu stomacal que dans tout autre espèce de *Pangasius*, d'où le nom « *conchophilus* » (qui aime les mollusques en latin) et de crevettes, de fruits, d'insectes, etc. Cette espèce potamodrome, migre dans le Mékong le long de la frontière thaïlando-laotienne quand les niveaux d'eau et la turbidité commencent à augmenter. Elle se reproduit au début de la saison des pluies quelque part entre Kompong Cham et les chutes de Khone. *P. conchophilus* est une des espèces les plus importantes pour la pêche dans les environs des chutes de Khone durant le début de la saison des pluies de mai à juillet (Baird, 1998).

### 1.5.3.2.3. *Pangasius krempfi*

Sous-classe des Actinoptérygiens  
Ordre des Siluriformes  
Famille des *Pangasiidae*

Nom anglais : Krempf's catfish  
Nom lao : Pa Suay hang leuang

Taille max : 120 cm SL  
Poids max : 14 kg



Le corps est gris clair sur les côtés et l'abdomen, plus foncé voire bleu-argenté sur le dessus. Le ventre est très blanc. Les nageoires sont souvent jaunes ou roses. *P. krempfi* est omnivore et se nourrit de fruits, de feuilles, d'algues et de crustacés.

Cette espèce est assez unique parmi la famille des *Pangasiidae* car elle passe une partie de sa vie dans les eaux marines côtières comme *P. mekongensis* ou *P. pangasius* (Cacot,

communication personnelle). Considérée comme une espèce anadrome avec un cycle de vie ressemblant au saumon, elle migre dans le Mékong afin de se reproduire. Il a été présumé qu'au moins deux populations entreprennent la migration. Une population migre en mai-septembre du sud des chutes de Khone jusqu'aux sites de pontes situés quelque part en amont dans le Mékong s'étalant jusqu'à la frontière laotien-thaïlandais-Myanmar. L'autre population migre durant la saison des pluies de mai à août, en aval de Stung Treng vers des sites de ponte inconnus quelque part entre Stung Treng et Kompong Cham au Cambodge. *P. kremfpi* est une des espèces les plus importantes pour les pêcheurs locaux dans les environs des chutes de Khone de mai à juillet (Baird, 1998).

## 2. Conditions expérimentales

Ce chapitre a pour but de présenter tous les éléments communs aux différents thèmes abordés dans les chapitres suivants.

### 2.1. Les structures

Tous les poissons et larves de cette étude ont été stockés à la station de Ban Hat dans deux types de structure d'élevage : des cages flottantes et deux circuits d'élevage.

#### 2.1.1. Les cages flottantes

La station de Ban Hat, située à environ 50 mètres du Mékong, comprend 16 cages flottantes (Photo 1) pour une superficie totale avoisinant les 70 m<sup>2</sup>. Sur ces 16 cages, 10 mesurent 3 m de longueur sur 2 m de largeur et 2 m de hauteur soit un volume de 12 m<sup>3</sup>. Les 6 autres ne mesurent que 2 m de longueur sur 1,5 m de largeur et 2 m de hauteur pour un volume de 6 m<sup>3</sup>.

Toutes ces cages flottantes contenaient initialement des *P. hypophthalmus* et quelques tilapias (*Oreochromis niloticus*). Très vite, lorsque les premiers géniteurs des autres espèces ont été capturés, nous avons décidé de libérer quatre grandes cages pour stocker ces derniers. Une grande cage sera d'ailleurs recouverte de filet d'ombrage car elle contiendra tous les géniteurs de *C. microlepis*, espèce au comportement très sauteur. Les trois autres grandes cages serviront à stocker les géniteurs d'*H. wyckioides*. Par la suite, une grande cage qui contenait des géniteurs d'*H. wyckioides* sera libérée à nouveau pour permettre le stockage de quelques larves de *P. hypophthalmus*, de *C. microlepis* et d'*H. wyckioides*, réparties dans deux hapas.



Photo 1 : Cages flottantes de la station aquacole de Ban Hat

## 2.1.2. Le circuit de bacs principal

Ce circuit d'élevage a été mis en place et construit dès mon arrivée grâce à l'expérience que j'avais acquise lors de mon précédent stage en Bolivie. La première étape de construction du circuit a été effectuée par mon maître de stage et une équipe de travailleurs laotiens. Cette étape consistait à mettre en place une chape en béton avec deux drains sur lesquels reposent les bacs d'élevage et un bac de collecte d'eau enfoncé dans le sol. La deuxième étape de construction auquel j'ai participé, était de mettre en place les 8 bacs d'élevage et de réaliser tout le circuit d'eau avec des tubes en PVC et faire les connexions entre les différents bacs (§ annexe 1).



Photo 2 : Le circuit principal

Ce circuit est un circuit semi-fermé, c'est-à-dire que l'eau du circuit qui est constamment filtrée, reste la même continuellement. Cependant, il arrive parfois qu'on rajoute de l'eau de l'extérieur en grande quantité dans le circuit pour rétablir les volumes d'eau d'où le nom de circuit semi-fermé. Ce dernier, grâce à son eau filtrée, permet de stocker des géniteurs, d'incuber des œufs et d'élever des laves.

Ce circuit est constitué de 10 bacs au total. 8 d'entre eux constituent les bacs d'élevage proprement dit pour un volume de 800 litres chacun. Ces bacs en résine et de forme cylindro-conique sont disposés en deux séries de 4 bacs et chaque série est placée sur un drain qui a pour but de capter et canaliser les eaux de sortie des bacs. L'eau récoltée par les deux drains se jette dans un grand bac de collecte des eaux qui est enterré. Dès la sortie des drains et avant de se jeter dans le grand bac enterré, l'eau est filtrée une première fois grâce à de la mousse de kapokier qui sert de filtre mécanique. Puis cette eau de collecte va être renvoyée grâce à une pompe immergée de 250 ou 750 W dans un autre bac de 500 litres situé à deux mètres de hauteur et qui sert de château d'eau. Ainsi, ce bac de charge sert à distribuer de l'eau sous pression aux 8 bacs d'élevage mais sert aussi de filtre biologique grâce à des bioballes (balles en plastique) placées à l'intérieur du bac. Ces bioballes ont pour but d'éliminer l'ammoniaque présente dans l'eau en permettant aux bactéries nitrifiantes de se fixer et se développer. Ainsi, l'eau distribuée aux bacs d'élevage est filtrée mécaniquement et biologiquement grâce à la mousse de kapokier et aux bioballes.

### **2.1.3. Le circuit de bacs provisoire**

Ce circuit provisoire a été installé à la station aquacole de Ban Hat durant les mois d'avril, mai et juin pour les reproductions de *C. microlepis*, d'*H. wyckioides* et de *P. hypophthalmus*. Il avait pour but d'accueillir des géniteurs, mâles et femelles, durant les traitements hormonaux avant les reproductions. En fait, ce circuit est un circuit de stockage et non d'élevage. Il comprend trois, parfois quatre bacs en plastique de forme cylindrique et d'une capacité de 500 litres chacun. A la sortie des bacs, l'eau est collectée dans un autre bac servant de filtre. Ce filtre est constitué par de la mousse de kapokier et des graviers servant de support aux bactéries nitrifiantes. A l'intérieur du filtre, une pompe immergée renvoie l'eau filtrée dans un petit château d'eau qui sert à distribuer l'eau sous pression aux bacs. Afin de limiter le stress des géniteurs durant les traitements, il arrivait fréquemment de saler l'eau du circuit à 2 ou 3 g.l<sup>-1</sup>. Parfois aussi, on effectuait des traitements curatifs aux géniteurs en ajoutant du vert de malachite et de l'oxytétracycline dans le circuit.

### **2.1.4. Le laboratoire**

Dès mon arrivée, il a fallu remettre en état le laboratoire et le rendre fonctionnel. Pour cela, des étagères et un lavabo ont été construits et la table de travail (ou paillasse) remise en état. Ce laboratoire comprend essentiellement une loupe binoculaire, un microscope, une balance électronique précise au milligramme, des balances à cadrans, du matériel de dissection et un réfrigérateur contenant les hormones et les implants et toute sorte de produits chimiques.

Le laboratoire est le local où on effectue les diverses manipulations suivantes : les dissections, la fabrication de l'aliment et d'implants hormonaux, la mesure des ovocytes, l'observation du développement embryonnaire, les comptages de larves et du zooplancton et la préparation des doses pour les injections hormonales.

## **2.2. Les techniques de la reproduction artificielle**

### **2.2.1. Les traitements hormonaux classiques**

Le but du traitement hormonal ou induction hormonale est d'induire et d'accélérer l'ovulation et la spermiation en augmentant la quantité d'hormones hypophysaires dans l'organisme. Ce pic d'hormones va agir directement sur les organes reproducteurs et induire chez la femelle une transformation des ovocytes en ovules et une plus grande production de spermatozoïdes chez le mâle.

Ces traitements hormonaux se font grâce à des injections intramusculaires que l'on effectue généralement dans la musculature dorsale du poisson près de la nageoire dorsale. Les hormones utilisées lors de ces injections sont de forme liquide et s'appellent l'hCG (Human Chorionic Gonadotropin) et la LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone). Leur domaines d'intervention varient (§ annexe 2). L'une agit au niveau des gonades (l'hCG) et l'autre agit au niveau de l'hypophyse (la LHRH). L'hCG utilisée a été achetée au Viet Nam et est extraite d'urine de femme enceinte. La LHRH qui est une GnRH (Gonadotropin-Releasing

Hormone) provient d'un médicament que l'on trouve dans le commerce : le Suprefact™. Il est important de noter que pour toute injection de LHRH, on doit associer un antidopaminergique. En effet, la dopamine exerce un effet inhibiteur important sur l'action du GnRH sur l'hypophyse. L'administration conjointe d'un antagoniste dopaminergique permet de lever cette inhibition (Sokolowska *et al* 1985). Cet antidopaminergique utilisé provient d'un autre médicament : le Motilium qui contient de la dompéridone et qui est injecté à raison de 10 mg.kg<sup>-1</sup>. Ce Motilium est sous forme solide (cachet de 10 mg). Pour l'associer au Suprefact, chaque cachet doit être au préalable broyé avec un petit pilon dans un mortier pour obtenir une poudre la plus fine possible.

## 2.2.2. Les implants hormonaux

Ces implants hormonaux sont des implants contenant du GnRHa que nous avons fabriqué artisanalement (§ annexe 3) sur la base du protocole de Lee *et al.* (1986) avec une matrice de cholestérol (85 %) et de cellulose (15 %). La concentration en GnRHa dans l'implant pouvait varier selon notre choix. Ainsi nous avons pu réaliser des implants de 10, 25, 50, 75, 100 et 150 µg.

Voici le protocole de fabrication : faire une matrice avec 85 % de cholestérol et 15 % de cellulose que l'on mélange pendant 10 minutes. Ajouter le Suprefact™ (LHRHa 1 mg.ml<sup>-1</sup>) à la dose souhaitée (ex. 50 µg par implant) puis mélanger pendant 5 minutes. Sécher à 35–38°C avec un sèche cheveux sans oublier de mélanger plusieurs fois durant le séchage. Après le séchage, introduire de la margarine dans le mélange afin qu'elle représente 5 % du poids total. Le moule qui va servir à fabriquer les implants est constitué de deux plaques en plexiglas qui sont fixées l'une à l'autre ; une des deux plaques est percée par 23 trous (un trou par implant). On introduit le mélange obtenu précédemment dans les trous de moulage pour obtenir des implants ; la quantité versée dans chaque puits est de 17–18 mg. On presse bien le mélange versé dans chaque puits avec une tige métallique puis on sépare les plaques pour récolter les implants pesant chacun environ 16 mg ; ils mesurent 4 mm de longueur et 2,5 mm de diamètre. Ces implants pourront être conservés au frais (4-5 °C) pendant 2 mois (Cacot, communication personnelle).

### Exemple de fabrication :

Pour des implants de 50 µg :

- Faire 23 x 16 mg = 368 mg de mixture cholestérol/cellulose.
- Ajouter 50 µg x 23 de Suprefact = 1150 µg de LHRHa.
- Ajouter 19,4 mg de margarine après séchage.

## 2.2.3. La gestion des gamètes

### 2.2.3.1. Collecte et conservation du sperme

La récolte du sperme chez les mâles s'effectue à l'aide d'une ou plusieurs seringues de 3 ou 5 ml que l'on place à la sortie de l'orifice génital (annexe 4). Puis on effectue une pression sur l'abdomen au niveau des testicules de la partie antérieure vers la partie postérieure afin de faire sortir le sperme que l'on récolte avec précaution dans la seringue.

Attention, la récolte du sperme doit se faire en évitant tout contact avec l'eau ou l'urine. Sinon, le sperme s'active à cause du choc osmotique que procure le passage du

sperme de l'intérieur de l'individu dans l'eau. Il se trouverait activé et donc inutile pour la fécondation ultérieure. C'est pour cela que la seringue contient toujours 2 ml de sérum physiologique (à 9 g.l<sup>-1</sup> de NaCl) pour éviter ce choc osmotique et donc l'activation. Ainsi, après la récolte du sperme, on vérifie le contenu de la seringue pour voir si ce dernier n'a pas été activé par la présence d'eau ou s'il n'a pas été contaminé par de l'urine. Pour cela, on place une goutte de sperme sur une lamelle et on fait une mise au point au microscope (x 100 ou x 160) sur un amas de spermatozoïdes. Puis on active le sperme avec une goutte d'eau et on regarde au microscope si les spermatozoïdes bougent. Si le sperme s'active, cela signifie qu'il n'a pas été activé au préalable et que nous pouvons l'utiliser pour féconder.

Il est important de noter que le sperme peut être stocké au réfrigérateur jusqu'à 12 heures en gardant son pouvoir fécondant ce qui permet une certaine flexibilité dans le temps si la femelle n'ovule pas aux heures prévues.

### **2.2.3.2. Collecte des ovules**

Pour effectuer la récolte des ovules, il faut tout d'abord mettre la femelle quelques minutes dans un bac de 100-150 litres qui contient du tranquillisant (eugénol à 0,03 ml.l<sup>-1</sup>). Puis on sort la femelle du bac d'anesthésiant et on la dépose sur une table de travail pour effectuer la récolte. L'extraction des ovules se fait grâce à une pression abdominale que l'on exerce de la partie antérieure vers la partie postérieure au niveau du ventre de la femelle. La récolte des ovules se fait directement dans des bols en plastique ou des bassines que l'on place en dessous de l'orifice génital (annexe 4).

### **2.2.3.3. Fécondation et mise en incubation**

La fécondation s'effectue directement dans les bols dans lesquels on a récolté les ovules. Pour effectuer la fécondation, nous nous servons d'une plume d'oiseau qui va nous servir à mélanger les ovules et le sperme et donc de mettre le maximum de spermatozoïdes en contact avec les ovules. L'avantage de la plume d'oiseau, c'est qu'elle est assez souple pour ne pas endommager les ovules lors du mélange.

Après avoir pesé les bols, on injecte rapidement une faible quantité de sperme (de l'ordre de 1 ml) à l'aide d'une seringue et on commence à mélanger le tout avec la plume. Après avoir remué 1 minute, on injecte de l'eau pour activer le sperme et donc réaliser la fécondation. Puis on continue à remuer le tout durant 1 minute jusqu'à la fin de l'activation du sperme. En effet, le sperme des espèces concernées, s'active durant maximum 1 minute. Enfin, quand on considère que l'activation du sperme est terminée, on cesse de remuer et on dépose le contenu du bol dans les incubateurs (annexe 4).

### **2.2.3.4. Mesure des diamètres ovocytaires**

La mesure des diamètres ovocytaires est une manipulation qui est effectuée pour chaque espèce et pour chaque femelle qui a reçu ou non un traitement ovulatoire. Pour réaliser cette mesure, nous nous servons d'une loupe binoculaire contenant un micromètre dans un de ses objectifs. Les mesures sont effectuées en frais ou après conservation dans une solution, la solution de Gilson. Cette solution permet de conserver les ovocytes très longtemps (jusqu'à plusieurs mois) et permet surtout de dissocier les ovocytes les uns des autres ce qui facilite la

mesure. Pour préparer un litre de solution : il faut 60 ml d'éthanol, 920 ml d'eau, 15 ml d'acide nitrique, 9 ml d'acide acétique et 20 g de chlorure de mercure.

La distribution du diamètre ovocytaire nous permet premièrement de savoir si une femelle est assez mature ou non avant qu'elle ne reçoive un traitement hormonal. Elle nous permet aussi et surtout de suivre l'évolution de la taille des ovocytes durant et après un traitement hormonal. De plus, cette observation des tailles nous permet de savoir aussi si les ovocytes sont en train de se transformer en ovules et donc si la femelle est prête à ovuler et à être reproduite. Pour savoir si les ovocytes sont devenus des ovules, on se sert évidemment de la taille des ovocytes mais aussi d'un liquide appelé le liquide de Serra (60 % d'éthanol, 20 % de formol et 20 % d'acide acétique) qui va éclaircir les ovocytes et faire apparaître la vésicule germinale à l'intérieur de ce dernier. La migration puis l'éclatement de la vésicule germinale à l'intérieur de l'ovocyte va nous permettre de savoir si l'ovocyte est prêt ou non à devenir un ovule et donc de savoir si oui ou non il est fécondable.

## **2.3. Nourrissage et fabrication de l'aliment**

### **2.3.1. Méthode de nourrissage**

L'alimentation concerne uniquement l'élevage larvaire. En effet, durant tout le stage, les géniteurs n'ont pas été nourris excepté les géniteurs de *P. hypophthalmus* qui appartiennent au LARReC et qui sont destinés à la production. Ces derniers ont été nourris avec un granulé extrudé à 28% de protéines.

