PROPOSITION D'ASSOCIATION DE J.F. BAROILLER, CIRAD-EMVT, AU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DES POISSONS DE L'INRA (RENNES) SUR LE THEME:

"RECHERCHE, DANS LA GONADE EN COURS DE DIFFERENCIATION, D'EXPRESSIONS SPECIFIQUES DE GENES LIES A LA MASCULINISATION PAR LA TEMPERATURE CHEZ LE TILAPIA".

J.F. BAROILLER

Aout 1995

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique

CIRAD-EMVT: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, département d'Elevage et Médecine Vétérinaire Tropicale

PROPOSITION D'ASSOCIATION DE J.F. BAROILLER, CIRAD-EMVT, AU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DES POISSONS DE L'INRA (RENNES) SUR LE THEME:

"RECHERCHE, DANS LA GONADE EN COURS DE DIFFERENCIATION, D'EXPRESSIONS SPECIFIQUES DE GENES LIES A LA MASCULINISATION PAR LA TEMPERATURE CHEZ LE TILAPIA".

J.F. BAROILLER

Aout 1995

INRA: **I**nstitut **N**ational de la **R**echerche **A**gronomique

CIRAD-EMVT: Centre de **C**oopération **I**nternationale en **R**echerche **A**gronomique pour le **D**éveloppement, département d'**E**levage et **M**édecine **V**étérinaire **T**ropicale

Sommaire

I. Curriculum Vitae 3

II. Présentation des activités de J.F. BAROILLER au sein du CIRAD-EMVT 10
A. Situation de l'Unité de Recherche Aquaculture du CIRAD-EMVT 10
1. Ressources humaines 10
2. Problématiques de Recherche et de Développement de l'U.R. Aquaculture 10
a) Thématiques scientifiques 10
3. Les implantations et la répartition des taches 10
a) Afrique 10
b) Asie 12
c) France 13
B. Activités de Développement, Missions 14
C. Présentation sommaire de mes activités de Recherche au sein de l'U.R 14
1. Activités passées 15
2. Activités présentes 15

III. Activités de Recherche développée avec le Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA, à Rennes, 16
A. Objectifs et cadre général 16
B. Dimorphisme de croissance lié au sexe chez le tilapia 18
C. Déterminisme et différenciation du sexe chez le tilapia 20
1. Justification appliquée 20
2. Intérêt scientifique 21
a) la différenciation du sexe 21
b) le déterminisme génétique du sexe 21
3. L'étude de la physiologie de la différenciation gonadique 22
4. Potentialités masculinisantes et féminisantes des stéroïdes spécifiquement identifiés pendant la différenciation ovarienne et testiculaire 23
5. Déterminisme génétique du sexe 24
6. Déterminisme environnemental du sexe 27
a) Mise en évidence d'un déterminisme environnemental du sexe 27
b) Effet des basses températures 29
c) Variabilité de la thermosensibilité 29
d) Effet de la température sur une autre espèce de tilapia 29

IV. Bilan et Perspectives 30
A. Bilan en matière de Recherche 30
B. Bilan personnel et pour le CIRAD-EMVT 30
C. Perspectives envisagées: programme proposé dans le cadre d'une association avec le Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA 31
a) Activités de l'Equipe Différenciation et Ovogenèse du laboratoire de Physiologie des Poissons sur la truite arc en ciel 31
b) Connaissances actuelles sur les mécanismes de la TSD chez les reptiles
c) Proposition de programme d'association
d) Intégration du programme proposé au sein des activités de l'Equipe Différenciation et Ovogenèse et liens avec le Laboratoire de Génétique des Poissons 33

Annexe: Liste des Publications

I. CURRICULUM VITAE

I. Curriculum Vitae

Jean-François Baroiller
Né le 28 Mai 1957 à Nancy
Marié, 3 enfants

Diplomes

- Baccalauréat D (Mention AB)
- Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) de Biologie et Physiologie de la Reproduction (Mention B)
- Thèse de Doctorat de l'Université P. et M. Curie, Paris VI (Mention très honorable avec les félicitations du jury)

Langues

Anglais scientifique: traduction et conversation

Situation professionnelle

01.02.1988 - Recruté à la Division Pêche et Pisciculture du Centre Technique Forestier Tropical (CTFT), département du Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD).

14.06.1988 - Affecté au Département Piscicole de l'Institut des Savanes (IDESSA) de Bouaké (Côte d'Ivoire).

15.05.1992 - Mise en place et coordination scientifique et financière d'une collaboration CIRAD-INRA-ORSTOM-Laboratoire d'Endocrinologie comparée de Leuwen (Belgique)-IDESSA. Afin d'optimiser la coordination, une localisation au Laboratoire de Physiologie des poissons de l'INRA à Rennes a été privilégiée jusqu'au terme du projet (31/12/95).

13.01.1994 - Chargé de mission par le CIRAD et l'INRA dans le cadre du projet de Recherches sur l'aquaculture du tilapia rouge à l'Ile de La Réunion (mandaté par les 2 organismes pour assurer le pilotage scientifique du projet).

Participations à des Congrès

1984 - 1ère Réunion Française de Physiologie de la Reproduction des Poissons (**présentation d'une communication**). Paimpont, Octobre 1984.

1985 - Symposium International sur l'Aquaculture de la Carpe. Evry, Septembre 1985.

1986 - Symposium Franco-Israelien: Reproduction in fish. Basic and applied aspects in endocrinology and genetics (**présentation d'une communication**). Tel Aviv, 10-12 Novembre 1986.

1987 - 2eme Réunion Française de Physiologie de la Reproduction des Poissons (**présentation d'une communication**). Bordeaux, Septembre 1987.

1988 - Symposium International sur l'Aquaculture en Afrique (**présentation d'une communication**). Bouaké (Côte dIvoire), 9-11 Novembre 1988.

1989 - Asian Regional Worhshop on tilapia genetics, Manila, Philippines. **1er auteur d'une communication** présentée par A. Cissé (chercheur au Centre de Recherche Océanographique d'Abidjan): Baroiller, J.F., Rognon, X., Yapi, V.C. and Cissé, A. Genetic characterization and sex determination in tilapia in Côte d'Ivoire. (*)

1990 - Colloque sur les Bases Biologiques de l'Aquaculture - Guidel, 5-7 Septembre 1990.

1991 - Colloque "Sexe et évolution" de la Société française de Génétique et de la Société de Biologie du développement. Institut Pasteur, 24-25 mai. **Coauteur d'une communication** présentée par D. Chourrout (Laboratoire de Génétique des Poissons / INRA): Nakayama,I., Baroiller, J.F. et Chourrout, D. "Facteurs génétiques et environnementaux déterminants le sexe chez les poissons téléostéens". (*)

1991 - 3eme Symposium International sur le Tilapia en Aquaculture, ISTA III, (**présentation de 3 communications**). Abidjan, 11-16 Novembre 1991.

1992 - Second International Symposium of Fish Endocrinology. Palais du Grand Large, St Malo, 1-4 Juin. **Présentation d'un poster**: Involvment of 11ß-oxygenated androgens in testicular differentiation; temperature effects of 11ß-hydroxylase activity in the mechanisms of temperature sensitivity of gonadal sex differentiation in *Oreochromis niloticus*, J.F. Baroiller, A. Fostier and B. Jalabert.

1994 - Bordeaux Aquaculture: **Coauteur d'un poster**: Oral administration of Strontium or Fluoresceine for marking of *Oreochromis niloticus* fry, A. Toguyeni, B. Fauconneau, J.F. Baroiller and S.J. Kaushik (*).

1994 - Atelier "Déterminisme et Différenciation du sexe" de la Société Française de Génétique. 28-29 Avril 1994, Jouy-en-Josas. **Présentation d'un poster** "La température et les chromosomes sexuels déterminent le sexe-ratio chez *Oreochromis niloticus*, Baroiller, J.F., Chourrout, D., Fostier, A., et B. Jalabert.

1994 - Congrès International sur les Bases Biologiques de l'Aquaculture des Siluriformes (BASIL). Montpellier.

1994 - Congrès International d'Endocrinologie Comparée, Cordoba, Espagne. **Coauteur d'une communication** présentée par A. Toguyeni: Relationship between endogenous thyroid, steroid and GH hormonal status and growth parameters in *Oreochromis niloticus*: effect of feeding and sex, A. Toguyeni, J.F. Baroiller, B. Fauconneau, A. Fostier, K.A. Mol and P.Y. LeBail (*).

1995 - ROC-FRANCE-Joint Symposium on Marine Biotechnology. Taipeih, R.O.C., 14-15 Mars 1995, **1er auteur d'une communication** présentée par D. Chourrout: Sex determination studies in two species of teleost fish. **Baroiller, J.F.**, Nakayama, I., Foresti, F. and Chourrout, D. (*).

1995 - 5th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. 2-8 July, 1995, The University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA. **Présentation d'une communication** orale: Temperature sex determination in two tilapia species, *Oreochromis niloticus* and the red tilapia (Red Florida strain): effect of high and low temperatures, J.F. Baroiller, F. Clota and E. Geraz.

1995 - 3ème Atelier "Déterminisme et Différenciation du sexe" de la Société Française de Génétique. 28-29 Septembre 1994, Orléans.

---

* pas de présence effective, mais co-auteur de la comunication ou du poster présenté.

Participation à l'organisation de Colloque

- Membre du comité d'organisation et du comité scientifique du 3eme Symposium International sur le Tilapia en Aquaculture, ISTA III. Abidjan, 11-16 Novembre 1991.

Participation à des groupes de travail

- Groupe de travail sur le métabolisme de la 17α-Methyltestostérone chez la truite arc-en-ciel. Laboratoire de Recherches sur les Additifs Alimentaires. Toulouse, 18 Mai 1987.

- Groupe de travail "Reproduction". Réunion de la SEMII (Salmoniculture Expérimentale Marine IFREMER-INRA): **Présentation d'une synthèse bibliographique** des connaissances disponibles dans le domaine de l'Inversion sexuelle par traitement hormonal chez les Salmonidés. 9 Juillet 1987.

- Groupe de travail: "L'Aquaculture des tilapias; du développement à la recherche". **Présentation d'une synthèse bibliographique** sur la physiologie de la reproduction chez le tilapia. Nogent-sur-Marne, 28 Septembre 1987.

- Réunion sur la Biodiversité organisée par l'ORSTOM. **Présentation d'une communication**: thermosensibilité de la différenciation du sexe et biodiversité. Arles, 7-9 Sept. 1992.

- Groupement de Coopération Scientifique sur les Bases Biologiques de l'Aquaculture (GCS - BBA), Groupe de Travail "Aquaculture Tropicale" (GTAT). **Présentation du compte- Rendu** de l'opération de Recherche réalisée dans le cadre de ce groupe de 1990-1992: Baroiller, J.F., Fostier, A. et B. Jalabert. Rôle des facteurs externes sur la différenciation sexuelle: influence de la température et interactions avec le déterminisme du sexe chez *Oreochromis niloticus*, 10 sept. 1992.

- Coordination et animation d'une réunion sur la Différenciation et le Déterminisme du sexe chez le tilapia, Jouy-en-Josas,

- Membre Invité de la Commission Scientifique chargée d'évaluer les programmes du Laboratoire de Biologie Marine de l'Université de Bordeaux I, en vue de son rattachement à l'INRA comme laboratoire associé.

- Membre du Groupe "Déterminisme et Différenciation du Sexe" de la Société Française de Génétique.

- Coordination et animation d'une réunion sur le Dimorphisme de croissance lié au sexe chez le tilapia, Rennes, 1995 (participation de chercheurs français, belges et portugais).

Activités d'Enseignement

- Cours (4 h) donnés dans le cadre du D.A.A. de l'**ENSA** et de l'**ISPA** de **Rennes**, 1988.

- Cours sur la Physiologie de la Reproduction des Poissons d'Elevage Africains au Centre de Formation Piscicole de **Bouaké** (**Côte d'Ivoire**), à des élèves ingénieurs en dernière année de l'ISSTH (Institut Supérieur des Sciences et Techniques Halieutiques) de Nouadhibou (Mauritanie):

	1989	1990	1991	1992	1993
heures dispensées	6	12	20	20	28

- Cours (6 h) sur la Biologie et Physiologie de la Reproduction des Tilapias en dernière année d'**ENITA** (Ecole Nationale d'Ingénieurs des travaux Agricoles) de **Bordeaux**, 1994 et 1995.

- Cours (3h) sur la Différenciation sexuelle chez les poissons et ses déterminismes au **DEA** de Biologie Agronomie, Option Biologie Aquacole, Univ. **Rennes** I / ENSAR.

Missions à l'étranger ou hors métropole

- **Côte d'Ivoire** (1986 - 1 mois):

Mise en place d'expérimentations destinées à la production de géniteurs à descendances monosexes mâles et monosexes femelles (dans le cadre d'une thèse de Doctorat d'Université essentiellement réalisée au Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA)

- **Côte d'Ivoire** (1987 - 1 mois):

suivi des expérimentations mises en place en 1986.

- **Israël** (1990 - 1 semaine):

Visite des Laboratoires des Dr. Gordin, Yaron, Wohlfarth, Milstein et Hulata.

- **Mauritanie** (1992 - 9 jours):

Participation aux jurys de soutenance de mémoire d'ingénieurs de l'Institut Supérieur des Sciences et Techniques Halieutiques (ISSTH) à Nouadhibou. Visite du Centre National de Recherches Océanographiques et des Pêches (CNROP) de Nouadhibou.

- **Côte d'Ivoire** (1992 - 4,5 mois):

Mise en place et suivi d'expérimentations dans le cadre de la collaboration CIRAD-INRA-IDESSA.

- **Italie** (1992 - 2 jours):

Elaboration d'un projet de Recherches européen (AIR) sur le tilapia et la Rizipisciculture.

- **Belgique**: (1992 - 2 jours)

Elaboration d'un projet de Recherches Européen (STD III) sur le tilapia en tant que Coordonnateur: Amélioration de la Croissance d'*Oreochromis niloticus* par des techniques non hormonales de contrôle de la reproduction et optimisation des conditions d'élevage en Pisciculture africaine. (Projet classé priotaire A3 par la Commission).

- **Côte d'Ivoire** (1993 - 4,5 mois):

Mise en place et suivi d'expérimentations dans le cadre de la collaboration CIRAD-INRA-IDESSA.

- **Niger** (1993 - 10 jours):

Expertise du projet sur l'élevage en cage du tilapia dans le fleuve Niger, Encadrement et Mise en place d'expérimentations sur la production massive d'alevins et l'inversion hormonale.

- **Ile de La Réunion** (1993 - 12 jours):

Mise en place d'expérimentations pour l'optimisation des traitements de masculinisation par utilisation de la 11β-hydroxyandrostenedione, *via* l'alimentation.

- **Philippines**: (1994 - 12 jours)

Consultant pour le volet 3 (Aquaculture Technology Verification and Training) de l'ASEAN-EEC Aquaculture Development and Coordination Program, AADCP. Présentation d'une conférence au BFAR de Munoz.

- **Ile de La Réunion** (1994 - 34 jours):

Coordination du projet tilapia rouge à l'Ile de La Réunion, et suivi/encadrement des expérimentations mises en place par un étudiant de l'ENSAR sur la Génétique de la coloration et du sexe du tilapia rouge menés dans le cadre du projet tilapia rouge CIRAD/INRA/ARDA .

