

DK 530312

BA_TH1301

Université Montpellier II
Sciences et Techniques du Languedoc
Place Eugène Bataillon
34095 MONTPELLIER Cedex 5

CIRAD-EMVT
TA 30 / B
Campus International de Baillarguet
34398 MONTPELLIER Cedex 5

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

**METHODES ET APPLICATIONS DE LA
STERILISATION DES GONADES CHEZ LES
POISSONS**

par

Marion MICHELAT

**CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet**

Année universitaire 2004-2005

**BA
TH1301**



CIRAD

000073169

RESUME

L'aquaculture est une des solutions adaptées pour répondre au besoin grandissant de protéines de la population mondiale en raison d'une forte croissance démographique. L'aquaculture est en plein essor et est constamment à la recherche d'améliorations de la rentabilité et de la qualité du poisson et ce, depuis peu, dans le respect de l'environnement et de la santé du consommateur. La stérilisation des poissons d'élevage va dans ce sens. Ainsi, les poissons stériles ont une qualité de chair plus constante et, si ils se retrouvent accidentellement dans la nature, ils ne pourront pas s'hybrider avec les populations locales. Différentes techniques de stérilisation sont utilisées : le traitement par hormones stéroïdes, l'hybridation, la triploïdisation et la transgénèse. Aucune d'entre elles n'est efficace à cent pour cent mais la triploïdisation est la plus fiable. Une nouvelle méthode est en cours d'étude : la stérilisation par la température (traitement par la chaleur pour détruire les cellules germinales). Cette méthode aurait l'avantage par rapport aux autres d'être plus naturelle.

Mots-clés : aquaculture-poissons-stérilisation-gonades-hormones stéroïdes-hybridation-triploïdisation-transgénèse-température.

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| Résumé et mots-clés | |
| Introduction | 1 |
| I. Les gonades des poissons et leur régulation hormonale | 2 |
| I.1. La gamétogenèse | 3 |
| I.2. Les gonades | 4 |
| I.2.1. Les testicules | 4 |
| I.2.2. Les ovaires | 5 |
| I.3. L'hermaphrodisme | 8 |
| I.4. Le cycle sexuel | 9 |
| I.5. Le dimorphisme sexuel | 9 |
| I.6. Le contrôle neuro-endocrinien de la gamétogenèse : l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade | 10 |
| II. Intérêts de la stérilité gonadique en aquaculture | 10 |
| II.1. Suppression de la maturité sexuelle | 10 |
| II.2. Préservation de la biodiversité | 12 |
| III. Techniques actuelles de stérilisation gonadique | 14 |
| III.1. Stérilisation gonadique par les hormones stéroïdes | 14 |
| III.2. Stérilisation gonadique par amélioration génétique | 16 |
| III.2.1. Hybridation | 16 |
| III.2.2. Manipulation chromosomique : triploïdisation | 16 |
| III.2.3. Manipulation génétique : transgenèse | 20 |
| IV. La température : un nouvel outil pour la stérilisation gonadique | 21 |
| IV.1. Sensibilité des gonades de mammifères à la température | 21 |
| IV.2. Sensibilité des gonades de poissons à la température | 26 |
| IV.3. Avantages de la stérilisation gonadique par la température | 30 |
| Conclusion | 30 |
| Bibliographie | 31 |

INTRODUCTION

En 2004, la population mondiale a atteint 6,5 milliards. On attend 8 milliards d'ici 2030. En conséquence de cette croissance démographique la demande alimentaire et plus particulièrement le besoin en protéines animales ne cessent d'augmenter. Or les stocks naturels de poissons qui représentent une des sources d'apport en protéines animales s'épuisent et ne suffisent plus à nourrir les populations. C'est aujourd'hui l'aquaculture qui contribue en grande quantité à répondre à la demande (Source FAO).

L'aquaculture connaît un essor considérable dans le monde entier. Aussi est elle toujours en quête d'une amélioration des rendements et de la qualité des produits pour répondre aux exigences des consommateurs. La difficulté principale réside dans le fait que cette amélioration doit se faire tout en respectant l'environnement et la santé humaine.

Nous allons traiter ici de la stérilité gonadique des poissons et de son application en aquaculture. En effet, l'utilisation de techniques de stérilisation gonadique confère de meilleures qualités aux poissons et une meilleure valorisation des produits sur le marché.

Dans un premier temps nous décrirons les gonades des poissons et leur régulation hormonale. Nous pourrions ainsi mettre en évidence dans un deuxième temps les avantages de la stérilité pour les poissons d'élevage. Dans un troisième temps nous passerons en revue les différentes techniques de stérilisation gonadique existantes. Enfin, une nouvelle méthode de stérilisation gonadique à l'étude sera présentée en dernière partie.

Avant de commencer, il convient d'explicitier ce qu'on entend par "stérilité". Ce terme a été défini au sens propre comme l'impossibilité d'un individu à avoir une descendance (Chevassus *et al.*, 1979). Deux types distincts de stérilité gonadique sont possibles :

- celle qui se caractérise par la présence d'une gonade peu ou pas développée et qui ne produit pas de gamètes
- celle, appelée infertilité (stérilité incomplète et/ou transitoire), dans laquelle les gonades se développent normalement, fournissent des gamètes morphologiquement normaux mais pas viables, les développements embryonnaires obtenus à partir de tels gamètes avortant très rapidement.

I. LES GONADES DES POISSONS ET LEUR REGULATION

I.1 LA GAMETOGENESE (cours de Tomasini, 2005)

Fondamentalement, les grandes étapes de la spermatogenèse et de l'ovogenèse sont semblables (figure 1). Il existe cependant des différences qu'il faut souligner :

- chez les mâles, la spermatogenèse de nombreuses cellules germinales se déroule à l'intérieur d'un cyste formé de quelques cellules de Sertoli. Chez les femelles, chaque cellule germinale est entourée d'une granulosa, constituée de nombreuses cellules nourricières, les cellules folliculaires, et qui est l'un des éléments principaux du follicule à l'intérieur duquel se déroule l'ovogenèse.

- au cours de la spermatogenèse, une spermatogonie aboutit à la formation de quatre spermatozoïdes, alors que durant l'ovogenèse, une ovogonie ne donne qu'un ovule.

- chez les mâles, en fin de gamétogenèse, les cellules sexuelles subissent une étape supplémentaire, la spermiogenèse, au cours de laquelle une cellule d'aspect banal subit des transformations essentiellement morphologiques pour donner une cellule hautement spécialisée, le spermatozoïde (figure 2). La structure des spermatozoïdes est variable et souvent en rapport avec le mode de fertilisation. Ainsi, l'absence fréquente d'acrosome pourrait être mis en relation avec la présence d'un micropyle chez les œufs de Poissons. Souvent également, chez les espèces dont la fertilisation est interne, le noyau est allongé et la pièce intermédiaire bien développée, alors que chez celles à fécondation externe, le noyau est rond et la pièce intermédiaire courte. Chez certaines espèces les spermatozoïdes sont aflagellés ou biflagellés.

- chez les femelles, au cours de l'ovogenèse, les cellules germinales accumulent une grande quantité de vitellus (vitellogenèse), accumulation qui est le principal responsable de l'augmentation de la taille des ovocytes. On distingue chez les Poissons trois types de matériel vitellin : les gouttelettes d'huile, les vésicules vitellines et les globules vitellins. Ce sont, en général, les gouttelettes d'huile qui apparaissent les premières dans la zone périnucléaire, mais la séquence et l'apparence de ce matériel vitellin varient avec les espèces.

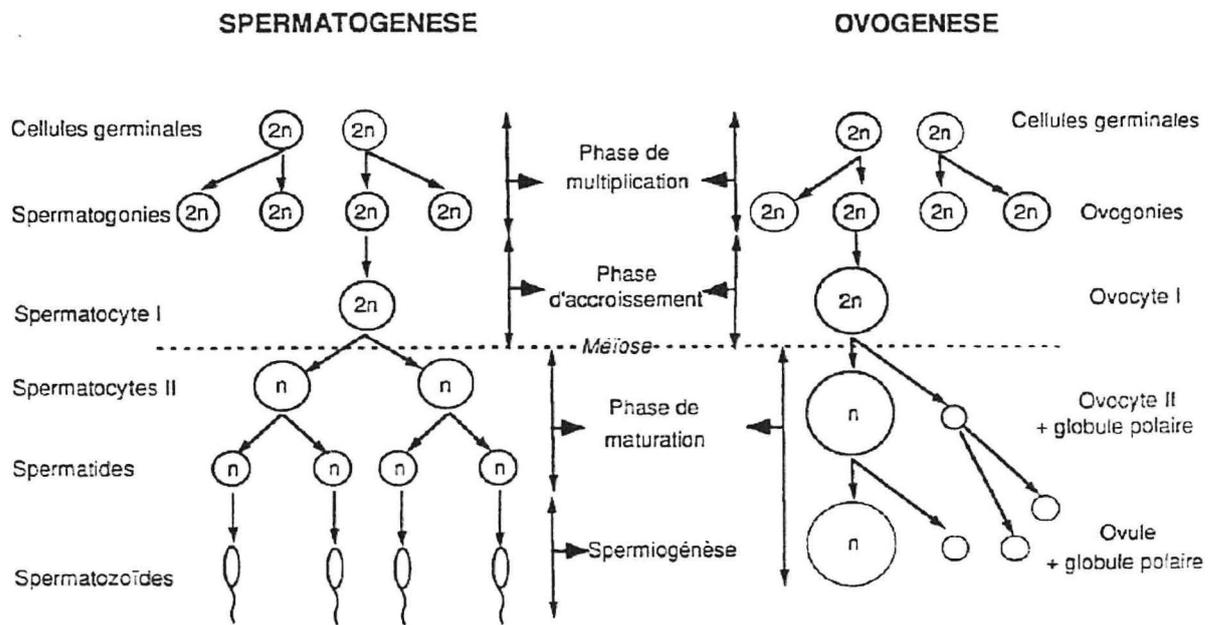


Figure 1. La gamétogenèse (d'après Tomasini, 2005).

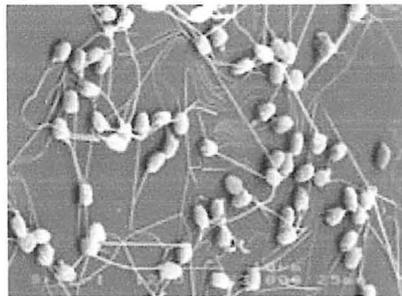


Figure 2. Spermatozoïdes de truite (source web).

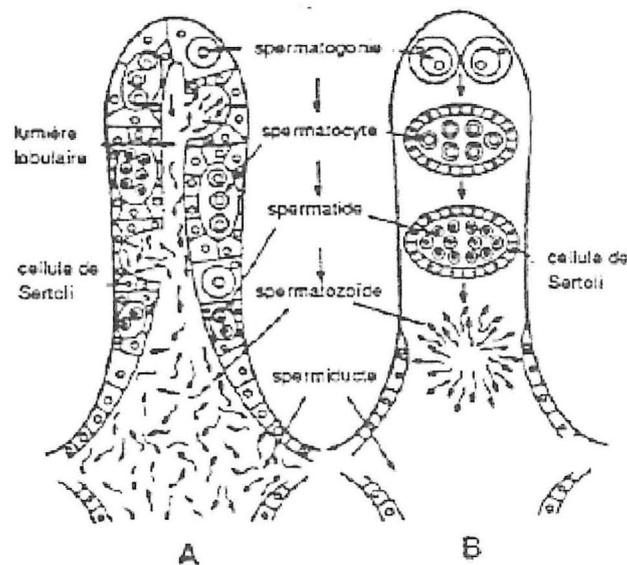


Figure 3. Structure du testicule chez les Téléostéens (A : type lobulaire, B : type tubulaire) (d'après Tomasini, 2005).