L'alimentation des larves se déroule en deux étapes à raison de 5 repas par jour. Premièrement les larves sont nourries avec du zooplancton (*moinas* et copépodes principalement) de J 3 à J 6 puis deuxièmement, l'alimentation des larves est faite avec un aliment sec artificiel de J 6 à la fin de l'élevage larvaire. Pour la transition entre ces deux étapes, une période de sevrage de deux jours environ, substitue progressivement le plancton par l'aliment sec.

L'alimentation des larves, espèce par espèce, sera détaillée dans le chapitre suivant dans la partie élevage larvaire.

### **2.3.2. Capture et maintien en vie du zooplancton**

Le début de l'alimentation des larves se fait donc avec des proies vivantes. Ainsi, lorsqu'une fécondation est réussie, du zooplancton doit être disponible dès le troisième jour après fécondation. Pour cela, tous les deux jours, à l'aube, dans un grand étang (environ 1500 m<sup>2</sup>) de la station de Ban Na sur l'île de Khong, on effectue la capture grâce à une poche en filet insérée dans un cadre métallique de 2 m sur 1. L'étang était fertilisé à la bouse de vache ; il est utilisé pour stocker des fingerlings en hapas. Notre « chalut » à plancton est tracté par deux personnes à la surface de l'étang. La maille du filet, assez fine pour capturer des *moinas* et des copépodes, permet ainsi de collecter le zooplancton (annexe 5). Il est important de noter que cette capture se fait très tôt le matin car le zooplancton a tendance à remonter à la surface pour respirer durant la nuit. En effet, à la fin de la nuit, la concentration en oxygène est au plus bas et le plancton va chercher l'oxygène à la surface.

Le plancton est distribué à raison de 3000 individus par litre environ. Afin d'assurer la conservation et la survie des *moinas* et de favoriser leur reproduction, le stock capturé est

conservé vivant dans un bac de 150 litres aéré protégé du soleil le jour, et maintenu à température (28°C) durant la nuit au moyen d'une résistance pour aquarium. Le stock de *moinas* reçoit une nourriture à base de levure de boulanger (2/3) et de spiruline (1/3) ; le mélange est distribué à raison de 30 mg.l<sup>-1</sup> une ou deux fois par jour. Cet aliment est également versé dans le bac des larves permettant ainsi une reproduction du plancton au sein même du bac d'élevage larvaire.

### 2.3.3. Fabrication de l'aliment sec

Cet aliment sec distribué durant et après le sevrage, est constitué à la base d'un aliment en poudre dit « starter » acheté dans le commerce ; très nutritif (40% de protéines et 6% de lipides). Il est d'utilisation courante pour l'alimentation des larves stockées en étang. On y ajoute un mélange d'autres ingrédients pour renforcer sa teneur en vitamines et lipides. Ce mélange est réalisé avec trois blancs d'œufs de poule (environ 200 g) auquel on ajoute de l'huile de soja, de l'huile de calamar et du premix vitaminique. On peut y adjoindre de façon facultative les jaunes d'œufs.

Lorsque le mélange est préparé, on ajoute une quantité suffisante d'aliment starter pour obtenir une pâte souple et modelable mais non collante. On pétri tout ça en ajoutant la quantité suffisante de poudre (aliment starter) jusqu'à obtenir la consistance souhaitable de la pâte. Puis on étale le tout pour le mettre à sécher. Après séchage grâce à un sèche cheveux, l'aliment est moulu dans un mixer électrique et passé au tamis afin d'obtenir différentes granulométries. Quatre mailles de tamis sont utilisées (deux tailles de micro-granulés ; la poudre la plus fine n'étant pas utilisée).



Photo 3 : Aliment sec passé au tamis.

### **3. La collecte et le stockage des poissons géniteurs**

Ce stage a nécessité l'utilisation de nombreux géniteurs sauvages mais, lors de mon arrivée sur la station aquacole de Ban Hat, la station était dépourvue de géniteurs. Ainsi, les premiers temps, il a fallu établir un réseau pour se procurer plusieurs géniteurs directement issus du milieu naturel. Nous avons établi un réseau de capture qui s'est déroulé en deux étapes successives : tout d'abord l'acquisition de *Cirrhinus microlepis* et *Hemibagrus wyckioides*, puis l'acquisition de *Pangasius krempfi* et *Pangasius conchophilus*. Ces deux étapes ne pouvaient que se dérouler l'une après l'autre à cause de la disponibilité des espèces sauvages dans le fleuve et des sites de capture différents.

#### **3.1 Acquisition de *Cirrhinus microlepis* et *Hemibagrus wyckioides***

Au total, plus d'une trentaine de géniteurs de *C. microlepis* et une quarantaine de *H. wyckioides* ont été capturés.

##### **3.1.1. Lieux et date de capture**

Tous les géniteurs sont issus du Mékong, et ont été capturés principalement dans les alentours de la station de Ban Hat. La capture de ces deux espèces se déroule durant les mois d'avril et de mai. En ce qui concerne *C. microlepis*, un grand nombre de géniteurs est capturé de mi-mai à fin mai lors de l'arrivée des premières pluies. En revanche, pour *H. wyckioides*, la capture s'effectue durant les deux mois de façon plus étalée.

##### **3.1.2. Méthodes de capture**

Les poissons sont capturés par des pêcheurs locaux au filet pour les géniteurs de *Cirrhinus microlepis* et à la ligne pour les géniteurs de *Hemibagrus wyckioides*. La mise en relation avec ces différents pêcheurs a été établie grâce notamment à Mr Charoun, personnage local expérimenté, qui a une grande connaissance de la zone et de nombreux contacts avec les pêcheurs locaux. Par la suite ces relations ont été entretenues en particulier par Somphanh Philavong. Sous leurs conseils avisés et afin de se procurer le maximum de géniteurs rapidement, plusieurs sites de captures sont choisis. Au total, cinq sites différents sont sélectionnés (deux îles : Don Sadam et Don Som, et trois villages sur la rive est du Mékong : Ban Thakho, Ban Hat puis Khina). Parmi ces sites, au début, nous avons essayé le site de Ban Thakho mais aucun poisson n'y a été pêché et nous l'avons remplacé par celui de Khina plus intéressant. Les sites de Don Sadam et Don Som sont tenus par des pêcheurs. En revanche, les sites de Khina et Ban Hat sont tenus par des commerçants ou "fish traders" ce qui permet de diffuser l'information aux divers pêcheurs des alentours et ce qui permet d'obtenir encore plus de géniteurs. Parmi le site de Ban Hat, en plus du site du fish trader, il arrive quotidiennement que des pêcheurs du village nous amènent directement en bateau des géniteurs au pied de la station sur la berge.



**Photo 4 : Géniteur de *Cirrhinus microlepis* apporté directement à la station par un pêcheur.**

Pour chaque site, il faut établir le contact avec les pêcheurs ou les "fish traders" pour leur demander premièrement de capturer ou se procurer des géniteurs vivants, puis négocier un prix au kilogramme et enfin leur demander s'ils acceptent de stocker les géniteurs dans une cage que nous laissons chez eux. Ces cages de stockage à l'armature métallique sont faites en filet et restent flottantes grâce à quatre flotteurs (jerricans en plastique) que nous avons attachés dans la partie supérieure de la cage. Les dimensions de la cage sont de 90 x 90 x 140 cm.



**Photos 5 a et b : Cage de stockage de Don Sadam**

Dès que quelques géniteurs (2 à 5) sont capturés et stockés dans la cage, les pêcheurs ou "fish traders" nous informent par téléphone et nous allons sur le site les chercher pour les ramener sur la station de Ban Hat.

### 3.1.3. Transport des géniteurs

Tous les géniteurs qui ont été capturés sur les différents sites, ont été transportés en voiture jusqu'à la station de Ban Hat. En ce qui concerne les sites de Don Sadam et Don Som, une partie du transport a été effectuée en pirogue car nous ne pouvions accéder sur ces îles qu'en bateau. Pour tout transport, les poissons sont placés dans un bac en plastique (de 300 litres pour le transport en voiture et de 150 litres pour le transport en bateau). Un deuxième bac de 150 litres peut servir pour le transport en voiture quand de nombreux poissons doivent être transportés. Afin de diminuer le stress provoqué par les diverses manipulations (pesée, biopsie, transport...), plusieurs précautions sont prises. Tout d'abord, nous refroidissons volontairement l'eau de transport avec de la glace pour diminuer l'activité du poisson. De plus, l'eau est aussi aérée grâce à une pompe à air électrique branchée sur batterie pour éviter une éventuelle asphyxie. Il est important de noter qu'une bouteille d'oxygène de secours est toujours emportée en cas d'une panne inattendue de la pompe électrique ou de la batterie. Nous avons pris aussi l'habitude de saler l'eau de transport (2 à 3 g/l de sel) pour réduire la perte d'ions du poisson liée au stress.

**Tableau 1 : Liste du matériel pour transporter les géniteurs**

<b>Matériels utilisés</b>	<b>Utilité</b>
Petit camion	Transport
Bac de 300 litres (et bac de 150 litres)	Stockage des poissons lors du transport en voiture
Bac de 150 litres	Stockage des poissons lors du transport en bateau
Batterie et câbles électriques	Source d'énergie pour la pompe à air
Pompe à air électrique + bulleurs	Aération de l'eau
Bouteille à oxygène	Oxygénation de secours
Sel	Pour augmenter la salinité des eaux de transport
Grande glacière + glace	Pour refroidir les eaux de transport
Pompe immergée + tuyau bleu + groupe électrogène	Remplissage des bacs de 800 et 500 litres
Seaux (10 litres et 20 litres)	Aide au remplissage des bacs
Nattes + corde	Couvrir les bacs pour pas que les poissons s'échappent lors du transport
Balance	Pour peser les poissons achetés
Brancards (petits et grands)	Pour transporter les poissons
Petite glacière	Pour stocker le petit matériel (canules, sel...)
Pipelles de Cornier	Pour effectuer des biopsies sur les femelles capturées
Bétadine	Pour soigner les éventuelles blessures des poissons
Tubes à essai + liquide de Gilson + marqueur	Pour stocker d'éventuels ovocytes pris après des biopsies.

### 3.1.4. Stockage des géniteurs sur la station

Dès leur arrivée sur la station, les géniteurs ont été stockés dans les cages flottantes situés au pied de la station (§2.1.1) ou bien dans les bacs du circuit provisoire.

Si un géniteur nous semble mûre, il est stocké soit directement en bac de stabulation du circuit provisoire (pour les géniteurs mûres de *Cirrhinus*), soit placé individuellement dans une petite cage flottante (pour les femelles mûres de *Hemibagrus*).

## 3.2. Acquisition de *Pangasius krempfi* et *Pangasius conchophilus*

Cette année, une quarantaine de *P. krempfi* et une dizaine de *P. conchophilus* ont été capturés.

### 3.2.1. Lieux et date de capture

La capture de ces deux espèces de la famille des Pangasiidae s'effectue sur une île appelée Don Nokassoun située à deux kilomètres seulement de la frontière cambodgienne dans la région des 4 000 îles et où l'accès ne peut se faire qu'en pirogue. Seul ce site nous permet de capturer et stocker des géniteurs vivants. Les captures s'effectuent avec des pièges spécifiques durant le début de la saison des pluies de mi-juin à fin juillet.

### 3.2.2. Méthodes de capture

La capture de ces *Pangasius* est réalisée dans des rapides avec des pièges immergés appelés "ly". Ces ly sont fabriqués artisanalement, sont constitués de tiges de bois et de bambou et ont été mis en place par des pêcheurs durant la saison sèche au moment où le niveau de l'eau du fleuve était le plus bas. Lorsque l'eau commence à monter avec le début de la saison des pluies, la partie basse des ly commence à être immergée et constitue ainsi un excellent piège pour capturer des poissons vivants. Les ly, en forme de tremplin, sont orientés face au courant pour permettre de capturer les poissons qui migrent vers l'amont. En effet, les poissons qui remontent les rapides ont du mal à nager de façon continue et lorsqu'ils se laissent emporter un peu par le courant, ils se retrouvent en contact avec le tapis en bambou du ly, perdent l'équilibre et se retrouvent alors projetés par la force du courant hors de l'eau sur le ly. La force du courant empêchant le poisson de repartir, il devient alors facile de se saisir de ce dernier. Afin de minimiser le temps de séjour du poisson sur le ly, il y a toujours au moins une personne qui veille sur le piège pour se saisir rapidement d'un éventuel géniteur.

Une fois le géniteur capturé, il est immédiatement pesé puis mis dans un bac d'anesthésiant contenant de l'eugénol (0,03 à 0,05 ml/l). Lors de cette anesthésie, le poisson est marqué avec une pastille en plastique, colorée, numérotée et attachée avec du fil nylon à l'épine osseuse d'une des nageoires pectorales. Puis nous cherchons à déterminer le sexe de l'individu capturé : soit en constatant l'émission de sperme pour les mâles après un léger stripping soit par le prélèvement d'ovocytes pour les femelles après une biopsie avec une pipette de Cornier.



**Photo 6 : Pièges ou ly pour capturer les géniteurs à Don Nokassoun  
(à gauche en saison sèche ; à droite au début de la saison des pluies)**



**Photo 7 : Géniteur *P. krempfi* piégé sur le ly**



**Photo 8 : Saisie du géniteur *P. krempfi***

### **3.2.3. Stockage des géniteurs à Don Nokassoun**

Le poisson pesé, marqué et sexé, est placé dans un grand bassin d'un volume d'eau de 14 m<sup>3</sup>. Ce bassin de 5,8 mètres de diamètre et de 0,6 mètre de profondeur en eau a été creusé dans le sable. Le fond et les parois du trou sont recouverts par une bâche plastifiée imperméable. L'eau du bassin est salée volontairement (4 g/l) pour diminuer le stress des poissons stockés. Au centre du bassin, nous délimitons un compartiment en plaçant une rangée circulaire de sacs de sable empilés les uns sur les autres à 1,5 m du bord, le bassin a donc une forme de tore. Ce compartiment a pour but d'empêcher les poissons stockés d'aller au centre du bassin où nous avons placé deux pompes immergées, l'une servant à amener l'eau dans un filtre biologique et l'autre servant à créer un courant dans le bassin. Les poissons nagent ainsi de façon circulaire dans le bassin généralement en remontant le courant. Enfin, pour éviter que la température de l'eau ne monte trop durant la journée, nous avons placé du filet d'ombrage au dessus du bassin. Nous avons ainsi stocké jusqu'à 40 poissons dans des conditions qui semblaient bonnes.



**Photo 9 : Bassin de stockage des géniteurs**

Nous avons tenté de reproduire certains géniteurs à Don Nokassoun. Pour cela, tout géniteur en cours de traitement hormonal est généralement placé dans une piscine autoportante. Parfois, certains géniteurs implantés restent dans le grand bassin. Au total, nous avons deux piscines autoportantes et chacune comporte un petit filtre biologique. Les dimensions de chaque piscine sont de 3,5 mètres de diamètre et de 0,6 mètre de hauteur soit environ 5-6 m<sup>3</sup> par piscine. La densité maximale est de six géniteurs par piscine ce qui nous permet de traiter au maximum douze géniteurs en même temps.



**Photo 10 et photo 11 : Piscine autoportante pour le stockage des géniteurs en cours de traitement.**

### **3.2.4. Transport des géniteurs**

Tous les géniteurs ne sont pas stockés à Don Nokassoun. En effet, une douzaine de géniteurs sont transportés à la station de Ban Hat pour pouvoir être reproduits dans des meilleures conditions expérimentales. Le transport est effectué dans des sacs plastiques remplis d'eau (environ 10 litres) et d'oxygène pur. Chaque sac ne contient qu'un seul poisson. Ce sac de transport est constitué de deux poches plastiques emboîtées l'une dans l'autre et

recouvertes par un sac en toile. Les sacs ont une forme spécialement allongée conçue pour réduire le volume du sac et ainsi le volume total de chargement. Les sacs contenant les poissons sont transportés par pirogue puis par voiture vers la station aquacole de Ban Hat. Une fois arrivés, les poissons sont placés dans les bacs d'élevage de 800 litres du circuit principal avec un grand renouvellement d'eau et une bonne oxygénation.



**Photo 12 : Remplissage à l'oxygène d'un sac de transport de géniteur**

## **4. Résultats**

### **4.1. La reproduction**

L'objectif majeur du projet de cette année était de réussir la reproduction artificielle de chaque espèce présenté précédemment (§ 1.5) en expérimentant divers traitements hormonaux jusqu'à trouver une méthode efficace et productive pour obtenir le maximum de larves.

Afin de simplifier la compréhension de cette partie, il sera présenté la reproduction, espèce par espèce, en expliquant dans un premier temps, les matériels et méthodes spécifiques, puis les résultats et enfin nous discuterons des informations obtenues et des perspectives envisageables dans l'avenir pour améliorer les techniques.

#### **4.1.1. *Cirrhinus microlepis***

L'étude sur la reproduction de cette espèce cette année fait suite au travail effectué par Philippe Cacot en 2005 au Laos (Cacot, 2005).

##### **4.1.1.1. Matériels et méthodes**

###### **4.1.1.1.1. Stockage des géniteurs**

- **Mâles**

Les mâles, généralement au nombre de 2 ou 3, sont stockés dans les bacs en plastique du circuit provisoire, bien oxygénés, avec un renouvellement d'eau permanent et couverts d'un filet d'ombrage fermement attaché pour empêcher les poissons de sauter hors du bac.