- **Belgique**: (1994 - 2 jours)

Elaboration d'un projet de Recherches sur le déterminisme du sexe chez le tilapia en tant que Coordonnateur du projet tilapia rouge avec le Laboratoire de démographie des Poissons et d'Aquaculture de Tihange (Univ. de Liège), Belgique.

- **Niger** (1994 - 10 jours):

Suivi et Encadrement d'un chercheur thésard Nigérien, Mahaman Alhassane,

- **Ile de La Réunion** (1995 - 10 jours):

Coordination du projet tilapia rouge à l'Ile de La Réunion, et mise en place d'un programme sur le déterminisme du sexe chez le Gueule Rouge dans le cadre d'une thèse Européenne de D. Desprez, VAT, CIRAD.

- **USA** (1995 - 9 jours):

5th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. 2-8 July, 1995, The University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA. **Présentation d'une communication** orale: Temperature sex determination in two tilapia species, *Oreochromis niloticus* and the red tilapia (Red Florida strain): effect of high and low temperatures, J.F. Baroiller, F. Clota and E. Geraz.

- **Ile de La Réunion** (1995 - 8 jours):

Coordination du projet tilapia rouge à l'Ile de La Réunion, et suivi/encadrement des expérimentations mises en place par un étudiant de l'ENSAR/ISPA sur le cycle sexuel du tilapia rouge, et d'une thèse Européenne sur le Déterminisme Génétique du sexe du tilapia rouge menés dans le cadre du projet tilapia rouge CIRAD/INRA/ARDA .

- **Philippines** (1995 - 10 jours):

Collaboration avec le PCMARD (Los Banos) et le FAC-CLSU (Munoz): suivi des expérimentations mises en place, analyse des résultats et préparation du rapport final.

Activités d'Encadrement (Stages de Recherche)

* *Techniciens:*

- **Ecole Forestière** de Bouaké (**Côte d'Ivoire**): 1 étudiant technicien supérieur

- **IUT** de **Montpellier**: 1 étudiant

- **CREUFOP** de **Montpellier**: 1 étudiant

* *DEA et Ecoles d'Ingénieurs:*

- **DEA** de Biologie et d'Ecologie de l'Université d'Abidjan (**Côte d'Ivoire**): 2 étudiants

- **ENSA** de Yamoussoukro (**Côte d'Ivoire**): 1 étudiant ingénieur agronome

- CFP/**ISSTH** de Bouaké/Nouadhibou (**Côte d'Ivoire**/Mauritanie): 5 étudiants ingénieurs

- **Université** de Pangassinan (**Philippines**): 1 étudiante

- Etudiants de la sous-région: 4 étudiants (**Niger**, **Benin**, **Sénégal**, **Burkina-Faso**)

- Co-Encadrement de 2 **DEA** de Biologie et Agronomie, Option Biologie Aquacole, Univ. de **Rennes** I (1991/92, 1994/95)

- Ingénieur **ENSAR**, **Rennes**, Lieux de Stage: Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA, à Rennes, Ile de La Réunion

- Ingénieur **ENITA** de **Bordeaux**, Lieux de Stage: Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA, à Rennes, GAMET de Montpellier

- Ingénieur **ENSAR/ISPA**, **Rennes**, Lieux de Stage, Ile de La Réunion

* *Thèses:*

- Co-Encadrement avec l'INRA Physiologie des Poissons, d'une **thèse** de **Docteur Ingénieur** de l'**ENSAR**, Rennes (Aboubacar Toguyeni)

- Co-Encadrement avec un chercheur belge, C. Melard (Université de Liège) d'une **thèse Européenne** dans le cadre du projet tilapia rouge à 'Ile de La Réunion (Damien Desprez).

- Encadrement de la **Thèse de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes** (Sorbonne) d'un Chercheur du Niger intervenant dans le cadre du projet Niger (Mahaman Alhassane).

Participation à des Jurys (niveau 3ème cycle) en France

- **DEA** de Biologie et Agronomie, Option Biologie Aquacole, Univ. de Rennes I : A. Toguyeni: Etude des facteurs physiologiques liés au sexe phénotypique dans le déterminisme du dimorphisme sexuel de croissance chez *Oreochromis niloticus*, Septembre 1992.

- **Thèse de Docteur en Sciences de l'Université Paris XI** ORSAY: X. Rognon: Diversité Génétique et relations Phylogénétiques chez les tilapias (Pisces : Cichlidae); Comparaison des données du Polymorphisme enzymatique et mitochondrial, Décembre 1993.

- **DAA** de Biologie et Agronomie, Option Biologie Aquacole, Univ. de Rennes I / ENSAR : C. Briand. Etude des ségrégations des déterminants génétiques du sexe et de la couleur chez le tilapia rouge de La Réunion. Septembre 1994.

- **Thèse de Docteur en Sciences de l'Université de Rennes**: A. Toguyeni. Etude des facteurs physiologiques, génétiques et comportementaux liés au sexe, dans le déterminisme du dimorphisme sexuel de croissance chez *Oreochromis niloticus.* Novembre, 1995.

Stages de formation spécialisée

- 1986: **Informatique**, utilisation du MINI 6 (5 jours)/ INRA de Rennes.

- 1988: **Caractérisation Electrophorétique** des espèces de tilapia, (1 mois), Laboratoire de Génétique des Poissons de l'INRA (R. Guyomard), Jouy-en-Josas.

- 1994: **Biologie Moléculaire** (2 semaines): Ecole-Chercheur ENSAR/INRA, Théorie et pratique de 4 méthodes de génétique moléculaire (Hybridation in situ, manipulation de grands fragments d'ADN, amplification de l'ADN par PCR, séquençage), Rennes.

II. PRESENTATION DES ACTIVITES DE J.F. BAROILLER AU SEIN DU CIRAD-EMVT

A. Situation de l'Unité de Recherche Aquaculture du CIRAD-EMVT

1. Ressources humaines

2. Problématiques de Recherche et de Développement de l'U.R. Aquaculture

a) Thématiques scientifiques

3. Les implantations et la répartition des taches

a) Afrique

b) Asie

c) France

B. Activités de Développement, Missions

C. Présentation sommaire de mes activités de Recherche au sein de l'U.R

1. Activités passées

2. Activités présentes

II. Présentation des activités de J.F. BAROILLER au sein du CIRAD-EMVT

A. Situation de l'Unité de Recherche Aquaculture du CIRAD-EMVT

1. Ressources humaines

Les Recherches Aquacoles constituent l'une des 4 Unités de Recherche (U.R.) du Département Elevage et Médecine Vétérinaire Tropicales du CIRAD.

A l'horizon 1996, l'effectif prévisionnel de l'Unité de Recherche, est de 8 agents, dont 6 cadres.

2. Problématiques de Recherche et de Développement de l'U.R. Aquaculture:

L'espèce majeure étudiée par l'U.R. Aquaculture est le tilapia, originaire d'Afrique où il représente environ 80% de la consommation de poisson d'eau douce; c'est également le 3ème groupe d'espèces d'eau douce produit en pisciculture dans le monde (500.000 tonnes/an). Cette production de tilapia est aujourd'hui assurée à 80% par l'Asie.

L'expérience du développement fait émerger des questions posées à une recherche parfois très appliquée, parfois très fondamentale le plus souvent réalisée en collaboration avec des partenaires privilégiés, en particulier l'INRA.

L'un des thèmes pérennes de l'UR est une recherche de base sur la Biologie des tilapias qui vise à répondre aux questions majeures posées par l'élevage intensif de cette espèce (fig. 1).

a) Thématiques scientifiques

- Contrôle de la reproduction chez les tilapias (Déterminisme et Différenciation du sexe, Cycle sexuel, Interactions Croissance/Reproduction): **J.F. Baroiller**, responsable scientifique.
- Ecosystème étang
- Systèmes d'élevage
- Systèmes de production

3. Les implantations et la répartition des taches:

Les implantations de la thématique "contrôle de la reproduction chez le tilapia" sont résumées dans la figure 2.

a) Afrique

le Niger:

- appui à la professionnalisation de l'Aquaculture représentée aujourd'hui par une organisation structurée, indépendante de l'Etat et de ses administrations: l'ADA (association des aquaculteurs),

Face à une baisse de la production halieutique du fleuve Niger (11000 tonnes en 1978/2000 t en 1985) liée à une diminution des surfaces inondables et une intensification de l'effort de pêche, un projet d'élevage du tilapia en cages flottantes a été initié sur ce fleuve dès 1981.

Après 2 phases respectivement consacrées à la mise au point des systèmes et techniques d'élevage puis de vulgarisation auprès des pêcheurs, le projet aborde une 3ème phase de viabilisation de la filière.

■ conduite d'un programme de recherches d'accompagnement aux Elevages de poissons en Cages flottantes sur une station nouvellement créée (1994):

• La "diversification des espèces d'élevage: Production d'alevins de *Clarias gariepinus* et d'*Heterobranchus bidorsalis*"

• L'Aliment et la conduite de l'alimentation.

Compte tenu des faibles disponibilités en sous-produits de l'agriculture, une part importante des matières premières, entrant dans la composition de l'aliment fabriqué sur place, provient d'importations (farine de poisson, tourteau de coton, ... originaires essentiellement du Nigeria et de la Côte d'Ivoire). De ce fait, l'étude cherche à démontrer la possibilité d'utiliser, en plus grandes proportions, une source protéique de moindre prix. Le programme étudie, en particulier, les effets de l'incorporation de différents pourcentages de tourteau de coton classique ou glandless (sans gossypol) sur la croissance des tilapias. Un travail parallèle est entrepris en Côte d'Ivoire sur 2 espèces de poisson-chat africain par P. Luquet (INRA détaché à l'ORSTOM/CRO) qui assure l'encadrement scientifique de ce programme. Ce travail devrait rapidement déboucher sur une meilleure formulation de l'aliment.

• L'Optimisation de la croissance d'*O. niloticus* élevé en cages flottantes dans le fleuve Niger par contrôle de sa reproduction.

L'encadrement scientifique de ce programme est assuré par **J.F. Baroiller**:

- Etude des performances zootechniques des femelles élevées en cages flottantes:

Des expérimentations préliminaires suggèrent que la période d'apparition du dimorphisme de croissance lié au sexe pourrait dépendre fortement des conditions d'élevage. En particulier, des lots monosexes femelles placés dans des cages suffisamment éloignées de celles des mâles afin d'éviter toute éventuelle interaction sociale (stimuli sonores, visuels ou phéromonaux) semblent présenter des potentialités de croissance équivalentes à celles des mâles au moins jusqu'à un poids moyen de 150 g. Le projet, dans sa partie développement comme dans son volet recherche constitue un bon champ d'expérimentations pour tester l'hypothèse d'un effet des facteurs de l'environnement sur la mise en place de la gamétogenèse et l'apparition du dimorphisme de croissance.

- Production de populations monosexes mâles par inversion hormonale

* Optimisation de la production d'alevins par adaptation de techniques utilisées en Asie (philippines):

• production d'alevins en happa (cages en filet moustiquaire) en étang ou dans le fleuve Niger.

• production en étangs avec pêches journalières aux heures les plus chaudes dès l'apparition, en surface, des premiers nuages d'alevins.

Les premiers résultats obtenus montrent que ces 2 techniques permettent, pour un nombre équivalent de géniteurs, de multiplier par un facteur supérieur à 2-3 (selon la technique employée), les quantités d'alevins récoltés. De plus, la très grande homogénéité d'âge et taille des

alevins récoltés, favorise la croissance moyenne de la population en diminuant les interactions sociales (hiérarchie) mais aussi autorise la mise en place de traitements de production de populations monosexes mâles. Enfin, l'utilisation de happa, permet soit de réduire la surface d'élevage, soit de produire les alevins directement dans le fleuve; jusqu'à présent la production d'alevins était réalisée en station d'étangs, loin des lieux de grossissement, et le transport des alevins occasionnait de fortes mortalités qui rejaillissaient fortement sur le coût de production du poisson marchand.

* traitement d'inversion hormonale:

Les essais de traitements d'inversion hormonale réalisés en station, dans les conditions difficiles du projet (aliment pauvre et composite, eau très chargée en plancton, grandes fluctuations thermiques), visent à déterminer la faisabilité d'utilisation d'une telle technique en utilisant un stéroïde artificiel ou un stéroïde naturel.

- thermosensibilité de la différenciation des souches locales de 2 espèces de tilapia, *O. niloticus* et *O. aureus:*

L'inversion hormonale ne doit constituer au mieux qu'une étape de transition, en attendant des techniques ne faisant pas appel à l'utilisation d'hormones, même naturelles. Il importe donc de rechercher si les souches locales de tilapia présentent une thermosensibilité de la différenciation qui pourrait permettre d'envisager une approche environnementale pour la production de populations monosexes mâles.

- approche génétique: obtention de géniteurs néofemelles ZZ d'*O. aureus*, à descendances monosexes mâles:

O. aureus, étant une espèce à homogamétie mâle (mâle ZZ, femelle WZ comme chez les oiseaux), il est possible par féminisation d'alevins classiques et testage individuel des femelles obtenues, de détecter des néofemelles ZZ à descendances monosexes mâles.

Même si cette approche ne permet en général pas d'obtenir 100% de mâles, les fortes proportions attendues, 92-95% de mâles, assureraient déjà une meilleure rentabilité de l'élevage de tilapia, dans les conditions locales.

la Côte d'Ivoire:

- poursuite d'un programme de recherches sur la connaissance et la gestion des écosystèmes aquacoles, et plus particulièrement dans des conditions de conduite d'élevage basées sur un faible niveau d'intrants; le but de ce programme est de contribuer à la résolution des problèmes posés par le développement de la pisciculture en milieu rural, enjeu majeur pour l'avenir

- mise en oeuvre d'une recherche système portant sur le rôle de la pisciculture dans la dynamique des systèmes de production agricole qui pourrait trouver sa première matérialisation par un engagement du CIRAD dans le projet "appui à la profession piscicole du Centre Ouest" dans sa seconde phase qui démarre fin 1994

b) Asie

le Viet Nam:

travail de recherche stratégique pour l'Aquaculture de ce pays, en collaboration avec l'ORSTOM: la reproduction d'un silure, *Pangassius pangassius*, largement élevé en cages flottantes dans le delta du Mékong, dont les approvisionnements en alevins dépendent en totalité de captures

dans le milieu naturel jusqu'à présent. Ce travail est réalisé avec 3 partenaires vietnamiens. Ce pays peut constituer une base de choix dans la région indochinoise pour l'avenir. Les premières reproductions induites viennent d'être obtenues et les alevins issus des fécondations sont en suivi de croissance précoce.

l'Indonésie:

un programme de recherches a été identifié qui porte globalement sur l'Aquaculture en cage dans les lacs: interaction élevage / environnement dans leurs dimensions biologiques, techniques et écologiques. Ce travail est réalisé en collaboration avec l'ORSTOM et un partenaire Indonésien.

les Philippines:

c'est le second producteur de tilapia après la Chine, avec 100.000 tonnes recensées en 1995. Un programme de recherches a été initié par **J.F. Baroiller** en collaboration avec le **PCMARD** et le **FAC/CLSU** sur la croissance différentielle liée au sexe chez le tilapia et l'inversion hormonale utilisant une hormone naturelle:

- Afin de rechercher une composante génétique à la meilleure croissances des individus mâles, des lots mâles de différents génotypes (XX, XY, YY) ont été mis en élevage comparativement avec des lots femelles XX. Par ailleurs, l'influence du sex-ratio sur l'apparition du dimorphisme de croissance mâle/femelle a été testé en mélangeant selon différentes proportions, une population monosexe mâle et une population monosexe femelle. L'analyse des résultats est en cours mais d'ores et déjà, l'importance des interactions mâles/femelles sur la croissance différentielle est mise en évidence.
- les Philippines pratiquent l'inversion hormonale utilisant des stéroïdes artificiels depuis plus de 20 ans. L'utilisation d'un androgène naturellement produit par le tilapia pendant son ontogenèse testiculaire peut constituer une première amélioration, dans l'attente d'un traitement sans hormone. Les 2 traitements sont donc comparés dans leurs conditions de production philippines.

c) France

DOM-TOM:

Le programme Aquaculture et Pêche a initié en 1993, une opération de Recherche sur le Tilapia rouge à l'Ile de La Réunion, en partenariat avec **l'ARDA** et l'**INRA**, sur les installations de cette association. Une lettre de mission a été confiée par le CIRAD et l'INRA à **J.F. Baroiller** pour coordonner les activités scientifiques du projet.
Ce travail s'inscrit dans les compétences et les priorités scientifiques du programme: Physiologie et Génétique appliquées au déterminisme de la coloration et à la production de populations monosexes mâles par des techniques propres pour l'environnement.
Un VAT a été affecté sur les aspects déterminisme du sexe, et effectue sa thèse sous le double encadrement scientifique de **J.F. Baroiller** et **C. Melard** (Université de Liège, Belgique). Le tilapia rouge offre l'originalité d'être issu de croisements entre 4 espèces différentes de tilapia (2 espèces à homogamétie femelle et 2 espèces à homogamétie mâle); il est considéré comme un pool de gènes de ces 4 espèces. L'étude du déterminisme génétique du sexe d'une telle souche n'a encore jamais été réalisée. Les premiers résultats obtenus suggèrent que tous les chromosomes sexuels provenant des 4 espèces d'origine persistent et 5 génotypes de mâles et 4 génotypes de femelles pourraient coexister dans cette souche.