1.2 LES GONADES (cours de Tomasini, 2005)

1.2.1 Les testicules

Chez la majorité des Poissons, on trouve une paire de testicules suspendus au plafond de la cavité abdominale par un méso : le mésorchium. Les testicules ont, en général, une forme allongée et une section ovale à triangulaire, et leur surface a un aspect lisse. Cet aspect cependant varie avec l'âge et la période du cycle sexuel. Durant la reproduction, lorsqu'ils sont à maturité, ils peuvent occuper toute la cavité abdominale. Les testicules droit et gauche présentent souvent des différences de poids et de taille. Dans certains cas ils rentrent en contact dans leur partie terminale ou fusionnent pour prendre une forme en Y (*Perca*, *Cyprinus*). Parfois même, il ne subsiste plus qu'un seul testicule (par exemple *Notopterus notopterus* ne possède plus que le testicule gauche).

Chez les Poissons, la structure testiculaire est très variable selon les espèces, mais on reconnaît deux types différents selon la différenciation du tissu germinal :

- le type lobulaire, typique de la plupart des Poissons.
- le type tubulaire qui se réduit au groupe des Athériniformes.

Dans le **type lobulaire** (figure 3A) le testicule se compose de nombreux lobules séparés les uns des autres par une fine assise de tissu conjonctif fibreux, l'arrangement des lobules variant considérablement selon les espèces. Au niveau du lobule, on trouve des cystes formés par des cellules germinales entourées de quelques cellules somatiques nourricières (cellules de Sertoli). Au départ, chaque cyste contient une spermatogonie primaire qui se divise et donne successivement des spermatogonies, spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes (figure 1). Durant cette maturation toutes les cellules germinales d'un même cyste sont à peu près au même stade. En fin de spermatogenèse, le cyste se rompt et libère les spermatozoïdes dans la lumière lobulaire en continuité avec le spermiducte.

Dans le **type tubulaire** (figure 3B) il y a de nombreux tubules, régulièrement orientés entre la tunique externe du testicule, côté correspondant au bout aveugle du tubule, et une cavité centrale où sont libérés les spermatozoïdes. Les spermatogonies primaires ne se trouvent qu'à l'extrémité aveugle des tubules. Au fur et à mesure que se déroule la spermatogenèse les cystes se déplacent vers le centre du testicule en direction du canal déférent. Il n'existe pas dans le type tubulaire d'équivalent de la lumière lobulaire.

Entre les lobules et les tubules, se trouvent des cellules interstitielles, des cellules de Leydig, des fibroblastes, des vaisseaux sanguins et lymphatiques.

I.2.2 Les ovaires

Chez la plupart des Poissons, ils se présentent, en général comme une paire de sacs allongés, de section circulaire, suspendu chacun au plafond de la cavité abdominale par un méso : le mesovarium. Chez certaines espèces, les deux ovaires fusionnent au cours de leur développement pour ne former qu'un seul organe. L'aspect des ovaires, comme celui des testicules, est très variable selon la période du cycle de reproduction. Ayant la forme de deux cordons filiformes en période de repos sexuel, ils augmentent énormément de volume durant la période de reproduction, pour occuper presque la totalité de la cavité abdominale. Ils prennent alors une coloration jaune à orangé et leur surface a un aspect granuleux.

Chez la majorité des Poissons, l'ovaire est de type creux. La cavité ovarienne et l'oviducte qui la prolonge se forment de façon tout à fait particulière chez les Poissons :

Dans le **type parovarien** l'ébauche ovarienne vient se souder à la paroi de la cavité abdominale, ou un feuillet d'épithélium coelomique croît sur un côté de l'ébauche ovarienne.

Dans le **type entovarien** l'ébauche ovarienne se redéploie sur elle-même. Le conduit intraovarien ainsi formé s'accroît vers l'arrière et établit une liaison avec l'extérieur.

Les ovaires sont limités par une paroi conjonctivo-musculaire d'où se détachent des lamelles ovariennes (ou lamelles ovifères, ou septa) dont les axes longitudinaux sont parallèles à celui de l'ovaire et qui sont orientés vers la cavité ovarienne (figure 4). Suivant le stade de maturité et l'âge, le nombre de lamelles est plus ou moins élevé. Ces lamelles sont remplies d'ovogonies ou de cellules sexuelles à divers stades de l'ovogenèse (figure 5). Chacune de ces cellules évolue à l'intérieur d'un follicule (figure 6). Très tôt au cours de l'ovogenèse, chacune d'elles s'entoure d'une assise de cellules folliculaires qui se multiplient pour former la granulosa. Simultanément, les éléments du tissu connectif environnant s'organisent pour former une thèque séparée de la granulosa par une lame basale. La thèque contient des fibroblastes, des fibres de collagène, des capillaires et, chez certaines espèces, des cellules thécales spéciales productrices de stéroïdes (figure 7)

Suivant le mode développement des ovocytes, on distingue trois types d'ovaires :

- **l'ovaire à synchronisme total**, dans lequel les ovocytes ont un développement synchrone et, à un moment donné, tous les ovocytes de l'ovaire sont à peu près au même stade. Ce type concerne les Poissons qui ne pondent qu'une seule fois dans leur vie puis meurent.

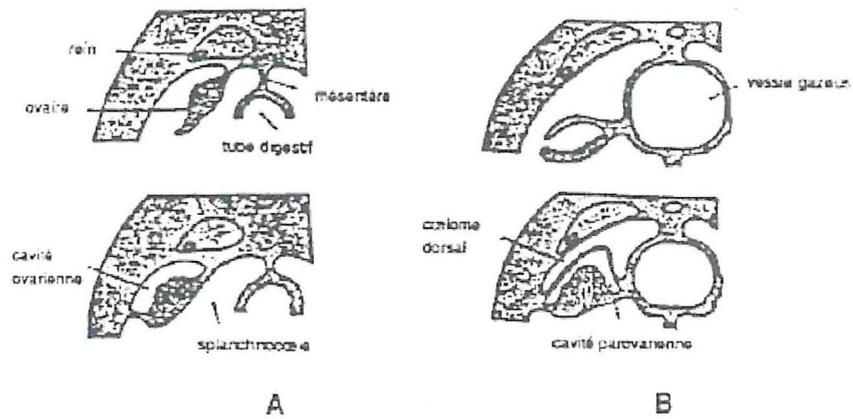


Figure 4. Différents types de développement des ovaires (A, B : types parovariens, C : type entovarien) (d'après Tomasini, 2005).

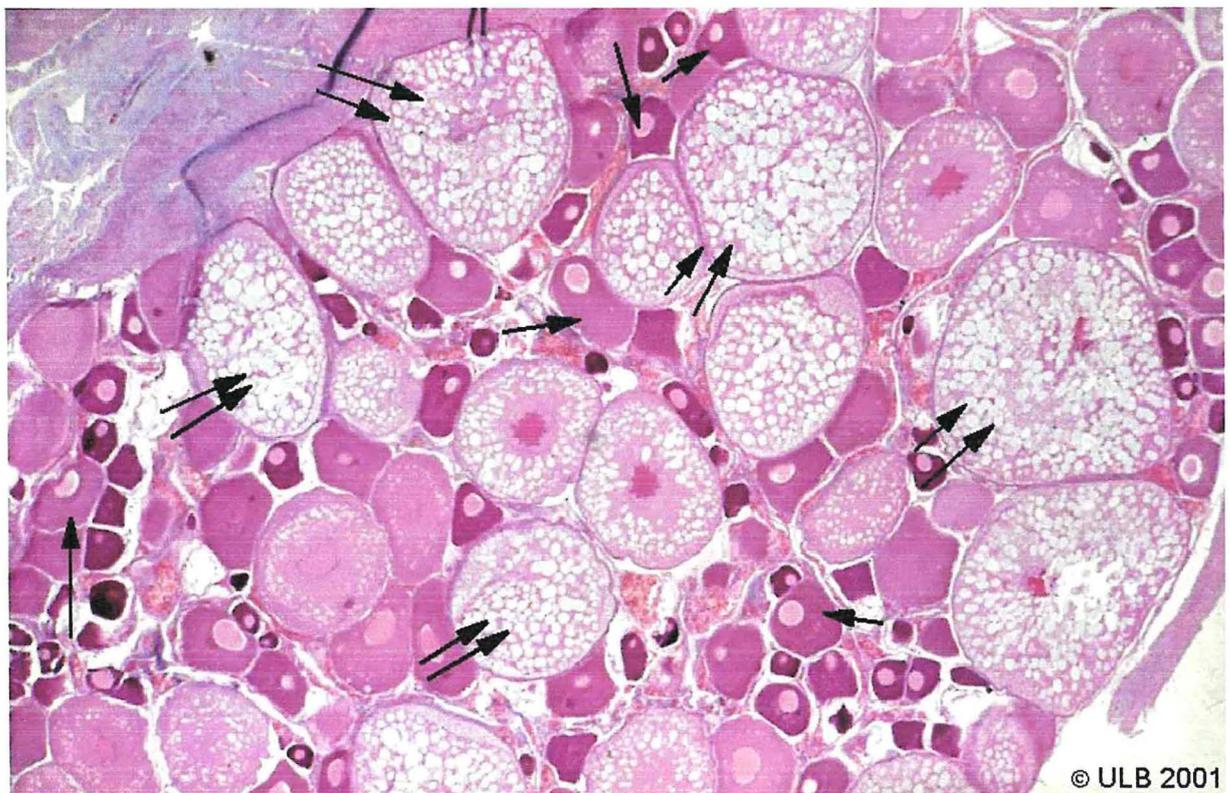


Figure 5. Ovaire de poisson : vue générale associant plusieurs ovocytes à un stade prévitellogène (flèches simples) et des ovocytes de plus grande taille chargés de vitellus (flèches doubles) (source web).

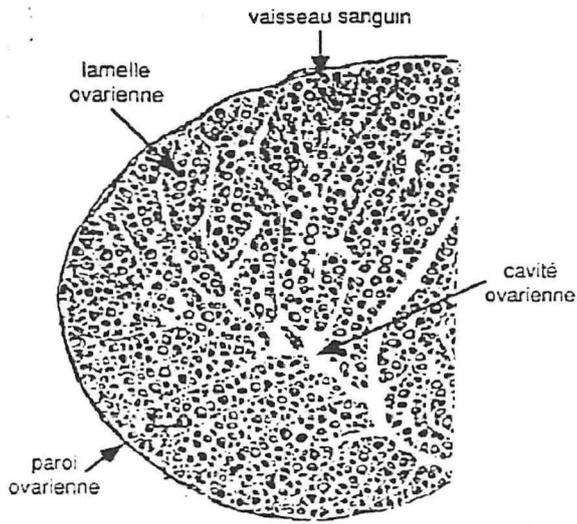


Figure 6. Coupe d'ovaire de Téléostéen (d'après Tomasini, 2005).

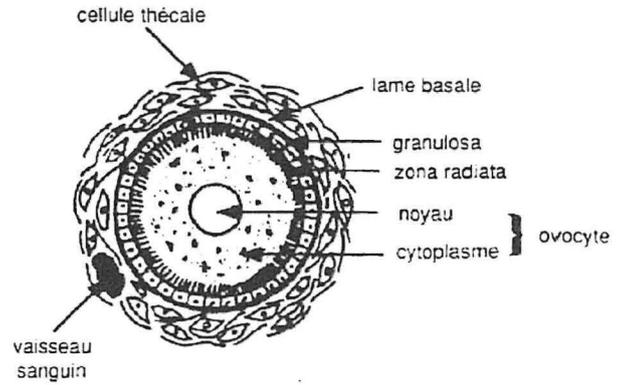


Figure 7. Schéma de follicule ovarien (d'après Tomasini, 2005).