- **Femelles**

Pour chaque reproduction, une seule femelle est stockée dans un bac de 800 litres. Un mâle a été également mis dans le même bac pour les premiers essais en espérant une stimulation éventuelle, voire la fécondation des œufs. Ce bac est couvert avec du filet d'ombrage disposé en forme de tipi pour que les poissons puissent sauter sans tomber hors du bac. Un courant d'eau soutenu est induit grâce à une pompe immergée placée dans un bac de surverse qui récolte l'eau de sortie du bac. Le fait d'induire un courant permet de limiter le stress des poissons car en effet, c'est une espèce nageante habituée à vivre dans des eaux rapides. Au niveau de la sortie d'eau qui se jette dans le bac de surverse, nous plaçons une épuisette à plancton qui nous permet de savoir à quel moment la femelle expulse ses premiers ovules. Dès qu'un ovule se trouve dans l'épuisette, nous saisissons la femelle pour récolter tous ces œufs en effectuant un "stripping" (massage abdominal).



Photo 13 : bac de stockage pour la femelle *C. microlepis* en cours de traitement hormonal

#### 4.1.1.1.2. Traitements hormonaux et récolte des gamètes

##### ▪ Mâles

La quantité de sperme émise par un mâle *C. microlepis* étant très faible, deux à trois mâles sont généralement nécessaires pour fournir assez de sperme pour la fécondation des œufs d'une femelle, encore que nous ne savons pas exactement le pouvoir fécondant du sperme. Les mâles sont toujours injectés 12 heures à 16 heures avant la récolte du sperme avec du Suprefact à  $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRHa, associé à  $10 \text{mg.kg}^{-1}$  de Motilium qui contient du dompéridone, un produit antidopaminergique.

##### ▪ Femelles

Le même traitement hormonal a été appliqué à chaque femelle *C. microlepis*. La femelle reçoit, à chaque fois, deux injections d'hormone LHRH (Suprefact) espacée dans le temps et administrée sous deux formes différentes :

- ⇒ La première injection se fait sous forme solide, avec des implants de LHRHa (§2.2.2), pour une concentration de  $70 \mu\text{g.kg}^{-1}$  en moyenne. Pour l'implantation, la femelle est toujours anesthésiée au préalable dans un bac contenant un puissant anesthésiant : l'eugénol à une concentration d'environ  $0,03 \text{ml.l}^{-1}$ .
- ⇒ La seconde injection, qui intervient toujours 16 heures après l'implant, est sous forme liquide, avec  $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRHa (Suprefact) associé à du dompéridone (Motilium à  $10 \text{mg.kg}^{-1}$ ).

L'ovulation et la ponte de la femelle sont attendues environ cinq à sept heures après la seconde injection (temps variable en fonction de la température et de la physiologie de l'individu) et la récolte des ovules se fait par stripping dans une petite bassine bien séchée au préalable.

Lorsque les ovules sont tous récoltés, on ajoute directement le sperme sur ces derniers et on active le sperme en ajoutant de l'eau pour féconder les œufs (§2.2.3.3).

### 4.1.1.1.3. Incubation

Après fécondation, les œufs s'hydratent rapidement et se mettent à flotter. Afin de bien oxygéner les œufs, ils sont disposés dans un incubateur spécial, en tissu, qui est immergé dans un grand bac de 800 litres. Au fond de l'incubateur, une pompe immergée envoie un courant d'eau de bas en haut pour que les œufs soient toujours en mouvement dans l'incubateur.

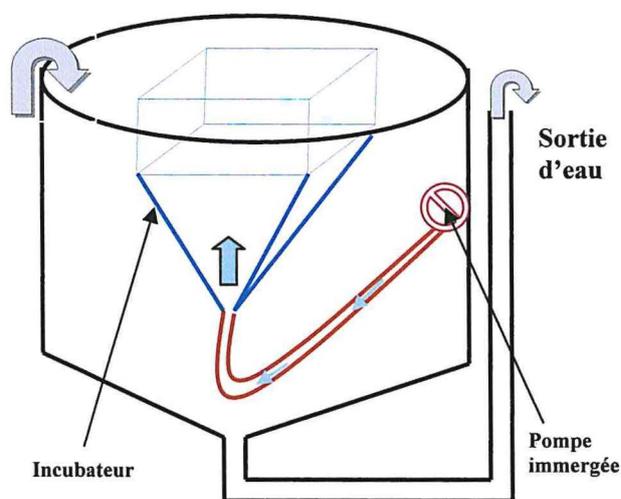
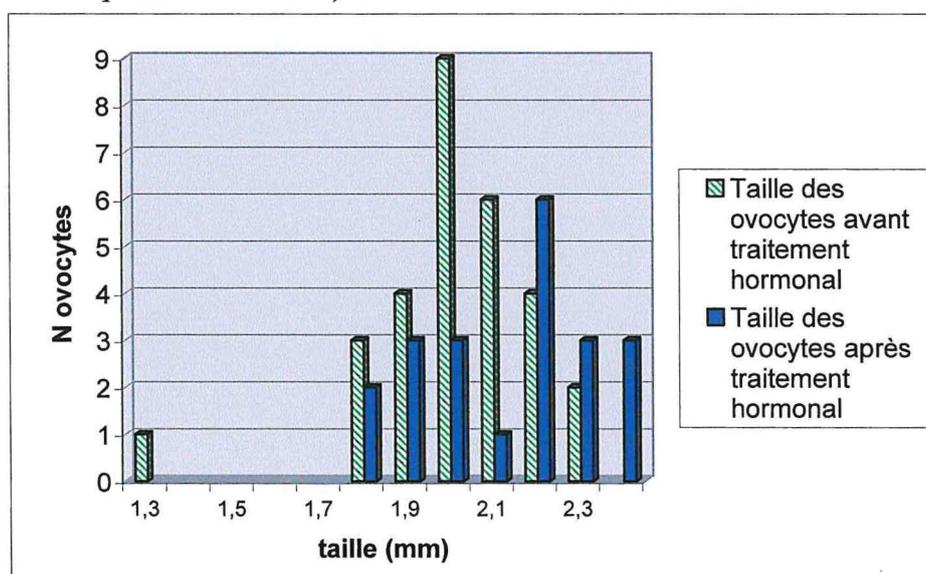


Photo 14 : Schéma et photo de l'incubateur pour les œufs de *Cirrhinus microlepis*.

### 4.1.1.2. Résultats

Toutes les femelles traitées ont reçu le même traitement hormonal (§4.1.1.1.2) et il a été observé à plusieurs reprises que ce traitement hormonal permettait aux ovocytes d'augmenter leur taille pour devenir donc des ovules prêts à être fécondés. Sur le graphique suivant, est présenté l'évolution de taille des ovocytes avant (au cours de la pose de l'implant) et après (durant la phase d'ovulation) le traitement hormonal chez une des femelles.



graphique 1 : Taille des ovocytes avant et après traitement hormonal chez une femelle *C. microlepis*

Au total, sur 12 femelles tentées à la station de Ban Hat, 7 ont ovulé et ont pu être fécondées. Les raisons pour lesquelles les autres femelles n'ont pas ovulé sont diverses : mort prématurée, erreur de manipulation lors de l'injection hormonale, femelle pas assez mûre, stripping trop tôt...

Le temps de latence entre la seconde injection hormonale et l'ovulation varie de 4:10 (h : min) à 10 heures en fonction des femelles. Ceci est dû à la physiologie de la femelle et à la température de l'eau : de 26,7°C pour une femelle de 7 heures à 30,8°C pour une femelle de 4:30 heures. Le poisson étant un animal poïkilotherme (ou "à sang froid"), il est normal que la vitesse de son métabolisme soit régulé par la température de l'eau ce qui peut expliquer ces différences au niveau des temps de latence pour chaque femelle.

Sur les 7 femelles qui ont ovulés, seulement 3 ont pu donner des larves avec des taux d'éclosion très faibles : 1 femelle à 40 % et 2 à moins de 10 %. Il a été observé que la durée du développement embryonnaire de cette espèce est très rapide. En effet, l'éclosion intervient entre 12 h 30 et 14 h 30 après la fécondation pour des températures avoisinants les 29,5°C.

Tableau 2 : Présentation des résultats chez *C. microlepis*

Poids vif (kg)	Temps de latence (h : mn) <sup>(c)</sup>	T. (°C)	Poids (g) des oeufs strippés	N ovules / g ovules	N ovules strippés	N ovules/kg PV	Taux d'éclosion (%)
1,6	10	-	<sup>(a)</sup> 5	-	-	-	0
1,8	5	-	<sup>(a)</sup> 80	-	-	-	0
2,5	4 :10	29	400	<sup>(b)</sup> 502	200 10 <sup>3</sup>	80 10 <sup>3</sup>	0
2,2	5	30,1	260	538	140 10 <sup>3</sup>	64 10 <sup>3</sup>	40
2,1	7	26,7	246	467	115 10 <sup>3</sup>	55 10 <sup>3</sup>	<10
2,9	4,5	30,8	456	<sup>(b)</sup> 502	228 10 <sup>3</sup>	78 10 <sup>3</sup>	<10
2,1	6	28,1	<sup>(a)</sup> 97	-	-	-	0
Moyenne (SD)	6 :05 (2 :10)	28,9 (1,6)	340 (103)	502	171 10 <sup>3</sup> (52 10 <sup>3</sup> )	69 10 <sup>3</sup> (12 10 <sup>3</sup> )	8,6

<sup>(a)</sup> : Données qui ne sont pas prises en compte dans le calcul de la moyenne et de la fécondité car les ovulations étaient certainement partielles.

<sup>(b)</sup> : Donnée extrapolée avec la moyenne des valeurs des deux femelles.

<sup>(c)</sup> : Délai entre la seconde injection et l'ovulation

#### 4.1.1.3. Discussion

La reproduction de *Cirrhinus microlepis* a donné de bons résultats dans l'ensemble. En effet, le traitement hormonal appliqué avec deux injections, une sous forme d'implant LHRHa (70µg.kg<sup>-1</sup>) et une sous forme liquide (30 µg.kg<sup>-1</sup> de LHRH + 10 mg.kg<sup>-1</sup> de dompéridone), espacées de 16 heures, a permis d'obtenir très fréquemment des pontes. En ce qui concerne les femelles qui n'ont pas eu de ponte, cela est dû souvent à des erreurs techniques ou parfois à la physiologie de la femelle, pas prête à être reproduite car pas assez mûre.

Un point qui restera à approfondir c'est la quantité de sperme réellement nécessaire pour assurer une bonne fécondation. Mais le principal problème qu'il faudra améliorer les années suivantes, est le taux d'éclosion très faible que nous obtenons à chaque fois. En effet, les taux de fécondation restent aux alentours de 90 % jusqu'à la quatrième heure après la fécondation puis, ces taux commencent à décroître fortement pour atteindre tout juste 10 % lors de l'éclosion. En fait, il semble important de ne pas bouger les œufs durant toute la phase de segmentation voire de gastrulation (Woynarovich, 1984). Afin d'améliorer les taux d'éclosion de cette espèce, le Dr Philippe Cacot a travaillé en parallèle dans la station aquacole du km 8 proche de Paksé. Il a expérimenté divers types d'incubateurs, changé les débits de l'eau qui met les œufs en suspension, fait varier les densités, etc... Il semblerait que le type d'incubateur qui convient doit être de petit volume avec une quantité importante d'œufs et un très faible débit de bas en haut durant les premières heures (Woynarovich, 1984). Malheureusement, aucun résultat significatif n'a encore été trouvé.

#### **4.1.2. *Hemibagrus wyckioides***

Très peu de données biologiques et écologiques existent sur *H. wyckioides* et l'élevage de cette espèce, pourtant à forte valeur marchande, est très peu exercée à travers le monde. Seuls quelques pays asiatiques comme la Thaïlande et le Vietnam, produisent ce poisson-chat mais à des quantités qui sont inconnues et certainement faibles. En ce qui concerne la reproduction artificielle d'*H. wyckioides*, rares sont les données excepté quelques rapports en thaïlandais. Ainsi, l'essentiel du travail effectué cette année sur cette espèce s'appuyait sur un travail déjà effectué par une étudiante Séverine Crouzet en 2003 au Vietnam avec Philippe Cacot (Crouzet, 2003).

##### **4.1.2.1. Matériels et méthodes**

###### **4.1.2.1.1. Traitements hormonaux et récolte des gamètes**

###### ▪ **Mâles**

Les mâles ne reçoivent généralement pas de traitement hormonal avant les reproductions et en ce qui concerne la récolte des gamètes, elle se fait obligatoirement après une dissection car, en effet, les mâles de cette espèce ne sont pas fluents (stripping impossible) et il est donc nécessaire de sacrifier les mâles pour prélever ces testicules et en extraire le sperme après un broyage de ces dernières. Cette manipulation qui prend une trentaine de minutes est assez délicate car premièrement elle oblige de tuer un mâle sans savoir si oui ou non il est bien mûre et deuxièmement elle demande une bonne maîtrise technique lors de la dissection et du broyage. Afin de ne pas activer le sperme, cette manipulation doit se faire toujours en milieu anhydre. Ce prélèvement du sperme se fait en plusieurs étapes successives :

- ⇒ Dissection du mâle et prélèvement des testicules
- ⇒ Nettoyage et rinçage des testicules avec du sérum physiologique
- ⇒ Dilacération des testicules aux ciseaux
- ⇒ Broyage et extraction du sperme

NB : Une fois prélevé, le sperme peut se conserver au réfrigérateur pendant plusieurs heures.

## ▪ Femelles

Pour cette espèce, nous avons effectué un traitement hormonal en plusieurs étapes. Tout d'abord, chaque femelle reçoit, durant quelques jours (3 à 6 jours), une fois par jour, à la même heure, une injection d'hCG à  $500 \text{ UI.kg}^{-1}$ . Ce type d'injection quotidienne s'appelle un traitement de finition ou priming. Quelques ovocytes sont prélevés par biopsie (ou canulation) à l'aide d'une pipette de Cornier au bout du troisième jour. Ces ovocytes prélevés sont observés à la loupe binoculaire (§2.2.3.4). Cette mesure de la taille des ovocytes nous permet d'observer le grossissement progressif de ces derniers et confirmer ainsi l'effet du traitement. Si la taille des ovocytes ne nous semble pas acceptable, nous continuons le traitement de finition. En revanche, si la taille nous paraît intéressante, nous lançons alors un traitement hormonal ovulatoire effectué en deux injections :

- ⇒ La première injection est un mélange d'hCG et de LHRH avec  $1\ 000 \text{ UI.kg}^{-1}$  d'hCG,  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRH et  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de dompéridone. Cette injection intervient toujours 8 heures après la dernière injection d'hCG à  $500 \text{ UI.kg}^{-1}$ .
- ⇒ La deuxième injection, appliquée 8 heures après la première, est aussi un mélange d'hCG et de LHRH mais à des doses plus fortes que la première injection soit  $3\ 000 \text{ UI.kg}^{-1}$  d'hCG,  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRH et  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de dompéridone.

NB : il est arrivé parfois que certaines femelles n'aient pas reçu exactement le même type de mélange d'hormones lors des deux injections. Cela sera précisé par la suite.

Après ce traitement ovulatoire, la ponte est attendue environ 10 heures après la deuxième injection. Cependant la température de l'eau peut faire varier ce temps de latence comme il a été expliqué précédemment chez *C. microlepis* (§4.1.1.2)

La récolte des gamètes de la femelle se fait après un massage abdominal (stripping) dans un petit récipient bien sec. Après la récolte, les œufs sont pesés et rapidement fécondés avec du sperme prélevé au préalable. Lorsque la fécondation est finie, les œufs sont mis en incubation.

### **4.1.2.1.2. Incubation**

Les œufs d'*Hemibagrus wyckioides* lorsqu'ils sont fécondés, deviennent collants. C'est pour cela que pour l'incubation, les œufs sont déposés sur une plaque en filet immergée dans un bac de 800 litres, bien oxygéné et avec un petit renouvellement d'eau.

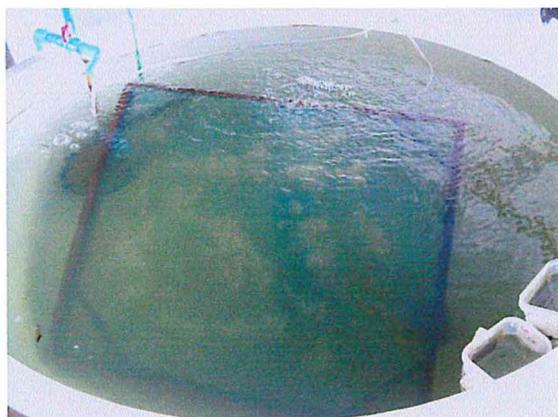


Photo 3 : Incubateur pour les oeufs de *H. wyckioides*

#### 4.1.2.2. Résultats

Au total, 17 femelles *Hemibagrus wyckioides* ont été utilisées pour être reproduites artificiellement. Sur ces 17 femelles, douze ont reçu un traitement hormonal semblable à celui décrit précédemment avec un traitement de finition plus un traitement ovulatoire en deux injections. Quatre ont reçu un autre type de traitement hormonal avec l'injection d'implants LHRHa pour une concentration de  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRHa. Malheureusement ce dernier type de traitement avec implants n'a donné aucun résultat et aucune ovulation n'a été observée sur ces quatre femelles Enfin, une femelle a reçu dans un premier temps un implant puis 9 jours après, elle a reçu un traitement hormonal avec des traitements de finition et un traitement ovulatoire (femelle n°3).

Le nombre de femelles traitées pour chaque type de traitement est décrit dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Récapitulatif des différents traitements et le nombre de femelles traitées

Traitement hormonal utilisé	Nombre de femelles traitées	Résultats
Implant de GnRH	5	0 ovulations
Traitement de finition (primings HCG)	13	11 traitements ovulatoires appliquées, 2 traitements abandonnés
Traitement ovulatoire avec HCG + LHRH + dompéridone	5	4 ovulations
Traitement ovulatoire avec LHRH + dompéridone	3	1 ovulation
Traitement ovulatoire avec LHRH	3	1 ovulation

Au total, six femelles ont ovulé et ont pu être reproduites. Ces six femelles qui n'ont pas toutes reçu le même type de traitement sont décrites ci-dessous.