Montpellier:

Depuis mars 1992, a été constitué un pôle Aquaculture tropicale à Montpellier, par le regroupement des 3 équipes Aquaculture et Pêche du **CIRAD**, de l'**ORSTOM** et du **CEMAGREF**. Dénommé **GAMET** (Groupe Aquaculture Méditerranéenne et Tropicale), il a pour but de devenir:

- un point d'entrée privilégié en France des demandes d'appui en matière d'Aquaculture Méditerranéenne et Tropicale
- une base arrière pour assurer aux chercheurs, ingénieurs et techniciens expatriés, un lieu d'échange avec les unités de Recherches françaises
- un laboratoire d'Aquaculture intervenant en appui aux programmes conduits sur les autres stations des 3 organismes et un outil de collaboration avec les institutions de recherche par mise à disposition de modèles biologiques originaux (essentiellement tilapia et silures).

Ce regroupement doit être poursuivi et renforcé dans sa triple dimension Recherche / Formation / Documentation-Information.

Toutefois, ce regroupement ne doit pas systématiquement prendre la forme d'un rassemblement physique des compétences sur le site de Montpellier: un réseau de laboratoires de Recherche scientifique disciplinaire français (majoritairement l'INRA et des Universités actuellement) avec Montpellier pour centre de gravité tropicaliste est également souhaitable. Dans une telle optique, des membres des équipes Aquaculture des organismes constituant le GAMET, affectés en France, pourraient être localisés dans d'autres laboratoires de leur spécialité (physiologie, génétique, nutrition...) en renforçant les liaisons entre ceux-ci et Montpellier.

Un programme (cf. annexe) visant à analyser la composante génétique de la thermosensibilité de la différenciation chez le tilapia a été mis en place depuis fin 1994 par **J.F. Baroiller**, en collaboration avec l'**INRA**, qui a détaché **F. Clota** (Ingénieur d'Etudes INRA) sur cette opération:

Analyse de la variation de la thermosensibilité dans les descendances successives de 5 couples d'*O. niloticus*. Ségrégation du caractère thermosensible (croisements de type diallèle entre les 5 couples, et traitement des descendances obtenues; évolution des caractéristiques de la thermosensibilité sur plusieurs générations affiliées.

B. Activités de Développement, Missions

Elles consistent en un Transfert de techniques, en Formation et Appui aux Recherches menées sur place, en Collaborations Scientifiques.

C'est ainsi par exemple, que les résultats obtenus dans le domaine de la Physiologie de la différenciation gonadique, sont testés à travers l'utilisation en grandeur réelle d'androgènes naturels pour l'inversion hormonale dans 3 projets différents (Philippines, La Réunion, et Niger) sur plusieurs espèces de tilapia (*Oreochromis niloticus, Oreochromis aureus, Sarotherodon melanotheron* et le tilapia rouge; il en est de même pour les résultats sur le déterminisme génétique du sexe, puisque la faisabilité d'utilisation de géniteurs néofemelles ZZ d' *O. aureus* est testée sur un projet de développement à La Réunion et le sera au Niger. Enfin, la thermosensibilité de la différenciation est en cours de testage pour les différentes souches des différents projets.

C. Présentation sommaire des activités de Recherche de J.F. Baroiller au sein de l'U.R

15.10.1988 - Responsable Scientifique du volet "Recherches Piscicoles" du Projet FED de l'IDESSA: Contrôle artificiel de la reproduction de la perche du Nil, *Lates niloticus*, et d'un Clariidae, *Heterobranchus isopterus*, pour le repeuplement ou la diversification des espèces d'élevage.

16.01.1992 - Responsable Scientifique de l'ATP-CIRAD N° 72/92 "Etude des facteurs physiologiques liés au sexe phénotypique dans le déterminisme du dimorphisme de croissance chez Oreochromis niloticus" réalisée en collaboration avec l'INRA, l'ORSTOM et le Laboratoire d'Endocrinologie comparée de Leuwen (Belgique).

15.05.1992 - Mise en place et coordination d'une collaboration CIRAD-INRA-IDESSA avec localisation au Laboratoire de Physiologie des poissons de l'INRA à Rennes pour la durée du projet (92-95).

13.01.1994 - Chargé de mission par le CIRAD et l'INRA dans le cadre du projet de Recherches sur l'Aquaculture du tilapia rouge à l'Ile de La Réunion (mandaté par les 2 organismes pour assurer le pilotage scientifique du projet).

1. Activités passées:

• 1988 - 1991: Responsable scientifique du volet piscicole du Projet FED/IDESSA. Mise au point de techniques de contrôle artificiel de la reproduction chez de nouvelles espèces potentielles, *Lates niloticus* (Capitaine d'eau douce) et *Heterobranchus isopterus*, en vue de repeuplement de retenues hydro-agro-pastorales ou de diversification aquacole. Le travail sur l'induction de ponte chez *Heterobranchus isopterus*, réalisé en collaboration avec M. Oswald (responsable d'un projet de Développement de la Pisciculture en Côte d'Ivoire, financé par le FAC), a notamment permis de mettre au point une technique d'hypophysation homologue, aujourd'hui utilisée par la plupart des pisciculteurs de la région Centre-Ouest de Côte d'Ivoire pratiquant l'élevage de ce silure africain. La reproduction artificielle du capitaine (poisson prisé dans toute l'Afrique et faisant déjà l'objet d'exportations vers l'Europe à partir des pêches) a été maîtrisée pour la première fois, par induction hormonale, à l'aide d'analogues du LHRH.

2. Activités présentes:

2 programmes **prioritaires** sont menés depuis 1985 en collaboration avec l'INRA

• 1985 - 1995: Différenciation et déterminisme du sexe chez le tilapia. Ce programme, toujours mené en collaboration avec l'INRA, **constitue désormais l'essentiel de mes activités**.

• 1992 - 1995: Dimorphisme de Croissance lié au sexe chez le tilapia: Ce programme, qui s'achève fin 1995, a fait l'objet d'un financement sous la forme d'une ATP-CIRAD dont **J.F. Baroiller** assure la coordination scientifique et financière; il constitue pour l'essentiel le travail de thèse d'un étudiant du Burkina-Faso, co-encadré par le CIRAD (**J.F. Baroiller**) et l'INRA (**B. Fauconneau, A. Fostier, et P.Y. LeBail**).

Toutes les missions effectuées par J.F. Baroiller depuis 1988, concernaient l'un ou l'autre de ces 2 derniers thèmes, et elles ont pour la plupart débouché sur une collaboration internationale avec financement extérieur.

III. ACTIVITES DE RECHERCHE DEVELOPPEES AVEC LE LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DES POISSONS DE L'INRA

A. Objectifs et cadre général

B. Dimorphisme de croissance lié au sexe chez le tilapia

C. Déterminisme et différenciation du sexe chez le tilapia

1. Justification appliquée

2. Intérêt scientifique

3. L'étude de la physiologie de la différenciation gonadique

4. Potentialités masculinisantes et féminisantes des stéroïdes spécifiquement identifiés pendant la différenciation ovarienne et testiculaire

5. Déterminisme génétique du sexe

6. Mise en évidence d'un déterminisme environnemental du sexe

III. Activités de Recherche développées avec le Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA, à Rennes,

A. Objectifs et cadre général

Les tilapias (*Oreochromis*, *Sarotherodon* et *Tilapia*), avec une production mondiale d'environ 500.000 tonnes par an, constituent aujourd'hui, en eau douce, l'un des 3 groupes les plus utilisés en Aquaculture avec les familles des Cyprinidés et des Salmonidés. Néanmoins la grande efficacité de reproduction des espèces d'*Oreochromis* (les plus fréquents en pisciculture du tilapia), liée à leurs caractéristiques biologiques et éthologiques (fig. 3), constitue à la fois un atout précieux (production de juvéniles durant toute l'année) mais aussi un inconvénient majeur (reproduction aux dépends de la croissance) pour la pisciculture de ces espèces. En effet, ces caractéristiques conduisent en milieu fermé et en situation de compétition alimentaire, à une surpopulation et un nanisme des individus. La solution à ce problème limitant la rentabilité des élevages consiste actuellement à produire des populations monosexes (Baroiller et Jalabert, 1989). Dans ce cas, les populations entièrement mâles sont préférées du fait des meilleures performances de croissance de ce sexe par rapport aux femelles. Ce dimorphisme de croissance entre les mâles et les femelles de tilapia apparaît rapidement en élevage mixte.

La rentabilité d'un élevage de tilapia est donc conditionnée par un contrôle artificiel strict de la reproduction. Actuellement, en pisciculture, ce contrôle est principalement assuré par 2 techniques (Baroiller et Jalabert, 1989):

* le sexage manuel, basé sur l'existence d'un dimorphisme sexuel de la papille uro-génitale, qui conduit à éliminer dés que possible (après 2-3 mois de prégrossissement) la totalité des femelles, soit environ la moitié de la population initiale. Cette technique, qui nécessite du temps et du personnel qualifié, reste néanmoins entachée de 2,7 à 10 % d'erreurs de diagnostic. De plus, elle conduit à élever durant 2-3 mois des alevins dont la moitié (les femelles) sera éliminée. Cette technique, simple mais coûteuse en temps et main d'oeuvre, utilisée en Afrique, se traduit donc par une sous-utilisation des infrastructures d'élevage et un moindre rendement de l'aliment (lequel représente pourtant environ 50% des intrants); en effet, 50% du volume disponible, et de l'aliment distribué sont utilisés pendant 3 mois par des individus rejetés ultérieurement.

* l'inversion hormonale consiste à masculiniser la totalité d'une population d'alevins en incorporant, durant une courte période, un stéroïde dans l'alimentation. Cette technique couramment utilisée depuis plusieurs dizaines d'années par les pays gros producteurs de tilapia, comme Israël, Taiwan, et les Philippines, conduit à l'obtention de populations phénotypiquement 100% mâles, avec une croissance équivalente de tous les individus, supprimant ainsi la lourde opération du sexage. Toutefois, cette méthode implique de traiter systématiquement chaque nouvelle population d'alevins destinée à la production. Or l'utilisation d'hormones artificielles pour la production d'animaux destinés à la consommation humaine reste interdite dans des pays industrialisés (France, Angleterre, par exemple) qui considèrent que le devenir et l'effet des produits de dégradation des stéroïdes de synthèse sont encore insuffisamment étudiés, en particulier pour leurs conséquences écologiques.

Deux autres méthodes sont actuellement envisagées pour éviter la reproduction des tilapias en élevage:

■ Une approche génétique peut être théoriquement proposée chez les espèces classiques d'élevage de tilapia comme *Oreochromis niloticus*, *O. aureus* (Baroiller et Jalabert, 1989): elle consiste, par le biais d'inversions hormonales, à rendre possible le croisement intra-spécifique de 2 géniteurs homogamétiques; des descendances systématiquement mâles sont alors théoriquement obtenues (Shelton *et al.*, 1978).

■ L'autre méthode consiste à produire des animaux stériles par voie génétique (polyploïdisation) ou physiologique (inhibiteurs de la production hormonale gonadique ou hypophysaire, gonadiques autoimmunisation...):

✦de faibles pourcentages de survie sont pour l'instant obtenus après triploïdisation et aucun tétraploïde viable n'a pu être obtenu à ce jour (Chourrout et Itskovitch, 1983; Penman *et al.*, 1987); dans d'autres familles, comme les Salmonidés, les tétraploïdes (4n) sont viables et fertiles; à partir de quelques uns de ces individus, il est possible d'obtenir un grand nombre de triploïdes par un simple croisement avec des individus classiques (2n), selon le schéma, 4n x 2 n → 3n,

✦l'autoimmunisation dirigée contre les hormones majeures de la reproduction (peptides hypothalamiques, hormones gonadotropes ...) n'a quant à elle pas encore donné lieu à l'expérimentation chez le tilapia et reste peu avancée chez d'autres espèces. Quoi qu'il en soit, il conviendrait d'abord de démontrer la pertinence de la poursuite de telles études, à des fins appliquées. En effet, la stérilité confère théoriquement une augmentation de la croissance. Toutefois, la meilleure croissance du mâle chez le tilapia pourrait traduire l'existence de facteurs physiologiques liés au fonctionnement des testicules. Dans une telle hypothèse, les populations monosexes mâles pourraient donc présenter un avantage par rapport à l'utilisation d'animaux stériles. Inversement, la moindre croissance des femelles pourrait résulter de la forte mobilisation énergétique des ovaires au cours du cycle. Dans ce cas, la stérilisation, qui peut être envisagée par des techniques n'utilisant pas d'hormones, pourrait s'avérer une voie originale et prometteuse pour le contrôle artificiel de la reproduction indispensable à la rentabilité de l'élevage du tilapia.

Afin de rechercher de nouvelles approches pour éviter la reproduction anarchiques des tilapias en élevage, il convenait donc de mieux comprendre la différenciation et le déterminisme du sexe d'une part (production de populations monosexes mâles) ainsi que le déterminisme de la croissance différentielle mâle/femelle d'autre part (pertinence d'une approche stérilisation et/ou stimulation des potentialités de croissance des femelles).

Une collaboration entre le CIRAD et l'INRA, dans le domaine de la différenciation et du déterminisme du sexe chez le tilapia a été initiée en 1985[1], avec ma formation doctorale au Laboratoire de Physiologie des Poissons de Rennes. Recruté par le CIRAD à l'issue de cette thèse, j'ai "hérité" de la responsabilité scientifique du volet piscicole d'un projet FED sur la station piscicole de l'IDESSA à Bouaké, où j'étais affecté; toutefois, je me suis efforcé de poursuivre prioritairement ce programme sur la différenciation et du déterminisme du sexe chez le tilapia, en maintenant (avec le soutien actif de J. Lazard, Chef de la division Pêche et Pisciculture du CIRAD) une collaboration étroite avec le Département d'Hydrobiologie de l'INRA (Laboratoire de Physiologie des Poissons, à Rennes, et Laboratoire de Génétique des Poissons, à Jouy-en-Josas). Cette collaboration qui consistait d'abord en un appui scientifique par ces 2 laboratoires du Département d' Hydrobiologie de l'INRA, s'est rapidement renforcée par 1-2 mois/an de présence au laboratoire de Physiologie de l'INRA à Rennes depuis 1990.