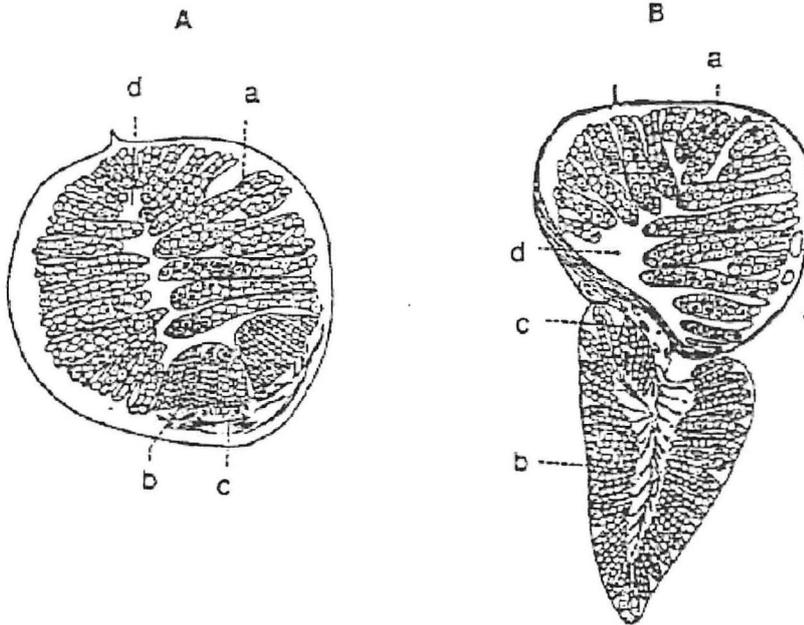


Figure 8. Ovotestis de Serranidé (A) et de Sparidé (B)
 a : lamelles ovariennes
 b : lobe testiculaire
 c : canal déférent
 d : cavité gonadique
 (d'après Tomasini, 2005).

- **l'ovaire à synchronisme par groupe**, dans lequel on trouve deux groupes d'ovocytes à des stades de développement différents dans l'ovaire. Les uns sont plus ou moins mûrs et seront pondus au cours de la saison de reproduction, les autres constituent un stock d'ovocytes immatures qui seront pondus à la saison suivante. Ce type d'ovaire se rencontre chez les Poissons qui pondent plusieurs fois au cours de leur vie, mais une seule fois par saison de ponte, habituellement courte. En fait, dans les ovaires présentant deux lots d'ovocytes, on ne peut pas affirmer que d'autres lots n'apparaîtront pas et ne mûriront pas après la ponte du premier lot.

- **l'ovaire asynchrone**, qui contient, à un moment donné, des lots de cellules sexuelles à des stades de développement différents. On trouve ce type chez les Poissons qui pondent plusieurs fois au cours d'une saison de ponte habituellement étalée dans le temps.

1.3 L'HERMAPHRODISME (cours de Tomasini, 2005)

Bien que la majorité des Poissons soient gonochoriques, il existe de nombreux cas d'hermaphrodisme. Celui-ci se caractérise par la présence conjointe, chez un même individu, de tissu ovarien et testiculaire (figure 8). Il faut distinguer plusieurs modalités :

- **l'ambisexualité ou hermaphrodisme juvénile** : les jeunes individus possèdent à la fois des ovocytes et des spermatozoïdes mais cet hermaphrodisme non fonctionnel disparaît avec l'âge, l'un des deux sexes accélérant son développement et l'emportant sur l'autre en entraînant sa déchéance. C'est le cas par exemple des anguilles.

- **l'hermaphrodisme successif** : il y a intervention simultanée ou successive des tissus ovariens et testiculaires. L'hermaphrodisme successif peut être protérogyne (d'abord femelle puis mâle), comme chez les Labridés (loups), certains Sparidés et certains Scaridés (poissons-perroquets), ou protandre (poisson d'abord mâle puis femelle), comme chez les Platicéphalidés et certains Sparidés (daurades, pageots).

- **l'hermaphrodisme potentiel** : il dérive de l'hermaphrodisme successif. L'un des territoires sexuels reste rudimentaire et latent durant toute la vie de l'animal qui est donc gonochorique (chez certains Serranidés et Sparidés). Cependant une inversion sexuelle peut se produire à tout moment. Ce phénomène a pu notamment être observé chez les individus âgés de nombreux Poissons.

Les modalités de l'hermaphrodisme sont nombreuses et complexes. Par exemple, des espèces protandres peuvent présenter des femelles primaires et des espèces protérogynes, des mâles primaires.

1.4 LE CYCLE SEXUEL (cours de Tomasini, 2005)

La reproduction des Poissons est un phénomène cyclique. Pour en définir les diverses phases, plusieurs méthodes existent.

L'observation microscopique consiste à suivre l'évolution des cellules sexuelles au cours de la gamétogenèse. Son inconvénient est d'être longue et astreignante. Plusieurs critères sont utilisés pour mettre en évidence les différentes étapes de la gamétogenèse, basés sur la taille des cellules, l'importance relative du noyau et du cytoplasme (rapport nucléoplasmique), la quantité et la distribution des diverses inclusions cellulaires (particulièrement du matériel vitellin, dans le cas de l'ovogenèse). De nombreuses échelles de maturité ont été proposées, notamment celles de Wood, Bennett *et al.*, James, Lal, ou Srivastava et Bathi. Elles tiennent souvent compte de la spécificité des espèces à partir desquelles elles ont été établies, et présentent un certain nombre de stades (6 à 8 en général).

L'observation macroscopique : au cours du cycle sexuel, les gonades prennent des aspects divers (gonades immatures, en voie de maturation, matures, lors de la ponte, en post-ponte, au repos) que l'on peut facilement appréhender macroscopiquement. Dans ce cas aussi diverses échelles ont été établies en se basant sur l'observation macroscopique des gonades et sur les critères suivants : coloration, consistance, importance de la vascularisation superficielle, épaisseur et transparence de la paroi gonadique, forme, volume occupé par la gonade dans la cavité abdominale, émission plus ou moins facile des produits sexuels par pression sur les gonades, ovocytes plus ou moins visibles à travers la paroi ovarienne (chez les femelles).

Les critères pondéraux : l'accroissement pondéral des gonades est suivi durant le cycle sexuel. Pour cela on définit un rapport gonadosomatique (RGS) dont il existe plusieurs expressions différentes :

$$\begin{array}{ll} \text{RGS} = 100 \text{ MG} / \text{M} & \text{MG} = \text{masse des gonades} ; \text{M} = \text{masse totale du poisson} \\ \text{RGS} = 100 \text{ MG} / (\text{M} - \text{MG}) & \text{M} - \text{MG} = \text{masse somatique du poisson} \\ \text{RGS} = 10^n \text{ MG} / \text{aL}^b & \text{W} = \text{aL}^b = \text{relation masse - longueur} \\ \text{RGS} = 10^n \text{ MG} / \text{L}^3 & \text{L} = \text{longueur du poisson} \end{array}$$

1.5 LE DIMORPHISME SEXUEL (cours de Tomasini, 2005)

Chez de nombreux Poissons, des caractères sexuels primaires et secondaires permettent de distinguer les mâles des femelles. Certains de ces caractères peuvent être permanents ou temporaires et, dans ce dernier cas ils apparaissent en période de reproduction.

Parmi les caractères secondaires, la différence de taille entre mâles et femelles est un caractère non négligeable pour l'élevage de poissons.

I.6 LE CONTROLE NEURO-ENDOCRINIEN DE LA GAMETOGENESE : L'AXE HYPOTHALAMUS-HYPOPHYSE-GONADE (Barnabé, 1991)

La réception de stimuli environnementaux tels que la photopériode, la température et les précipitations se fait au niveau du système nerveux en particulier au niveau de l'hypothalamus. Ce dernier contient les corps cellulaires de neurones dont les fibres axonales se prolongent dans la neurohypophyse puis dans l'adénohypophyse (figure 9). Ces cellules sont appelées cellules neurosécrétrices, elles répondent à un signal électrique provenant du cerveau en libérant un messenger chimique à la terminaison de l'axone, assurant ainsi le passage entre l'information neurale et hormonale. Ce messenger chimique est une hormone libérante (RH : "releasing hormone"), la GnRH, qui va stimuler la production de gonadotrophine (GtH) ou hormone gonadotrope par l'hypophyse.

Il faut noter que la production de GnRH est naturellement inhibée par la dopamine.

Il existe deux principaux types de gonadotrophine produites par l'hypophyse : GtHI qui est analogue à l'hormone folliculo-stimulante des Mammifères (FSH) et est sécrétée pendant tout le cycle sexuel (avec une augmentation au début et à la fin du cycle ; GtHII qui est analogue à l'hormone lutéinisante des Mammifères (LH) et est produite principalement à la fin du cycle. Ces hormones vont être transportées par l'appareil circulatoire et agir sur certains tissus qui participent à l'élaboration directe ou indirecte des produits sexuels. C'est le cas de la gonade dont le tissu somatique sécrète des stéroïdes sexuels. Ces androgènes (11 céto-testostérone et testostérone, précurseurs des oestrogènes), oestrogènes (oestradiol) et progestérones (17 α hydroxyprogestérone et 20 β déhydroprogestérone) agissent directement sur les gonades mais sont également capables de rétro-action ("feed-back") sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (figure 10).

II. INTERETS DE LA STERILITE GONADIQUE EN AQUACULTURE

II.1 SUPPRESSION DE LA MATURITE SEXUELLE

La fonction de reproduction influence fortement la croissance corporelle (Fontaine, Le Bail, 2004). Dans un premier temps, lorsque le cycle reproducteur démarre, la gonade se développe lentement (du stade prévitellogénèse jusqu'au début de la vitellogénèse exogène). Parallèlement on observe souvent, comparé à des individus immatures, une accélération de la croissance corporelle et une accumulation de graisses périviscérales et musculaires.

Dans un deuxième temps, la vitellogénèse exogène étant très active, la gonade croît fortement jusqu'à la ponte.

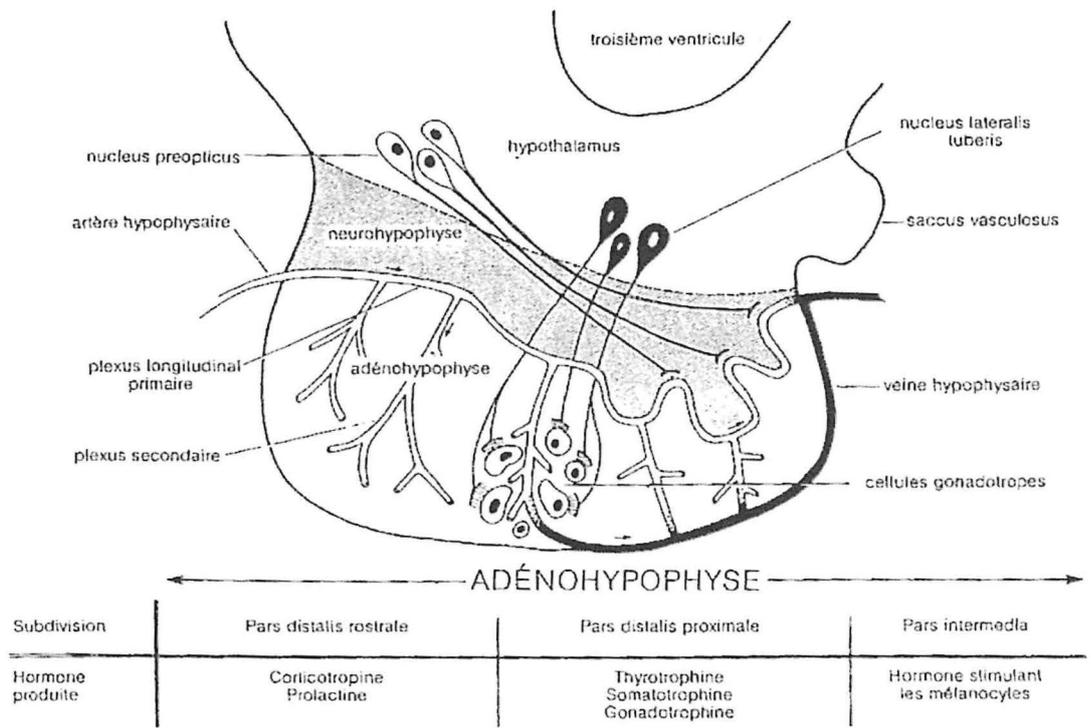


Figure 9. Schéma de l'adénohypophyse (d'après Harvey et Hoar, 1980).

