

**PROGRAMME DE RENFORCEMENT DES CAPACITES
DU 04 AU 18 JUILLET 2014 AUX SEYCHELLES**

**RAPPORT DE LA FORMATION
DE PERFECTIONNEMENT :
HISTOLOGIE DES GONADES DE L'ALBACORE ET DU PATUDO DANS
L'ATLANTIQUE**

Dr. Diaha N'guessan Constance¹

SUMMARY

The Recommendation by ICCAT on the Establishment of a Scientific Capacity Building Fund for Developing States which are ICCAT Contracting Parties [Rec. 13-19] establishes funds intended for scientists from those developing States which are ICCAT Contracting Parties to attend ad hoc training workshops of their choice (of up to 14 days) on ICCAT related matters in scientific and/or research centres of other ICCAT CPCs. This document outlines the results of the placement of Dr Constance Diaha in a Research Centre of the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) to work on the biology of the tropical tuna species.

RÉSUMÉ

La Recommandation de l'ICCAT sur l'établissement d'un fonds pour le renforcement des capacités scientifiques pour les États en développement qui sont des Parties contractantes de l'ICCAT (Rec. 13-19) établit des fonds destinés à des scientifiques de ces États en développement qui sont Parties contractantes à l'ICCAT pour que ceux-ci assistent à des journées de formation ad hoc de leur choix (de 14 jours maximum) sur des sujets liés aux instituts scientifiques de l'ICCAT et/ou centres de recherche d'autres CPC de l'ICCAT. Ce document contient les résultats du séjour de la Dr Constance Diaha dans un centre de recherche de l'Institut de Recherche pour le développement (IRD) pour travailler sur la biologie des espèces de thonidés tropicaux.

RESUMEN

La Recomendación de ICCAT sobre el establecimiento de un fondo de creación de capacidad científica para los estados en desarrollo que son partes contratantes de ICCAT [Rec. 13-19] establece fondos destinados a científicos de dichos Estados en desarrollo que son Partes contratantes de ICCAT para que asistan a Jornadas de formación ad hoc de su elección (de hasta 14 días) sobre temas relacionados con ICCAT en institutos científicos y/o centros de investigación de otras CPC de ICCAT. Este documento recoge los resultados de la estancia de la Dra. Constance Diaha en un Centro de Investigación del Institut de Recherche pour le Développement (IRD) para trabajar sobre la biología de las especies de atunes tropicales.

¹ Département Ressources Aquatiques Vivantes DRAV-CRO Côte d'Ivoire.

Introduction

En Côte d'Ivoire, l'étude de la biologie de la reproduction des thonidés est essentiellement assurée par le Centre de Recherches Océanologiques d'Abidjan (CRO). Le travail consiste à suivre les stades de maturité sexuelle par les analyses macroscopiques et microscopiques des gonades en vue de déterminer le cycle d'activité sexuelle et la période de ponte des thonidés et d'identifier les femelles à échantillonner pour estimer leur fécondité relative et absolue individuelle. Cependant ces informations sont insuffisantes pour fournir à l'ICCAT un avis scientifique rigoureux car certains protocoles ne sont pas correctement exécutés faute de technicité. Les méthodes d'étude biologique évoluent dans le but d'avoir des résultats plus fiables et facilement interprétables. Or au CRO, cette technicité rigoureuse fait défaut et les résultats d'études biologiques sont sujet à discussion.

C'est dans le cadre du programme de renforcement des capacités des scientifiques en vue d'améliorer la qualité des données biologiques que j'ai effectué une formation en histologie au laboratoire de biologie de la Seychelles Fishing Authority (SFA) à Victoria (Mahé, Seychelles). J'ai été accueillie dans l'équipe IRD/SFA composée de 4 membres : Dr. Nathalie BODIN et Dr. Emmanuel CHASSOT (Chercheurs permanents IRD), Dr. Iker ZUDAIRE (Contractuel IRD, programme DCF), et Mlle Maria CEDRAS (Technicienne SFA, responsable laboratoire).

L'objectif de cette formation était d'améliorer mes connaissances et maîtriser trois principales techniques qui permettent une estimation précise des différents paramètres de reproduction chez les poissons, en particulier les thons tropicaux :

- l'analyse de l'histologie,
- l'analyse de la fécondité par gravimétrie
- l'analyse de la stratégie de reproduction par analyse d'image

1. Analyse histologique

1.1 Déshydratation et paraffinage

Une coupe nette d'une épaisseur d'environ 2-3 mm est d'abord effectuée à l'aide d'un scalpel dans le milieu du prélèvement gonadique puis déposée dans une histosette qui sera plongée successivement dans des bains d'alcool à 70%, alcool à 90%, alcool à 96% et Claral (solution remplaçant le xylène hautement toxique) à l'aide d'un appareil automatique (**Figure 1, Tableau 1**).