#### **4.1.2.2.1. Femelle 1**

##### **Traitement hormonal**

Cette femelle de 5,3 kg a reçu deux types de traitement hormonal (6 primings à l'hCG) plus un traitement ovulatoire avec du LHRH associé à la dompéridone + de l'hCG effectué en 2 injections.

##### **Ovulation, fécondation et éclosion**

Deux mâles ont été sélectionnés pour la reproduction mais n'ont pas reçu de traitement hormonal. Ces 2 mâles ont été tués pour prélever leur sperme après broyage de leurs testicules. Ensuite la fécondation s'est effectuée avec un pool de sperme des 2 mâles.

La femelle a été strippée (massage abdominal) 10 heures après la seconde injection hormonale : 325 g d'ovules ont été récoltés.

L'éclosion des larves est apparue 24 heures après la fécondation pour une température d'incubation avoisinant les 30°C.

#### **4.1.2.2.2. Femelle 2**

##### **Traitement hormonal**

Cette femelle de 4,3 kg a reçu deux types de traitement hormonal (4 priming à l'hCG à 500 UI.kg<sup>-1</sup>) plus un traitement ovulatoire avec du LHRH associé à la dompéridone + de l'hCG effectué en 2 injections.

##### **Ovulation, fécondation et éclosion**

Au préalable un mâle de 3 kg a été injecté avec du Suprefact à 30 µg.kg<sup>-1</sup>. Cependant lors du prélèvement de ses testicules, leur taille trop petite nous a obligé à changer de mâle. Ainsi, un autre mâle a été sélectionné pour la reproduction mais qui n'avait pas reçu de traitement hormonal. Ce mâle a été tué pour prélever son sperme après broyage de ses testicules.

La femelle a été strippée (massage abdominal) 9 h 15 après la seconde injection hormonale : 220 g d'ovules ont été récoltés.

L'éclosion des larves est apparue 23 heures après la fécondation pour une température d'incubation comprise entre 29,5 et 32 °C.

**NB :** Pour cette femelle, les larves éclosent sont pour la plupart déformées (environ 80 %), plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela :

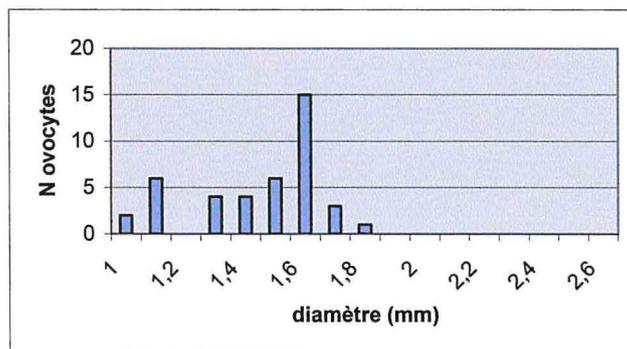
- Femelle strippée trop tardivement
- Chute de la température pendant la nuit
- Nouveau circuit trop vite mis en eau

### 4.1.2.2.3. Femelle 3

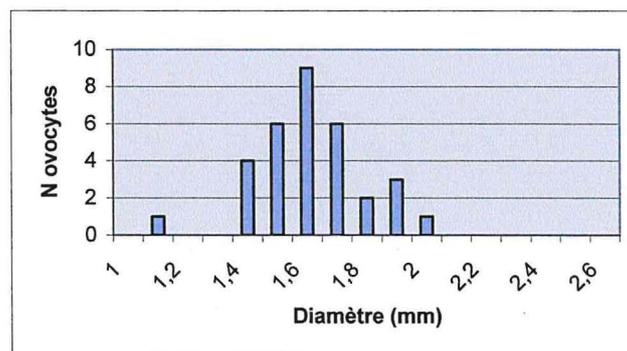
#### Traitement hormonal

Cette femelle de 4,5 kg a reçu un de traitement hormonal soit 7 primings avec de l'hCG à  $500 \text{ UI.kg}^{-1}$  puis deux injections de LHRH + dompéridone associée à du hCG. La première injection comprenait  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRH (suprefact) +  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de dompéridone +  $1000 \text{ UI.kg}^{-1}$  d'hCG. La deuxième injection, 8 heures après, comprenait  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRH (Suprefact) +  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de dompéridone +  $3000 \text{ UI.kg}^{-1}$  d'hCG. Au préalable cette femelle avait reçu des implants LHRH à  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$  mais qui n'avait pas fait ovuler la femelle.

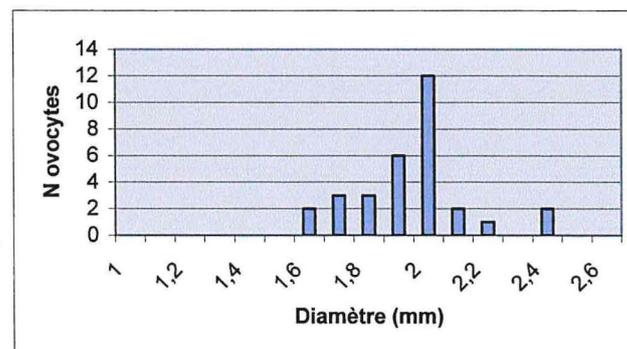
L'effet du traitement hormonal a pu être observé chez cette femelle en observant l'évolution de taille des ovocytes avant et après traitements de finition et aussi avant l'ovulation.



graphique 2 : Diamètre des ovocytes avant les traitements de finition



graphique 3 : Diamètre des ovocytes après les traitements de finition



graphique 4 : Diamètre des ovocytes après le traitement ovulatoire, avant l'ovulation

## **Ovulation, fécondation et éclosion**

Un mâle de 6 kg a été utilisé pour reproduire cette femelle. Ses testicules ont été prélevés après dissection le 18 mai à 7 h 45. Pour obtenir le sperme nous avons effectué un broyage des testicules. Le poids de ses testicules était de 14,137 g.

La femelle a été strippée 9 heures après la seconde injection hormonale : 142,5 g d'ovules ont été récoltés.

L'éclosion des larves est apparue 28,5 heures après la fécondation pour une température d'incubation de 28°C.

**NB :** Lors du stripping, un parasite (vers rouges) a été expulsé par la papille génitale. Ce parasite jusqu'ici non identifié vit dans l'oviducte voire dans les ovaires. On ne sait pas encore s'il est hématophage ou s'il se nourrit des ovocytes de son hôte.

### **4.1.2.2.4. Femelle 4**

#### **Traitement hormonal**

Cette femelle a reçu un de traitement hormonal soit 4 primings avec de l'hCG à 500 UI.kg<sup>-1</sup> puis deux injections de LHRH + dompéridone associée à du hCG. La première injection comprenait 10 µg.kg<sup>-1</sup> de LHRH (suprefact) + 10 mg.kg<sup>-1</sup> de dompéridone + 1000 UI.kg<sup>-1</sup> d'hCG. La deuxième injection, 8 heures après, comprenait 50 µg.kg<sup>-1</sup> de LHRH (suprefact) + 10 mg.kg<sup>-1</sup> de dompéridone + 3000 UI.kg<sup>-1</sup> d'hCG.

## **Ovulation, fécondation et éclosion**

Le même mâle que celui utilisé pour la femelle 3 a permis de reproduire cette femelle. La femelle a été strippée 8 h 30 après la seconde injection hormonale : 165,5 g d'ovules ont été récoltés.

**NB :** Lors du stripping, le même parasite (vers rouges) que pour la femelle 3 a été expulsé par la papille génitale.

L'éclosion des larves est apparue 28 heures après la fécondation pour une température d'incubation de 28°C.

### **4.1.2.2.5. Femelle 5**

#### **Traitement hormonal**

Cette femelle a reçu un priming à l'hCG à 500 UI.kg<sup>-1</sup> le 20 mai à 8 h 40. Puis, un traitement ovulatoire fut lancé après, avec du Suprefact en deux injections. La première injection, le 20 mai à 16 h 00, avec 10 µg.kg<sup>-1</sup> de LHRH et la deuxième, le 21 mai à 00 h 00 avec 50 µg.kg<sup>-1</sup> de LHRH.

### **Ovulation, fécondation et éclosion**

Un mâle a été utilisé pour cette reproduction. Son poids était de 4 kg. Ces testicules ont été prélevés après dissection, broyés puis nous avons récoltés le sperme. Le poids des testicules était de 6,10 g.

La femelle a bien répondu au traitement. En effet, 17 heures après la deuxième injection, l'ovulation a été observée et la fécondation tentée.

Malheureusement aucune larve n'a été obtenue. Plusieurs hypothèses sont émises :

- Soit les œufs avaient surmaturé et ont été prélevés trop tardivement.
- Soit le traitement hormonal n'a pas assez été efficace.

#### **4.1.2.2.6. Femelle 6**

##### **Traitement hormonal**

Cette femelle de 5,8 kg a reçu différents traitements hormonaux soit 6 primings avec de l'hCG à  $500 \text{ UI.kg}^{-1}$  puis deux injections de LHRH + dompéridone. La première injection comprenait  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRH (Suprefact) +  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de dompéridone. La deuxième injection, 8 heures après, comprenait  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRH (Suprefact) +  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de dompéridone.

##### **Ovulation, fécondation et éclosion**

Un mâle de 3 kg a été utilisé pour reproduire cette femelle. Ses testicules ont été prélevés après dissection. Pour obtenir le sperme nous avons effectué un broyage des testicules. Le poids de ses testicules était de 10 g.

Environ 14 heures après la seconde injection ovulatoire, la femelle est strippée : 114 g d'œufs sont récoltés. La fécondation est tentée et réussie.

L'éclosion a été observée 27 heures après la fécondation pour une température d'incubation de  $26,5 - 28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Un récapitulatif des résultats obtenus par ces six femelles est présenté par la suite dans le tableau 4.

Tableau 4 : Récapitulatif des femelles *H. wyckioides* qui ont ovulé

N° femelle	Poids (kg)	Traitement de finition (N inj. x dose UI.kg <sup>-1</sup> )	Traitement ovulatoire				Temps de latence (heures)	Température (°C)	Poids (g) des œufs strippés	N ovules / g ovules	Fécondité (N ovules)	N ovules / kg PV	Ecllosion	Taux d'éclosion (%)
			1 <sup>ère</sup> injection		2 <sup>ème</sup> injection									
			Hormone	Dose	Hormone	Dose								
1	5,3	6 x 500	hCG LHRH Dompé.	1000 10 10	hCG LHRH Dompé.	3000 50 10	10	29 - 30,5	325	240	75,5 10 <sup>3</sup>	14,2 10 <sup>3</sup>	oui	91,3
2	4,3	4 x 500	hCG LHRH Dompé.	1000 10 10	hCG LHRH Dompé.	3000 50 10	9,2	30	220	198	43,5 10 <sup>3</sup>	10,1 10 <sup>3</sup>	oui	60
3 <sup>(a)</sup>	4,5	7 x 500	hCG LHRH Dompé.	1000 10 10	hCG LHRH Dompé.	3000 50 10	9	29 - 30,5	143	254	36,2 10 <sup>3</sup>	8 10 <sup>3</sup>	oui	93
4	3,6	4 x 500	hCG LHRH Dompé.	1000 10 10	hCG LHRH Dompé.	3000 50 10	8,5	29 - 30,5	166	252	41,5 10 <sup>3</sup>	11,7 10 <sup>3</sup>	oui	67
5	4	1 x 500	LHRH	10	LHRH	50	17	27,5- 29,5	112	236 <sup>(b)</sup>	26,4 10 <sup>3</sup> <sup>(b)</sup>	6,6 10 <sup>3</sup> <sup>(b)</sup>	non	0
6	5,8	6 x 500	LHRH Dompé.	10 10	LHRH Dompé.	50 10	14	26,5- 29,5	114	250 <sup>(c)</sup>	28,5 10 <sup>3</sup> <sup>(c)</sup>	4,9 10 <sup>3</sup> <sup>(c)</sup>	oui	20
Moyenne	4,6	4,7	-	-	-	-	11,3	29,3	180	236	49,1 10 <sup>3</sup>	11 10 <sup>3</sup>	-	55,2
(SD)	(0,8)	(2,2)	-	-	-	-	(3,4)	(0,9)	(81)	(26)	(17,8 10 <sup>3</sup> )	(2,6 10 <sup>3</sup> )	-	(38)

<sup>(a)</sup> : Cette femelle a reçu au préalable un implant de LHRHa de 100 µg.kg<sup>-1</sup>

<sup>(b)</sup> : Donnée extrapolée avec la moyenne des valeurs des autres femelles

<sup>(c)</sup> : Estimation

### 4.1.2.3. Discussion

Le traitement hormonal classique présenté en 4.1.2.1.1, choisi pour les femelles de *H. wyckioides* est efficace car nous avons obtenu diverses pontes et réussi à obtenir de nombreuses larves.

Si l'on regarde les résultats des 2 femelles (femelles 5 et 6) qui n'ont pas reçu le même type de traitement, c'est-à-dire sans hCG en traitement ovulatoire. En ce qui concerne la femelle 5, elle n'a reçu qu'un traitement de finition avec une seule injection d'hCG et un traitement ovulatoire sans hCG et sans dompéridone. Cette femelle a ovulé mais la fécondation fut nulle. Pour la femelle 6, elle a reçu plusieurs traitements de finition (6) et du dompéridone a été injecté lors du traitement ovulatoire. Cette femelle, en revanche, a ovulé, la fécondation a été réussie et on a obtenu un taux d'éclosion de 20 %. On peut donc se poser la question de savoir si oui ou non l'hCG est utile lors du traitement ovulatoire puisqu'on a obtenu des larves chez la femelle 6 même si le taux d'éclosion reste faible. De plus, l'utilisation du dompéridone peut être mis en cause aux yeux de ce qui s'est passé avec la femelle 5 puisque nous avons obtenu quand même une ovulation. En revanche, il semble indispensable d'effectuer plusieurs traitements de finition à l'hCG pour réussir la reproduction. Ainsi, pour la femelle 5, on ne sait pas si le fait de n'avoir pas réussi la fécondation vient du fait de n'avoir pas mis de dompéridone dans le traitement ovulatoire ou si c'est parce qu'on n'a pas fait assez de traitements de finition ou simplement si c'est dû uniquement à cette femelle.

### 4.1.3. *Pangasius hypophthalmus*

La reproduction et l'obtention de larves sont bien maîtrisées chez cette espèce en Asie du Sud-Est, en particulier au Vietnam. Mais cette année, nous avons travaillé sur *P. hypophthalmus* pour essayer d'obtenir des larves avec un autre traitement hormonal, c'est-à-dire avec des implants de LHRHa. D'ailleurs, nous nous sommes servis des résultats de nos diverses expérimentations pour appliquer ultérieurement ce type de traitement chez une espèce voisine : *P. krempfi*.

Deux expérimentations ont été effectuées. La première avait pour but de voir si un traitement hormonal avec des implants est aussi voire plus efficace qu'un traitement hormonal dit classique avec deux injections d'une solution de LHRHa et dompéridone. La deuxième expérimentation avait pour but tester un effet dose-réponse des implants hormonaux pour induire une ovulation.

#### 4.1.3.1. Première expérimentation

##### 4.1.3.1.1. *Matériels et méthodes*

##### 4.1.3.1.1.1. Traitements hormonaux

- Mâle

Un lot de 10 mâles matures est sélectionné et stocké dans un des bacs du circuit provisoire. Pour cette expérimentation, seul 3 mâles ont été utilisés et injectés avec  $15 \mu\text{g.kg}^{-1}$

de LHRH + 10 mg.kg<sup>-1</sup> de dompéridone. Les mâles ont été strippés 4 heures après l'injection et nous nous sommes servi d'un pool de sperme des 3 mâles pour la fécondation.

▪ **Femelle**

Deux lots de 6 femelles sont constitués. Chaque lot est stocké dans un bac du circuit provisoire.

Un lot de femelles reçoit un traitement de LHRH + dompéridone en deux injections : 1<sup>ère</sup> injection 15 µg.kg<sup>-1</sup> de LHRH + 10 mg.kg<sup>-1</sup> de dompéridone et 2<sup>ème</sup> injection 30 µg.kg<sup>-1</sup> de LHRH + 10 mg.kg<sup>-1</sup> de dompéridone ; le temps de latence entre les 2 injections est de 6 heures.

L'autre lot de femelles reçoit des implants de LHRHa ajustés pour une dose par kilogramme de poids vif de 100 µg.kg<sup>-1</sup>. Pour reconnaître les femelles entre elles nous avons établi un code de différenciation en effectuant une découpe avec un ciseau sur les nageoires pectorales et pelviennes.

**NB :** Toutes manipulations du type pose d'implant ou stripping sont effectuées après un bain anesthésiant avec de l'eugénol (essence du clou de girofle) de 0,03 à 0,05 ml.l<sup>-1</sup>.

**4.1.3.1.1.2. Incubation**

Les œufs fécondés ont tous été stockés dans un même bac sur divers filets qui leur ont servis de support. L'eau du bac d'environ 30°C était aérée avec un bulleur. Quelques heures après, les filets contenant les œufs ont été transférés dans un bac du circuit provisoire où étaient stockés les géniteurs. Les taux de fécondation ont pu être déterminés grâce à un échantillon d'œufs qui a été placé dans une barquette distincte pour chaque femelle.

**4.1.3.1.2. Résultats**

**Traitement standard avec LHRH et dompéridone**

Sur les 6 femelles traitées avec du LHRH associé à du dompéridone, deux ont ovulé et une a pu être fécondée.