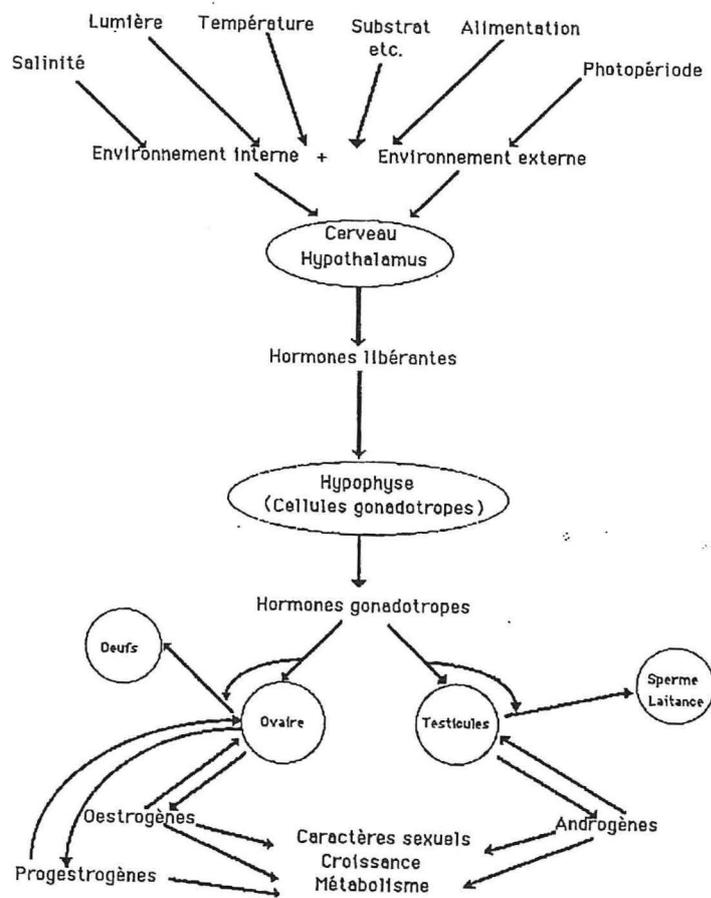


Figure 10. Axe hypothalamus-hypophyse-gonade (d'après Barnabé, 1991).

Ce phénomène s'accompagne d'un arrêt ou d'un ralentissement de la croissance corporelle, voire une baisse du poids corporel, souvent imputable à une diminution ou à un arrêt de la prise alimentaire, soit avant la période de reproduction (Salmonidés), soit durant la période d'incubation des œufs (Cichlidés, Ariidés,...).

Ces variations de croissance corporelle s'expliquent par deux facteurs. D'une part la croissance est stimulée par certaines hormones anabolisantes (stéroïdes sexuels à faible concentration, thyroxine, hormone de croissance) durant la première phase de la gamétogenèse (Le Gac *et al.*, 1993). D'autre part, le ralentissement de la croissance corporelle durant la seconde phase de la gamétogenèse est causé par la réorientation massive de l'énergie absorbée (ou stockée) vers le développement des gonades (constitution des réserves vitellines chez la femelle ou du sperme chez le mâle) associée à un effet inhibiteur des concentrations élevées des stéroïdes sexuels (Le Bail, 1988, Toguyeni *et al.*, 1996, Tacon *et al.*, 2000, Massou *et al.*, 2004).

Ces mécanismes expliquent en partie le fait qu'on puisse observer des différences de croissance entre les sexes (en faveur des mâles chez le tilapia, l'atipa, le mullet, en faveur des femelles chez la truite, l'alose, le barbeau ou la perche). En effet, lorsque pour l'un des deux sexes le cycle reproducteur démarre plus tôt (1 à 2 ans pour de nombreuses espèces), il en résulte un différentiel de croissance corporelle, souvent négatif, avec une maturation plus tardive pour l'autre sexe.

Il faut noter cependant que l'entrée en puberté est plus fonction de la taille de l'animal que de son âge (Le Bail, 1988). Chez les Salmonidés, c'est au moment où les individus atteignent entre le quart et le tiers du poids maximal de l'espèce ou de la population étudiée qu'ils débutent leur puberté, les populations à croissance corporelle rapide ayant une maturité plus précoce.

La maturation sexuelle est également souvent associée à une plus grande fragilité des animaux voire même à une mortalité inévitable dans le cas des Salmonidés du genre *Oncorhynchus* (Susuki et Fukuda, 1973).

L'élevage d'individus stériles permet donc d'éviter les ralentissements de croissance corporelle et la dégradation de la qualité de la chair due à la perte des lipides musculaires et, par la même occasion, d'augmenter la rentabilité économique dans les systèmes. Cela permet en outre de contrôler les populations d'espèces prolifiques telles que le tilapia, afin d'éviter les surdensités dans les bassins d'élevage.

II.2 PRESERVATION DE LA BIODIVERSITE

L'élevage (dans un but scientifique ou commercial) de poissons transgéniques (ou hybrides) présente un danger réel pour l'environnement. En effet, il existe des risques de contamination génétique par passages accidentels de ces poissons (notamment des alevins) dans le milieu naturel (Breton et Prunet) :

- par les systèmes hors-sol découverts, en cas d'absence de barrière physique en sortie de l'élevage et de rejets d'effluents non traités à la rivière ;
- par la prédation des oiseaux qui laissent échapper leur proie ;
- par les élevages en systèmes semi-naturels propices aux fuites ;
- par leur utilisation en aquaculture car les installations piscicoles n'offrent presque aucune garantie contre les risques d'échappement et sont soumises à des paramètres incontrôlables (souvent d'origine climatique comme les crues, tempêtes,...)

En outre, la plupart des espèces utilisées en aquaculture ont une fécondité élevée : de quelques centaines d'œufs par kilogramme chez le tilapia, à 1 500-2 000 œufs/kg chez les Salmonidés et à quelques centaines de milliers chez la carpe et la plupart des espèces marines. Cela représente donc un très fort potentiel de dissémination. Parallèlement, des hybrides féconds peuvent être obtenus par hybridation interspécifique, au sein d'une même famille.

Par ailleurs, Muir et Howard (1999) ont mis en évidence que la libération d'un seul poisson transgénique au sein d'une population composée d'individus normaux peut anéantir cette population en quelques générations : c'est ce qu'ils ont appelé le gène de Troie. En effet les deux chercheurs ont modifié génétiquement un petit poisson d'aquarium, *Oryzias latipes* (le medaka du Japon) en y insérant le gène d'une hormone de croissance. Ils ont obtenu des poissons plus gros, qui grossissent et atteignent leur maturité sexuelle plus vite et pondent plus d'œufs que les autres.

Malheureusement, la modification génétique réduit la viabilité de ces poissons, phénomène qui a aussi été observé chez les saumons transgéniques expérimentaux. En fait les deux tiers seulement des medakas atteignent l'âge adulte. De plus, ceux qui l'atteignent transmettent très rapidement leurs gènes puisqu'ils fournissent un grand nombre d'œufs et sont des partenaires sexuels très recherchés du fait de leur grosseur.

Par conséquent, au bout de quelques générations, presque toute la population est porteuse du gène modifié. Chaque génération perd donc le tiers de ses individus avant d'atteindre l'âge adulte. Des simulations faites par ordinateur par les deux chercheurs démontrent qu'à long terme, la population décline et finit par disparaître. En libérant 60 poissons transgéniques parmi 60 000 individus, le groupe entier disparaît en 40 générations. Un seul poisson modifié suffit à anéantir le groupe, si on lui laisse assez de temps.

III. TECHNIQUES ACTUELLES DE STERILISATION

III.1 STERILISATION PAR LES HORMONES STEROÏDES

Chez les Poissons, la morphogenèse des gonades a lieu le plus souvent au cours des premiers jours voire des premières semaines d'alimentation. Il est de ce fait possible d'associer à l'alimentation des alevins certaines hormones stéroïdes (naturelles ou de synthèse) qui vont influencer la différenciation sexuelle et l'orienter dans le sens mâle ou femelle : on parle alors d'hormone "masculinisante" ou "féminisante". Il convient cependant de déterminer précisément pour chaque espèce la dose et la période optimale d'administration, les hormones de synthèse étant actives à des doses plus faibles que les hormones naturelles et le surdosage pouvant parfois être à l'origine de résultats paradoxaux (par exemple une masculinisation par les hormones féminisantes).

L'application de ces traitements a été réalisée sur quelques espèces d'intérêt commercial telles que le Tilapia (Jalabert *et al.*, 1974) et *Onchorynchus mykiss* (Jalabert *et al.*, 1975). Ces traitements ont une efficacité relative comme le montrent les résultats obtenus chez la Truite arc-en-ciel (tableau 1).

Tableau 1 – Proportion des sexes à 2 ans chez les individus ayant reçu une administration d'hormones stéroïdes dans l'aliment entre 0 et 6 mois (Jalabert *et al.*, 1975)

| TYPE | HORMONE FEMINISANTE (OESTRONE, 30 A 120 MG/G D'ALIMENT) | HORMONE MASCULINISANTE (METHYLTESTOSTERONE, 15 A 60 MG /G D'ALIMENT) | TEMOINS |
|---------------|---|--|---------|
| Mâle | 9,9 % | 58,3 % | 52 % |
| Femelle | 54 % | 18,3 % | 48 % |
| Hermaphrodite | 30,5 % | 11,7 % | - |
| Stérile | 5,6 % | 11,7 % | - |

On remarque en particulier que l'administration de ces hormones stéroïdes a conduit à la stérilité d'un nombre non négligeable d'individus (près de 6 % pour ceux traités avec l'oestrone et un peu moins de 12 % pour ceux traités avec la méthyltestostérone).

D'après ces observations, le traitement par hormones stéroïdes, qui, dans un premier temps, peut servir à l'obtention de populations monosexes dans les élevages piscicoles pourrait, par ailleurs, constituer une technique intéressante pour la stérilisation de poissons.

En revanche, l'administration d'hormones stéroïdes peut causer un certain taux de mortalité au cours de l'élevage. Pour une production à grande échelle cette méthode ne se révélerait donc pas rentable. De plus, aux yeux du consommateur un produit issu de traitements hormonaux ne bénéficie pas d'une bonne image, bien qu'aucun résidu du traitement ne soit décelable chez l'adulte du fait de sa précocité et de sa courte durée (Chevassus B. *et al.*, 1979).

En outre, l'utilisation en pisciculture de substances médicamenteuses telles que les androgènes, est régie par différentes directives de la loi française et européenne. En effet, la législation sur les androgènes stipule que leur usage est interdit sur les poissons destinés à la consommation.

