ÉTUDE DE LA MATURITÉ SEXUELLE DES SARDINELLES SARDINELLA EBA (VAL) ET SARDINELLA AURITA C. ET V. DE LA RÉGION DE POINTE-NOIRE

par A. FONTANA*

Résumé

Pour définir les stades sexuels de Sardinella aurita et Sardinella eba, nous proposons une nouvelle échelle dont les caractéristiques sont basées sur la distribution de fréquences des diamètres des ovocytes et ovules intra-ovariens et sur l'étude macroscopique et histologique des gonades.

Cette échelle met en évidence le phénomène de ponte secondaire qui est particulièrement important chez les sardinelles.

Abstract

To define sexual stages of Sardinella eba and Sardinella aurita, we propose a new scale the characteristics of which are based on the frequencies distributions of ovocyts and intraovarian ovas diameters and on the macroscopic and histologic study of gonads.

This scale emphasizes the phenomena of secundary spawning which is very important for sardinella.

РЕЗЮМЕ

Для определения развития эародышевой клетки Sardinella aurita, Sardinella eba мы предлагаем новое подразделение, характеристики которого основаны на распределении частот диаметров яйцеклеток и на микроскопическом и гистологическом изучении зародышевых клеток.

При таком подразделении легко определить вторичное метание икры, которое имеет большое значение у Sardinella.

* Océanographe biologiste, Centre O.R.S.T.O.M. de Pointe-Noire (Congo).

A. FONTANA

1. INTRODUCTION

Les échelles proposées jusqu'à présent (BELLOC et DESBROSSES, 1930-ANDREU, 1951; 1955-ANDREU et PINTO, 1957) pour la détermination des stades sexuels de Clupéidés se référaient plus ou moins à l'échelle internationale établie pour le hareng (Wood, 1930). Telle était l'échelle employée pour les sardinelles au Centre O.R.S.T.O.M. de Pointe-Noire et qui n'a pas donné entière satisfaction pour suivre les processus de maturation des gonades. En effet, chez le hareng qui a servi de base à l'ensemble des études, il y a un seul groupe d'ovocytes qui évolue jusqu'à la ponte. Chez les sardinelles, au contraire, on peut observer trois groupes bien distincts d'ovocytes, ce qui permet de supposer que ces poissons pondent plusieurs fois durant une même saison de ponte.

Pour établir une nouvelle échelle de maturité sexuelle des femelles, nous avons été amené à faire d'une part la mesure et le comptage des ovocytes et ovules intra-ovariens et d'autre part une étude macroscopique détaillée des ovaires complétée par un examen de coupes histologiques. Pour l'étude de la maturité sexuelle des mâles, la mesure des spermatocytes est impossible à faire et on a été obligé de se baser uniquement sur les observations macroscopiques.

2. ÉTUDE DE LA MATURITÉ SEXUELLE DES FEMELLES

2.1. Méthodes d'études.

2.1.1. Échantillonnage et prélèvement.

Notre cycle d'observation porte sur un an. Le rythme d'échantillonnage, fonction de la pêche du sardinier local, est en moyenne bimensuel. A chaque fois, un échantillon comprenant 10 individus par classe de 1 cm est prélevé. Ces poissons sont alors mesurés et pesés. Les ovaires sont pesés à 0,1 gr près puis mis en flacon de verre et conservés au deep-freezer quand le nombre de gonades est trop important pour être étudié dans la journée.

2.1.2. Observation macroscopique.

On examine attentivement les ovaires en notant leur aspect général, leur coloration et la visibilité des ovocytes à travers la membrane ovarienne.

2.1.3. Mensuration et comptage des ovocytes.

On prélève un petit échantillon de 0,05 gr environ dans la partie médiane de l'ovaire. Cet échantillon est placé dans un petit tube de verre contenant du formol à 5 %. Au bout de 3 à 4 jours et après agitation répétée du tube, le stroma ovarien se dissout et les ovocytes se détachent facilement les uns des autres. Ceux-ci sont alors placés dans une cuve de Dollfus à fond quadrillé et examinés à la loupe binoculaire.