En 1992, j'ai eu l'opportunité de proposer au CIRAD de financer, à travers une ATP, un travail sur le Dimorphisme de Croissance lié au sexe chez le tilapia, en collaboration avec l'INRA et l'ORSTOM. D'autres laboratoires extérieurs se sont par la suite rattachés à ce projet dont j'assurais la responsabilité scientifique: Laboratoire d'Endocrinologie Comparée de Leuwen (Belgique), Laboratoire de Nutrition des Poissons de l'INRA, FAC/CLSU (Philippines), Université de Swansea (Pays de Galles).

---

[1]De fait, une première collaboration dans ce domaine, remonte aux années 1968-1969, lorsque B. Jalabert, dans le cadre de son poste de VSN à la Station de Recherches Piscicoles du CTFT (cet Institut est devenu aujourd'hui l'un des 7 Départements du CIRAD) à Bouaké en Côte d'Ivoire, réalisait les tous premiers travaux sur le déterminisme génétique du sexe chez le tilapia, qui font encore référence aujourd'hui.

Cette responsabilité m'a conduit à partager mon temps entre le laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA à Rennes (environ 6 mois/an) et la Côte d'Ivoire (4-5 mois/an) sur ces 2 thématiques de la différenciation/ déterminisme du sexe et du dimorphisme de croissance chez le tilapia. Enfin, à partir de fin 1993, suite à une dégradation des conditions de travail en Côte d'Ivoire, les expérimentations mises en oeuvre dans le cadre de ces 2 thématiques, ont du être réalisées en France entre Rennes et Montpellier, ou à travers des collaborations (Belgique, Philippines).

B. Dimorphisme de croissance lié au sexe chez le tilapia

Chez les espèces du genre *Oreochromis*, cette différence de croissance liée au sexe résulte **en partie** de l'arrêt total (ou quasi total) de prise d'aliment par les femelles durant l'incubation buccale (fig. 3) de leurs oeufs et alevins (Baroiller et Jalabert, 1990). Compte tenu de la reproduction quasi-continue des tilapias (sous réserve d'une température supérieure à 22°C), cette période de 2 semaines minimum d'incubation et donc de jeûne peut se répéter environ tous les 30 jours durant la totalité de l'année.

Il reste que, même en l'absence de reproduction, la croissance des femelles s'avère inférieure à celle des mâles. En particulier, la croissance de lots de poissons de phénotype exclusivement mâle, composés à partir de différents génotypes (exclusivement mâles ou femelles, ou mâles et femelles), est toujours supérieure à celle d'un lot de poissons génétiquement et phénotypiquement femelles (Hanson *et al.*, 1983). Par ailleurs, aucune différence de croissance n'est observable entre 2 lots de tilapia de même phénotype mâle, respectivement composés de génotypes femelles et de mâles génotypiques (les mâles de génotype femelle étant obtenus par inversion hormonale). Ce dimorphisme de croissance pourrait donc avoir des bases physiologiques (fig.4).

Jusqu'ici, faute d'outils méthodologiques appropriés, aucune analyse physiologique de ce dimorphisme de croissance n'a été réalisée dans le genre *Oreochromis*. De plus, aucune étude n'a cherché à corréler précisément l'apparition de ce dimorphisme avec des phases critiques du développement des alevins et des juvéniles. En particulier, des étapes essentielles de l'ontogenèse gonadique, comme la différenciation du sexe ou la puberté, pourraient être liés au déterminisme de la croissance.

En effet, de nombreuses interactions croissance-reproduction ont été mises en évidence chez les poissons téléostéens (revue de LeBail, 1988), et des résultats préliminaires (Baroiller, données non publiées) situent l'apparition du dimorphisme de croissance dans les 2-3 premiers mois de vie chez *Oreochromis niloticus*. Or, durant cette période, se mettent en place successivement la différenciation sexuelle de la gonade, puis la puberté (Baroiller *et al.*,en préparation). Ces événements gamétogéniques sont associés à d'importantes modifications endocriniennes qui touchent en particulier la production de stéroïdes sexuels par les gonades (Fostier *et al.*, 1983).

Schématiquement, 2 types d'hormones sont impliquées dans les phénomènes de croissance (revue de LeBail, 1988): une hormone hypophysaire, l'hormone de croissance (growth hormone = GH) ainsi que certains stéroïdes connus pour leurs effets anabolisants (en particulier la testostérone). Inversement d'autres stéroïdes comme l'oestradiol, peuvent avoir une action négative dans les phénomènes de croissance (Jalabert *et al.*,). Cet effet des oestrogènes pourrait être lié à leur rôle dans la vitellogenèse. L'oestradiol stimule spécifiquement, la synthèse hépatique de la vitellogénine. L'accumulation de cette lipoprotéine dans l'ovocyte constitue le vitellus qui représente plus de 80% du poids sec des oeufs de poissons (Selman et Wallace, 1989). Chez le saumon atlantique, la stimulation de la synthèse hépatique de vitellogénine s'accompagne d'une diminution de la synthèse de protéines de structures comme la myosine (Olin et Von Der Decken, 1987). Chez *Oreochromis niloticus*, les potentialités stéroidogènes précoces des gonades mâles et femelles ont été analysées durant les 3 premiers mois de leur vie; la testostérone peut être synthétisée par les gonades des deux sexes contrairement à l'oestradiol dont la production se révèle spécifique de l'ovaire (Baroiller *et al.*, b, en préparation). La synthèse de vitellogénine chez les femelles de tilapia

pourrait être l'un des facteurs influant sur leur taux de croissance. Inversement, certains androgènes s'avèrent spécifiques du sexe mâle durant cette même période (Baroiller, 1988; Baroiller et al., b, en préparation) et présentent, non seulement un fort pouvoir masculinisant (Baroiller et Toguyeni, 1991) mais également un effet anabolisant (Katz *et al.*,1976).

L'étude cherche donc à définir aussi précisément que possible la période d'apparition du dimorphisme de croissance chez *O. niloticus* par rapport à la mise en place des 2 événements gamétogéniques majeurs que constituent la différenciation gonadique et la puberté. Parallèlement, un suivi endocrinologique couvrant cette période explore le déterminisme physiologique du dimorphisme de croissance et précise les interactions éventuelles reproduction-croissance.

Les premiers signes de vitellogenèse sont recherchées par la mesure des taux circulants de vitellogénine afin de tester l'hypothèse d'un antagonisme entre sa synthèse et la croissance.

L'utilisation d'implants (stéroïdiens ou inhibiteurs de stéroïdes) sur des juvéniles entiers ou castrés permet de tester les hypothèses de l'implication des différents types d'hormones analysées (stéroïdes, hormone de croissance, hormones thyroïdiennes).

La composante génétique de cette croissance différentielle est analysée en comparant la croissance de géniteurs mâles et femelles de différents génotypes (mâles XX, XY et YY; femelles XX).

Par mélange, selon différentes proportions, de populations mixtes et monosexes femelles, l'importance des interactions sociales mâles/femelles a été analysée.

Enfin, le comportement alimentaire des mâles et des femelles a été analysé comparativement dans des conditions d'alimentation volontaire (distributeurs à la demande déclenchés par les poissons eux-mêmes).

En résumé, ce travail cherche à préciser les facteurs indissociables de la masculinisation dans l'avantage de croissance observé chez les mâles. Cela permettra, d'une part d'évaluer l'intérêt de consacrer des efforts, sans doute importants dans l'état actuel des connaissances, à l'obtention d'animaux stériles. D'autre part, la connaissance des facteurs physiologiques, génétiques, et comportementaux impliqués dans le déterminisme du dimorphisme sexuel de croissance chez le tilapia, ouvrira la possibilité d'analyser leur modulation par des facteurs externes en vue de se placer dans des conditions optimales d'élevage.

Principaux résultats obtenus à ce jour:

Le dimorphisme de croissance ne se met en place qu'à l'age de 3-4 mois environ, en précédant semble-t'il la première maturité sexuelle.

Les principales différences observées peu après l'apparition du dimorphisme de croissance concernent essentiellement les hormones thyroïdiennes (et plus particulièrement la T3) et un androgène (la 11-cétotestosterone) dont les concentrations plasmatiques sont systématiquement supérieures chez les mâles, contrairement aux niveaux d'un oestrogène (l'oestradiol-17ß) plus élevé chez les femelles. Des expérimentations sur des animaux implantés préciseront la part relative de ces différentes hormones dans le dimorphisme de croissance.

Le tilapia est une espèce capable auto réguler sa consommation en fonction de ses besoins. Face à une permanente disponibilité en aliment, et bien que capable de s'alimenter de nuit, il présente un rythme d'alimentation essentiellement diurne, comportant 2 pics principaux, à l'aube et en fin d'après-midi.

Dans des conditions d'alimentation volontaire (distributeurs déclenchés par le poisson lui -même), les différences de performances de croissance observées semblent résulter au moins pour partie des meilleures capacités d'utilisation de l'aliment par les mâles qui présentent un meilleur indice

de conversion que les femelles; en effet, aucune différence d'ingestion volontaire n'est décelée entre mâles et femelles.

Les interactions sociales interviennent probablement de manière importantes dans le dimorphisme de croissance; en effet, des populations mixtes (mâles et femelles en présence selon différentes proportions) présentent une augmentation de la consommation en parallèle avec une diminution des taux de croissance femelles comme mâles par rapport à des populations monosexes mâles ou monosexes femelles.

La castration des femelles, avant l'apparition du dimorphisme, ne semble pas permettre à celles-ci d'acquérir des potentialités de croissance comparables à celles des mâles entiers ou castrés. Si une telle hypothèse devait être confirmée, la stérilisation, bien que résolvant le problème des reproductions non contrôlées, ne permettrait pas de bénéficier d'une bonne croissance de tous les individus, quelque soit leur sexe génotypique, contrairement à ce qui est généralement obtenu avec des lots masculinisés.

C. Déterminisme et différenciation du sexe chez le tilapia

1. Justification appliquée

La nécessité d'obtenir chez le tilapia des populations monosexes mâles pour assurer une bonne rentabilité de l'élevage, a suscité dans ce groupe d'espèces, de très nombreux travaux sur le déterminisme génétique du sexe. En effet, comme pour la plupart des espèces majeures de poissons d'élevage, le dimorphisme sexuel externe n'apparaît en général qu'à la puberté, de sorte qu'un sexage très précoce, *de visu*, n'est pas concevable avant 3-4 mois (30-50 g), et les quelques erreurs de sexage se traduiront rapidement par un retour vers un sexe-ratio équilibré (fig.5); de plus, les chromosomes sexuels peu différenciés, ne généralement pas visibles par des techniques cytogénétiques et des marqueurs liés au sexe n'ont pour l'instant pas été identifiés. Toutefois le problème du sexage a pu être contourné comme chez un nombre grandissant d'espèces, grâce aux possibilités d'inversion du sexe par voie hormonale, à la suite des travaux de pionnier de Yamamoto, dans les années 1960, sur un poisson d'aquariophilie, le médaka.

Cette technique, simple et fiable, conduit à l'obtention de populations phénotypiquement 100% mâles, avec une croissance équivalente de tous les individus, supprimant ainsi la lourde opération du sexage. Toutefois, cette méthode implique de traiter systématiquement chaque nouvelle population d'alevins destinée à la production. Or l'utilisation d'hormones artificielles pour la production d'animaux destinés à la consommation humaine reste interdite dans des pays industrialisés (France, Angleterre, par exemple) qui considèrent que le devenir et l'effet des produits de dégradation des stéroïdes de synthèse sont encore insuffisamment étudiés, en particulier pour leurs conséquences écologiques.

1. L'utilisation d'une hormone naturellement impliquée dans la différenciation du sexe mâle, peut constituer une première amélioration sensible des techniques actuellement proposées reposant sur l'emploi de stéroïdes artificiels.

2. En 1985, l'approche génétique consistant, par le biais d'inversions hormonales, à rendre possible le croisement intra-spécifique de 2 géniteurs homozygotes dans leur génotype sexuel n'avait été testée expérimentalement que chez *O. aureus* (Shelton *et al.*, 1978): des femelles inattendues selon le modèle théorique monofactoriel (WZ/ZZ) apparaissaient dans certaines descendances théoriquement monosexes mâles (fig. 6) issues du croisement de mâles classiques ZZ par des néofemelles ZZ (alevins génotypiquement mâles féminisés fonctionnellement à l'aide d'oestrogènes).

Une telle approche pouvait également être envisagée chez *O. niloticus* (production de mâles et femelles YY); toutefois, il importait préalablement de démontrer la viabilité du génotype

nouveau YY, obtenu par croisement d'un mâle classique XY par une néofemelle XY (issue de la féminisation fonctionnelle d'un alevin génétiquement mâle XY).

2. Intérêt scientifique:

a) la différenciation du sexe

Chez les tilapias, comme chez l'ensemble des téléostéens, aucune preuve physiologique déterminante ne supporte l'hypothèse de Yamamoto (1969) selon laquelle les stéroïdes sont les inducteurs naturels de la différenciation (Adkins-Regan, 1987). La modification du processus naturel de la différenciation sexuelle par des stéroïdes exogènes pourrait être due à un effet pharmacologique (Reinboth, 1970). En effet, chez les poissons gonochoriques, très peu de travaux avaient abordé le problème de la stéroïdogenèse précoce durant la période de la différenciation gonadique du sexe (Van den Hurk et al., 1982).

Par ailleurs, chez les mammifères, si les grandes lignes de la mise en place des tractus génitaux externes et internes sont bien connus (fig. 7), et bien que le gène SRY (sex determining region, Y chromosome) a été identifié au TDF (testis determining factor), signal primaire du déterminisme testiculaire (fig. 8), la nature de l'inducteur final de la différencation gonadique (passage d'une gonade indifférenciée à un testicule ou un ovaire, reste en revanche à élucider.

Il importait donc de caractériser les potentialités stéroïdogènes des gonades durant la période de la différenciation.

b) le déterminisme génétique du sexe

Le déterminisme du sexe est l'ensemble des mécanismes qui conduisent une gonade à passer d'un stade sexuellement indifférencié, à l'état de testicule ou d'ovaire.
De nombreuses études attestent de l'existence d'un déterminisme génétique du sexe chez les amphibiens et les poissons. relativement peu de travaux de cytogénétique ont permis de visualiser les chromosomes sexuels dans ces classes; les chromosomes sexuels y sot considérés comme en moyenne très peu différenciés (Schmid et Haaf, 1989; Sola et al., 1981; Jablonka et Lamb, 1990). Dans de rares cas, il est possible d'affirmer leur existence grâce à la mise en évidence de marqueurs mendéliens liés au sexe; ces marqueurs sont particulièrement abondants chez quelques espèces de poissons d'aquarium (Kallman, 1975). Enfin, la même conclusion peut être tirée d'expériences de testage après inversion hormonale ou après gynogenèse induite (Hunter et Donaldson, 1983).