La directive 96/22 (modifiée par la directive 2003/74) mentionne dans son article 5 : « *En ce qui concerne les animaux d'aquaculture, les alevins peuvent être traités pendant les trois premiers mois en vue de l'inversion sexuelle par des médicaments vétérinaires à effet androgène, autorisés conformément aux directives 81/851/CEE et 81/852/CEE (abrogées par la directive 2001/82 NdT)* » en précisant bien que ce traitement « *est interdit aux animaux de rente* ».

Au niveau de la législation française, le décret 2003-138 (repris par l'article R234-6 du code rural) précise que « *les médicaments vétérinaires contenant des substances à activité anabolisante, anticatabolisante ou bêta-agoniste ne peuvent être administrés à des espèces dont la chair ou les produits sont destinés à la consommation humaine que dans les conditions suivantes : [...] Les substances à effet androgène, administrées aux alevins de poissons qui ne sont pas destinés à la consommation, pendant les trois premiers mois de leur vie et en vue de l'inversion sexuelle* ».

L'article L-234-2 précise qu' « *il est interdit de mettre sur le marché ou d'introduire sur le territoire métropolitain ou dans les départements d'outre-mer, pour des animaux des espèces dont la chair ou les produits sont destinés à l'alimentation humaine, ou d'administrer à de tels animaux des substances à activité anabolisante, anticatabolisante ou bêta-agoniste. Il est interdit aux personnes ayant la garde de ces animaux de détenir sans justification ces substances.* »

L'utilisation de cette technique afin d'obtenir des individus stériles n'est par conséquent pas idéale d'autant plus que, depuis l'histoire du bœuf aux hormones, l'emploi de toute hormone en production animale a été interdite en Europe (à l'exception des cas où seuls les géniteurs sont traités et non les descendants commercialisés). Toutefois les hormones peuvent être utilisées mais pour des expérimentations sans application commerciale. Cependant dans le reste du monde cette méthode est encore employée.

III.2 STERILISATION PAR AMELIORATION GENETIQUE

III.2.1 Hybridation (interspécifique)

L'hybridation est considérée, au sens large, comme une insémination hétérospécifique (Chevassus, 1983).

Parmi les différents buts de l'hybridation celui qui nous intéresse dans le cas présent est le retard voire l'inhibition de la maturation sexuelle. Cela permettrait d'éviter une baisse de la croissance. Malheureusement les résultats de Susuki et Fukuda (1972) chez les Salmonidés ne sont pas concluants : même parmi les hybrides une baisse de la croissance peut être détectée pendant l'hiver. (Comme la température et l'alimentation étaient constantes, les auteurs supposent que les courtes journées pourraient en être à l'origine.) De même, Lincoln (1981) attestent que la stérilité gamétique des mâles triploïdes hybrides Plie × Flet (*Platichthys flesus*) n'empêche pas l'expression de caractéristiques spécifiques à l'âge mature.

La stérilité des hybrides chez les Poissons n'est pas une règle générale alors qu'elle est très fréquente chez les Mammifères supérieurs. En outre elle peut induire deux types de stérilité : l'une gonadique, l'autre gamétique. Ainsi l'hybride carpe commune ♀ (*Cyprinus carpio*) × carpe argentée ♂ (*Hypophthalmichthys molitrix*) donne des descendants viables et fertiles, tous de sexe femelle ou hermaphrodite. Cependant les gamètes collectés sont fréquemment d'aspect anormal et en quantité insuffisante (les spermatozoïdes sont rares, parfois aflagellés, les œufs sont de taille très variable). Ils ne conduisent donc à aucun développement viable, même en croisement avec l'une des espèces parentales.

Une absence de gonades peut par contre être observée chez certains hybrides de Salmonidés (Susuki et Fukuda, 1973) (figure 11). Celle-ci permet, surtout chez les femelles, une augmentation de l'indice de carcasse (tableau 2). Ces hybrides doivent cependant présenter une viabilité et une croissance voisine de celle des espèces parentales pour être économiquement exploitables (Chevassus, 1979)

III.2.2 Manipulation chromosomique : triploïdisation (Breton et al., 1996)

La triploïdie est une modification du stock chromosomique. Cette modification peut être d'origine naturelle puisque des individus triploïdes (et tétraploïdes) sont parfois observés dans les populations majoritairement diploïdes de Poissons.

Ce sont d'anciens travaux sur les Amphibiens qui ont montré la possibilité d'obtenir des individus triploïdes par des interventions simples sur les gamètes ou sur les œufs fécondés, et qui ont permis d'utiliser cette technique chez les poissons d'élevage. Il existe deux voies pour aboutir à un individu triploïde, l'une directe, l'autre indirecte (figure 12).

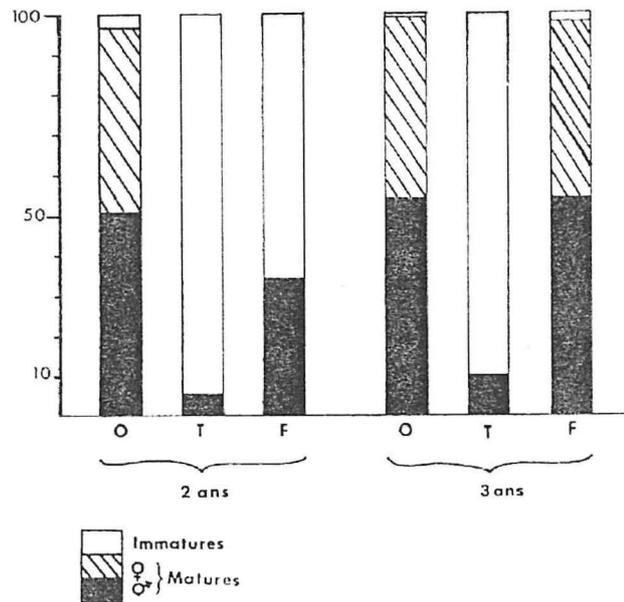


Figure 11. Taux d'animaux matures à 2 et 3 ans chez les hybrides "Tiger" comparativement aux espèces parentales (d'après Suzuki et Fukuda, 1973).
O : Omble de fontaine, T : Tiger, F : Truite fario

Tableau 2. Indice de carcasse (poids du corps éviscéré / poids total) chez les hybrides Tiger et les espèces parentales à 3 ans (d'après Suzuki et Fukuda, 1973)

| Sexe | Groupe | Poids moyen (g) | Poids moyen des gonades (g) | Index de carcasse (%) |
|----------|--------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------|
| Femelles | Ombles de fontaine | 814 | 160 | 76,9 |
| | Tiger | 505 | 0,5 | 93,2 |
| | Truite fario | 435 | 76 | 79,5 |
| Mâles | Ombles de fontaine | 864 | 19 | 92,8 |
| | Tiger | 509 | 3,5 | 93,5 |
| | Truite fario | 490 | 13 | 94,0 |

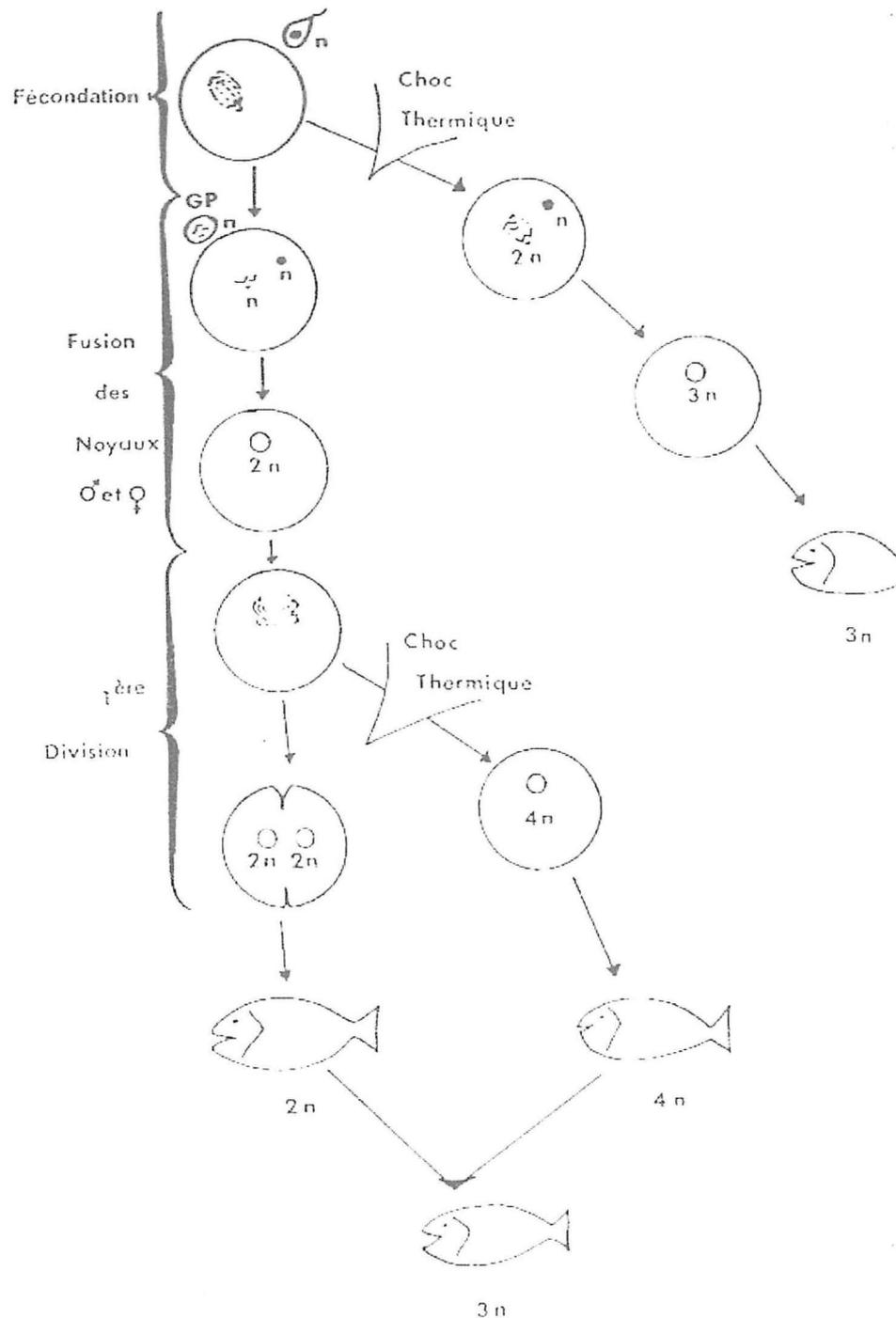


Figure 12. Induction de la triploïdie chez les Poissons

L'application d'un choc thermique (ou d'un traitement chimique approprié) immédiatement après la fécondation ou avant la première division peut permettre d'obtenir soit des triploïdes soit des tétraploïdes (GP : globule polaire, émis par l'ovule après la fécondation et correspondant à l'achèvement de la méiose) (d'après Chevassus *et al.*, 1979).

La voie directe consiste à inhiber la deuxième division de méiose par rétention du second globule polaire. Dans la voie indirecte un croisement est effectué entre un parent diploïde normal et un parent tétraploïde.

La triploïdisation des poissons par voie directe a été réalisée pour la première fois par Swarup, en 1956, chez l'épinoche, à l'aide de la première méthode mentionnée ci-dessus. C'est l'application de chocs froids (0 à 4°C) ou chauds, sur des œufs venant d'être fécondés, qui permet d'empêcher l'expulsion du deuxième globule polaire. Par la suite d'autres expériences ont démontré l'efficacité des traitements froids chez un très grand nombre d'espèces testées. Chez les Salmonidés (en particulier *Onchorhynchus mykiss*) seuls les chocs chauds (24 à 30°C) permettent l'obtention de très bons résultats. Chourrout (1980) a été le premier à atteindre jusqu'à 100 % de triploïdie et de très satisfaisants taux de survie. Depuis, cette technique a été validée chez tous les Salmonidés et chez beaucoup d'autres espèces (Chourrout, 1987 et Ihssen *et al.*, 1990).