On mesure à l'aide d'un micromètre oculaire environ 2 à 300 ovocytes pour obtenir la distribution de fréquence de leur diamètre. Comme nous l'avons contrôlé en prélevant des échantillons à différents endroits d'une même gonade, les ovocytes de différents diamètres sont disposés au hasard dans l'ovaire : on admet donc que la distribution de fréquence d'un échantillon est représentative de celle de l'ensemble des ovocytes de l'ovaire. Pratiquement, on se contente de compter et mesurer les ovocytes contenant du vitellus, d'un diamètre supérieur à 160 μ car il est très difficile et sans intérêt de séparer et de compter sous loupe binoculaire les ovocytes du stock général.

2.1.4. Coupes histologiques.

L'étude complémentaire des ovaires par la technique des colorations permet de connaître les caractéristiques histologiques des ovocytes correspondant aux différents modes. Dès que l'on a



Fig. 1. — Phases de maturation des ovaires définies en fonction des fréquences des diamètres des ovocytes et ovules intra-ovariens.

prélevé une portion d'ovaire pour la mesure des ovocytes, le reste est fixé au Bouin, inclus à la paraffine et coloré.

Différentes colorations ont été employées :

- Hématoxyline éosine.
- Trichromique de Masson.
- Mallory.
- Réaction tannoferrique.
- Hémalun érythrosine safran (Masson).



Fig. 2. - Relation entre le diamètre modal du 1er et 2e groupe d'ovocytes.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le trichromique de Masson et la coloration de Mallory qui donnent des coupes bien différenciées. La réaction tannoferrique est spécifique des granulations protéiques et donne d'assez bons résultats dans la coloration des granules vitellins notamment au premier stade de la vitellogénèse.

2.2. Observations et interprétations.

Nos observations ont porté aussi bien sur Sardinella eba que sur Sardinella aurita et ont montré que les caractères du cycle sexuel étaient identiques chez ces deux espèces.

2.2.1. Distribution de fréquence des diamètres des ovocytes et ovules intra-ovariens.

Ces distributions de fréquence permettent de distinguer 6 stades, A à F, indiqués sur la figure 1. La maturation des ovocytes se fait par vagues successives. Au fur et à mesure que le premier groupe d'ovocytes mûrit et est pondu, un second prend sa place et ainsi de suite. Le tableau 1 nous donne en microns d'une part l'intervalle de variation des diamètres des ovocytes pour chaque stade et d'autre part la valeur modale à la fin de chaque stade.

| Stade | A | В | С | a | E | F |
|------------------------------|------|-----------|---------|----------|---------|--------------------------------|
| Intervalle de varia- tion | →160 | 160 à 480 | 400-630 | 800-1000 | 400-470 | Cellules en voie de nécrose |
| Valeur modale | 100 | 450 | 580 | 900 | 450 | — |

TABLEAU 1

Ce tableau peut être utile pour connaître le stade sexuel d'un ovaire dont la détermination demeure incertaine. Il suffit alors de mesurer au binoculaire une vingtaine d'ovocytes choisis parmi les plus gros. Toutefois, la mesure seule des ovocytes ne permet pas de différencier un ovaire à la fin du stade E d'un ovaire à la fin du stade B qui n'a pas encore pondu. Ils possèdent tous les deux un mode à 450 μ environ. Mais ces ovaires, comme nous le verrons plus loin en détail, ont un aspect macroscopique si différent, que la confusion entre les deux stades est impossible. A la fin du stade E l'ovaire est mou, vascularisé et de couleur rose saumon avec de nombreux espaces hyalins alors qu'à la fin du stade B il est ferme et orangé.

Il nous a paru intéressant d'étudier la relation existant entre les valeurs modales du premier et deuxième groupe d'ovocytes. La figure 2 nous montre ainsi qu'il y a une bonne relation pour les stades B-C et D. Les groupes d'ovocytes mûrissent en même temps, mais dès la fin du stade C, seuls les ovocytes du premier groupe continuent apparemment à augmenter de volume. La rareté des stades D dans nos échantillons nous fait supposer que la ponte doit être un phénomène très rapide et qui entraînerait peut-être les sardinelles à faire une migration en profondeur à ce moment là. Il faut noter également qu'il est extrêmement rare de rencontrer des ovaires dont les ovocytes ont un diamètre compris entre 630 et 800 μ . La brusque augmentation de volume entre les stades C et D est due à une très rapide absorption d'eau. Celle-ci provoquera l'éclatement des follicules et la ponte.