Trois protocoles de paraffinage ont ensuite été utilisés afin de préparer les échantillons à la mise en bloc puis à la coupe (**Tableau 1**). Le choix de l'un ou l'autre des protocoles dépend du résultat obtenu après les différents bains de préparation mais aussi de l'aspect macroscopique des gonades.

Après le dernier bain de paraffine, nous avons utilisé un Tissue TEK pour l'inclusion et des moules en Acier inoxydables de 37×24×9mm et des histosettes pour préparer les coupes (**Figure 2**).

1.2 Coupe histologique et coloration

Nous avons utilisé un microtome (**Figure 3**) pour effectuer les coupes de 7 à 10 micromètre d'épaisseur qui ont été déposées dans un bain flottant (**Figure 4**) à 40°C avant leur montage entre lame et lamelle. Les lames ainsi obtenues sont déposées dans un séchoir à 50°C jusqu'à ce que le montage sèche. Ces lames sont ensuite rangées sur un portoir de lame pour la coloration (**Figure 5**). Le protocole utilisé pour la coloration est présenté dans le **Tableau 2**.

Les différentes lames restent dans le dernier bain de xylène pendant le processus de montage. Les lames sont retirées une à une de la solution de xylène puis on ajoute de l'Eukitt (colle) et enfin la lamelle. Le montage ainsi obtenu est déposé à l'air libre le temps de sécher.

1.3 Lecture des coupes histologiques

Sur la base de la terminologie utilisée par Brown-Petersen et al. (2011) et appliquée pour l'albacore par Zudaire et al. (2013), les ovaires ont été classés selon le plus avancé des stades des ovocytes présents dans l'ovaire. Ainsi :

- la phase de l'ovaire immature comprend le stade de croissance primaire
- la phase de l'ovaire en développement comprend les stades de (i) la formation de la corticale alvéolaire, (ii) de la vitellogénèse primaire et (iii) de la vitellogénèse secondaire
- la phase de frai-capable qui comprend les stades de (i) la vitellogénèse tertiaire, (ii) la migration de la vésicule germinale et (iii) l'hydratation
- la phase de régénération

Les échantillons ont été également utilisés pour déterminer les différents stades d'atrésie que sont l'atrésie Alpha et l'atrésie Béta et aussi les follicules post-ovulatoires.

2. Analyse de la fécondité par gravimétrie

La fécondité a été appréhendée à travers l'estimation du potentiel de ponte par la méthode gravimétrique qui correspond au nombre d'œufs éjectés par ponte (batch fecundity). Pour cette étude, 3 sous-échantillons de 0,1 g ($\pm 0,01$) ont été recueillis à partir de la gonade fixée dans le formol à 4% auquel on a ajouté quelques gouttes de glycérine pour faire la différence entre les ovocytes matures qui deviennent translucides et les immatures qui demeurent opaques. Sous une loupe binoculaire, on compte tous les ovocytes transparents. La fécondité par ponte a été calculée à partir de la densité moyenne pondérée des trois sous-échantillons multipliés par le poids total de l'ovaire. Un seuil de 10% pour le coefficient de variance a été appliqué pour les trois sous-échantillons, et quand ce seuil a été dépassé, les ovocytes sont recomptés ou un autre prélèvement est opéré.

3. Stratégie de reproduction par analyse d'image

La méthode de l'analyse d'image permet de déterminer la stratégie de la régulation de la fécondité à travers l'estimation des fréquences de taille et de la distribution des ovocytes. Pour cela, nous avons utilisé un logiciel d'analyse d'image automatisé commandé par ordinateur (ImageJ et plugin ObjectJ). A partir des ovaires conservés dans la solution tampon de formol, un échantillon de 0,04 g ($\pm 0,0001$ g) a été prélevé et mis dans une solution de Rose de Bengale pendant au moins 24 h. La solution de Rose de Bengale est obtenue à partir de 2g de poudre diluée dans 1L de formol à 4%. L'échantillon coloré en rose est passé dans un tamis à 125mm de maille avant d'être pulvérisé par de l'eau à haute pression pour séparer le tissu conjonctif des ovocytes. Les ovocytes débarrassés de toutes impuretés sont mis dans une boîte comportant 4 loges de même dimension afin de faire des photos des ovocytes avec un appareil numérique incorporé au microscope. Sur les différentes photos obtenues, le diamètre des ovocytes est automatiquement mesuré grâce au logiciel d'analyse d'image.