Il est également possible de remplacer les chocs thermiques par des chocs de pression, à 500 ou 600 atmosphères pendant quelques minutes. Ce type de chocs semble fournir des rendements plus réguliers et n'induit aucune mortalité contrairement aux chocs thermiques pour lesquels les niveaux thermiques efficaces sont parfois létaux. Cependant le coût élevé de l'appareil à pression demeure un élément dissuasif pour de nombreuses entreprises.

La technique indirecte qui consiste à croiser un individu diploïde avec un individu tétraploïde présente pour sa part des limites. Ainsi, le taux de triploïdisation bien qu'élevé, n'est pas total (95 %) et l'entretien "en routine" d'un stock de géniteurs tétraploïdes est difficile. Cette voie n'apparaît donc pas assez compétitive pour des espèces comme les Salmonidés, chez lesquels les techniques de reproduction artificielle sont suffisamment maîtrisées pour permettre une application facile des traitements d'induction directe de la triploïdie, mais elle pourrait devenir avantageuse dans d'autres cas.

De nombreuses études ont été réalisées pour évaluer les performances des poissons triploïdes obtenus, notamment celles effectuées par Quillet *et al.* (1988) sur les Salmonidés.

La mortalité des triploïdes est plus élevée durant les stades précoces (en partie à cause des effets négatifs des traitements d'induction). A la fin de la période immature, on observe une dépression modérée mais significative de leurs performances de survie et de croissance par rapport à celles des animaux témoins diploïdes. Lors de la maturation sexuelle les triploïdes deviennent supérieurs aux témoins, en survie comme en croissance. En effet, ils sont effectivement stériles puisque inaptes à produire des gamètes, ce qui leur permet d'allouer toutes leurs ressources à la croissance et non à la maturation des gamètes. Cependant, cette stérilité se traduit différemment chez les deux sexes.

Bien que génétiquement stériles, les mâles présentent ainsi un développement plus ou moins accentué du testicule, qui s'accompagne de l'apparition de caractères sexuels secondaires plus ou moins importants avec toutes les conséquences que cela comporte (mortalité, chute de croissance, baisse de la qualité de la chair). Ce phénomène a également été mentionné par Thorgaard (1983). Les femelles, quant à elles, ont une stérilité complète et définitive. La croissance ovarienne est totalement inhibée : on voit ainsi des ovaires de moins d'un gramme sur des animaux de plus d'un kilogramme. Ces femelles triploïdes poursuivent donc leur croissance, sans la baisse de qualité organoleptique liée à la maturation sexuelle.

La triploïdisation ne permet donc d'obtenir tous les avantages de la stérilité que chez des populations monosexes femelles. De plus, l'inhibition de la maturation des gonades est plus ou moins accentuée selon les espèces (Bramick *et al.*, 1995).

La triploïdisation peut être associée à l'hybridation. Appliquée à des hybrides d'espèces appartenant au même taxon, elle permet d'éliminer toute fertilité résiduelle et par la même occasion, les risques d'introggression dans la nature avec des espèces parentes. Une augmentation de la stérilité a par exemple été observée chez des hybrides *Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus* (Na-Nakorn *et al.*, 2004). En outre, cela contribue à l'amélioration de la survie de certains hybrides interspécifiques et intergénériques (Scheerer et Thorgaard, 1987), notamment chez les Salmonidés.

III.2.3 Manipulation génétique : transgénèse

La transgénèse est une technique qui consiste à insérer un gène exogène dans un organisme au stade embryonnaire pour modifier un caractère ou pour l'améliorer. Pour cela on assemble une molécule d'ADN spécifique comportant le gène codant pour la protéine d'intérêt. La molécule est ensuite transférée en un à dix millions d'exemplaires, dans l'embryon, par micro-injection. En réalité, peu de copies seront intégrées dans le génome. Chez les Poissons, l'œuf étant très petit et se divisant très rapidement il est impossible de savoir à quel endroit exactement a été injecté, donc incorporé, le transgène (cytoplasme, périnucléus,...). On obtient donc une expression en mosaïque (répartition hétérogène dans l'embryon).

La transgénèse pourrait permettre d'obtenir des individus stériles en agissant au niveau de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade. Ainsi Hew et Fletcher (2001) ont proposé d'utiliser un gène antisens ou une ribozyme pour dégrader les ARNm de la GnRH ou de la GtH Iβ (gonadotropin Iβ). L'expression de la GnRH sera inactivée de façon réversible.

Uzbekova et son équipe (2000) ont réalisé une expérience, chez la truite, en intégrant un transgène "promoteur spécifique de sGnRH du saumon – antisens de sGnRH". Ils ont observé :

- une baisse du taux d'ARNm et de protéines GnRH, au niveau du cerveau des poissons transgéniques immatures,
- une diminution du taux de protéines GnRH dans l'hypophyse des poissons transgéniques en maturation,
- aucun effet significatif sur le taux de LH et de FSH,
- une maturation asynchrone,
- une maturation dans le temps.

Les poissons obtenus ne sont malheureusement pas stériles.

A ce jour l'obtention d'individus stériles par la transgénèse reste non concluante mais d'autres essais sont en cours.

IV. LA TEMPERATURE : UN NOUVEL OUTIL POUR LA STERILISATION

La température est un facteur clé déjà largement utilisé pour permettre d'orienter le sexe des poissons afin d'obtenir des populations monosexes (Coulibaly, 1990).

Les résultats d'études menées sur les Mammifères et portant sur les conséquences d'une élévation de température dans les gonades ont conduit à des études similaires sur les Poissons. C'est au vu des résultats obtenus chez ces derniers que l'idée l'utilisation de la température a été proposée pour leur stérilisation gonadique.

IV.1 SENSIBILITE DES GONADES DE MAMMIFERES A LA TEMPERATURE

Chez la plupart des Mammifères, les testicules sont toujours maintenus à une température inférieure de 3 à 5°C par rapport à la température de l'abdomen (Mieusset *et al.*, 1995). Cela s'explique par le fait que les processus de spermatogenèse sont très sensibles aux fortes températures. En effet, une exposition des testicules à une température égale ou supérieure à celle du corps ou une cryptorchidie (insuffisance ou anomalie de la migration d'un testicule de l'abdomen vers les bourses) provoquent une augmentation de la mort des cellules germinales. Pour ce qui est des ovaires on n'observe pas d'incidence particulière de l'élévation de la température sur les cellules germinales. Nous allons donc consacrer cette partie à la sensibilité des gonades mâles à la température.

Alors que le nombre de cellules de Sertoli n'est en général pas affecté, le nombre de spermatocytes primaires et de spermatides chute rapidement (Hochereau-de Reviers *et al.*, 1993). Chez de nombreuses espèces telles que le rat, les populations de spermatogonies ne sont pas modifiées immédiatement (Farooqui *et al.*, 1997), permettant à de nouveaux cycles spermatiques de recommencer si une température normale est restaurée dans un temps raisonnable (Karpe *et al.*, 1981).

Les températures élevées sont à l'origine de l'augmentation ou de la diminution de la synthèse d'un bon nombre de protéines. Beaucoup d'activités enzymatiques sont affectées (Hoffmann *et al.*, 1989, Fugisawa *et al.*, 1989) et la composition lipidique des membranes plasmiques est modifiée (Tanigawa *et al.*, 1990). Les profondes modifications des structures cellulaires des spermatocytes primaires et des spermatides génèrent, ou sont une conséquence, d'une apoptose rapide et massive (Shikone *et al.*, 1994, Henricksen *et al.*, 1995, Yin *et al.*, 1997) (figure 13).

On remarque cependant que certains stades de spermatogenèse sont plus sensibles que d'autres. On observe donc une réponse différentielle à l'élévation de température. Ainsi, les spermatogonies et les spermatozoïdes sont les plus résistants alors que les spermatocytes et les spermatides montrent un plus haut degré de sensibilité (Young, 1927, Lu *et al.*, 1999) (figure 14). Ceci pourrait s'expliquer par l'expression sélective des gènes de réponse au stress ("HSPs-chaperones", "DNA repair", "Oxydative stress") pendant la spermatogenèse (Aguilar-Mahecha *et al.*, 2001).

Par ailleurs, l'exposition du testicule à des fortes températures est à l'origine d'une altération de l'expression de la protéine P53, altération qui commence un à deux jours avant le début de la perte de cellules germinales (Socher *et al.*, 1997). Cette protéine P53 est en fait un facteur de transcription qui régule la croissance cellulaire (par un arrêt du cycle cellulaire pour permettre éventuellement la réparation de l'ADN avant la réplication ou la mitose) et induit la mort cellulaire par apoptose (pour éliminer des cellules endommagées et irréparables) ; elle est présente naturellement en forte concentration dans le testicule. La protéine P53 aurait donc un rôle significatif dans la disparition de cellules germinales liée à la température.

Il existe un autre facteur de transcription avec un rôle similaire : HSF1 (heat shock transcription factor). HSF1 n'active pas les gènes "Heat Shock" (Izu *et al.*, 2003) codant pour des protéines de stress, le stress pouvant être d'origine chimique, physique ou métabolique. A la place, HSF1 favorise la mort cellulaire par apoptose des spermatocytes stade pachytène exposés à un stress thermique. Il agit aussi comme un facteur de survie cellulaire des cellules germinales plus immatures, dont probablement les spermatogonies, sans l'activation de gènes "Heat Shock". HSF1 a, par conséquent, deux fonctions opposées dans les cellules germinales. La décision entre la vie et la mort des cellules dépend de la balance entre signaux de survie et signaux de mort (HSF1 étant le médiateur dans chacun des deux types de signal). Les signaux de mort doivent donc dominer les signaux de survie chez les spermatocytes stade pachytène et inversement chez les cellules germinales indifférenciées.

En résumé P53 et HSF1 interviennent dans les mécanismes de contrôle de la qualité de la spermatogenèse.

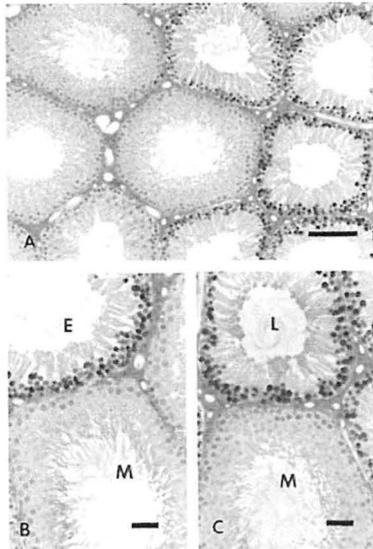


Figure 13. Détection *in situ* de l'apoptose des cellules germinales de rats traités par la chaleur (A-C)
 E : premiers stades de la spermatogenèse, L : stades avancés, M : stades intermédiaires
 Grossissement : A : $\times 290$ (barre d'échelle : 0,07 mm), B et C : $\times 420$ (barre d'échelle : 25 μm)
 (d'après Lue *et al.*, 1999).