2.2.2. Caractères macroscopiques des gonades.

L'étude macroscopique des ovaires permet de définir 6 stades qui correspondent parfaitement à ceux définis par l'étude des distributions de fréquence des ovocytes :

STADE A. Les gonades sont petites et fermes, transparentes ou rose clair. Les ovocytes ne sont pas visibles.

STADE B. L'ovaire passe du rose pâle au rose foncé puis à l'orange clair. Quelques ovocytes sont parfois visibles à travers la membrane ovarienne à la fin du stade B, mais l'ovaire reste ferme.

STADE C. La coloration est variable : jaune orange clair ou foncé. L'ovaire plus gros devient moins ferme. La surface devient granuleuse et les ovocytes sont visibles à l'œil nu.

STADE D. L'ovaire est très gros et occupe toute la cavité abdominale. La membrane ovarienne est très fine. Les ovules sont transparents et parfaitement visibles. A la moindre pression exercée sur l'abdomen les ovules sont expulsés.

STADE E. Après la ponte, l'ovaire est flasque, très vascularisé. Il est généralement de couleur rose saumon et rouge à la fin du stade, notamment dans la partie postérieure. On voit à travers la membrane ovarienne distendue, les ovocytes de 450 μ environ caractérisant le début du stade C. Il reste encore quelques ovules transparents mais ceux-ci vont dégénérer et à leur place subsisteront des espaces hyalins.

STADE F. Après la dernière ponte, l'ovaire est épuisé, complètement collapsé. Il a l'aspect d'un sac vide et possède une coloration rouge due à une très forte vascularisation. On observe également des taches marron représentant des zones en voie de nécrose. Là encore, on peut rencontrer quelques ovules transparents résiduels.

Il convient d'ajouter, au sujet des caractères macroscopiques, que l'on constate une évolution générale de l'aspect et de la couleur de l'ovaire au cours de la maturation mais que ces caractères ne sont pas toujours, à eux seuls, des critères rigoureux de reconnaissance. Les poissons présentent quelquefois des gonades rouge sang qu'on serait tenté d'attribuer au stade F. En fait la mesure des ovocytes montre qu'il s'agit d'un stade B ou C. Ces hémorragies seraient dues à un traumatisme provoqué au moment de la capture du poisson. D'autre part, au stade C les ovocytes ne sont pas toujours très visibles à travers la membrane ovarienne.

2.2.3. Caractères histologiques des gonades.

L'étude histologique montre que les stades admis précédemment correspondent effectivement à différentes étapes de maturation des ovocytes.

STADE A. Dans les ovaires immatures les ovocytes de forme polyédrique se trouvent disposés régulièrement le long des lamelles ovariennes. Leur cytoplasme est homogène et fortement basophile. La réaction tannoférrique ne provoque aucun précipité responsable de la présence de granules vitellins. Le noyau est bien délimité mais peu chromatique avec de nombreux nucléoles disposés contre la membrane nucléaire. Le rapport nucléocytoplasmique est égal en moyenne à 0,50. Les ovocytes caractéristiques du stade A représentent les ovocytes du stock général de réserve.

STADE B. Il est caractérisé surtout par le début de la vitellogénèse. Il y a apparition et développement d'une couronne de granules vitellins de la périphérie de la cellule vers le noyau. A la fin du stade B le vitellus occupe tout l'espace protoplasmique à l'exception de deux zones cytoplasmiques, une à la périphérie de la cellule et l'autre autour du noyau. La basophilie du cytoplasme devient moins forte. De nombreuses gouttelettes lipidiques apparaissent au sein du vitellus. Le noyau devient de plus en plus chromatique et le rapport nucléocytoplasmique passe à 0.30.

STADE C. Les ovocytes ont une forme arrondie. Une étroite bande de cytoplasme devenu acidophile persiste à la périphérie de la cellule. Les granules vitellins fusionnent et augmentent de volume. Les gouttelettes lipidiques se concentrent en une couronne périnucléaire. A ce stade, il peut se produire un début d'absorption d'eau par les ovocytes. Ceci entraîne une légère plasmolyse due aux déshydratants histologiques, et les cellules apparaissent alors rétractées à l'intérieur de leur follicule. Le noyau, assez chromatique, est plus diffus et présente des expansions dans lesquelles on retrouve parfois les nucléoles. Le rapport nucléocytoplasmique diminue encore et est égal à 0,15.