**Tableau 5 : Résultats du traitement avec LHRH et dompéridone sur des femelles *P. hypophthalmus***

N° femelle	Poids (g)	LF (cm)	Ovulation	Temps de latence (h : mn)	Poids ovules strippés (g)	Fécondité (g oeufs/kg PV)	Taux de fécondation (%)
0	580	35	Oui	17 : 30	15,11	26	Echec
1	590	35	Oui	9	21,92	37,2	85
2	520	32,4	Non	-	-	-	-
3	710	34,9	Non	-	-	-	-
4	914	37	Non	-	-	-	-
5	640	33,5	Non	-	-	-	-

### Traitement avec implants

Sur les 6 femelles traitées avec des implants, 4 ont ovulé correctement.

**Tableau 6 : Résultats du traitement avec implants sur des femelles *P. hypophthalmus***

N° femelle	Poids (g)	LF (cm)	Ovulation	Temps de latence (h : mn)	Poids ovules strippés (g)	Fécondité (g oeufs/kg PV)	Taux de fécondation (%)
0	720	35,5	Non	-	-	-	-
1	720	35,5	Partielle	21 : 30	8,66	12,0	0
2	650	34,2	Oui	16	40,01	55,6	64
3	565	33,8	Oui	21	25,65	43,4	59,6
4	650	34,5	Oui	14	124,4	80,9	91,5
5	430	31,5	Oui	14	39,38	91,6	79,5

#### **4.1.3.1.3. Discussion**

Dans cette expérimentation le traitement hormonal avec des implants est plus efficace que le traitement standard puisque 4 femelles sur 6 ont ovulé. Le traitement appliqué avec du LHRH associé à du dompéridone est moins efficace puisque seulement 2 femelles sur 6 ont ovulé. L'avantage du traitement avec implant est que l'on manipule le poisson qu'une seule fois ce qui entraîne moins de stress qu'avec un traitement au LHRH en deux injections. Mais cette expérience n'a été qu'une première expérience dont l'objectif était de savoir si un traitement hormonal avec implants pouvait faire ovuler une femelle *P. hypophthalmus* et au bout de combien de temps. Cette expérimentation ayant de bons résultats, nous avons décidé d'effectuer une autre expérimentation pour savoir pour quelle dose en LHRH, l'implant semble le plus efficace.

L'avantage de l'implant est que l'hormone diffuse progressivement ; ce traitement est à la fois moins « abrupt » mais plus soutenu que des injections classiques. Il est probablement mieux adapté à des poissons qui nécessitent un traitement plus long.

Il y a probablement un effet négatif du stress causé par le stockage des femelles toutes ensemble dans le même bac. La fécondité par kilogramme décroît des premières femelles strippées à la dernière ; la capture répétée des femelles avant l'ovulation est probablement nuisible. D'où l'idée de séparer individuellement les femelles pour la suite.

#### **4.1.3.2. Deuxième expérimentation**

##### **4.1.3.2.1. Matériels méthodes**

Le but est de tester l'effet d'un traitement hormonal sur plusieurs femelles de *Pangasianodon hypophthalmus* avec des implants de LHRH à différentes concentrations. Les concentrations testées sont  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  et  $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRH avec 4 femelles par dose.

L'expérimentation a été réalisée en 2 étapes. Dans un premier temps, du 3 au 4 juin, nous avons manipulé avec 6 femelles et 2 mâles. Puis dans un deuxième temps du 5 au 6 juin, nous avons manipulé avec 8 femelles et 4 mâles.

Du 3 au 4 juin :

- **Mâles**

Quatre mâles spermiantes ont été collectés dans une des cages flottantes de la station de Ban Hat et stockés dans un bac de 150 litres. Les 4 mâles ont été injectés et ont reçu un traitement hormonal avec du suprefact à  $15 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRH et  $10 \text{mg.kg}^{-1}$  de dompéridone. Les injections ont été effectuées le 3 juin à 19 h 00. Pour la fécondation, deux mâles ont été strippés à 11 h 00 le 4 juin et leur sperme a été récolté et mélangé.

- **Femelles**

Six femelles ont été collectées dans une des cages flottantes de la station de Ban Hat et stockées dans deux bacs de 800 litres. Ainsi, nous avons disposé trois femelles par bac (bacs B1 et A2), isolée l'une de l'autre pour faciliter la capture. Chaque femelle était en fait placée dans une petite cage individuelle faite en grillage plastique.



Photo 4: Cages en grillage plastique pour isoler les femelles dans le bac de 800 litres.

Tableau 7 : Liste des femelles et doses d'implants qu'elles ont reçu

N° de la femelle	Poids (g)	Bac de stockage	Concentration d'hormone souhaitée ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Concentration d'hormone réellement injectée ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )
1	750	B1	100	100
2	900	B1	100	?
3	800	B1	50	43,75
4	1 000	A2	50	50
5	900	A2	25	27,8
6	1 000	A2	25	25

#### Du 5 au 6 juin

##### ▪ Mâles

Le 5 juin à 18 h 00, 4 mâles ont été capturés dans la cage du Mékong et stockés dans un bac de 150 litres. Deux mâles ont été strippés le 6 juin à 10 h 00.

##### ▪ Femelles

8 femelles ont été capturées pour cette manipulation. 3 ont été placées individuellement dans 3 petites cages en grillage plastique situées dans un bac de 800 litres appelé B1. Une autre femelle a été placée individuellement dans une petite cage en grillage plastique dans un autre bac de 800 litres appelé A2. Enfin, les 4 autres femelles restantes (qui ont reçu la dose de  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) ont été placées deux à deux dans 2 petites cages en grillage plastique du bac A2.

**Tableau 8 : Liste des femelles et doses d'implants qu'elles ont reçu**

N° de la femelle	Poids (g)	Bac de stockage	Concentration d'hormone souhaitée (µg/kg)	Concentration d'hormone réellement injectée (µg/kg)
1	700	B1	50	50
2	600	B1	25	25
3	500	B1	50	50
4	800	A2	25	25
5	700	A2	100	107
6	650	A2	100	92
7	700	A2	100	107
8	750	A2	100	100

#### 4.1.3.2.2. Résultats

Ici dans le tableau ci-dessous, sont présentés les résultats obtenus chez toutes les femelles. Une femelle n'apparaît pas dans le tableau, la femelle n°1 de l'expérience 1 car une erreur de manipulation, nous a obligé à ne pas la compter dans les résultats.

**Tableau 9 : Récapitulatif des résultats obtenus**

Expérience <sup>(a)</sup>	N° femelle	Poids (g)	N poisson / cage	Dose (µg.kg <sup>-1</sup> )	Résultats
1	6	1 000	1	25	Début du processus d'ovulation
1	5	900	1	28	Surmaturation
2	2	600	1	25	Bonne ovulation (22 g oeufs)
2	4	800	1	25	Début du processus d'ovulation
1	3	800	1	44	Bonne ovulation (46 g oeufs) mais pas d'éclosion
1	4	1 000	1	50	Bonne ovulation (92 g oeufs) mais pas d'éclosion
2	1	700	1	50	Début du processus d'ovulation
2	3	500	1	50	Bonne ovulation (34 g oeufs) mais pas d'éclosion
2	6	650	2	92	Pas d'ovulation mais présence de quelques ovules
2	8	750	2	100	Pas d'ovulation mais présence de quelques ovules
2	5	700	2	107	Ovulation partielle (stripping difficile)
2	7	700	2	107	Ovulation partielle (stripping difficile)

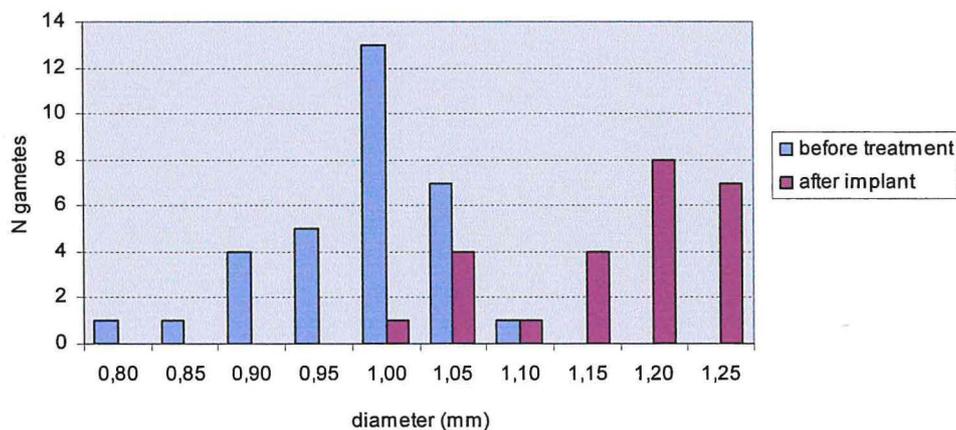
<sup>(a)</sup> : Expérience 1 du 3-4 Juin ; Expérience 2 du 5-6 Juin

Les quatre bonnes ovulations ont été obtenues avec 2 femelles de l'expérience 1 et deux femelles de l'expérience 2. Cette observation indique qu'il n'y a probablement pas d'effet expérience pour les doses de 25 et 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Il y a un effet positif des doses de 25 à 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  puisque le taux d'ovulation est de 33 % et 75 % respectivement. Pour les deux traitements ensemble, les trois autres femelles avaient commencé le processus d'ovulation mais n'ont pas atteint l'ovulation car les ovocytes étaient bloqués en GVBD.

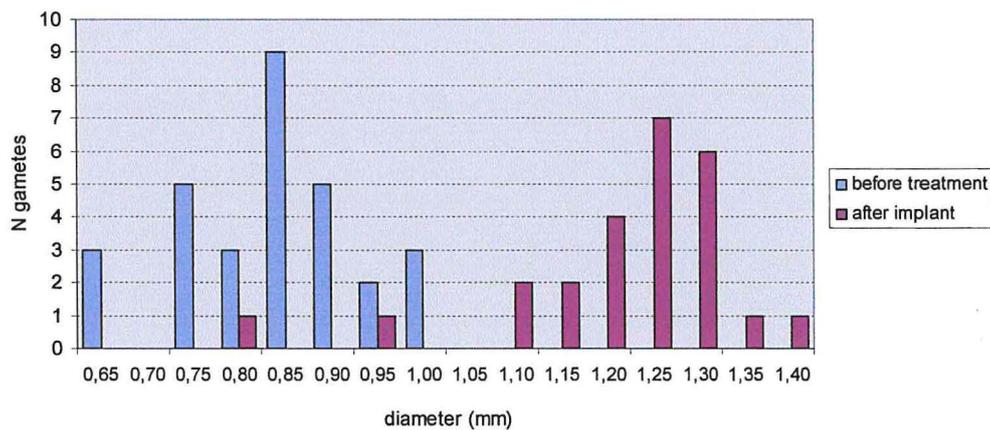
Il n'y a pas d'ovulation avec 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  bien que les 4 femelles allaient atteindre l'ovulation. Ce résultat est assez surprenant car nous avons obtenu de bons taux d'ovulation dans l'expérimentation précédente (4 femelles sur 6). Dans l'expérimentation présente, il faut noter que les poissons étaient stockés avec deux poissons par petite cage. Ainsi, on peut se demander s'il n'y a pas eu un effet négatif de stress dû au condition de stockage. Idéalement, la dose de 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  devrait être testé à nouveau avec des femelles stockées individuellement dans la petite cage.

Le diamètre des gamètes prélevés de 10 femelles est de  $0.99 \pm 0.11$  mm avant traitement et  $1.05 \pm 0.08$  mm après l'injection. Ils ne sont pas significativement différents. Mais si on considère les diamètres individuellement, ça a augmenté significativement chez 5 femelles de  $0.94 \pm 0.11$  mm à  $1.12 \pm 0.08$  mm et le coefficient de variation a diminué de 12,2% à 6,8% ce qui indique que les distributions sont devenues plus homogène. Parmi ces femelles, quatre ont été induites avec 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et une avec 25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . L'augmentation la plus forte est présentée dans les graphiques suivants pour les femelles n°2, 6 et 8. Il est important de noter que la proportion de gros ovocytes (diamètre  $\geq 0,9$  mm) est passée de 33% à 96% pour la femelle n°6. Cette évolution montre l'effet du traitement.

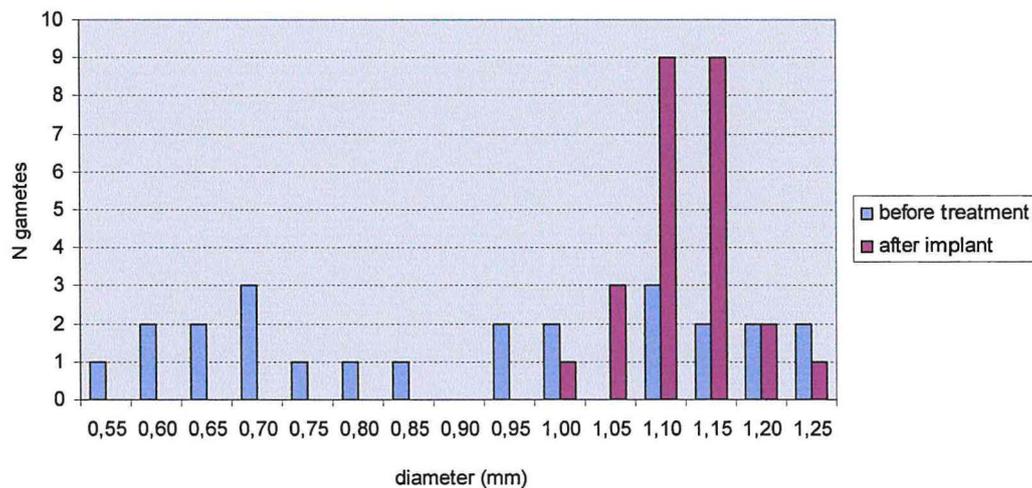
Female 2



**Female 6**



**Female 8**



**graphiques 5 a, b et c : Distribution des diamètres ovocytaires avant et après l'injection de l'implant: cas de trois femelles**

#### **4.1.3.2.3. Discussion**

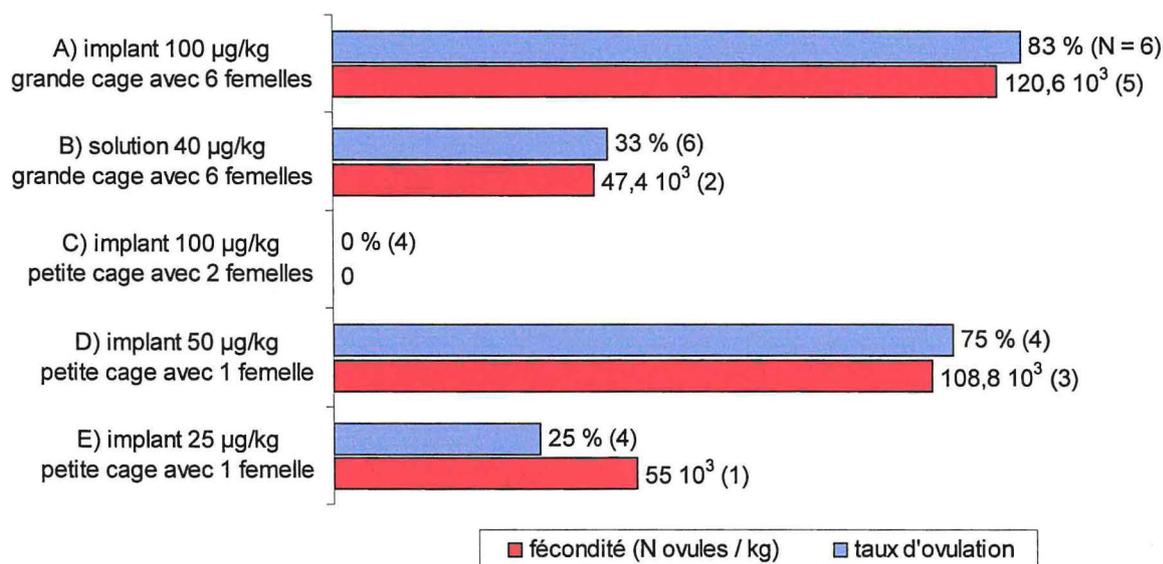
L'implant avec la dose de 100 ou 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  montre un bon potentiel pour induire l'ovulation. La plus forte dose (100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) devrait être testé à nouveau avec des femelles stockées individuellement pour confirmer ces résultats. Bien que l'implant avec la plus faible dose (25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) soit moins efficient il semble avoir un bon effet priming sur la taille des ovocytes. Pour l'avenir, une injection additionnelle de suprefact (30  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) et de motilium (10  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) pourrait être testé pour achever l'ovulation environ 14 heures après l'injection de l'implant, basé sur le protocole utilisé pour la reproduction de *C. microlepis* (§ 4.1.1.1.2).

#### 4.2.3.3. Bilan des deux expérimentations sur *P. hypophthalmus*

Si l'on résume et discute les résultats de ces deux expérimentations. Le graphique 6 indique un effet nettement supérieur de l'implant à 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (traitement A) sur l'injection d'une solution d'hormone (traitement B) tant au niveau du taux d'ovulation que de la fécondité moyenne ; il s'agit de la première expérience durant laquelle les femelles étaient stockées ensemble dans une grande cage.

Les résultats de la seconde expérience sont difficilement interprétables car les femelles du traitement C sont stockées deux par deux dans des petites cages alors que les femelles des traitements D et E sont stockées individuellement dans les mêmes petites cages. Nous n'avions en effet pas assez de cages pour toutes les femelles. La comparaison du traitement C avec le traitement A suggère que le stockage de deux femelles dans une même petite cage est néfaste au processus d'ovulation. Peut-être que la cage est trop petite et que le confinement dans celle-ci de deux poissons cause alors un stress important. Dans ce cas, cela signifierait que le facteur stress peut totalement inhiber le processus d'ovulation pourtant induit par un traitement qui donne de bons résultats dans une condition de stockage plus favorable.