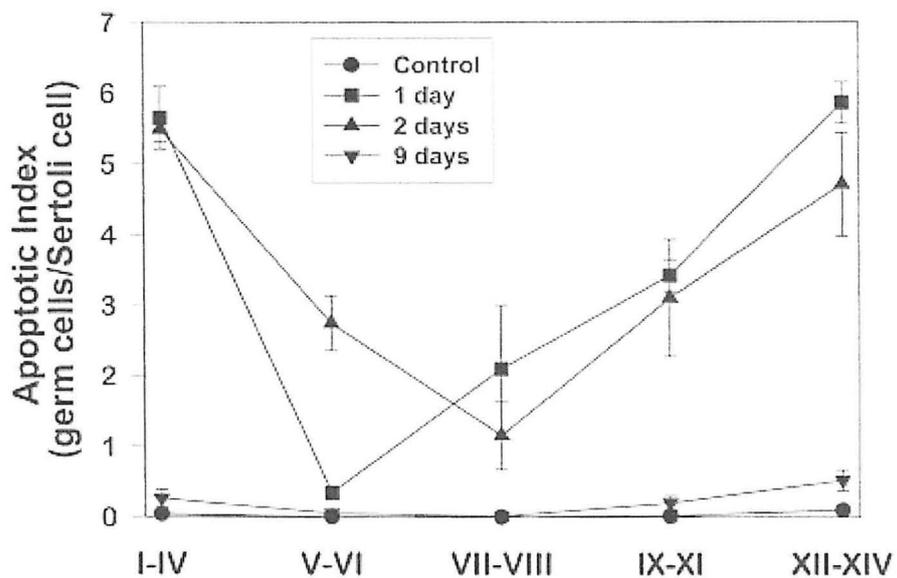


Figure 14. Effet de la chaleur sur l'apoptose des cellules germinales à différents stades du cycle de l'épithélium séminifère.
 L'index apoptotique du contrôle est très bas. Un jour après l'exposition à la chaleur, l'apoptose des cellules germinales est très importante, les stades I-IV et XII-XIV étant les plus affectés. Un effet similaire est observé au deuxième jour. Au neuvième jour, l'incidence de l'apoptose est similaire à celle du contrôle puisque la majorité des cellules apoptotiques ont été phagocytées par les cellules de Sertoli (d'après Lue *et al.*, 1999).

Parmi les protéines dont la synthèse est réduite à des températures élevées on trouve la Cirp ("cold-inducible RNA-binding protein"). Cette protéine, activée in vitro à 32°C (stress froid) dans les cellules somatiques de souris et d'humains, active la suppression de la croissance des cellules en réponse à l'action du froid. Elle est exprimée dans les testicules de souris, plus précisément dans les cellules germinales, et est structurellement similaire à la protéine RBM1, protéine en relation avec le facteur d'azoospermie qui contrôle la spermatogenèse chez l'homme.

Le taux de protéine Cirp varie en fonction du stade de différenciation (Nishiyama *et al.*, 1998) et demeure très élevé dans le noyau des spermatocytes primaires. Son expression est régulée de manière à rester à une faible concentration à des températures élevées, dans les cellules germinales mâles de souris et d'hommes.

Une autre protéine, structurellement très similaire à la protéine Cirp voit son expression réduite lors d'une augmentation de température du testicule (Danno *et al.*, 2000). Il s'agit de la Rbm3 ("RNA binding motif protein 3), qui est, elle aussi, activée par le froid dans les cellules somatiques. La Cirp et la Rbm3 appartiennent à une famille de protéines riches en glycine et pouvant se lier à l'ARN.

Dans les testicules de souris, l'ARNm et la protéine de Rbm3 ont été détectés dans les cellules de Sertoli mais pas dans les cellules germinales (contrairement à la Cirp qui s'exprime dans les cellules germinales). De plus son expression n'a pas été observée dans les cellules de Sertoli de fœtus, mais l'a été dans celles de nouveaux-nés et de souris plus âgées.

Quand les souris ont été exposées par cryptorchidie expérimentale, à un stress à la chaleur, le taux de protéines Rbm3 a diminué dans les cellules de Sertoli (figure 15).

Puisque le lieu d'expression n'est pas le même pour la Cirp et la Rbm3, que leurs cinétiques d'induction sont légèrement différentes et que la Rbm3 ne semble pas activer une suppression de croissance cellulaire lors d'un stress par le froid, cela suggère qu'elles jouent des rôles distincts sous des conditions physiologiques et de stress analogues.

Le développement de cellules de Sertoli matures fonctionnelles ne commence dans le testicule qu'approximativement à l'âge de deux semaines (avant cet âge les cellules présentes étaient des cellules non fonctionnelles). La distribution temporelle de Rbm3 pendant le développement du testicule de souris montre une corrélation avec l'acquisition de la fonction de développement par les cellules de Sertoli.

Les cellules de Sertoli jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de la spermatogenèse. En effet, en plus d'assurer un rôle trophique, c'est à l'intérieur d'elles que sont présentes des protéines dont l'expression est régulée par la température. De plus elles expriment des récepteurs tyrosine kinase, durant le développement postnatal, dont l'absence, causée par une mutation par exemple, conduit à la mort progressive des cellules germinales (Lu *et al.*, 1999).

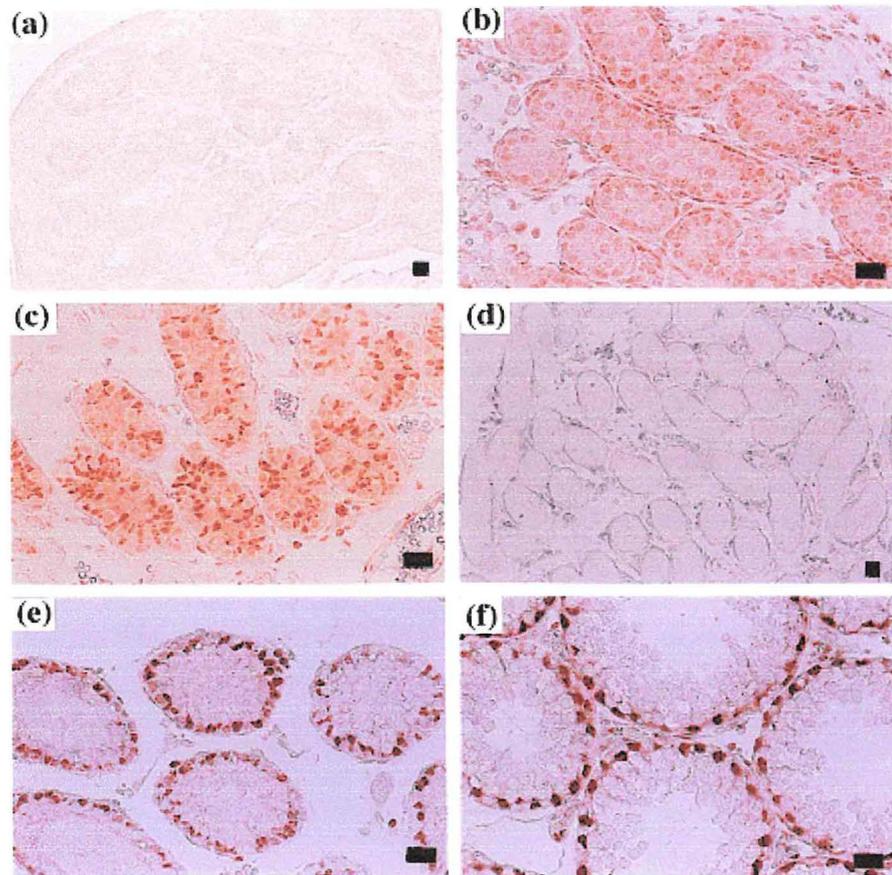


Figure 15. Expression de Rbm3 au cours du développement testiculaire chez la souris : chez un fœtus de 17 jours (a), un nouveau-né (b), un individu âgé de 8 jours (c et d), âgé de 17 jours (e), et de 21 jours (f). Barre d'échelle : 20 μ m (d'après Danno *et al.*, 2000).

Courtens *et al.* (1999) ont montré que l'attachement des cellules de Sertoli aux cellules germinales et l'apport de lactate semblent nécessaires pour le développement des cellules germinales à des températures élevées.

En effet, l'énergie utilisée par le testicule provient en majorité du glucose et la synthèse de la plupart des protéines des cellules germinales est sous le contrôle du métabolisme du glucose.

Des enzymes glycolytiques sont présentes dans les cellules germinales du compartiment adluminal des tubes séminifères. De plus, du glucose est présent en très basse concentration dans le lumen des tubes séminifères. La majeure partie de l'ATP des spermatides est en fait synthétisée par la dégradation de lactate et de pyruvate produits massivement par les cellules de Sertoli (la synthèse de lactate et de pyruvate étant en partie régulée par la FSH et l'insuline). En outre, le lactate est le substrat énergétique préférentiel des spermatozoïdes et des spermatides.

La production d'ATP par les cellules germinales dépend principalement du métabolisme mitochondrial et de l'approvisionnement régulier en "combustible". L'expérience menée sur des rats présentant du cryptorchidisme, a montré que l'addition de lactate exogène limite la perte de cellules germinales pour plusieurs jours et diminue pendant deux semaines le nombre de cellules germinales qui dégénèrent.

Cependant cela ne suffit pas à réduire définitivement leur disparition car cela n'empêche pas les problèmes de dysfonctionnement des cellules de Sertoli. Ainsi, les températures élevées provoquent des vacuoles au niveau du cytoplasme de ces cellules et des anomalies dans les contacts entre celles-ci et les cellules germinales.

Des protéines-récepteurs transmembranaires qui transmettent des signaux apoptotiques pendant l'exposition à la chaleur ont été identifiées dans des testicules de souris (Lee *et al.*, 1999). Ce système de protéines composé de Fas-L et de Fas, qui sont exprimées respectivement par les cellules de Sertoli et les cellules germinales, est un régulateur essentiel de l'activation de la mort des cellules germinales. De plus, le taux de Fas augmente avec la chaleur, démontrant ainsi que les cellules germinales ont un plus forte probabilité d'être affectées que les cellules de Sertoli.

IV.2 SENSIBILITE DES GONADES DE POISSONS A LA TEMPERATURE

Chez les Poissons les gonades sont sensibles aussi à la température. En effet on sait déjà qu'une élévation de température peut orienter le sexe-ratio vers l'un ou l'autre sexe. Lors de leurs travaux sur ce phénomène, il a été également mis en évidence qu'une exposition prolongée à une température élevée (29°C) pendant la différenciation sexuelle des gonades a conduit à une déficience en cellules germinales chez certains Poissons (Strüssmann *et al.*, 1997). D'autres études ont suivi, notamment l'induction expérimentale de la disparition des cellules germinales chez des larves et des juvéniles des deux sexes, par exposition à de fortes températures, au début de la gonadogenèse (Strüssmann *et al.*, 1998).

Les résultats obtenus (figures 16 et 17) montrent que la déficience en cellules germinales observée est due à une perte réelle de cellules germinales et pas simplement à une différenciation sexuelle retardée. Les cellules germinales de Poissons sont donc bien sensibles à la température. De plus, la mort de celles-ci peut se produire à des températures bien plus basses que celle relevées dans les expériences sur les testicules de Mammifères. En fait il se pourrait que cette sensibilité à la température soit une caractéristique commune parmi les Vertébrés, bien qu'à des seuils de température différents. Cette étude a également mis en évidence que les cellules germinales de l'ovaire en développement des Poissons, contrairement à celui des Mammifères, sont aussi sensibles à la chaleur que celles du testicule en développement.

Le fait que les gonades à déficience bilatérale en cellules germinales apparaissent structurellement intactes, à l'exception de la disparition des cellules germinales, et que les cellules germinales aient disparu chez les mâles et les femelles, semble indiquer que la mort de ces cellules est indépendante de la mort des cellules de soutien (par exemple les cellules de Leydig et de Sertoli chez le mâle, les cellules folliculaires chez la femelle).

En outre, certains ovaires sont complètement dépourvus d'ovogonies et d'ovocytes jusqu'au stade pachytène mais ont de gros ovocytes au stade diplotène. Il semble ainsi qu'il existe pour la dégénération des cellules germinales par la température un stade seuil, proche de ces deux stades, au moins chez les femelles.