Chez les poissons l'existence d'une composante génétique déterminant le sexe n'est pas une situation rare (Chourrout, 1988). Celle-ci est dans la plupart des cas, explicable par une hétérogamétie mâle ou femelle. Les types de systèmes peuvent être retrouvés au sein du même ordre, ou de la même espèce (Anders et al., 1970). L'apparition ou le renversement de systèmes hétérogamétiques a sans doute eu leu indépendamment et à de multiples reprises chez les poissons.

Chez les Salmonidés, l'apport de la gynogenèse, de la polyploïdisation et du testage en descendance d'individus inversés par traitement hormonal démontre clairement que la présence d'un chromosome Y est nécessaire et suffisante pour induire un développement mâle.

Chez le tilapia, la présence des 2 systèmes d'hétérogaméties opposées (XX/XY et ZZ/WZ) au sein d'un même genre, chez des espèces qui s'hybrident facilement, constitue un modèle fascinant: cette situation pourrait refléter une rapidité d'évolution des chromosomes sexuels, avec peut-être, une transition actuelle entre les 2 systèmes d'hétérogamétie.

Néanmoins, contrairement aux Salmonidés, les tilapias présentent de nombreuses déviations dans les sexe-ratios de descendances issues de croisements inter comme intra-spécifiques. L'ensemble de ces déviations n'a toujours pas été expliqué à ce jour, et d'autres facteurs génétiques

ou épigénétiques se surajoutent probablement à un déterminisme monofactoriel simple porté par des chromosomes sexuels.

3. L'étude de la physiologie de la différenciation gonadique

En 1985, quand ce programme a été initié, une seule étude avait été réalisée chez une espèce gonochorique, la truite arc-en-ciel, afin d'analyser les potentialités stéroïdogènes des gonades avant et pendant leur différenciation; cette étude ne permettait d'ailleurs pas de conclure quant à l'existence d'une activité stéroïdienne avant la différenciation (Van den Hurk et al., 1982). Dès lors, la nature stéroïdienne des inducteurs de la différenciation restait encore à être démontrée.

Afin de mieux comprendre le rôle physiologique des stéroïdes lors de la différenciation gonadique du sexe, et d'envisager une amélioration des techniques de contrôle, des études morphologiques et endocrinologiques ont été entreprises en parallèle sur des alevins d'*Oreochromis niloticus* élevés à 27°C (fig. 9).

L'ontogenèse gonadique a été suivie du 9ème au 90ème jour post-fécondation (P.F). Les premières caractéristiques classiques de la différenciation ovarienne (figures de prophase de méiose et auxocytose ovocytaire) apparaissent de 28 à 35 jours P.F pour une température d'élevage de 27°C (fig. 9). La mise en place de la configuration lobulaire, premier événement histologique signant une différenciation testiculaire, précède de peu les premières méioses de la lignée germinale mâle, vers 55 jours P.F.

L'utilisation d'approches histochimiques (mise en évidence de la 3βHSD) révèle la **présence de cellules potentiellement stéroïdogènes dès 25-27 jours P.F. soit avant la mise en place de la différenciation**. La microscopie électronique confirme la présence précoce de cellules classiquement considérées comme stéroïdogènes (mitochondries à crêtes tubulaires,).

Les potentialités stéroïdogènes des gonades d'alevins ont été analysées in vitro du 25ème au 90ème jour P.F (fig. 9). Les 2 précurseurs tritiés utilisés (Pregnenolone et Androstenedione) sont activement métabolisés à tous les âges étudiés. **Des potentialités stéroïdogènes sont donc mises en évidence *in vitro* dans des gonades histologiquement indifférenciées** de 25 jours PF.

Des métabolites radioactifs, extraits des incubations des gonades de 90 jours P.F en présence de chacun des précurseurs, ont été purifiés pour identification; un schéma préliminaire de la stéroïdogenèse testiculaire et ovarienne est proposé pour cet âge (fig. 10). Certains de ces stéroïdes, propres à chaque sexe ont été identifiés plus précocement au cours de l'ontogenèse (fig. 11).

Une à deux semaines après l'initiation de la différenciation ovarienne, 2 androgènes 11-oxygénés, **l'adrénostérone et la 11ß-hydroxyandrostenedione,** et 2 oestrogènes, l'oestradiol et l'oestrone chez les femelles **sont respectivement identifiés spécifiquement chez le mâle et la femelle à 42 jours**, stade le plus précoce permettant la purification des métabolites (fig. 11).

Des stéroïdes, mesurés par dosage radio-immunologique dans la gonade avant et pendant l'initiation de la différenciation, reflètent probablement l'activité d'une partie des enzymes mises en évidence *in vitro*.

Des arguments histochimiques et physiologiques sont apportés à l'hypothèse de l'existence de stéroïdes gonadiques au moment de la différenciation. Des stéroïdes spécifiques du sexe pourraient donc être synthétisés, au moins dans les testicules, pendant la différenciation.

4. Potentialités masculinisantes et féminisantes des stéroïdes spécifiquement identifiés pendant la différenciation ovarienne et testiculaire:

Afin de tester l'hypothèse d'une potentielle implication de cet androgène dans les phénomènes de la différenciation testiculaire, mais aussi de rechercher une alternative aux traitements classiques d'inversion par des stéroïdes artificiels, une étude comparative de l'efficacité de masculinisation de la 11β-hydroxyandrostenedione par rapport à la 17α méthyltestostérone a été menée chez *Oreochromis niloticus, O. aureus, Sarotherodon. melanotheron* et chez un tilapia rouge de la souche Red Florida.

L'alimentation supplémentée 26-35 jours en androgène naturel, 11ß hydroxyandrostenedione permet de produire des groupes monosexes mâles fonctionnels dans les 4 espèces de tilapia étudiées dans divers conditions d' élevage.

Dans l'étude actuelle, pour une durée de traitement très similaire (minimum: 21 / 26 jours) la dose optimal de stéroïde paraît être spécifique: *O. aureus* requiert des doses plus fortes d'androgène (50µg.g-1) que *O. niloticus* (10µg.g-1) pour obtenir des populations 97-100% mâles. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes utilisant des stéroïdes artificiels (17αMT, 17αET)
Cette différence spécifique peut être expliquée par des caractéristiques physiologiques ou / et éthologiques. Un taux d'incorporation et de rétention différentiel du stéroïde exogène par les 2 espèces ou une meilleure réceptivité des gonades d'*O. niloticus* à ces 2 hormones pourrait conduire à de telles différences de sexe-ratios. Cette spécificité pourrait aussi être rapportée aux concentrations respectives de stéroïdes endogènes dans ces 4 espèce de tilapia: par exemple, les concentrations de testostérone dans des extraits de broyats de tilapia entiers diffèrent beaucoup entre *O. niloticus*, O. mossambicus et O. hornorum quand ils sont mesurés à 7 semaines d'age (Rothbard et al., 1987). Enfin, une mise en place plus précoce ou plus intense d'une hiérarchisation sociale chez une population d'alevins d'*O. aureus* par rapport à *O. niloticus* pourrait réduire l'accessibilité de la nourriture pour les individus dominés. Une hiérarchisation aussi précoce pour ce qui est de la taille des alevins survient au moins chez O. mossambicus (Pandian et Varadaraj, 1987; Varadaraj et Pandian, 1987).

Dans 2 des 4 espèces de tilapia étudiées (fig. 12), des populations monosexes mâles peuvent être obtenues par traitement d' inversion du sexe utilisant l'androgène naturel 11ßOHA4 avec des doses comparables (10µg.g-1 chez *O. niloticus*, 50µg.g-1 chez *O. aureus*) à celles classiquement utilises pour la 17MT (respectivement 10 - 30µg.g-1 et 60µg.g-1). Aucune autre donnée n'est disponible chez *S. melanotheron* et très peu de résultats existent chez le tilapia rouge, concernant l'inversion hormonale du sexe; nous avons aussi produit des populations 100% mâles chez ces deux espèces. Généralement, les androgènes artificiels présentent des potentialités masculinisantes supérieures à celles des stéroïdes naturels (Hunter et Donaldson, 1983; Yamazaki, 1983).

Chez *O. niloticus*, l'efficacité d'un traitement à 5 µg de 11ßOHA4 par gramme d'aliment pendant 21 jours, pourrait être dépendant de l'âge initial des descendances au début du traitement: 88.9% mâles sont produits quand le traitement débute à 10 jours d'age, tandis que 69.7% mâles ou aucune déviation sont respectivement obtenus en utilisant des alevins de 14 et 15 jours. Ces différences suggèrent l'existence d'une période hormono-sensible. Le traitement doit débuter avant la fin de cette période, faute de quoi, les gonades pourraient être irreversiblement engagés dans un processus de différenciation selon le génotype. Une période comparable est aussi suggérée chez autre espèce comme O. mossambicus où le traitement doit commencer entre 10 et 12 jours après l'éclosion (ce qui correspond à 14 - 16 jours après la fécondation) pour présenter la meilleure efficacité (Pandian et Varadaraj, 1988).

Chez les téléostéens, des critères indiscutables permettant une détection des tous premiers signes discrets de la différenciation gonadique font encore défaut (Brusle et Brusle, 1983; Fostier et al., 1983; Adkins-Regan, 1987; Baroiller, 1988 a, b), et l'initiation d'une activité méiotique est souvent rapportée comme la première indication d'une différenciation ovarienne chez le tilapia (Nakamura et Takahashi, 1973; Yoshikawa et Oguri, 1978; Nakamura et Nagahama, 1989). Pour une température d'élevage de 27°C, les modifications histologiques restent très discrètes dans les gonades indifférenciés d'*O. niloticus* de 9 à 20 jours (243-540 degrés.jours): un accroissement léger et graduel du nombre de cellules somatiques et germinales survient dans les gonades essentiellement composées de cellules somatiques (Baroiller, 1988a, b). Les premières caractéristiques méiotiques dans les cellules germinales et la formation de la cavité ovarienne a lieu à 28-35 jours (756-945 degrés.jours) (Baroiller, 1988a, b) ou 38-39 jours (Nakamura et Nagahama, 1985), après une prolifération active des deux composants somatique et germinal; de tels événements méiotiques surviennent ultérieurement pour la différenciation mâle (Baroiller, 1988a, b; Nakamura et Nagahama, 1989). Chez le tilapia, la plupart des traitements d'inversion efficace du sexe ont été appliqués sur des alevins de 9-14 jours pendant 21-30 jours, soit avant et pendant la période de prolifération goniale naturelle et l'apparition des premières caractéristiques méiotiques.

De plus, des études récentes suggèrent que les androgènes 11 - oxygénés pourraient être impliqués dans l'ontogenèse testiculaire (truite arc-en-ciel: Van den Hurk et Van Oordt, 1985; Maléjac, 1993, tilapia: Baroiller, 1988 a, b; poisson-chat africain: Van den Hurk et al., 1989; goldfish: Kobayashi et al. 1991, chinook saumon: Piferrer et al., 1993). Cependant, même si la 11ßOHA4 a été identifié comme un métabolite spécifique de l'androstenedione durant l'ontogenèse testiculaire précoce chez 3 espèces, cette efficacité masculinisante ne constitue pas une évidence définitive d'une participation directe de ce stéroïde dans la différenciation mâle. Des effets indirects pourraient survenir à travers divers stimulations stéroidiennes, et particulièrement à un niveau hypophysaire (revue de Fostier et al., 1983). Des études complémentaires sont entreprises pour mieux comprendre le rôle de cet androgène durant la différenciation testiculaire. Cependant, la 11ßOHA4 est un androgène gonadique endogène avec une forte potentialité masculinisante et anabolisante. C'est pourquoi, l'emploi d'un androgène naturel, la 11ßOHA4, peut donc constituer une alternative aux traitements classiques utilisant des stéroïdes artificiels, puisque des durées et des doses similaires produisent des effets masculinisants et anabolisant comparables chez le tilapia. Les traitements d'immersion devront être considérés de manière à optimiser le coût d'un traitement efficace par la11ßOHΔ_4 , chez le tilapia.

Par ailleurs, des expérimentations réalisées sur *Oreochromis aureus* (données non publiées) confirment les données de la littérature sur les faibles potentialités féminisantes des oestrogènes naturels, en particulier de l'oestradiol-17ß identifié peu après le début de la différenciation ovarienne. Toutefois, ce résultat ne constitue pas une preuve de la non-implication des oestrogènes dans la différenciation femelle.

5. Déterminisme génétique du sexe

Afin d'analyser la différenciation spécifique d'un seul sexe ou de tester le rôle de facteurs exogènes sur la différenciation des géniteurs à descendances monosexes femelles ou monosexes mâles ont été recherchés. En effet, de tels individus permettent la production de populations dont le sexe est connu a priori.

- Chez *O. niloticus*, nous avons démontré les premiers, la possibilité de produire des mâles YY (fig. 13). Ce nouveau génotype est viable et fertile et une descendance 100% mâle a bien été obtenue à partir d'un tel géniteur.

  D'autres équipes ont par la suite montré que de tels individus pouvaient néanmoins produire des pourcentages significatifs de femelles dans leurs descendances, en intra, comme en inter souche (Scott et al., 1988). Des femelles YY (fig. 14) ont depuis été également produites

et dans le croisement YY x YY, des femelles inattendues peuvent également apparaître dans les descendances (Mair et al., données non publiées). Ces résultats ne peuvent être expliqués par un simple déterminisme monofactoriel du sexe.

■ Chez les espèces comme *O. niloticus*, des néomâles XX peuvent constituer un outil précieux pour analyser aussi bien l'efficacité de traitements masculinisants, que le déterminisme du sexe. Une fratrie a donc été produit par inversion hormonale, testage puis masculinisation de descendances 100% femelles (fig. 15).

Les sex-ratios de 25 descendances de néomâles ont été déterminés par sexage de la totalité des 2529 alevins obtenus, soit environ 110 poissons par lot. 7 de ces familles, soit 28% des descendances, présentent des sex-ratios de 100% de femelle ou 0% de mâles (fig. 16). Dans les 18 autres descendances, des mâles inattendus selon un déterminisme monofactoriel, ont été obtenus dans des proportions comprises entre 1 et 40,5% de mâles. La distribution des fréquences de mâles dans ces descendances est de type unimodale, centrée autour de la classe 0-10% de mâles.

Chez les espèces comme *O. niloticus* où l'on considère que la femelle est homogamétique, la descendance d'un néomâle est théoriquement monosexe femelle d'après un modèle monofactoriel. Compte tenu des faibles effectifs sexés parfois rapportés dans la littérature, il est possible que ces faibles pourcentages soient souvent restés masqués, au moins partiellement, dans d'autres études. En effet, seule l'étude de Calhoun et Shelton, 1983 révèle l'existence de mâles inattendus dans une forte proportion des descendances de néomâles examinées. De même, les importantes variations de sex-ratios constatés dans la présente étude résultent sans doute partiellement du nombre important de descendances de néomâles utilisées.

Les mâles inattendus ne résultent pas d'erreurs de sexage microscopique et présentent une fertilité normale, puisque 3 d'entre eux ont été reproduits.