STADE D. On observe à ce stade de grosses cellules plasmolysées par l'action des déshydratants et constituant les ovules mûrs. Il n'est plus possible d'observer sur les coupes histologiques les différents organites cellulaires. Les follicules ont éclaté par suite de la brusque absorption d'eau des ovules. Le reste de l'ovaire est occupé par les ovocytes du stock général, ceux du stade B et ceux du début du stade C, qui vont être le point de départ de nouvelles pontes. Un ovule observé in vivo à la loupe binoculaire apparaît comme une grosse cellule hyaline bourrée de vitellus et possédant une seule goutte lipidique de 120 microns de diamètre. Le noyau reste invisible.

STADE E. On aperçoit encore au début de ce stade des ovules mûrs résiduels dans la partie postérieure de l'ovaire et dans le canal ovarien. Les ovocytes du stock le plus avancé correspondent à ceux du début du stade C. Les espaces hyalins observés macroscopiquement correspondent à des zones de nécrose. On constate également dans ces zones qu'il y a une prolifération de petites cellules à noyau très chromatique. Certains auteurs ont cru voir dans ces cellules, des leucocytes jouant un rôle de phagocytose mais rien jusqu'à présent ne permet de l'affirmer.

STADE F. L'ovaire après la dernière ponte apparaît nettement désorganisé et tous les ovocytes en voie de maturation présentent des signes de nécrose. Toutes ces cellules vont dégénérer et être réabsorbées ; seuls subsisteront les ovocytes du stock général.

2.2.4. Conclusions sur les stades admis à partir des critères précédents.

Notre étude a permis de définir 6 stades sexuels (A-B-C-D-E-F) chez les sardinelles. PINTO et ANDREU (1957) ont retrouvé ces mêmes stades chez Sardina pilchardus ce qui montre bien que le processus de maturation des ovaires semble identique chez les Clupéidés vivant en eaux chaudes ou tempérées chaudes. Cependant, à partir d'un autre critère, la taille à la première maturité, il nous est possible de distinguer dans le stade A, les poissons qui n'ont jamais pondu et les poissons qui sont au stade de repos après une période de ponte. Chez les sardinelles, la taille à la première maturité qui sera précisée dans un travail ultérieur, nous permettra donc de différencier le stade immature vrai du stade de repos. Ces deux stades possèdent tous deux la même distribution de fréquence des diamètres des ovocytes et pratiquement les mêmes caractères macroscopiques et histologiques.

Nous proposons donc à partir de ce nouveau critère, l'échelle définitive suivante :

 $A \begin{array}{c} \checkmark & I. \ Immature. \\ II. \ Repos. \end{array}$

- $B \rightarrow III.$ En voie de maturation.

 $C \rightarrow IV.$ Préponte.

- $D \rightarrow V$. Ponte.
- $E \rightarrow VI$. Fin de la ponte et récupération avant une ponte ultérieure.
- $F \rightarrow VII$. Fin de la dernière ponte et involution de l'ovaire.

3. ÉTUDE DE LA MATURITÉ SEXUELLE DES MÂLES

Il est moins aisé de définir une échelle sexuelle pour les mâles : d'une part, parce que la distribution des diamètres des spermatogonies et spermatocytes est impossible à faire vu leur très petite taille et d'autre part parce que les caractères macroscopiques et histologiques des gonades ne sont pas très différenciés suivant les stades.

Malgré tout, nos observations permettent d'adopter la même échelle pour les mâles que pour les femelles.

I. Immature.

II. Repos.

III. En voie de maturation.

IV. Pré-émission.

V. Émission de spermatozoïdes.

VI. Fin de l'émission des spermatozoïdes et récupération.

VII. Fin de la dernière émission de spermatozoïdes.

Caractéristiques macroscopiques des gonades.

STADE I. Les gonades sont blanches ou légèrement translucides, très fines et en lame de couteau.

STADE II. Les caractères sont identiques à ceux du stade I.

STADE III. La gonade devient plus large, mais reste blanche et ferme. Si l'on y fait une incision aucun liquide ne coule.

STADE IV. La gonade est moins ferme, mais un liquide coule dès que l'on pratique une incision.