Importance de la formation

- **Harmonisation du protocole d'analyse de la reproduction des thons tropicaux :**

Les études sur la reproduction sont importantes pour une compréhension globale de la dynamique des populations et pour prédire l'effet de la pêche sur le potentiel reproducteur d'un stock, ce qui est essentiel pour les décisions de gestion efficaces et pour la durabilité de la ressource (Schaefer, 2001; Murua & Motos, 2006). Pour cette raison l'utilisation de techniques précises et une terminologie normalisée est nécessaire pour éviter les préjugés à l'estimation des paramètres de la reproduction. Ces informations sont importantes et permettent une communication efficace entre les chercheurs. Ainsi les comparaisons seront facilitées au niveau de la collecte des données.

- **Perspectives à moyen et long terme pour le CRO et difficultés rencontrées :**

Les différentes techniques d'analyse de la reproduction apprises seront dans un premier temps transmises à l'ensemble du personnel du laboratoire de biologie du CRO. L'objectif à moyen terme sera d'appliquer ces méthodes aux thons tropicaux (listao, albacore et patudo) pêchés dans l'Océan Atlantique et débarqués à Abidjan. Les résultats obtenus en termes de stratégie de reproduction et fécondité seront ensuite comparés aux travaux réalisés dans les océans Indien et Pacifique. A plus long terme, des études similaires seront menées sur les autres espèces de poisson exploitées en Côte d'Ivoire et suivies par le CRO.

Cependant, il est à noter que malgré un fort investissement de la part du CRO avec l'aide de l'IRD pour le re-développement du laboratoire de biologie (achat d'un distributeur de paraffine, d'une plaque chauffante, d'un microscope avec caméra ainsi que l'ensemble des consommables et de la verrerie), certains appareils font toujours défaut (par ex : tissu processor, microtome) empêchant le bon déroulement des différentes analyses. Par exemple, le laboratoire du CRO est équipé d'un ancien microtome qui malheureusement ne permet pas l'obtention de coupes histologiques exploitables. Les chercheurs du CRO doivent dans un premier temps trouver une source de financement permettant le remplacement de cet appareil avant de pouvoir mener à bien leur recherche sur la reproduction des poissons.

References

- Brown-Peterson, N.J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B.J., Lowerre-Barbieri, S.K. 2011. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Mar. Coast. Fish.: Dyn. Manag. Ecosyst. Sci.* 3, 52-70.
- Murua, M., Motos, L. 2006. Reproductive strategy and spawning activity of the European hake *Merluccius merluccius* (L.) in the Bay of Biscay. *J. Fish Biol.* 69, 1288-1303.
- Schaefer, K.M. 2001b. Estimation of the maturity and fecundity of tunas. Report on the working group on modern approaches to assess maturity and fecundity of warm and cold water fish and squids. Bergen, Norway.
- Zudaire, I., Murua, H., Grande, M., Korta, M., Arrizabalaga, H., Areso, J., Delgado-Molina, A. 2013a. Fecundity regulation strategy of the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the Western Indian Ocean. *Fish. Res.* 138, 80–88.

Tableau 1. Trois différents protocoles de paraffinage appliqués aux échantillons.

Solution	Protocole 1	Protocole 2	Protocole 3
Alcool 70%	20 min		
Alcool 70%	25 min		
Alcool 90%	20 min		
Alcool 90%	25 min		
Alcool 96%	20 min		
Alcool 96%	25 min		
Claral	15 min		
Claral + Paraffine	toute la nuit à 60°C	toute la nuit à 45°C	4h à 60°C
Paraffine	3h à 60°C	3h à 55°C	3h à 60°C

Tableau 2. Protocole de coloration appliqué aux échantillons.

Solution	Temps d'immersion
Alcool absolu	2 min
Alcool absolu	2 min
Bain à l'eau	5 bains
Hématoxyline	2 min
Bain à l'eau courante	2 min
Alcool acide	5 bains
Bain à l'eau	2 min
Eosine	1 min
Alcool absolu	3 min
Alcool absolu	3 min
Xylène	5 min
Xylène	5 min



Figure 1. Tissue Processor.



Figure 2. Tissue TEK : Appareil d'inclusion des échantillons.



Figure 3. Microtome.