Par ailleurs, on note un effet de la diminution de la dose entre 50 et 25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (traitements D et E) sur le taux d'ovulation qui diminue de 75 % à 25 %. On note également une diminution entre 100 et 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (traitements A et D) avec le taux d'ovulation qui passe de 83 % à 75 %, mais attention car ces deux traitements n'ont pas été faits dans les mêmes conditions de stockage.



graphique 6 : Résultats de l'induction de l'ovulation chez *P. hypophthalmus* avec cinq conditions de traitement (A à E). Le nombre de femelles considérées est indiqué entre parenthèse ; la fécondité moyenne ne concerne que les femelles ayant ovulé.

#### 4.1.4. *Pangasius conchophilus*

Les géniteurs sont des individus sauvages provenant du milieu naturel. Ils sont capturés au moyen de « ly trap » puis placés dans le bassin circulaire de Don Nokassoun. Les géniteurs sont ensuite transférés à la station de Ban Hat. Ils voyagent selon leur taille, soit en sacs plastiques gonflés à l'oxygène et introduit dans des sacs horizontaux solides soit dans des bacs de transport dans lequel est ajouté de la glace et 3 à 4% de NaCl.

##### 4.1.4.1. Matériels et méthodes

###### 4.1.4.1.1. Traitements hormonaux

###### ▪ Mâles

Deux mâles ont servis à la reproduction. Ils ont été injectés à  $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRH (Suprefact) +  $10 \text{mg.kg}^{-1}$  de dompéridone (Motilium). Le sperme est extrêmement épais, d'une faible fluidité, et d'un faible volume (environ 0,3ml) mais très concentré.

###### ▪ Femelles

Afin de réduire au mieux le stress, il a été convenu de réduire progressivement le niveau d'eau dans les bacs puis d'anesthésier à l'eugénol les poissons directement dans leur bac, avant toute manipulation.

Cinq femelles ont été expérimentées. Le traitement hormonal appliquée aux femelles ressemble à celui appliqué aux femelles *H. wyckioides* (§4.1.2.1.1), c'est-à-dire, tout d'abord, chaque femelle reçoit (3 ou 6 jours), une fois par jour, à la même heure, une injection d'hCG à la faible dose de  $500 \text{UI.kg}^{-1}$ . Au cours de ce traitement, quelques ovocytes sont prélevés par biopsie à l'aide d'une pipette de Cornier au bout du troisième jour ; ce prélèvement est réalisé en même temps qu'est administrée une nouvelle injection d'hCG de  $500 \text{UI.kg}^{-1}$ . Ces ovocytes prélevés sont observés à la loupe binoculaire (§ 2.2.3.4). Si la taille nous semble acceptable, nous lançons alors un traitement hormonal ovulatoire effectué en deux injections mais différentes du traitement pour *H. wyckioides* :

- ⇒ La première injection est de l'hCG à  $500 \text{UI.kg}^{-1}$  et intervient 24 heures après le dernier traitement de finition.
- ⇒ La deuxième injection, appliquée 8 heures après la première, est un mélange d'hCG et de LHRH soit  $3\ 000 \text{UI.kg}^{-1}$  d'hCG,  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRH et  $10 \text{mg.kg}^{-1}$  de dompéridone.

###### 4.1.4.1.2. Incubation

Les œufs des femelles *P. conchophilus* étant adhésifs, nous nous sommes servis du même type d'incubateur que pour les *H. wyckioides* (§ 4.1.2.1.2).

#### 4.1.4.2. Résultats

Tableau 10 : Résultats des femelles *P. conchophilus* traitées

N° femelle	PV (kg)	Traitement de finition (N inj x dose UI.kg <sup>-1</sup> )	Traitement ovulatoire		Temps de latence	Température (°C)	Poids œufs (g)	N œufs strippés	Fécondité (œufs.kg <sup>-1</sup> )	Ecllosion (%)
			1 <sup>ère</sup> inj.	2 <sup>ème</sup> inj.						
7 J	2	3 x 500	(a)	(b)	11 h	27	80	88 358	44 179	90
8 R	1,3	6 x 500	(a)	(b)	-	27	-	-	-	-
1 R	2,5	6 x 500	(a)	(b)	15 h	25,5	62	52 886	21 154	20
6 J	1	3 x 500	(a)	(b)	17 h 30	25,5	(c)	(c)	(c)	5
17 J	3,9	6 x 500	(a)	(b)	13 h	27	170	160 000	41 026	90
Moyenne SD	2,1 (1,1)	4,8 x 500			14 h 10	26,4 (0,8)	104 (58)	100 414 (54565)	35 453 (12500)	51 (45)

(a) : une injection d'hCG à 500 UI.kg<sup>-1</sup>

(b) : une injection d'hCG à 3 000 UI.kg<sup>-1</sup> + 50 µg.kg<sup>-1</sup> de LHRH et 10 mg.kg<sup>-1</sup> de dompéridone.

(c) : œufs de mauvaise qualité, très petite taille, quantité extrêmement faible, mais essai de micro fécondation en boîtes aliquotes.

Au total, sur cinq femelles traitées, trois ont ovulé normalement, une a ovulé partiellement et une n'a pas ovulé du tout. Le même type de traitement a été appliqué aux cinq femelles. Cependant, le nombre d'injections pour le traitement de finition varie de 3 à 6. Ce nombre d'injections, au vu des résultats, n'a pas d'effet sur l'induction de l'ovulation. En effet, la femelle 7J n'a reçu que trois injections et a bien réagi tandis que les femelles 1R et 17J ont reçu six injections et ont aussi bien réagi. En fait, il semble que le nombre d'injections nécessaire dépende surtout de la maturité de la femelle ; une femelle bien mûre ne nécessite que trois injections.

Les temps de latence entre la deuxième injection du traitement ovulatoire et l'ovulation varient de 11 h à 17 h 30. Cette variation est sûrement liée à la physiologie de la femelle mais aussi à la température d'élevage. En ce qui concerne la femelle 6J, l'obtention d'œufs de mauvaise qualité vient peut être du fait que la femelle avait surmaturée puisque l'ovulation n'a été observée qu'après 17 h 30 pour une température de 25,5°C. Pour la même température, la femelle 1R avait ovulé au bout de 15 h.

#### 4.1.4.3. Discussion

Avec le faible nombre de femelles testées pour la reproduction de cette espèce, on peut dire que le traitement hormonal utilisé est efficace puisque trois femelles sur cinq ont ovulé et donné des larves, et une femelle n'a ovulé que partiellement. L'aquaculture de cette espèce n'est pas encore une pratique très coutumière du fait de l'abondance de cette espèce dans le Mékong. Cependant, la pression de pêche exercée sur cette espèce est très forte au Laos et il sera sûrement indispensable dans l'avenir de reproduire et d'élever cette espèce. Le traitement hormonal que nous avons effectué cette année semble efficace mais demande de nombreuses manipulations avec les femelles (beaucoup d'injections). C'est pourquoi, il serait intéressant

de travailler dans l'avenir sur un traitement hormonal avec implants comme il a été testé chez *P. hypophthalmus*.

#### **4.1.5. *Pangasius krempfi***

La reproduction de cette espèce n'a encore jamais été réussie dans le monde si on en croit la bibliographie et les discussions avec les professionnels asiatiques en aquaculture. Le Laos a la chance de pouvoir se procurer facilement des géniteurs mâtures au pied des chutes de Khône. C'est d'ailleurs, la priorité du projet CIRAD-LARReC de réussir la reproduction de *P. krempfi*. Pour cela, nous nous sommes procurés des géniteurs le long du canal est sur l'île de Don Nokassoun (§ 3.2.) et nous avons effectué diverses manipulations pour essayer d'induire une ovulation et réussir une reproduction artificielle.

*P. krempfi* est une espèce très fragile qui peut mourir facilement de stress. C'est pourquoi, au vu des résultats obtenus par Cacot (2004) et afin d'éviter une forte mortalité des géniteurs, nous nous sommes dirigés vers un protocole de traitement hormonal avec l'injection d'implants de LHRHa qui limite le nombre de manipulations. Au total, 23 femelles ont été implantées cette saison, mais beaucoup sont mortes durant les traitements et n'ont pu fournir de résultats. De plus, une erreur de manipulation a entraîné la perte de nombreuses données sur l'évolution de la taille des diamètres ovocytaires et donc sur l'effet des implants sur certaines femelles. Toutefois, une expérimentation bien maîtrisée a pu fournir de bons résultats et sera présentée par la suite. Cette expérimentation avait pour but de comparer l'effet d'implants de LHRHa à 85% ou 100% de cholestérol avec des doses de 50 et 70  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour les deux types d'implants.

##### **4.1.5.1. Matériels et méthodes**

###### ▪ **Mâles**

Les mâles sont très spermiantes en cette période de l'année et il n'est donc pas nécessaire de leur faire un traitement hormonal. Tous les mâles étaient stockés dans le bassin circulaire de 5,8 m de diamètre. Leur poids varie entre 2 et 4 kg.

###### ▪ **Femelles**

Pour cette expérimentation, les femelles ont été stockées dans deux piscines autoportantes (§ 3.2.). Une a été utilisée pour les femelles implantées avec les implants 100% cholestérol et l'autre servait à stocker les femelles implantées avec les implants 85% cholestérol. Dans chaque piscine, 6 ou 7 femelles étaient stockées.

Avant d'être placées dans une piscine, toutes les femelles ont été implantées ; ci-dessous est décrit la liste des femelles qui ont été utilisées pour cette expérimentation et les implants qu'elles ont reçus. Afin de distinguer les femelles les unes des autres, chaque femelle a été marquée au préalable avec une pastille de plastique colorée, numérotée et attachée avec du fil nylon à l'épine osseuse d'une des nageoires pectorales.

Pour le type d'implants 100%, les femelles ont été implantées le 8/07 (exceptée la femelle 6 blanc implantée le 9/07). La matrice de ces implants était constituée uniquement avec du cholestérol. Trois jours après l'injection de l'implant soit le 11/07, les femelles ont

été contrôlées. Chaque femelle, à ce moment là, a subi une biopsie et les ovocytes prélevés ont été observés dans du liquide de Serra et du Gilson. Puis, par la suite nous avons remis les femelles dans leur piscine pour les reprendre 2 jours plus tard (4 ou 5 jours après l'injection de l'implant) soit le 13/07.

Pour le type d'implants 85%, les femelles ont été implantées le 9/07. La matrice de ces implants était constituée avec du cholestérol à 85% et de la cellulose (CMC) à 15 %. Après l'injection de l'implant, les femelles ont été contrôlées 5 jours après soit le 14/07 à 17 h 30. Chaque femelle, à ce moment là, a subi une biopsie et les ovocytes prélevés ont été observés dans du liquide de Serra. Puis, par la suite nous avons remis les femelles dans leur piscine après avoir lancé un traitement hormonal au suprefact combiné à de l'hCG pour certaines.

#### 4.1.5.2. Résultats

Au total, sur 13 femelles traitées, 5 ont été retrouvées mortes avant la fin de l'expérimentation et n'ont pas pu fournir beaucoup de données. Sur les 8 autres, 4 pour chaque type d'implant, aucune femelle implantée avec des implants à 85 % de cholestérol n'a ovulé malgré un traitement ovulatoire effectuée. Pour les femelles implantées avec des implants à 100 % de cholestérol, une seule a ovulé suite au traitement ovulatoire, en plus, la fécondation s'est bien déroulée puisque nous avons obtenu des larves. Les résultats sont présentés dans le Tableau 11.

Si l'on s'intéresse à l'évolution des diamètres ovocytaires, on peut voir que, sur certaines femelles, le diamètre ovocytaire a augmenté. Pour la femelle 12 blanc, on est passé de 0,8 mm en moyenne avant l'implantation à 1,05 mm au bout de trois jours. Pour les femelles 11, 12 et 8 jaunes, on est passé de 0,95 à 1,05 mm au bout de cinq jours. Cette évolution de taille montre bien que les implants (de 100 ou 85% cholestérol) ont agit sur ces femelles même si l'ovulation n'a pas été observée. Il y a donc bien eu un effet positif de l'implant sur les gonades et les gamètes de certaines femelles.

La preuve en est puisqu'une femelle (la n° 10 verte) a ovulé. Nous ne connaissons pas l'évolution de la taille des diamètres ovocytaires de cette femelle car nous n'avons pas la donnée avant l'implantation mais le diamètre moyen après traitement, au bout de cinq jours, est très grand (1,2 mm). D'ailleurs, cette taille de 1,2 mm, nous a semblé importante lors de la mesure et c'est pourquoi, nous avons décidé de lancer un traitement ovulatoire à cette femelle avec  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de Suprefact sous forme liquide associés à  $10 \text{mg.kg}^{-1}$  de Motilium. L'ovulation est apparue 12 heures après cette injection ovulatoire pour une température avoisinant les  $28^\circ\text{C}$ . Les ovules de cette femelle (40 g) ont été alors immédiatement récoltés après un massage abdominal. La fécondation a été effectuée avec le sperme d'un mâle récolté quelques minutes auparavant. En ce qui concerne l'incubation, elle a été effectuée sur un filet immergé dans un bac de 300 litres, avec une eau filtrée et bien aérée. L'éclosion est apparue environ 30 heures après la fécondation pour des températures avoisinant les  $27 - 28^\circ\text{C}$ .

Tableau 11 : Résultats des traitements hormonaux avec implants (85 et 100%) chez *P. krempfi*

N° femelle	Poids (kg)	Type implant	Dose ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Diamètre (mm) avant implant	Diamètre (mm) après implant	Traitement ovulatoire	Ovulation	Remarque
12 blanc	4,3	100%	50	0,8	1,05 (à J+3)	Non	Non	Evolution taille des ovocytes mais pas d'ovulation
16 blanc	7,5	100%	50	-	-	Non	Non	Morte à J+1
8 verte	5,3	100%	70	-	-	Non	Non	Morte à J+2
4 jaune	4,5	100%	70	-	1,0 (à J+3)	Non	Non	Morte à J+5
6 verte	4,4	100%	70	-	0,95 (à J+3)	Non	Non	
6 blanc	3,8	100%	50	0,95	0,95 (à J+3)	Non	Non	Aucune évolution des ovocytes
10 verte	4,2	100%	50	-	1,2 (à J+5)	a	Oui	Obtention de l'ovulation et fécondation réussie
11 jaune	5,3	85%	50	0,95	1,05 (à J+5)	b	Non	Evolution taille des ovocytes mais pas d'ovulation
8 jaune	3,8	85%	70	0,95	1,05 (à J+5)	b	Non	Evolution taille des ovocytes mais pas d'ovulation
12 jaune	2,9	85%	70	0,95	1,05 (à J+5)	a	Non	Evolution taille des ovocytes mais pas d'ovulation
10 jaune	3,3	85%	50	-	-		Non	Morte à J+2
6 rouge	5,2	85%	50	-	1,1 (à J+5)	a	Non	Morte à J+5.
3 rouge	5	85%	70	-	1,05 (à J+5)	b	Non	Aucune évolution des ovocytes

a : 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  LHRH et 10  $\text{mg.kg}^{-1}$  de dompéridone

b : 3500 UI. $\text{kg}^{-1}$  HCG, 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  LHRH et 10  $\text{mg.kg}^{-1}$  de dompéridone

### 4.1.5.3. Discussion

La reproduction artificielle de *P. krempfi* n'a pu être réussie qu'une seule fois cette année et elle représente une première dans le domaine de l'aquaculture mondiale. Ce résultat très prometteur et cher au projet CIRAD-LARReC, est un bon début pour la maîtrise de la reproduction artificielle de cette espèce. Cependant, le protocole mis en place n'est pas encore au point et il faudra d'autres essais pour améliorer la technique. En effet, la femelle qui a été reproduite avec succès, a reçu un implant de type 100% de cholestérol à  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRHa, puis elle a reçu un traitement ovulatoire au bout de cinq jours avec  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de LHRHa et  $10 \text{mg.kg}^{-1}$  de dompéridone. Ce traitement hormonal a été efficace chez cette femelle mais devra être réexpérimenté dans l'avenir sur d'autres femelles. De plus, les doses en LHRH, la quantité de cholestérol dans les implants, le temps de latence entre l'implantation et le traitement ovulatoire devront être expérimentés à nouveau pour essayer d'améliorer le protocole.

Une autre approche aussi pourrait être intéressante, ce serait d'effectuer le même type de traitement hormonal que nous avons effectué avec succès chez *H. wyckioides*, où nous appliquons plusieurs traitements de finition ( $500 \text{UI.kg}^{-1}$  de hCG) plus un traitement ovulatoire. D'ailleurs, ce type de traitement a été tenté sur deux femelles *P. krempfi* à la station de Ban Hat en même temps que les reproductions que nous avons effectuées sur *P. conchophilus*. Malheureusement, l'une d'entre elles est morte pendant le traitement et l'autre n'a donné aucun résultat. Mais cette approche ne fut tentée qu'à la fin de la saison des captures et il serait intéressant d'expérimenter la saison prochaine ce traitement, à la station de Ban Hat, plus tôt et avec davantage de femelles.

Même si beaucoup d'efforts ont été fait de ce côté là, il faudra aussi réduire le stress dû aux conditions de stockage qui bloquerait l'ovulation. Il faudrait idéalement disposer de plusieurs grands bacs (3-5) qui permettraient une rotation. Une autre possibilité serait d'injecter un réducteur de stress sous forme d'implant.