STADE V. Il correspond à l'émission des spermatozoïdes. La gonade est très grosse et molle. A la moindre pression exercée sur l'abdomen le sperme coule.

STADE VI. Fin de l'émission des spermatozoïdes. La gonade est légèrement flasque. La couleur rose observée surtout dans la partie postérieure correspond à une très fine vascularisation.

STADE VII. Après la dernière émission de spermatozoïdes la gonade est très flasque et fortement vascularisée.

Le processus de maturation des mâles apparaît identique à celui des femelles. Il y a maturation continue de spermatocytes durant toute la saison de ponte.

4. CONCLUSION

A la suite de nos travaux nous pouvons établir le schéma général du cycle sexuel des sardinelles.

Après sa maturation normale du stade I au stade V, la gonade passe au stade VI puis revient au début du stade IV cela plusieurs fois durant une même saison de ponte. A la fin de cette période, toutes les gonades passent au stade VII puis II (Repos) avant de recommencer un nouveau cycle sexuel.



Nous donnons à titre de comparaison, le schéma général du cycle sexuel des harengs qui a servi de base à l'échelle employée à Pointe-Noire :

A. FONTANA

Cette échelle est, en fait, suffisante pour déterminer la saison de ponte puisque les stades IV, V, VI du hareng correspondent aux stades IV, V, des sardinelles, mais elle ne donne alors plus satisfaction pour des calculs de fécondité. La présence chez les sardinelles du cycle IV-V-VI-IV... pourrait expliquer la différence de fécondité qui existe entre ces poissons de mers chaudes et ceux de mers froides.

| Stade | Femelle | Diamètre modal du groupe d'ovocytes le plus avancé | Mâle |
|-------|--|---|---|
| I | Gonade petite et ferme — transparente ou rose clair — ovocytes invisibles. | 100 μ | Gonade blanche ou légèrement translu- cide — très fine et en lame de coutcau. |
| 11 | Caractères sensiblement identiques au stade I. | 100 μ | Caractères sensiblement identiques au stade I. |
| III | Gonade ferme et de couleur variant du rose pâle à l'orange clair — quelques ovocytes sont parfois visibles à travers la membrane ovarienne. | 450 μ | Gonade blanchâtre ferme ; aucun liquide ne coule si on y fait une incision. |
| IV | Gonade plus grosse et moins ferme géné- ralement orange clair puis foncé. Les ovocytes visibles à travers la mem- brane ovarienne rendent la surface de l'ovaire granuleuse. | 580 μ | Gonade plus molle et blanche — un liquide blanchâtre s'écoule dès que l'on pratique une incision. |
| V | Gonade très grosse occupant toute la cavité abdominale. Membrane ova- rienne très fine. Les ovules hyalins et de grosse taille sont parfaitement visibles et sont expulsés à la moindre pression exercée sur l'abdomen. | 900 fr | Gonade grosse et molle. Le sperme coule à la moindre pression exercée sur l'abdomen. |
| VI | L'ovaire est flasque très vascularisé. Sa couleur varie du rose saumon au rouge. A travers la membrane ova- rienne les ovocytes de 460 μ sont par- faitement visibles. Nombreux espaces hyalins. | 450 μ | Gonade flasque et présentant une vascu- larisation très fine particulièrement dans la partie postérieure. |
| VII | Ovaire complètement collapsé très flas- que de couleur rouge due à une très forte vascularisation. A ce stade, l'ovaire a l'aspect caractéristique d'un sac vide. | Ovocytes en voie de nécrose. | Gonade très flasque, épuisée et forte- ment vascularisée. |

Nouvelle échelle proposée

Remerciements

Nous tenons à remercier la direction et le personnel de l'armement COTONNEC qui nous a permis de faire notre travail d'échantillonnage.

.

Nos plus vifs remerciements vont également à M. Prosper M'FINA, qui a réalisé les très nombreuses coupes histologiques, MM. Y. GHENO, J. C. LE GUEN et F. POINSARD pour l'aide et les conseils qu'ils nous ont apportés tout au long de ce travail et M. DAGET qui a bien voulu revoir et corriger ce texte.

BIBLIOGRAPHIE

ANDREU (B.), 1953. — Consideraciones biologicas sobre la reproduccion de la Sardina gallega. Invest. pesquera, nºs 625-626, 34-40.