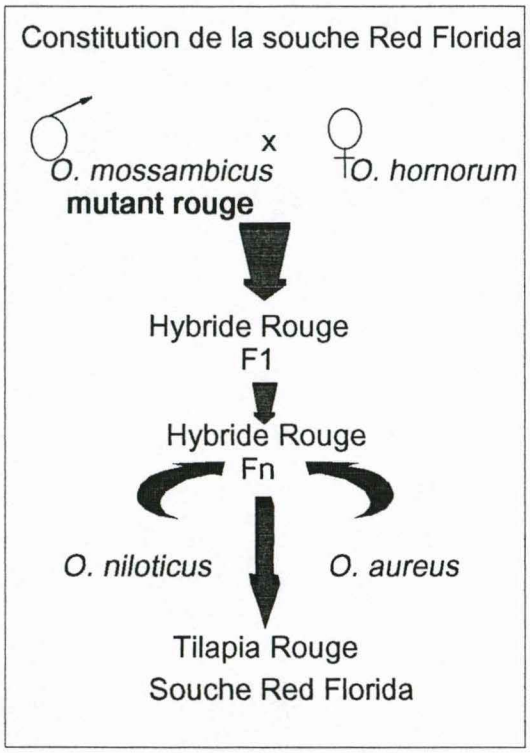
Le pourcentage de mâles inattendus diffère dans les descendances successives d'un même néomâle selon les reproductions; un néomâle dont la descendance suit le modèle théorique peut en effet produire jusqu'à 39,6% de mâles inattendus. Des effets paternels et maternels sont par ailleurs suggérés en croisement de type diallèle.

Les déviations observées par rapport au modèle théorique monofactoriel interviennent donc dans des proportions qui peuvent parfois être importantes (plus de 85% des descendances) et semblent peu compatibles avec l'intervention de facteurs autosomiques rares. Les conditions dans lesquelles interviennent ces inversions par rapport au phénotype théoriquement attendu restent à déterminer.

■ de la même manière, des néofemelles ZZ ont été obtenue chez *O. aureus* (Shelton et al, 1978; Melard, 1995; Lahav, 1995). Néanmoins, en analysant des descendances successives, des femelles inattendues apparaissent dans les descendances de néofemelles pourtant identifiées précédemment par leurs descendances monosexes mâles (données non publiées).
Encore une fois, ce résultat ne peut être expliqué par un simple déterminisme monofactoriel du sexe.

■ il en est de même chez *Sarotherodon melanotheron*, chez lesquels nos résultats démontrent qu'aussi bien en hybridation avec *Oreochromis niloticus* (par fécondation artificielle) qu'en testage d'animaux masculinisés, des sexe-ratios aberrants d'après un modèle classique apparaissent. Néanmoins, une base monofactorielle semble là aussi indiscutable. Jusqu'alors le déterminisme génétique de cette espèce n'avait pas été analysé.

■ Enfin, le "Gueule Rouge" de l'Ile de La Réunion (appellation locale d'un tilapia rouge), résulte de croisements successifs ou simultanés entre 4 espèces de tilapia, *Oreochromis niloticus, Oreochromis mossambicus, Oreochromis hornorum et O. aureus,* ayant conduit à une souche "Red Florida".



Chez des hybrides plus complexes, comme certaines souches de tilapia rouge, constituées à partir de croisements successifs de 3 ou 4 espèces initiales, le déterminisme du sexe n'a pas fait l'objet d'études systématiques. Il importe donc d'analyser les bases de ce déterminisme génétique chez le tilapia rouge, afin d'évaluer la pertinence d'une approche génétique pour la production de populations monosexes mâles chez de telles souches.

En l'absence de marqueur lié au sexe identifié chez le tilapia, toutes les méthodes d'étude du déterminisme du sexe chez ce groupe d'espèce sont basées sur l'examen des sexe-ratios de descendances de géniteurs classiques, inversés ou gynogénétiques.

Une première analyse du sexe-ratio a été menée sur plus de 60 descendances individuelles de cette même souche, issues des reproductions, effectuées entre 6 mâles et 22 femelles choisis d'après leur phénotype de coloration (Briand, Desprez et Baroiller, en préparation). 4 types de sexe-ratios ont été obtenus selon les descendances.

Ils correspondent à ce que l'on peut attendre si on fait l'hypothèse d'une conservation de tous les chromosomes sexuels provenant des 4 espèces d'origine (figure 17, 18):

En effet, si l'on émet une telle hypothèse et que l'on est en présence d'un déterminisme monofactoriel, 3 chromosomes sexuels sont susceptibles d'être identifiés chez les femelles (X, W et Z), tandis que 4 gonosomes peuvent être présents chez les mâles (X, Y, Z, W).

Dès lors, les croisements potentiels entre les 4 types de génotypes femelles et les 5 génotypes mâles conduiront à 5 types de sexe-ratio dans les descendances (mâles:femelles): 0:1, 1:3, 1:1, 3:1 et 1:0 (figure 18).

Quatre de ces 5 types de sexe-ratios ont été obtenus dans les 37 descendances analysées; seule une population 100% mâle n'a pas été observée.

Une stabilisation sur un génotype mâle et un génotype femelle ne semble donc pas être intervenue, et la gestion de la souche aurait donc permis la conservation de ces différents génotypes sexuels.

Tous les chromosomes sexuels potentiels (X, W et Z) sont donc présents dans les femelles de la population de "Gueule Rouge"; concernant les mâles, 3 (X, Y et Z) des 4 gonosomes théoriques (X, Y, Z et W) sont probablement représentés dans les 3 individus pour lesquels un génotype sexuel a pu être attribué.

Ces résultats suggèrent une conservation de la totalité des génotypes sexuels possibles dans la population de géniteurs présents à La Réunion.

Ce résultat confirme la base monofactorielle du déterminisme génétique du sexe chez le tilapia; toutefois, dans cette souche, apparaissent à nouveau des mâles ou des femelles inattendues.

Pour l'ensemble des 4 espèces ou souche de tilapia étudiées, 2 types d'hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces déviations de sexe-ratios:

- des modèles génétiques plus complexes, de type polygénique pourraient exister. Toutefois, l'absence de marqueurs génétiques liés au sexe chez le tilapia, rendent difficiles la réalisation d'analyses génétiques comme celles effectuées chez le platy (Kallman, 1984).
- Les déviations observées pourraient aussi résulter de potentiels effets des facteurs externes sur la différenciation. Selon les génotypes, un ou plusieurs facteurs externes, pourraient influencer le sexe phénotypique d'alevins en cours de différenciation gonadique du sexe. Cette dernière hypothèse, beaucoup plus facile à tester qu'un déterminisme complexe, permettrait alors d'expliquer au moins partiellement des résultats inattendus comme la détection de mâles dans les descendances issues de néomâles, mais aussi l'identification d'une néofemelle naturelle XY chez O. niloticus (Scott et al., 1989; Mair et al., 1991).

Une étude des effets de la température sur le sex-ratio des descendances issues de ces néomâles a donc été réalisée.

6. Déterminisme environnemental du sexe:

a) Mise en évidence d'un déterminisme environnemental du sexe:

Les vertébrés ont généralement fixé génétiquement leur déterminisme du sexe:

chez les Mammifères, le contrôle de la détermination du sexe est d'ordre génétique, et le sexe mâle est conditionné par la présence d'un chromosome Y.

dans d'autres espèces, le déterminisme du sexe est soumis à d'autres contrôles:

- chez la drosophile, le signal primaire est le rapport du nombre de chromosomes X au nombre d'autosomes.
- ce signal peut également dépendre de facteurs liés à l'environnement, comme dans le cas de plusieurs espèces d'Invertébrés (Bacci, 1965; Charnov et Bull, 1977) et de certains reptiles où le sexe dépend de la température d'incubation des oeufs.

Les crocodiles, la plupart des tortues et quelques lézards présentent un déterminisme du sexe dépendant de la température. Parmi les espèces étudiées, seules 4 espèces de tortues ne présentent

pas de déterminisme environnemental du sexe (toutes les espèces de tortues de mer présentent une TSD). En général les expérimentations en laboratoire apportent des températures critiques ou seuil pour la production de mâles ou de femelles; toutefois, d'autres facteurs compliquent le schéma: différences géographiques, influences génétiques (des travaux récents montrent que chez quelques espèces, des mâles et des femelles sont produits dans une large fourchette de température). Le déterminisme du sexe apparaît donc comme un processus complexe chez les reptiles qui ont une TSD/GSD, pas seulement d'un point de vue écologique, mais aussi d'un point de vue moléculaire.

Chez les poissons, très peu d'études ont analysé la possibilité d'un déterminisme du sexe par les facteurs de l'environnement. L'essentiel des travaux a longtemps concerné exclusivement les espèces hermaphrodites; chez ces dernières, l'influence de facteurs environnementaux a été démontrée sur la réversion naturelle du sexe (revues de Reinboth, 1975; Chan et Yeung, 1983). En particulier, chez *Rivulus marmoratus* les faibles températures permettent la production de mâles primaires (Harrington, 1967; 1968), et des modifications de photopériode conduisent à l'obtention de mâles secondaires (Harrington, 1971). Chez les espèces gonochoriques, seuls les travaux réalisés sur une espèce marine, *Menidia menidia* (Conover et Kynard, 1981; Conover, 1984; Conover et Fleisher, 1986; Conover et Heins, 1987 a, b) concluent clairement à un tel effet des facteurs externes.

Des études réalisées sur des espèces vivipares comme *Poeciliopsis lucida* suggèrent l'existence d'une base environnementale dans le déterminisme du sexe; toutefois les déviations observées pourraient provenir des effets de la température (Sullivan et Schultz, 1986) ou du pH (Rubin, 1985) sur la physiologie de l'organisme maternel, et non traduire un effet direct sur l'embryon.

La nécessité d'obtenir chez le tilapia des populations monosexes mâles pour assurer une bonne rentabilité de l'élevage, a suscité dans ce groupe d'espèces, de nombreux travaux sur le déterminisme du sexe. En l'absence d'hétérochromosomes ou de marqueurs liés au sexe, le déterminisme génétique du sexe a été essentiellement étudié, chez le tilapia, par l'analyse du sex-ratio des descendances d'individus obtenus par inversion hormonale ou gynogenèse. Ces travaux concluent à un déterminisme simple de type monofactoriel avec coexistence au sein d'un même groupe, d'espèces à homogamétie femelle (dont *Oreochromis niloticus*), et d'espèces à homogamétie mâle (*Oreochromis hornorum*, par exemple). Cependant dans de nombreux croisements inter comme intraspécifiques, les sex-ratios obtenus ne correspondent qu'imparfaitement aux modèles strictement basés sur des chromosomes sexuels. Ces déviations ont été souvent attribuées à des variants autosomaux; en l'absence de marqueurs liés au sexe, il est difficile d'entreprendre une telle démonstration. Nous avons donc envisagé une seconde hypothèse dans laquelle des facteurs de l'environnement, comme la température pourraient influencer la différenciation du sexe.

Les premières expérimentations ont été menées pendant la période hormono-sensible (21 jours à partir du 9-13 ème jour PF) qui débute avant l'apparition des premiers signes histologiques de la différenciation ovarienne (fig. 19a). Dans la plupart des descendances classiques utilisées, les traitements à 36°C augmentent significativement la proportion de mâles (53 à 81% en moyenne). Cet effet est moins prononcé à 34°C. Des traitements à 36°C ont été ensuite appliqués pendant 21 jours à différents âges, ou pour des durées variables à partir de 9-13 jours PF. La proportion de mâles augmente significativement pour des traitements ne débutant pas après le 13ème jour; ceux débutant entre 15 et 21 jours conduisant à des effets très modérés ou à une absence de réponse (fig. 19b). Une exposition de 10 jours à 36°C est suffisante pour affecter significativement la proportion de mâles et à l'intérieur de chaque famille, un traitement plus long (20-60 jours) produit des déviations comparables (fig. 19c). L'examen des taux de survie élimine la possibilité que l'augmentation du pourcentage de mâles résulte d'une mortalité préférentielle des femelles due au traitement. Cela suggère que les modifications du sex-ratio résultent d'inversions du sexe. 10 mâles issus d'un groupe traité à 36°C ont été individuellement reproduits avec des femelles standards (fig. 20). Au moment du sexage ce groupe comportait 79% de mâles. Un lot témoin à 46% de mâles était également élevé jusqu'à maturité et 15 de ces mâles reproduits avec des femelles standard. Toutes les descendances contrôles ont des sex-ratios équilibrés. Au contraire, 4 des 10 descendances issues des

mâles traités étaient composées d'une grande majorité de femelles. Ce résultat montre que la plupart, sinon la totalité des déviations de sex-ratio induites par la température correspondent à une masculinisation de femelles génétiques.

Des résultats équivalents ont été obtenus sur des lots monosexes femelles. Cela confirme donc l'hypothèse d'une inversion par la température (fig. 21).

Le sexe d'*Oreochromis niloticus* est donc dépendant de facteurs génétiques, du niveau de température et des interactions génotype/température.

b) effet des basses températures:

Des descendances individuelles, classiques ou génétiquement monosexes femelles (issues de mâles XX) ont été soumises à des fortes (30-36°C), moyennes (26-29°C) ou faibles (19-23°C) températures d'élevage, pendant leur période thermosensible (fig. 22a et b).

Seules les fortes températures (≥ 33-34°C), induisent des modifications significatives du sexe-ratio par rapport aux températures classiques (26-29°C). Aucune variation de sexe-ratio n'est observée après traitement à faibles températures.

c) variabilité de la thermosensibilité:

Afin de comparer leurs thermosensibilités, 3 descendances successives issues de 5 différents couples de reproducteurs ont été soumises à un traitement de 27 ou 36°C pendant 28 jours (fig. 23).

Pour chacun des couples de géniteurs, les 2-3 descendances successives, présentent des réponses non significativement différentes à un même traitement.

Inversement, 2 types de descendances sont observées: en effet, les descendances successives de 3 couples présentent une thermosensibilité, contrairement aux 2 autres couples dont les descendances successives ont des sexe-ratios stables quelque soit la température d'élevage (27 ou 36°C).

Enfin, un traitement de 36°C a été appliqué à une descendance génétiquement mixte. Dans le lot traité à 36°C, le pourcentage de mâles obtenus est de 78% de mâles (fig. 24). Huit de ces mâles sont élevés jusqu'à leur maturité sexuelle puis testés individuellement en descendance. Quatre de ces 8 mâles produisent des descendances monosexes femelles; ces descendances 100% femelles identifient des femelles génétiques masculinisées par la température (thermo-néomâles). Les 4 autres mâles produisant des descendances dont les sexe-ratios sont équilibrés, correspondent à des mâles génétiques.

Deux descendances issues des thermo-néomâles, sont chacune divisées en 2 lots, respectivement placés à 27 ou 36°C. Pour les 2 descendances, la proportion de mâles est significativement plus forte dans les lots élevés à forte température par rapport aux ratios obtenus à la température de 27°C. Les thermo-néomâles peuvent donc produire des descendances thermosensibles.

d) Effet de la température sur une autre espèce de tilapia:

Des résultats équivalents sont obtenus chez le tilapia rouge: les fortes températures sont capables d'augmenter significativement la proportion de mâles par rapport aux lots élevés à la température de 27°C. Une forte variabilité de thermosensibilité est observée selon les descendances (fig. 25).

IV. BILAN ET PERSPECTIVES

A. Bilan en matière de Recherche

B. Bilan personnel et pour le CIRAD-EMVT

C. Perspectives envisagées: Programme proposé dans le cadre d'une Association avec le Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA

a) Connaissances actuelles sur les mécanismes de la TSD chez les reptiles

b) Proposition de Programme d'association:

IV. Bilan et Perspectives

A. Bilan en matière de Recherche

La différenciation et le déterminisme du sexe sont bien sûr encore mal compris chez le tilapia; toutefois, le présent travail a néanmoins permis d'apporter un certain nombre de données originales et des outils qui devraient permettre d'approfondir ce vaste domaine de recherche:

Des arguments histochimiques et ultrastructuraux sont apportés à l'existence de stéroïdes gonadiques au moment de la différenciation, qui pourraient jouer le rôle d'inducteurs naturels du sexe.