## 4.2 Elevage larvaire

L'élevage larvaire a été une étape peu sollicitée cette année car nous avons dû orienter en priorité nos recherches sur la reproduction artificielle. De plus, le manque de structures présentes à la station de Ban Hat pour l'élevage larvaire (bacs et lieux d'élevage, aliment, et surtout personnel) ne nous a pas permis de privilégier cette phase. Cependant, parmi les nombreuses larves que nous avons obtenues cette année chez ces cinq espèces, certaines d'entre elles ont survécu et ont pu passer les stades critiques des premiers stades de vie pour devenir des juvéniles.

Quelques données ont pu quand même être collectées et seront décrites par la suite chez chaque espèce, espèce par espèce.

## **4.2.1. *Cirrhinus microlepis***

### **4.2.1.1. Obtention des larves et lieu de stockage**

Durant mon stage, des larves de *C.microlepis* ont été obtenues (annexe 7) à trois reprises avec trois femelles différentes (§4.1.1.2). La première femelle avec un taux d'éclosion de 40% a donné environ 50 000 larves. La deuxième avec un taux inférieur à 10% a donné un peu moins de 10000 larves. Enfin la troisième avec un taux de 10% a donné moins de 20 000 larves.

Pour chaque reproduction réussie, à la fin de l'incubation, le contenu des incubateurs est collecté puis trié pour isoler les larves vivantes. Ce tri s'effectue dans une bassine dans laquelle on dépose tout le contenu des incubateurs. Ce contenu est centrifugé à la main et tous les œufs morts se retrouvent au centre de la bassine. Les larves vivantes, qui sont nageantes, se détachent du centre pour venir nager à la surface. Il devient alors facile de les voir et de les collecter. Lorsque toutes les larves vivantes sont collectées, elles sont stockées dans un des bacs du circuit principal avec une bonne aération et un renouvellement d'eau important.

### **4.2.1.2. Alimentation**

L'alimentation débute à partir du troisième jour après éclosion avec des *moinas* récoltés à la station de Ban Na (§ 2.3.2). Au début, les larves reçoivent quatre repas par jour à raison de 2000 *moinas*/l. A partir du cinquième jour, les larves sont toujours nourries avec des *moinas* mais avec en plus un peu d'aliment sec (petite granulométrie). Au bout du septième jour, les larves ne sont plus nourries qu'avec de l'aliment sec en cinq repas par jour à 15% de leur biomasse.

### **4.2.1.3. Suivi des larves**

Le suivi du poids et de la survie des larves n'a pas été effectué précisément chez cette espèce et il est donc difficile de présenter des résultats.

## **4.2.2. *Hemibagrus wyckioides***

### **4.2.2.1. Obtention des larves et lieu de stockage**

Les œufs de *H. wyckioides* sont adhésifs et sont incubés sur un filet immergé dans un bac du circuit principal. Après éclosion, la larve sort de son œuf, se détache du filet tandis que la coque de l'œuf reste emprisonnée dans la maille du filet. Ainsi, pour séparer les larves vivantes des larves ou œufs morts, il suffit d'enlever délicatement l'incubateur en filet du bac à la fin de l'éclosion. Les larves qui viennent d'éclore nagent dans le bac d'incubation. Quelques heures (environ 24 h) après cette éclosion, tout le contenu du bac (larves vivantes et autres déchets) sont siphonnés et triés. Après ce tri, les larves sont stockées dans un des bacs du circuit principal avec une bonne aération et un renouvellement d'eau constant.

#### 4.2.2.2. Alimentation

Dès le deuxième jour post fécondation, les larves sont nourries à 15% de leur biomasse avec l'aliment sec, auquel est ajouté une distribution parallèle de *moinas* (environ 3000 *moinas*/l). Il est à noter que dès la première prise alimentaire, les larves acceptent aisément l'aliment sec, ce qui facilite le sevrage.

Au bout d'une semaine, les larves consomment uniquement de l'aliment sec inerte, à raison de 5 repas par jour à 15% de leur biomasse. A la deuxième semaine, la distribution se fait à 10% de la biomasse pour éviter une trop forte dégradation de la qualité de l'eau.

#### 4.2.2.3. Suivi des larves (poids et survie)

Nous avons effectué un suivi approximatif sur les larves issues d'une des femelles (annexe 8). Le suivi des larves issues des autres femelles n'a pas pu être effectué. De plus, plusieurs incidents techniques (coupure de courant, mauvaise qualité de l'eau, baisse des températures...) ont provoqué des pertes considérables dans les effectifs mésestimant ainsi la survie réelle des larves et perturbant les résultats.

En ce qui concerne le suivi que nous avons pu réaliser, à l'éclosion, l'effectif de cette femelle était estimé aux alentours de 68 000 larves. A J14, on avait plus que 8 000 larves. A J16, après une coupure de courant, on retrouve que 2 456 larves. Enfin au bout d'un mois, à J31, il ne reste plus que 87 juvéniles qui sont transférés à la station de Ban Na pour y être maintenus en happas dans un étang bétonné. Parmi les causes imputables à cette chute de l'effectif, outre une qualité d'eau variable et autres problèmes techniques, il faut y comprendre un certain manque de rigueur dans les soins et la maintenance appliqués aux larves.

Si l'on regarde l'évolution du poids moyen des larves de cette même femelle (Figure 3). A J2, le poids moyen est de 8,4 mg. A J14, il est estimé à 30-35 mg. Enfin, à J31, les juvéniles pèsent en moyenne 1 500 mg. Cette courbe de tendance montre bien que l'évolution du poids est exponentielle et que les larves ont commencé à prendre du poids tardivement à partir du 15<sup>ème</sup> jour. Cette prise de poids subite peut s'expliquer par une meilleure prise alimentaire avec une taille d'aliment mieux adapté à la taille de la bouche de la larve ou par l'apparition d'un cannibalisme entre les larves.

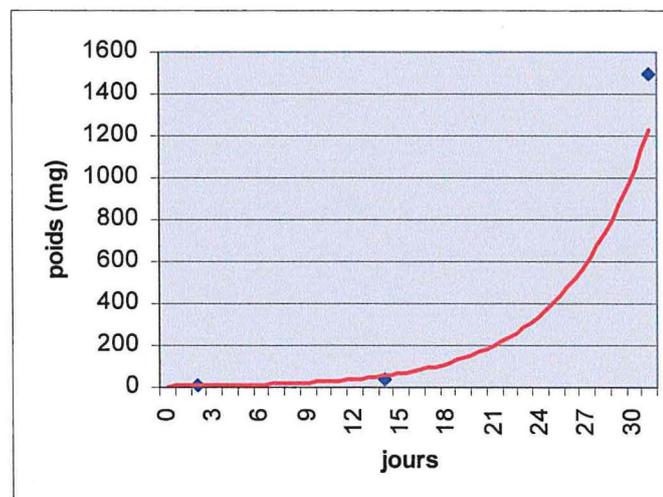


Figure 3: Evolution du poids moyen de larves de *Hemibagrus wyckioides*

### 4.2.3. *Pangasius hypophthalmus*

Les larves de *P. hypophthalmus* ont été suivies après la première expérimentation qui servait à savoir si l'implant avait un effet positif ou non (§ 4.1.3.1). Pour l'autre expérimentation, aucun suivi n'a pu être effectué à cause d'une erreur de manipulation qui a entraîné la mort de toutes les larves dès le troisième jour.

#### 4.2.3.1. Obtention des larves et lieux de stockage

Les œufs fécondés de quatre pontes différentes ont été préalablement déposés sur des filets immergés et incubés dans le même bac en eau stagnantes mais bien oxygénée au moyen de diffuseurs d'air. Ils ont ensuite été transférés dans un des bacs de 300 litres du circuit provisoire. Au bout d'une semaine, les larves sont transférées dans un bac de 800 litres du circuit principal.

Les premières éclosions ont eu lieu 20 heures après fécondation. Après estimation volumétrique, l'effectif est évalué à 47 825 larves.

#### 4.2.3.2. Alimentation

L'alimentation des larves a débuté dès le deuxième jour post éclosion. Les larves ont été nourries avec du zooplancton composé essentiellement de *moinas* et de copépodes.

Le plancton est distribué à raison de 3000i/l environ.. Dès le quatrième jour, à J4, un aliment artificiel est distribué parallèlement au plancton, pour progressivement se substituer à celui-ci, à raison de 5 repas par jour.

#### 4.2.3.3. Survie larvaire

Dès le troisième jour, une très forte mortalité est constatée. Plusieurs causes cumulées peuvent être évoquées pour expliquer cette mortalité. En effet, les 3 premiers jours constituent une phase critique. Les *moinas* étant de taille relativement importante (0,85 mm) la première prise alimentaire peut être délicate. Il s'installe ensuite un cannibalisme actif et « passif », c'est à dire que les larves porteuses de sortes de dents externes appelées épine orales s'accrochent accidentellement entres-elles et ne peuvent plus se détacher ce qui entraîne une mortalité élevée. Enfin un test de concentration en nitrites a indiqué une concentration extrêmement élevée induisant une toxicité importante démontant une inefficience de la filtration biologique, certainement due à un support bactérien inadapté.

A J7, l'effectif est alors de 4000 larves pour un poids moyen de 6,5 mg. La non disponibilité de notre balance de précision ne nous a pas permis d'assurer un suivi correct de cette croissance. De plus, plusieurs incidents tels que coupures électriques, pannes diverses, manipulations nécessitant la disponibilité du personnel ou quelques oublis de la part du technicien en charge de l'alimentation, on conduit à une faible croissance et une forte hétérogénéité de tailles. A J21, il ne reste plus que 202 individus dont les poids ont été estimés entre 50 et 800 mg et qui ont été transférés dans un happas placé en étang fertilisé sur la station de Ban Na. 202 autres alevins d'environ 25 mg sont conservés puis stockés dans un happas placé à l'intérieur d'une grande cage flottante de la station de Ban Hat.

#### 4.2.4. *Pangasius conchophilus*

Les larves de cette espèce n'ont été obtenues que 10 jours avant l'arrêt de mon stage ; il n'y a donc pas pu avoir de suivi pour ma part de ces larves. De plus, quelques jours avant mon départ, la non maintenance du technicien en charge de cet élevage larvaire a entraîné la mort de 99% des larves obtenues. En effet, aucun siphonage depuis ceux réalisés par les encadrants n'ont été effectués. De plus, l'aliment n'a pas toujours été distribué et les *moinas* pas toujours collectés. Ainsi en conséquence, un tapis de matière a piégé les larves entraînant la mort de la quasi-totalité du lot.

#### 4.2.5. *Pangasius krempfi*

Les larves de *P. krempfi* ont été obtenues pour la première fois cette année avec une seule femelle (annexe 9). Les oeufs ont été incubés dans un bac de 300 litres sur l'île de Don Nokassoun. L'éclosion est apparue 30 heures après fécondation. L'effectif des larves écloses est inconnu encore à ce jour car il n'a pas été possible de connaître le nombre d'ovules par gramme d'oeufs collectés car aucune balance de précision n'était présente sur le site.

A J1, les larves ont été transférées à la station de Ban Hat pour être stockées dans un bac de 800 litres du circuit principal avec un renouvellement d'eau de cinq fois le volume par jour pour un volume de 300 litres.

A J2, les larves reçoivent leur premier repas de *moinas* avec 800 *moinas*/l le matin puis 1600 *moinas*/l le soir. Un comptage approximatif du nombre de *moinas* dans le bac montre qu'ils n'ont pas été consommés.

A J4, la vésicule vitelline est résorbée et il y a le début de la pigmentation au niveau de la dorsale. La longueur des larves est de 7mm. Les larves sont graciles, d'apparence fragile et l'effectif semble réduit. L'estimation de l'effectif et du poids est reportée ultérieurement compte tenu du risque lié à la manipulation.

A J5, l'effectif devient faible. Les larves reçoivent une distribution de *moinas* trois fois par jour à concurrence de 1000 *moinas* par litre. Les *moinas* recevant eux-mêmes 3g d'aliment composé d'1/3 de spiruline et de 2/3 de levure de boulangerie, deux fois par jour.

A J6, les larves sont bien pigmentées. Un premier essai de distribution d'aliment sec est effectué : les larves viennent sur l'aliment et semblent le consommer.

A J7, nous démarrons un sevrage : les larves reçoivent cinq repas par jour : trois de *moinas* complétés à l'aliment sec plus deux uniquement avec l'aliment sec.

Les larves sont bien pigmentées (observation sous binoculaire) et mesurent en moyenne 8,5 mm. Elles restent cependant d'aspect gracile. L'effectif devient très réduit.

A J8, l'effectif est négligeable : il ne reste que 9 individus dont 4 faibles. Il n'y a pas de croissance nette. L'observation sous loupe binoculaire ne laisse apparaître aucun signe de pathologie. En revanche les larves sont maigres et l'observation (assez difficile) de l'estomac n'a pas permis de déceler la présence d'aliment, bien que la bouche soit bien ouverte avec la présence de dents. Contrairement à ce que leur comportement faisait penser, les larves pourraient ne pas s'être nourries ; peut-être à cause d'un manque d'appétence des aliments proposés ou une taille inadaptée, ou des températures nocturnes trop basses ou une association de ces différents facteurs défavorables.

A J10, toutes les larves sont mortes.

## Conclusion

Si l'on résume le travail qui a été effectué durant ce stage, on peut dire que le bilan est assez positif en ce qui concerne les reproductions. En effet, quelque soit l'espèce concernée, toutes ont été reproduites au moins une fois avec succès. En revanche, l'élevage larvaire n'a pu être maîtrisé chez aucune espèce et c'est pourquoi il faudra améliorer les structures et les conditions d'élevage de la station de Ban Hat. De plus, il sera primordial de trouver du personnel attribué spécifiquement à cette phase d'élevage. En effet, il nous a été difficile de travailler à la fois sur la reproduction et l'élevage larvaire de cinq espèces en 3 mois et demi.

Au point de vue des traitements hormonaux utilisés cette année, le bon point est les résultats que nous avons obtenus avec les implants de GnRH $\alpha$ . Trois espèces sur cinq ont pu être reproduites grâce à l'utilisation de ces implants. Outre le fait d'améliorer la technique, il serait intéressant aussi de tester des implants chargés en hormone gonadotrope de type hCG ou, plus vraisemblablement, GtH. Ces hormones agissent en effet directement sur les gonades et ce genre d'implant serait certainement très efficace ; son effet serait sûrement indépendant du stress durant le traitement. Des implants hCG ont été testés avec des résultats intéressants (mais préliminaires) sur *Clarias macrocephalus* et un Mastacembelidae (Cacot, 2002). Mais deux problèmes risquent de se poser : l'incorporation d'une poudre relativement volumineuse (surtout pour l'hCG) dans un petit implant et le coût de l'implant du fait que ces hormones sont nettement plus chères que le Suprefact.

Si on considère les résultats obtenus avec l'implant sur *Pangasius krempfi* voire avec les quelques tentatives sur *Hemibagrus wyckiioides*, ils semblent bien médiocres par rapport à ce qui peut s'obtenir dans le meilleur des cas avec *P. hypophthalmus*. On peut donc se poser la question de l'état de stress des poissons durant le traitement. Il est intéressant de noter également que ces implants ont été testés pour la première fois sur *Clarias gariepinus* en 2005 ; le taux d'ovulation était de 100 % quelque soit la dose testée, 50, 100 et 200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et que la fécondité était similaire dans les trois cas ; le traitement avait été appliqué à cinq femelles par traitement (Cacot, communication personnelle). Or ces poissons sont connus pour être rustiques et notamment très résistants à la manipulation, et ce d'autant plus dans notre cas que les géniteurs utilisés étaient certainement issus d'un grand nombre de générations maintenues en captivité. Ce dernier point est important car la domestication s'accompagne généralement de la sélection d'animaux moins sensibles au stress. Bref, plus que sur l'implant lui-même (la dose, le type de GnRH $\alpha$ , voire la composition de la matrice) les travaux futurs devraient porter sur les conditions de stockage visant à limiter le stress après l'injection de l'implant. On peut également chercher un moyen de traiter en parallèle le poisson avec une molécule de type anti-dopaminergique comme le dompéridone ; ce traitement est en effet connu pour améliorer un traitement au GnRH $\alpha$  ; il permet de lever l'inhibition au niveau de l'hypophyse sur la libération de GtH. Mais comment mettre cette molécule sous forme d'implant ?

Ce nouveau genre de manipulations sur le stress et son contrôle pourrait être fait avec les *P. hypophthalmus* stockés dans les cages flottantes de la station de Ban Hat dès le début de la saison prochaine.