ANDREU (B.), 1955. - The sexuality of sardines. Proc. & tech. Papers CGPM FAO Roma, 3, 45-60.

ANDREU (B.), PINTO (J. S.), 1957. — Caracteristicas histologicas y biometricas del ovario de sardina (S. pilchardus) en la maduracion, puesta y recuperacion, origen de los ovocitos. Invest. pesquera., 6, 3-38.

BELLOC (G.), DESBROSSES (P.), 1930. — Remarques sur la sexualité de la sardine, Clupea pilchardus (Walb.). Rev. Trav. Off. sc. iech. Pèches mar., 3, nº 1, 63-78.

CLARK (F. N.), 1934. — Maturity of the California sardine (Sardinops caerulea) determined by ova diameter measurements. California Div. Fish and Game Fish. Bull., nº 42, 48 p.

FULTON (T. W.), 1898. — On the growth and maturation of the ovarian eggs of teleosteans fishes. Ann. Rep. Fish. Board Scot. gen. Rep., 161-164, 88-124.

HIGHAM (J.), 1964. — Sexual maturation and spawning of Atlantic Menhaden. Fish Wildlife Serv. Fish. Bull., 63, n° 2, 255-271.

LANGERON (M.), 1949. — Précis de microscopie. Masson édit.

PINTO (J. S.), ANDREU (B.), 1956. — Algunos aspectos del desarrolo inicial del ovario de sardina (S. pilchardus Walb.). Invest. pesquera, 5, 3-12.

PINTO (J. S.), ANDREU (B.), 1957. — Scale for the determination of evolutive phases of sardine (S. pilchardus Walb.) ovaries in connection with the histophysiology of the gonad. Proc. & tech. Papers CGPM FAO Roma, 4, 393-411.

POLDER (J. J. W.), 1961. — Cyclical changes in testis and ovary related maturity stages in the north sea herring, Clupea harengus L. Arch. Neerl. Zool., 14, nº 1, 45-60.

Wood (H.), 1930. — Scottish herring schoals. Prespawning and spawning movements. Scotl. Fish. Bd. Sci. Invest., 1, 1-71.

ANDREU (B.), 1951. — Consideraciones sobre el comportamiento del ovario de sardina (S. pilchardus) en relacion con el proceso de maduracion y de freza. Bol. Inst. Esp. Ocean., 41, 16 p.



Photo 1. — Ovaire immature (stade I). Les ovocytes du stock général de réserve sont disposés le long des lamelles ovariennes. Leur cytoplasme est basophile. Grossissement : ×40.



Photo 2. — Ovaire au stade de repos (stade II). On trouve les mêmes ovocytes que dans le stade I avec une disposition peut-être moins régulière. Grossissement : ×45.

.





Photos 3 et 4. — Début de la maturation de l'ovaire (stade III). Il y a apparition au sein du cytoplasme d'une couronne de granules vitellins et de gouttelettes lipidiques. Le cytoplasme limité à deux anneaux périnucléaire et péricellulaire devient moins basophile. Grossissement : ×40 et ×150.





Pholos 5 ei 6. — Préponte (stade IV). Il persiste une étroite bande de cytoplasme autour du noyau. Les gouttelettes lipidiques dissoutes lors des préparations histologiques apparaissent en blanc au milieu du vitellus. Le noyau devient plus diffus. On peut observer également sur la photo 6 de nombreux ovocytes du stock général avec leur cytoplasme très basophile et leur noyau peu chromatique. Dans le noyau et plaqué contre la membrane nucléaire, on distingue de nombreux nucléoles. Grossissement : ×40 et ×150.



Photo 7. — Ovaire au stade V (Ponte). Les ovules sont plasmolysés sous l'action des déshydratants histologiquess On peut observer néanmoins de grosses granulations vitellines. Sur cette photo sont également visibles les ovocyte. de deux modes différents (320 et 450 μ) qui seront le point de départ de nouvelles pontes. Grossissement : ×40.



Photo 8. — Ovaire après une ponte partielle (stade VI). Les ovocytes du mode le plus avancé (450 μ) sont séparés entre eux par des zones de nécrose et de prolifération cellulaire. Ces zones correspondent aux espaces hyalins observés macroscopiquement sur la gonade à ce stade. Grossissement : $\times 40$.