L'un des androgènes, identifié précocement *in vitro*, présente de fortes potentialités masculinisantes, équivalentes à celles des stéroïdes artificiels classiquement utilisés pour l'inversion hormonale. Des populations 100% mâles sont obtenues à l'aide de cet androgène naturel. Ce stéroïde a depuis été identifié pendant des phases précoces de la différenciation testiculaire chez plusieurs espèces. Il constitue un candidat intéressant comme inducteur naturel de la différenciation testiculaire.

Un déterminisme monofactoriel basé sur une homogamétie femelle ou mâle, ne peut suffire à expliquer l'ensemble des sex-ratios obtenus. Toutefois, un tel système constitue sans aucun doute, la base du déterminisme génétique du sexe chez le tilapia.

La mise en évidence d'un déterminisme environnemental du sexe (thermosensibilité de la différenciation chez 2 espèces de tilapia) confirme bien que d'autres facteurs génétiques et épigénétiques se surajoutent à cette base monofactorielle portée par les chromosomes sexuels.

Les fortes variabilités de réponse à un même traitement par les fortes températures, suggèrent l'existence d'une composante génétique à cette thermosensibilité.

Un tel déterminisme environnemental pourrait être beaucoup plus répandu chez les poissons que ce que l'on considère actuellement. En effet, très peu de travaux ont analysé une telle hypothèse.

B. Bilan personnel et pour le CIRAD-EMVT

Ce programme a permis d'acquérir à la fois des résultats et compétences dans le domaine cognitif mais aussi dans le domaine appliqué, à travers des collaborations nationales et internationales.

Des techniques nouvelles de production de populations monosexes mâles sont d'ores et déjà proposées dans l'état actuel de ce travail.

Toutefois, les approches hormonales (même utilisant des hormones naturelles), ne doivent être qu'une étape pour permettre la recherche et la mise au point de techniques plus "propres", moins coûteuses et non dépendantes de produits parfois difficiles d'accès. A cet égard, une approche environnementale pour la production de populations à fortes proportions mâles constituerait à la fois une approche totalement originale, et idéale par rapport à toutes les caractéristiques recherchées pour un traitement.

Toutefois, il est maintenant nécessaire de mieux comprendre les caractéristiques génétiques et les mécanismes impliqués dans un tel déterminisme afin d'envisager son contrôle et son utilisation:

* Les interactions génotype/effet de la température suggèrent d'étudier la composante génétique de la thermosensibilité; une telle étude est en cours, en collaboration avec l'INRA, au GAMET de Montpellier.

* L'analyse des mécanismes impliqués nécessite de nouvelles approches, et devra donc être menée dans un environnement scientifique et technique favorable. Compte tenu des programmes et des techniques mises en place par le Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA à Rennes, nous proposons donc que cette analyse mécanistiques puisse s'effectuer dans le cadre d'une association avec l'Equipe Différenciation et Ovogenèse de ce laboratoire.

C. Perspectives envisagées: Programme proposé dans le cadre d'une Association avec le Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA

a) Activités de l'Equipe Différenciation et Ovogenèse du laboratoire de Physiologie des Poissons sur la truite arc en ciel:

La situation actuelle de J.F. Baroiller au sein de l'Equipe Différenciation et Ovogenèse, ainsi que les liens existants entre son programme et d'autres équipes du même laboratoire sont résumés dans la figure 26.

Dans un premier temps, le travail exploratoire (compte tenu du faible nombre d'études entreprises alors) réalisé sur le tilapia au Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA à Rennes, a permis d'apporter des arguments en faveur d'un rôle physiologique de certains stéroïdes lors de la différenciation gonadique du sexe. Toutefois, il a aussi eu le mérite de mettre en évidence un certain nombre de facteurs limitants pour l'étude de la physiologie de la différenciation. En particulier, la précocité de mise en place de la différenciation ovarienne chez des espèces comme le tilapia, ou la truite, conduit à travailler sur de très faibles quantités de matériel biologique (gonades de très petite taille pour des espèces à différenciation précoce comme le tilapia (28-35 jours à 27°C) ou la truite (55 jours à 12-13°C), impossibilité de prélèvement plasmatique durant la différenciation...).

Il était donc nécessaire de disposer de nouveaux outils mieux adaptés à de telles contraintes biologiques.

Le travail de thèse de M.L. Malejac (1989-1993) sur la différenciation sexuelle, a permis d'initier une étude sur la réceptivité des gonades à travers la mise place de nouveaux outils, essentiellement moléculaires (expression du gène codant pour le récepteur aux oestrogènes, en utilisant la technique de RT-PCR).

Le recrutement en août 1993, de Y. Guiguen, comme chargé de recherche sur le thème de l'implication des stéroïdes dans la différenciation sexuelle se situe dans la continuité de l'ensemble des travaux effectués au Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA à Rennes sur le tilapia et la truite. En particulier, est poursuivi le travail sur la réceptivité ovarienne aux oestrogènes lors de l'initiation de la différenciation avec des outils comparables (sonde d'ADNc du récepteur aux oestrogène et sonde d'ADNc de l'aromatase, enzyme conduisant à la synthèse des oestrogènes): Cette étude a permis de mettre en évidence l'expression du récepteur aux oestrogènes, ainsi que des potentialités de synthèse de cette famille de stéroïdes (expression du gène de l'aromatase) lors des premières étapes de la différenciation ovarienne. Il conviendra toutefois de vérifier l'existence de telles potentialités à des stades antérieurs à la différenciation femelle.

Une étude similaire sera menée sur la différenciation mâle. Dans un premier temps, des outils comparables sont actuellement recherchés; il s'agit en particulier de l'ADNc codant pour la 11ß-hydroxylase (enzyme permettant la synthèse de la 11ßOHΔ_4) ainsi que l'ADNc codant pour un probable récepteur aux androgènes chez le poisson..

Un deuxième volet consistera à identifier le(s) gène(s) spécifiquement exprimé(s) lors d'un traitement masculinisant à la 11ßOHΔ_4, à travers des banques d'ADNc soustractives.

Enfin, un travail récent de DEA encadré par A. Fostier (Iseki, 1995) a permis de mettre au point un milieu qui semble convenir pour la culture (organotypique et cellulaire) de gonade de tilapia.

Dans l'état actuel des 2 programmes sur la différenciation gonadique du sexe chez la truite et le tilapia, on peut considérer aujourd'hui que l'étude de la réceptivité gonadique à des stéroïdes spécifiques du sexe lors de la mise en place de la différenciation chez la truite et la thermosensibilité de la différenciation constituent les 2 aspects les plus novateurs resitués dans un contexte international.

De plus, des outils spécifiques ont été (ou sont en cours) mis en place pour les 2 modèles. En particulier, pour les 2 espèces, le CIRAD et l'INRA disposent de géniteurs à descendances monosexes femelles et à descendances monosexes mâles.

Des outils moléculaires ont été développés chez la truite:

ADNc du récepteur aux oestrogènes et sonde d'ADNc de l'aromatase

Chez le tilapia, des géniteurs à descendances peu ou pas thermosensibles, et des géniteurs à descendances très thermosensibles ont été caractérisés. Enfin, la technique de culture de gonades pourrait permettre d'étudier l'influence de la température ou le rôle des stéroïdes dans la différenciation.

Dans les 2 espèces, un androgène, la 11ßOHΔ_4, a été identifié précocement durant des étapes précoces de la différenciation testiculaire, et présente de fortes activités masculinisantes. Cet androgène pourrait être impliqué dans la différenciation testiculaire. L'ADNc codant pour la 11ß-hydroxylase, enzyme qui permet la synthèse de cet androgène, a été obtenu chez l'anguille au Japon (équipe du professeur Nagahama) et une collaboration est actuellement en cours pour son clonage chez la truite.

C'est donc chez la truite que l'on dispose actuellement du plus grand nombre d'outils moléculaires pour progresser dans la connaissance des mécanismes de la différenciation et en particulier du rôle des stéroïdes dans la différenciation.

C'est par contre chez le tilapia qu'a été mis en évidence une thermosensibilité de la différenciation.

Dans cet état actuel des connaissances, et compte tenu des outils disponibles, ces 2 espèces constituent donc 2 outils complémentaires pour l'analyse des mécanismes de la différenciation chez les poissons.

Il semble donc plus judicieux de profiter en parallèle de ces 2 approches possibles (réceptivité des gonades à des stéroïdes et thermosensibilité) pour l'étude de la différenciation, plutôt que de rechercher à mettre au point pour chaque espèce, de manière spécifique, les même outils pour une même étude.

b) Connaissances actuelles sur les mécanismes de la TSD chez les reptiles

Les données actuelles sur le déterminisme du sexe des vertébrés restent encore très fragmentaires.

Un schéma général du déterminisme génétique du sexe implique probablement une cascade de gènes ou de réactions, dont l'expression finale est le sexe mâle ou femelle. Le signal initial peut être considéré comme un "switch" qui contrôle l'expression de gènes déterminants le sexe. La nature du signal initial varie:

chez les Mammifères c'est la présence ou l'absence de chromosomes Y,

chez les reptiles c'est le niveau de température ou d'autres facteurs environnementaux,

chez la drosophile, c'est le ratio du nombre de chromosomes X sur le nombre d'autosomes:

- un ratio X/A $\geq 1 \Rightarrow$ femelle
- un ratio X/A $<0.5 \Rightarrow$ mâle
- $0.5 \leq X/A \leq 1 \Rightarrow$ intersexué + mosaïcisme pour des caractères sexuels secondaires

Chez la drosophile, le mécanisme par lequel le signal X/A est ressenti, implique un facteur de transcription (T4), dont le locus est situé sur le chromosome X. Durant l'embryogenèse précoce, le gène T4 est transcrit en utilisant une région promotrice spécifique. Puis il y a interactions dose-dépendante entre ce facteur et d'autres facteurs de transcriptions qui affectent directement l'activité d'un autre gène, Sxl (Sexe létal) qui est le maître régulateur du développement sexuel.

Chez les mammifères, si l'on cherche à établir une homologie, le facteur primaire initiateur de la cascade de détermination du testicule porté par le chromosome Y, nommé SRY (SRY humain et sry murin) et identifié au Testis Determining Factor (TDF) est probablement aussi un facteur de transcription.

Faute d'outils, très peu d'études avaient jusqu'alors été entreprises chez les reptiles thermosensibles, pour tenter d'analyser les mécanismes du déterminisme environnemental du sexe.

Chez les reptiles, parmi la famille des lézards geckos, de nombreuses espèces possèdent une TSD alors que d'autres espèces possèdent des GSD, avec homogamétie mâle ou femelle ou une GSD sans hétérochromosome. La coexistence de systèmes GSD et TSD dans des espèces apparentées suggèrent que les systèmes de déterminisme du sexe eux-mêmes pourraient être également apparentés. Il a été suggéré que la TSD pourrait représenter le système de déterminisme du sexe primitif chez les reptiles et que la GSD en dériverait (Ohno, 67). L'analyse de la phylogénie de la température TSD/GSD chez les reptiles tend à supporter cette hypothèse mais la TSD n'a été décrite que dans moins de 10% des espèces de reptiles et il est difficile de tirer une conclusion définitive dans ces conditions.

Il a été aussi suggéré que la température pourrait seulement outrepasser un système GSD sous-jacent.

Les premières études à l'échelle moléculaire, ont recherché la présence de gènes SRY-like et ZFY-like dans de nombreux vertébrés, dont les reptiles, en utilisant des sondes mammaliennes pour le motif conservé de SRY. Il existe maintenant des preuves de l'existence d'une famille de plusieurs gènes apparentés à Sry chez l'alligator et à ZFY chez au moins 2 Ordres de reptiles. Néanmoins, les patterns d'hybridation ne révèlent aucune spécificité liée au sexe chez les reptiles à déterminisme environnemental (TSD) comme génétique (GSD). Ces résultats suggèrent que les gènes SRY-like ou ZFY-like n'auraient pas un rôle primaire dans la TSD. Ces gènes sont toutefois exprimés avec une spécificité tissulaire, chez l'alligator.

Chez les Tortues, on considère de plus en plus, qu'existe un composant génétique du déterminisme du sexe qui pourrait s'apparenter à un système monofactoriel XX/XY ou ZZ/WZ; une étude récente décrit ainsi plusieurs espèces de tortues d'eau douce, chez lesquelles il existe une large fourchette de températures génératrice de sexe-ratio équilibrés (Ewert et Nelson, 1991). La température agirait alors comme un facteur affectant une activité du gène.

Dans une revue récente, Spotila et al, (1994), rappellent les mécanismes hypothétiques par lesquels passerait la perception de ce facteur par la cellule cible, ainsi que la réponse cellulaire à la température (fig. 27) :

La cellule pourrait percevoir le signal *via* un effet direct sur un facteur transcriptionnel, *via* un récepteur membranaire, ou *via* la modification du processus de transduction.

La réponse cellulaire pourrait passer par une modification des processus d'épissage, de transport et de la stabilisation du mRNA, et de sa traduction en protéines, ou directement sur le transport, la stabilisation ou l'effet de la (ou des) protéine(s).

Enfin, la réponse pourrait également intervenir via une régulation de la transcription (fig. 28):

la température pourrait modifier la conformation d'une molécule X, de telle façon qu'à une température masculinisante, X se lierait au site de stimulation (enhancer), stimulant ainsi fortement la transcription en augmentant ainsi la formation du produit du gène nécessaire à la différenciation testiculaire. Au contraire, à une température féminisante, la conformation de la molécule X ne lui permettrait pas de se lier au site de stimulation (enhancer) et peu de produit du gène serait ainsi formé, les gonades devenant alors femelles, par défaut.

Les approches moléculaires étant fort récentes dans le domaine de la TSD, les hypothèses proposées pour la perception du signal température, ainsi que pour la réponse cellulaire restent à démontrer. Néanmoins, quelques premiers éléments de réponse peuvent probablement être trouvés chez les Tortues chez qui, les études mécanistiques ont été les plus poussées à ce jour.

Chez *Emys orbicularis*, les faibles températures d'incubation des oeufs (18-28°C) induisent des pontes 100% mâles, les fortes températures (30-36°C) conduisant à des descendances 100% femelles;. entre 28 et 29.5°C, des mâles et des femelles sont observées à l'éclosion.

L'étude des effets des oestrogènes exogènes, d'anti-oestrogènes comme le tamoxifène ainsi que d'inhibiteurs de l'activité aromatase suggère que la température et l'oestradiol pourraient agir via la même voie physiologique (Dorizzi et al., 1991; Desvasges et Pieau, 1992; Desvages et al., 1993).

Par exemple, l'oestradiol, peut induire une différenciation femelle, à une température d'incubation produisant normalement 100% de mâles.

Une activité aromatase est présente dans le tissu gonadique embryonnaire femelle, mais pas ou peu dans le tissu gonadique mâle. L'activité aromatase augmente fortement vers la fin de la période thermosensible à température féminisante mais reste faible à température masculinisante.

Des passages vers des températures féminisantes augmentent grandement l'activité aromatase, alors que des shifts à une température masculinisante fait décroître fortement l'activité aromatase.