## Bibliographie

- Baird, I. G. 1998. Preliminary fishery stock assessment results from Ban Hang Khone, Khong district, Champassak Province, Southern Lao PDR. Technical report. Environmental Protection and Community Development in the Siphandone Wetland, Champassak Province, Lao PDR. Funded by European Union, implemented by CESVI. 12 pp.
- Cacot, P., Legendre, M., Dan, T.Q., Tung, L.T., Liem, P.T., Mariojouis, C., Lazard, L., 2002. Induced ovulation of *Pangasius bocourti* (sauvage, 1880) with a progressive hCG treatment. *Aquaculture* 213, 199-206
- Cacot, P., 1993. Présentation de la pisciculture en cages flottantes dans le Sud-Viêt Nam. Caractéristiques de l'élevage sur le Mékong de *Pangasius pangasius*. Study of the aquaculture of *Pangasius pangasius* in floating cages on the Mekong River in South Viet Nam. In French. CIRAD-EMVT / GAMET (Montpellier, France). 107 p.
- Cacot, P., 1999. Etude du cycle sexuel et maîtrise de la reproduction artificielle de *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880) et *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) dans le Delta du Mékong au Viêt Nam. Study of the sexual cycle and assessment of the artificial reproduction of *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880) and *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in the Mekong Delta in Viet Nam. In French. PhD thesis. INAPG, Department of Animal Productions (Paris). 350 p.
- Cacot, P., Eeckhoutte, P., Muon, D.T., Trieu, N.V., Legendre, M., Mariojouis, C., Lazard, J., 2002. Induced spermiation and milt management in *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880). *Aquaculture* 215, 67-77.
- Cacot, P., 2004. Domestication of the indigenous Mekong catfish *Pangasius krempfi*: overview of the fishery in Cambodia and Laos and preliminary study of the artificial reproduction above the Khone waterfalls. Activity report. CIRAD-EMVT (Montpellier, France). 107 p.
- Cacot, P., 2005. Contribution à l'amélioration de l'élevage larvaire du poisson-chat *Pangasius hypophthalmus* avec utilisation de moines produites sur levure et spiruline. Improvement of the larviculture of the catfish *Pangasius hypophthalmus* with the use of moines produced with baker's yeast and spirulina. In French. Activity report. CIRAD-EMVT (Montpellier, France). 39 p.
- Cacot, P., Phenaloun, L., 2005. Survey at the Khone waterfalls and experiments on the propagation of Pa-Phone (*Cirrhinus microlepis*) carried out at the km8 station (Pakse). CIRAD Activity report, 100 p.
- Crouzet, S., 2003. Etude de la reproduction et de l'élevage larvaire de *Hemibagrus wyckiioides* dans le Sud du Viet Nam. Master thesis. Université of Montpelleir II, DESS "Production Animale en Régions Chaudes". 90 p.
- Froese, R. & D. Pauly. Editors. 2005. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (Mars 2005).

- Gustiano R., Teugels G.G., Pouyaud L., 2003. Revision of the *Pangasius kunyit* catfish complex, with description of two species from South-East Asia (Siluriformes ; Pangasiidae). *J. Natural History*, 37, 357-376.
- Harvey, B.J., Carolsfeld, J., 1993. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa, International Development Research Center. 144 p.
- Lee, C. S., Tamaru, C. S., Kelley, C. D., 1986. Technique for making chronic-release LHRHa and 17-methyltestosterone pellets for intramuscular implantation in fishes. *Aquaculture* 59 (2), 161-168
- Legendre M., Albaret J.J., 1991. Maximum observed length as an indicator of growth rate in tropical fishes. *Aquaculture*, 94, 327-341.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* (10) 463-491.
- Slembrouck, J., O. Komarudin, Maskur & M. Legendre (Eds.) (2004). Technical Manual for Artificial Propagation of the Indonesian Catfish, *Pangasius djambal*. IRD-DKP Editions, Jakarta, 131 p.
- Sokolowska M., Peter R.E., Nahorniak C.S., 1985. The effects of different doses of pimozide and [D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-N ethylamide]-LHRH (LHRH-A) on gonadotropin release and ovulation in female goldfish. *Can. J. Zool.*, 63, 1252-1256.
- Teugels, G.G., 1996. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi ; Siluroidei) : an overview. *Aquat. Liv. Res.* Vol. 9, Hors série, 9-34.
- Van Zalinge, N.; L. Sopha, N.P. Bun, H. Kong & J.V. Jørgensen (2002). Status of the Mekong *Pangasianodon hypophthalmus* resources, with special reference to the stock shared between Cambodia and Viet Nam. MRC Technical Paper No. 1, Mekong River Commission, Phnom Penh. 29 pp.
- Warren, T; j., G. C. Chapman and D. Singanouvong. 1998. The upstream dry-season migration of some important fish species in the lower Mekong River of Laos. *Asian Fisheries Science* 11 : 239 - 251
- Woynarovich, E. and Horvath, L., 1984. The artificial propagation of warmwater finfish. A manual for extension. FAO, Fisheries Technical Paper. Rome. 183 p.

## Annexes

**Mots-clés :** Aquaculture, poissons, circuit d'élevage, reproduction, hormones, implants, alimentation, larves.

## ANNEXE 1

### Construction du circuit de bacs principal



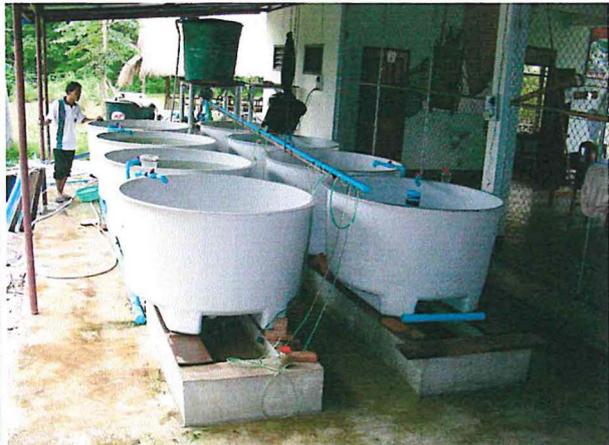
**Construction de la chape en béton**



**Construction des drains**



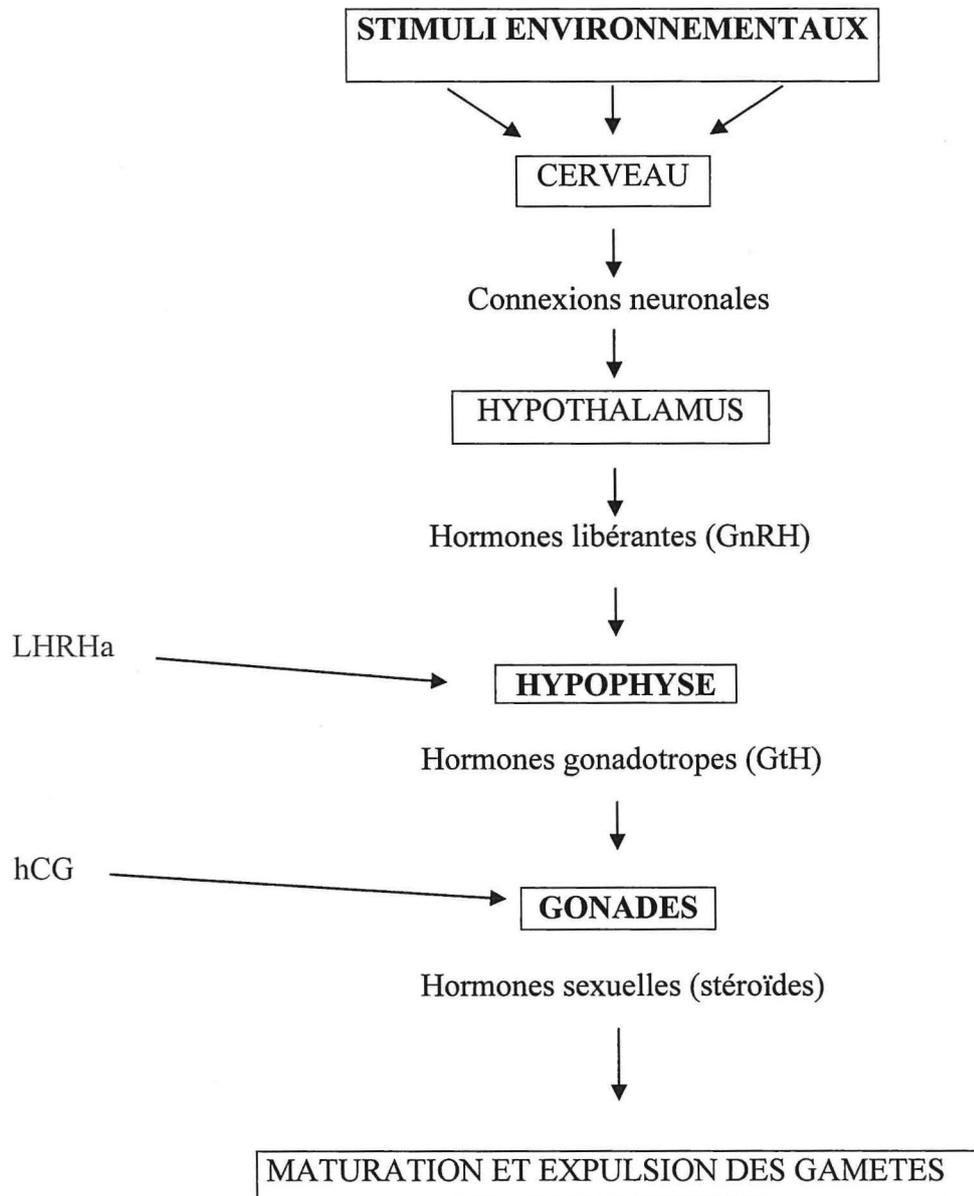
**Mise en place des bacs d'élevage**



**Circuit principal en fonction.**

## ANNEXE 2

**Principaux maillons de la chaîne physiologique (action neurale puis hormonale) allant de la réception des stimuli à la libération des gamètes (d'après Harvey et Carolsfeld, 1993)**

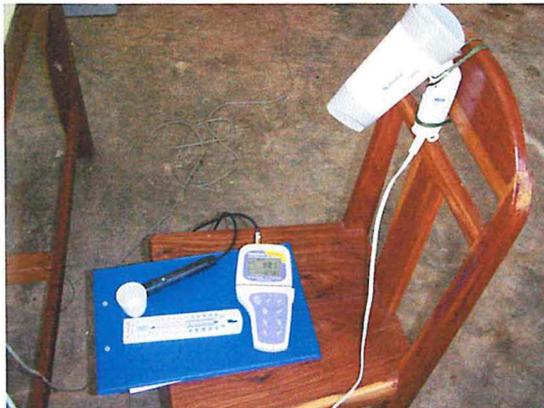


### ANNEXE 3

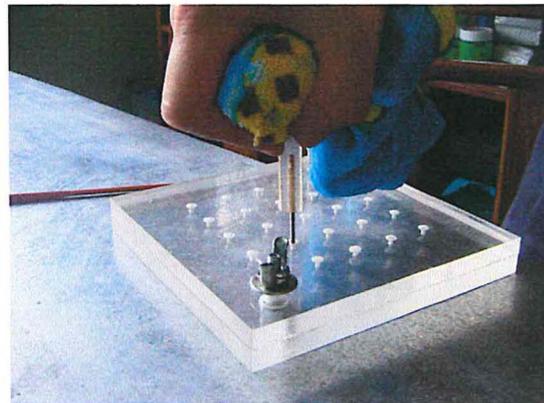
#### Fabrication de l'implant LHRHa et méthode d'injection



Plaques et outils pour le moulage



Séchage après incorporation de l'hormone



Moulage de l'implant dans un puits



Incision au scalpel



Injection de l'implant sur un *P. hypophthalmus*

## ANNEXE 4

### Gestion des gamètes



Collecte du sperme chez *P. hypophthalmus*



Récolte des ovules chez *C. microlepis*



Fécondation des œufs chez *C. microlepis*



Incubation des œufs de *C. microlepis*

## ANNEXE 5

### Méthode de capture du zooplancton



« Chalut » à plancton



Capture du plancton



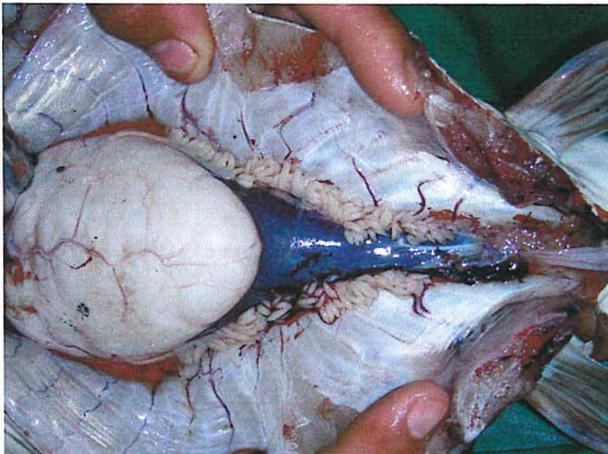
Récolte du plancton capturé



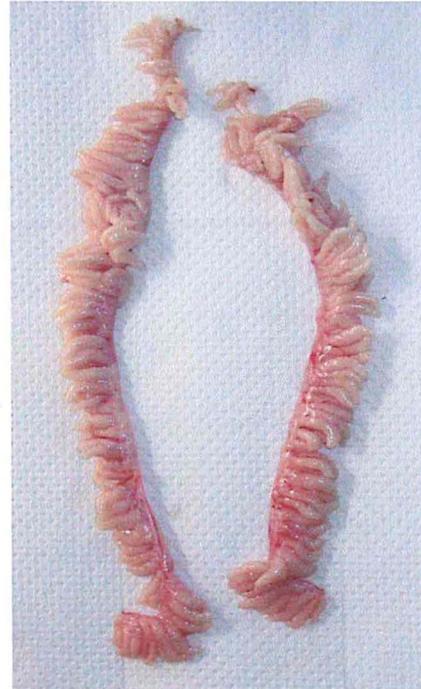
*Moinas* et copépodes observés à la binoculaire

## ANNEXE 6

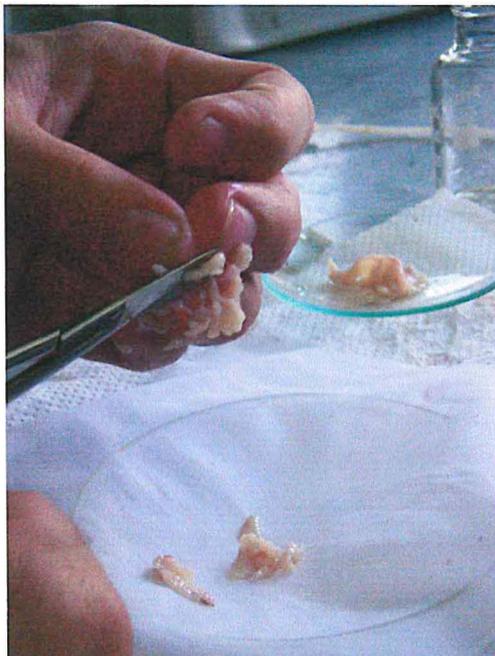
### Dissection et récolte du sperme chez les mâles *H. wyckioides*



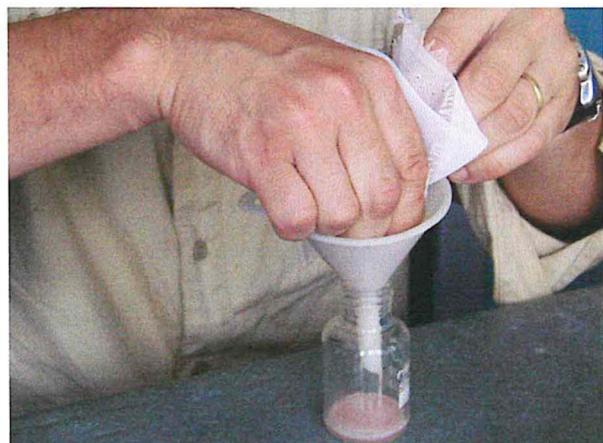
**Dissection du mâle**



**Testicules d'un mâle *H. wyckioides***



**Dilacération des testicules**



**Broyage des testicules pour récolter le sperme**

## ANNEXE 7

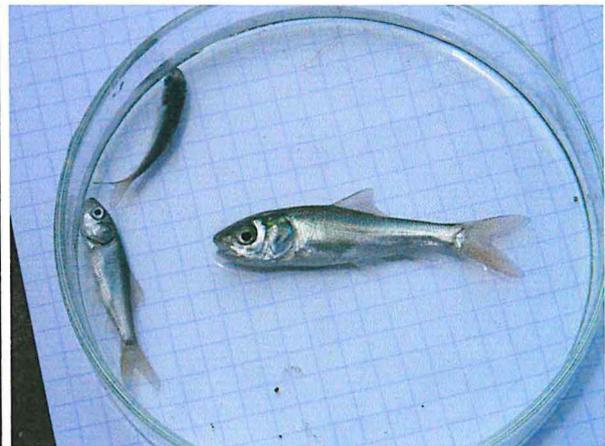
### Développement larvaire chez *Cirrhinus microlepis*



Larve après éclosion



Larve au 4<sup>ème</sup> jour



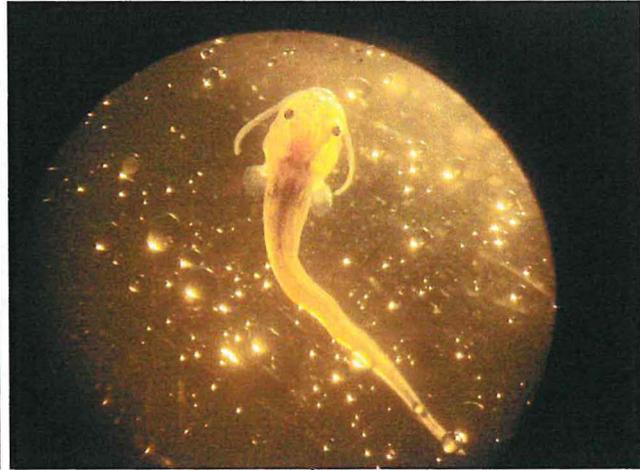
Juvénile de *C. microlepis*

## ANNEXE 8

### Développement larvaire chez *Hemibagrus wyckioides*



Larve au 1<sup>er</sup> jour



Larve au 4<sup>ème</sup> jour



Juvénile de 3 semaines



Juvénile de *H. wyckioides*

## ANNEXE 9

### Développement larvaire chez *Pangasius krempfi*



Larve au 2<sup>ème</sup> jour



Larve au 3<sup>ème</sup> jour



Larve au 6<sup>ème</sup> jour

**CIRAD-Dist**  
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE  
Baillarguet