Enfin, si l'on empêche l'action des oestrogènes par des techniques classiques (inhibiteurs de synthèse, anti-oestrogènes...), on masculinise les gonades en différenciation. Toutefois, des résultats équivalents n'ont pu être obtenus chez l'alligator (Lance et Bogart, 1994). Ces auteurs font l'hypothèse que la régulation de la transcription du gène de l'aromatase jouerait un rôle clé dans la différenciation gonadique des reptiles (fig. 29).

L'augmentation de l'activité aromatase résulte apparemment d'une augmentation de la production d'aromatase cytochrome P-450 plus que d'une augmentation de l'activité aromatase proprement dite.

Chez les reptiles, un des axes de recherches privilégié pour l'avenir, est la régulation de l'aromatase cytochrome P-450. Les études moléculaires sur la détermination ovarienne du sexe ont pour l'instant eu pour but de cloner les gènes des récepteurs aux oestrogènes et de l'aromatase cytochrome P450. Comme ces 2 gènes n'ont été que récemment clonés, des données physiologiques sur leur expression durant la TSD ne sont pas encore disponibles. En revanche, chez les oiseaux et les mammifères, elles suggèrent que des gènes ou des produits de gènes comme SRY ou l'hormone anti-Müllérienne pourraient affecter le système aromatase cytochrome P-450.

La température pourrait réguler la production de stéroïdes comme une part intégrale de la cascade du déterminisme du sexe.

En conclusion, l'effet de la température sur le sex-ratio passe probablement par une stimulation ou une répression de l'expression de certains gènes dans les cellules gonadiques.

Dans une telle hypothèse, la température pourrait agir chez le tilapia, en modulant l'expression de certains gènes, au niveau des cellules gonadiques. Elle pourrait par exemple, réguler la transcription de gène d'enzymes de la stéroïdogenèse, parmi lesquels, la 11β-hydroxylase, responsable de la synthèse de 11β-hydroxyandrostenedione (fig. 30).

c) Proposition de Programme d'association:

Le programme proposé dans le cadre de l'association vise à rechercher, dans la gonade en cours de différenciation, des expressions spécifiques de gènes liés à la masculinisation par la température chez le tilapia.

Dans une telle hypothèse, certains gènes impliqués dans la thermosensibilité du tilapia ne s'exprimeraient à taux important qu'après stimulation. Dés lors, les gonades d'alevins élevés à fortes températures, s'enrichissent ou s'appauvrissent alors en certains mRNA par rapport aux gonades d'alevins élevés à température classique.

Cette expression différentielle des gènes dans un même type cellulaire placé dans différentes conditions sera alors mise à profit pour enrichir les mRNA de départ en messager que l'on désire cloner.

Des descendances génétiquement femelles seront utilisées afin de disposer au départ, d'un lot dépourvu de tout facteur masculinisant. Deux types de descendances pourront être utilisés:

- descendances très fortement thermosensibles
- descendances non ou peu thermosensibles

Les descendances génétiquement femelles seront divisées en 2 lots, élevés à 27°C ou à 36°C pendant leur période thermosensible, soit de 10 jours P.F à 20 jours P.F.(fig. 32). La période minimale de traitement à 36°C permettant d'induire une déviation significative du sexe-ratio est de 10 jours; c'est donc cette période de traitement qui sera utilisée, pour à la fois bénéficier d'un traitement optimal, et en même temps minimiser, par un prélèvement le plus précoce possible, le nombre de gènes dont l'expression est potentiellement dépendante de la température. Par ailleurs, les descendances non sensibles placées à 36°C pourront être utilisées, si nécessaire, pour épuiser les mRNA induits par l'élévation de température mais non spécifiques de l'effet masculinisant de celle-ci.

La première étape consiste donc à établir 2 banques différentielles, les fortes températures pouvant aussi bien induire des gènes mâles que réprimer des gènes femelles (fig. 31). Pour cela, les mRNA sont extraits des tissus placés dans des conditions de stimulation ou d'absence de stimulation, le gène que l'on désire cloner étant potentiellement exprimé dans les gonades des individus placés à l'une des 2 températures, et pas dans l'autre (fig. 31). Tous les autres gènes ou presque sont exprimés dans les 2 conditions thermiques; si les gonades sont prélevés à des stades précoces de l'ontogenèse, durant la période thermo-sensible, avant la différenciation, on permet sans doute à moins de gènes d'être déjà exprimés. Par ailleurs, il est possible, si nécessaire (en cas de stimulation d'un grand nombre de gènes, non spécifiques de la masculinisation), d'épuiser les mRNA non spécifiques avec des descendances non thermosensibles soumises au même traitement.

Les mRNA des gonades placées dans l'une des 2 conditions d'élevages (fig. 32) sont transformés en cDNA monobrins, qui seront hybridés avec un excès de mRNA des gonades placés à l'autre température. Seuls les cDNA correspondants aux gènes uniquement exprimés dans l'une des 2 conditions resteront sous forme de cDNA monobrin (les autres seront sous forme d'hybride cDNA-mRNA). Les cDNA monobrin seront ensuite transformés en cDNA double brin, puis sont introduits par des vecteurs. Les clones recombinants constituent la banque différentielle.

Cette banque est étalée et il en est pris 2 empreintes: la première est hybridée avec les cDNA obtenus à partir des messagers des cellules des gonades d'une température, la seconde avec les cDNA obtenus à partir des messagers obtenus dans les gonades à la seconde température. Les

clones positifs sur la première empreinte et négatifs sur l'autre sont des clones spécifiques des cellules des gonades élevées à la 1ère température, donc des clones candidats pouvant contenir le(s) cDNA(s) recherché(s).

d) Intégration du programme proposé au sein des activités de l'Equipe Différenciation et Ovogenèse et liens avec le Laboratoire de Génétique des Poissons:

Le programme proposé permettrait de renforcer l'Equipe Différenciation dans son étude de la différenciation par une approche environnementale (figure 33).

Chez les poissons, compte tenu de la mise en évidence récente d'un tel déterminisme, aucune étude n'a pour l'instant cherché à comprendre les mécanismes sous-jacents. Par ailleurs, des données récentes, présentées au congrès d'Austin (USA, 1995) suggèrent qu'un tel déterminisme environnemental pourrait exister chez de nombreuses espèces de poissons. Chez les reptiles, de telles études mécanistiques ne font que débuter, faute d'outils appropriés. Dès lors, une telle étude reste tout à fait originale chez les vertébrés inférieurs thermosensibles, intéressant à la fois des aspects évolutionnistes, et physiologiques.

Un parallèle étroit existe entre la masculinisation par des stéroïdes exogènes et par un facteur externe comme la température. En particulier, ce parallèle se retrouve dans les caractéristiques de la sensibilité des gonades au facteur utilisé: période sensible, dose ou intensité du facteur, durée d'application... Par ailleurs, on connaît bien les effets qualitatifs et quantitatifs de la température sur le métabolisme stéroïdien in vitro chez le tilapia. La principale hypothèse concernant le mécanisme par lequel la température masculinise ou féminise la gonade chez les reptiles repose d'ailleurs sur la modulation d'activités enzymatiques de la stéroïdogenèse; si une telle hypothèse se vérifiait dans le cas du tilapia (fig. 30), les sondes d'ADNc truite codant pour la 11ß hydroxylase ou pour l'aromatase seraient utilisées pour cloner ce gène chez le tilapia, et analyser la régulation de sa transcription par la température.
De la même manière, la température induirait alors aussi, indirectement, l' expression des mêmes gènes que ceux liés à la masculinisation par la 11ßOHΔ_4, fournissant alors une autre approche pour l'étude des mécanismes sous-jacents.
De nombreux ponts existent donc entre ces 2 thèmes, qui devraient donc mutuellement bénéficier d'une telle association.

Les techniques utilisées pour la recherche d'expression spécifiques de gènes liés à la masculinisation par la 11ßOHΔ_4 et la température seront similaires, et dés lors, J.F. Baroiller pourra bénéficier des compétences acquises par Y. Guiguen en Biologie moléculaire à travers son postdoc aux USA, ainsi que de celles de nombreux chercheurs du Laboratoire de Physiologie ou de Génétique des Poissons dans ce domaine.

Le CIRAD-EMVT, pourra par ailleurs fournir de nombreuses souches naturelles ou domestiques, susceptibles de présenter une sensibilité différente à la température par rapport à celle utilisée jusqu'alors: on connaît par exemple une souche de la même espèce de tilapia, vivant naturellement dans des eaux en contacts avec des sources géothermales, et soumis à certaines périodes de l'année à des températures de 42°C. Chez une telle souche, il est probable qu'un processus adaptatif a du se mettre en place vis à vis d'un potentiel déterminisme environnemental, faute de quoi, sa survie aurait été menacée.

ANNEXE: LISTE DES PUBLICATIONS

Annexe: Liste des Publications

(1) **Baroiller, J.F.**, Fostier, A., Zohar, Y., et Marcuzzi, O., 1987. The metabolic clearance rate of estradiol-17ß in rainbow trout, Salmo gairdneri, estimated by both single and constant infusion methods: increase during oocyte maturation. Gen. Comp. Endocrinol. 66: 85-94.

(2) **Baroiller, J.F.**, 1988 a. Etude corrélée de l'apparition des critères morphologiques de la différenciation de la gonade et de ses potentialités stéroidogènes chez *Oreochromis niloticus*. Thèse Doc. de l'Univ. P. et M. Curie, Paris VI, 89 pp.

(3) **Baroiller, J.F.**, Fostier, A. et B. Jalabert, 1988. Precocious steroidogenesis in the gonads of *Oreochromis niloticus* during and after sexual differentiation. In: Reproduction in fish. Basic and applied aspects in endocrinology and genetics, (Y. Zohar et B. Breton, eds), Les Colloques de l'INRA, 44: 137-141.

(4) **Baroiller, J.F.**, 1988 b. Etude des processus morphologiques et endocrinologiques de la différenciation naturelle du sexe chez *Oreochromis niloticus*, appliquée à la production de populations monosexes: intérêts et perspectives. In G.M. Bernacsek and H. Powles (eds). Aquaculture Systems Research in Africa. Proceedings of a workshop held in Bouaké, Côte d'Ivoire, 14-17 Nov. 1988. International Development Research Center (IDRC), Ottawa, Canada, pp. 256-266.

(5) **Baroiller, J.F.** and Jalabert, B., 1989. Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapias. Aquat. Living Resour. 2: 105-116.

(6) **Baroiller, J.F.** et Jalabert, B., 1990. Physiologie de la reproduction des Tilapias: Bilan des connaissances et perspectives de recherche d'intérêt appliqué. In "L'Aquaculture des tilapias du développement à la recherche" (J. Lazard, B. Jalabert et T. Doudet, eds). Cahiers scientifiques du CTFT, 10: 39-62.

(7) **Baroiller, J.F.** and Toguyeni, A., 1993. Comparative effects of a natural steroid, 11ß-hydroxy-androstenedione (11ß-OH-A4) and a synthetic androgen, 17α-Methyltestosterone (17α-MT) on sex-ratio in *Oreochromis niloticus*. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kothias and D. Pauly (eds). "Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture". ICLARM Conf. Proc. 41. 11-16 Nov 1991, Abidjan, Côte d'Ivoire. Sous Presse.

(8) **Baroiller, J.F.**, 1993. Significant proportions of unexpected males in the majority of progenies from single pair matings with sibling sex-reversed males of *Oreochromis niloticus*. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kothias and D. Pauly (eds). "Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture". ICLARM Conf. Proc. 41. 11-16 Nov 1991, Abidjan, Côte d'Ivoire. Sous presse

(9) **Baroiller, J.F.**, Fostier, A., Cauty, C. and Jalabert, B., 1993. Significant effects of high temperatures on sex-ratio of progenies from *Oreochromis niloticus* with sibling sex-reversed males broodstock. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kothias and D. Pauly (eds). "Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture". ICLARM Conf. Proc. 41. 11-16 Nov 1991, Abidjan, Côte d'Ivoire. Sous presse

(10) **Baroiller, J.F.**, Rognon, X., Yapi, V.C. and Cisse, A., 1994. Genetic characterization and sex determination in tilapia in Côte d'Ivoire. In A.E., Eknath, B.A., Acosta and R.S.V. Pullin (eds) Present Progress, future needs in fish genetics research in Asia, Pacific and Africa. Asian Regional Worhshop on tilapia genetics, Manila, Philippines. ICLARM Conf. proc. 38. Sous presse.

(11) **Baroiller, J.F.**, Chourrout, D., Fostier, A., and Jalabert, B. 1995. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. J. Exp. Zool., 272: Sous presse

(12) **Baroiller, J.F.**, Clota, F. and Geraz, E., Temperature sex determination in two tilapias species, *Oreochromis niloticus* and the red tilapia (Red Florida strain): effect of high or low temperatures. In "Proceedings of the 5th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish". 2-8 July, 1995, The University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA, 3 pp. Sous Presse.

(13) **Baroiller, J.F.**, Nakayama, I., Foresti, F. and Chourrout, D., Sex determination studies in two species of teleost fish. In Proceedings of ROC-FRANCE-Joint Symposium on Marine Biotechnology. Taipeih, R.O.C., 14-15 Mars 1995, In press.

(14) Auperin, B., **Baroiller, J.F.**, Ricordel, M.J., Fostier, A. and Prunet, P., Effect of confinement stress on circulating levels of growth hormone and two prolactins in tilapia (*Oreochromis niloticus*) in freshwater. Soumis pour publication dans General and Comparative Endocrinology.

(15) Toguyeni, A., **Baroiller, J.F.**, Fauconneau, B., Fostier, A., Mol, K.A., and LeBail, P.Y., Relationship between endogenous thyroid, steroid and GH hormonal status and growth parameteres in *Oreochromis niloticus*: effects of feeding levels and sex. Soumis pour publication dans Fish Physiology and Biochemistry.

(16) **Baroiller, J.F.**, Desprez, D., Toguyeni, A., Melard, C., Hoareau, M.C. and P. Bosc., 1995. Use of a natural steroid, 11ß-hydroxy-androstenedione ($11ßOHA_4$) for the production of male monosex populations in 4 tilapia species, *Oreochromis niloticus Oreochromis aureus, S. melanotheron* and the red hybrid "Red Florida". Soumis pour publication dans Aquatic Living Resources.

(17) **Baroiller, J.F.**, Jalabert, B. and Cauty, C., The gonadal sex differentiation in *Oreochromis niloticus*: Histological and enzyme-histochemical studies. Soumis pour publication dans Gen. Comp. Endocrinol.

(18) Toguyeni, A., Fauconneau, B., Fostier, A., Boujard, T., Kuhn, E.R., Mol, K.A., and **Baroiller, J.F.**, Relationship between feeding behaviour, feed utilization, plasma levels of thyroid and steroid hormones in relation to sex-ratio in *Oreochromis niloticus*: effects of feeding levels and sex. Soumis pour publication dans Fish Physiology and Biochemistry.

(19) Toguyeni, A., Fauconneau, B., Aubin, J., Vauchez, C., S.J. Kaushik., and **Baroiller, J.F.**, Comparison of four methods for individual or "en mass" marking of *Oreochromis niloticus* fry and juveniles. Soumis pour publication dans Aq. Liv. Res.

(20) Tacon, P., Levavi-Sivan, B., Yaron, Z., **Baroiller, J.F.**, LeBail, P.Y., Prunet, P., and B. Jalabert., Relations between the expression of maternal behaviour and some endocrine profiles during the reproductive cycle in the mouthbrooding cichlid fish, *Oreochromis niloticus* : sex steroids, gonadotropin, prolactin and growth hormone. Soumis pour publication dans Gen. Comp. Endocrinol.