Enfin, lors de cette expérience, une variation cellulaire et individuelle dans la sensibilité à la chaleur a été mise en évidence mais son origine n'a pas été élucidée.

En ce qui concerne les dynamiques et les mécanismes de disparition des cellules germinales il a été montré que les cellules germinales commencent à mourir peu de temps après le début de l'exposition à la chaleur (Ito *et al.*, 2002).

Le transfert à 29°C, en général, a entraîné immédiatement une apparition ou une augmentation du nombre de cellules histologiquement anormales (Ito *et al.*, 2003). Ces cellules germinales anormales ont un noyau pycnotique ou éosinophile et un cytoplasme souvent éosinophile. Ces caractéristiques ne suffisent pas à déterminer les mécanismes de dégénération mais sont toutefois compatibles avec l'apoptose ou la mort cellulaire programmée.

La perte complète des cellules germinales n'a été observée que chez les individus exposés à la température pour des périodes de 8 à 12 semaines mais aucun traitement n'a produit 100 % de poissons stériles.

Après avoir appliqué une diminution de température, les cellules germinales restantes ont proliféré et se sont développées chez les mâles comme chez les femelles. Ceci indique que les autres cellules (cellules de Sertoli et de Leydig pour les mâles, et les cellules folliculaires pour les femelles), qui forment la base somatique et régulent le développement des cellules germinales, sont très peu ou pas affectées par la chaleur.

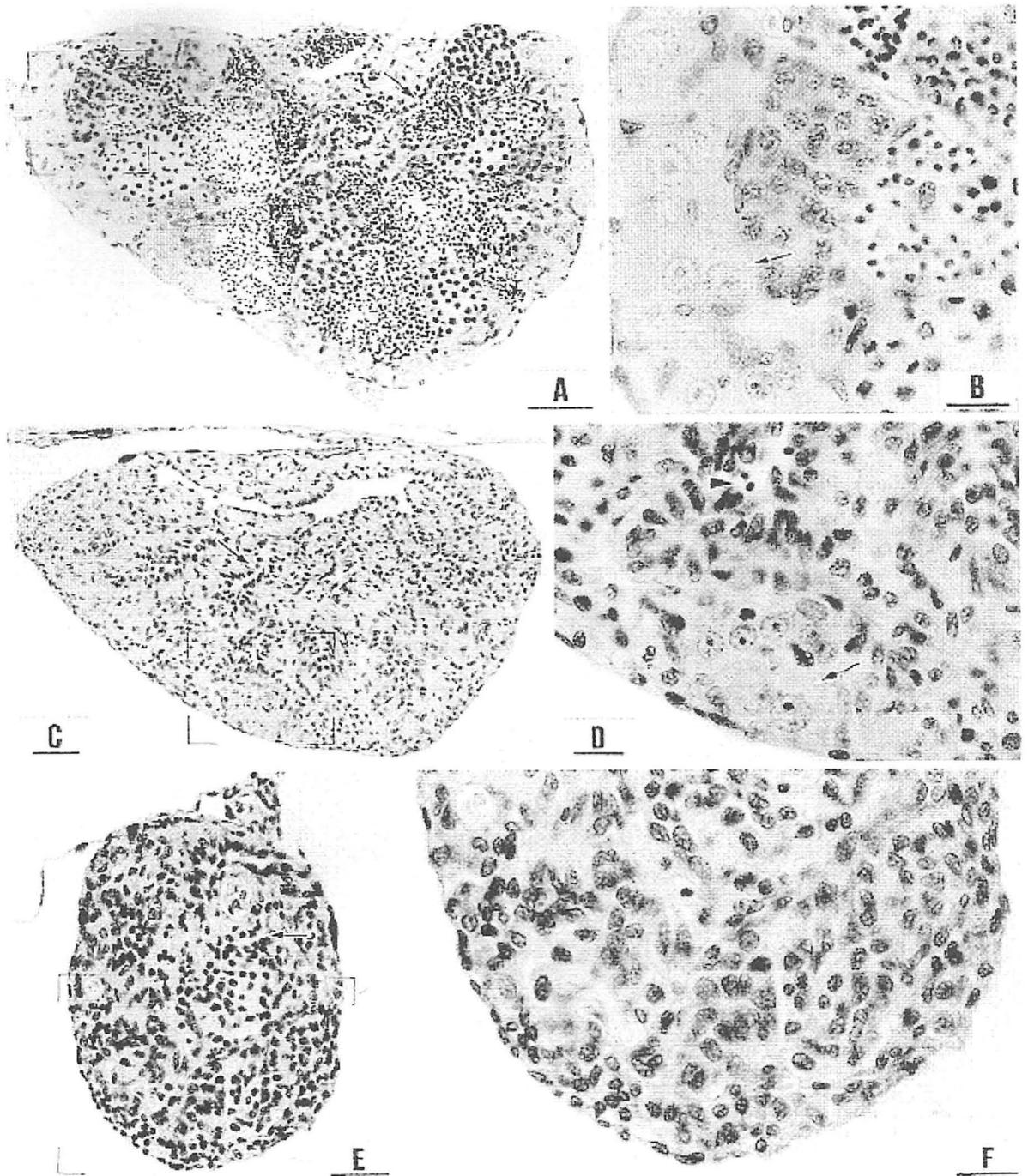


Figure 16. Aspect histologique de testicule normal (A, B), partiellement (C, D), et complètement (E, F) déficient en cellules germinales (*Odonthestes bonariensis*). Les photos de droite sont des détails des photos de gauche. Les flèches indiquent le lumen en A, C et E et les cystes de cellules germinales en B et D. Des spermatozoïdes sont présents en D (tête de flèche), cela indique que la spermatogenèse se déroule dans un cyste voisin
 Les barres représentent 10 μm en B, D et F, 20 μm en E et 30 μm en A et C
 (d'après Strüssmann *et al.*, 1998).

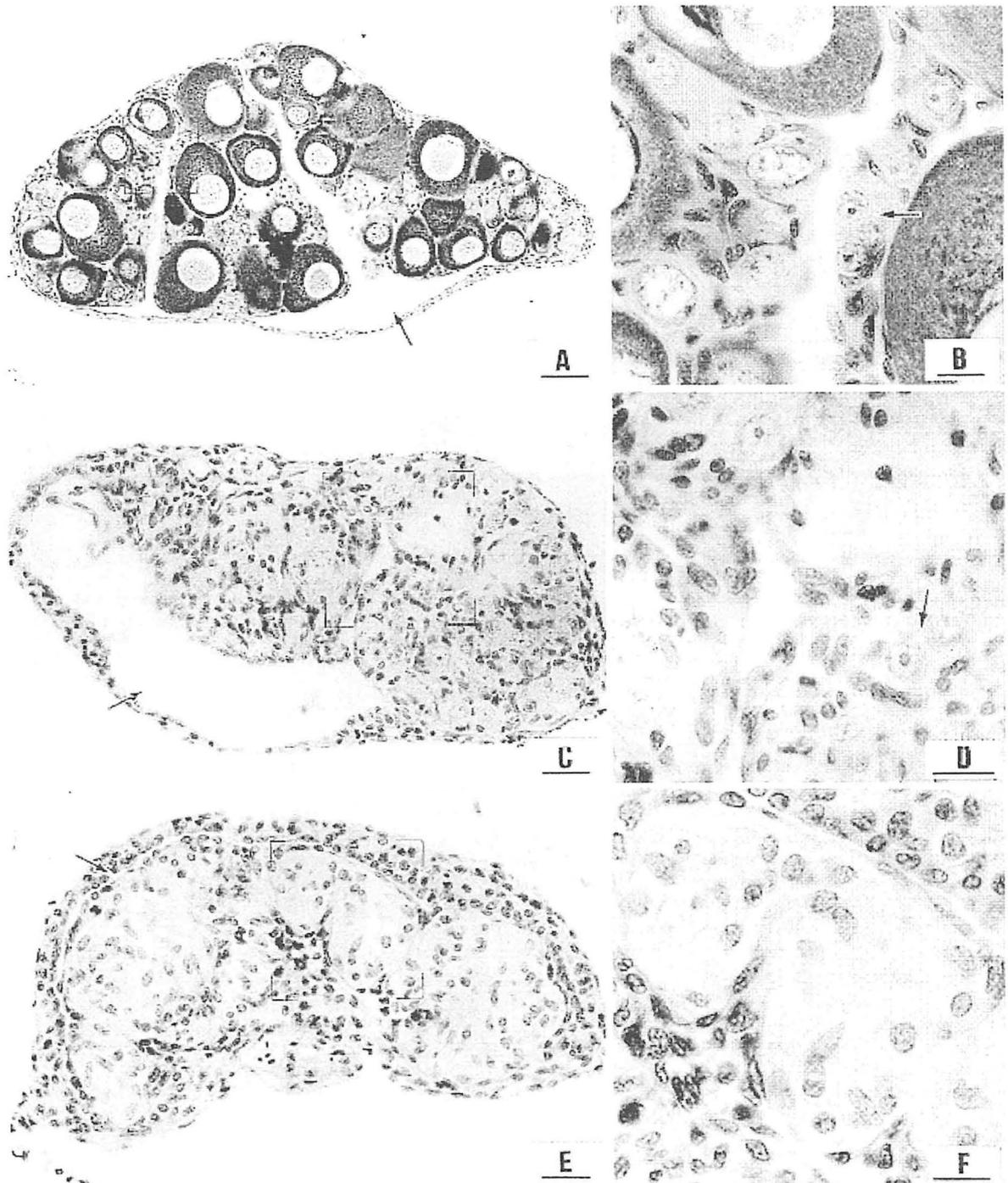


Figure 17. Aspect histologique d'ovaire normal (A, B), partiellement (C,D) et complètement (E, F) déficient en cellules germinales (*Odonthestes bonariensis*). Les photos de droite sont des détails des photos de gauche. Les flèches indiquent la cavité ovarienne en A, C et E et les ovogonies en B et D
 Les barres représentent 10 μm en B, D et F, 20 μm en C et E et 50 μm en A
 (d'après Strüssmann *et al.*, 1998).

IV.3 AVANTAGES DE LA STERILISATION PAR LA TEMPERATURE

Les poissons étant des animaux poïkilothermes, il est plus facile que chez les Mammifères d'exposer les gonades à une température élevée. En effet il suffit d'augmenter la température de l'eau du bassin.

De plus, la différence par rapport aux autres méthodes de stérilisation est que cette méthode est "naturelle" puisque sans utilisation d'hormone ni amélioration génétique.

Cette stérilisation par la température se veut "générique, universelle et acceptable", les cellules germinales étant intrinsèquement sensibles à la chaleur (Baroiller, communication personnelle).

CONCLUSION

La stérilisation des poissons peut s'avérer d'un grand intérêt en aquaculture.

En effet, l'élevage de poissons stériles permettrait d'obtenir une meilleure croissance corporelle et une chair de qualité constante et donc, dans le cas des systèmes intensifs, d'augmenter la rentabilité économique. Cela permettrait d'éviter les surdensités de poissons dans les bassins.

En outre, si des poissons venaient à s'échapper des élevages, du fait de leur stérilité, ils seraient dans l'incapacité de se reproduire avec les populations naturelles et ne porteraient donc pas atteinte à la biodiversité.

Aujourd'hui, plusieurs techniques sont utilisées pour stériliser les poissons : le traitement par hormones stéroïdes (pas très acceptable par le consommateur, notamment en Europe mais cependant encore employée), l'hybridation (bonne efficacité mais elle n'empêche pas l'expression de caractéristiques spécifiques à l'âge mature), la triploïdisation (les mâles triploïdes ont une stérilité incomplète, contrairement aux femelles chez lesquelles l'efficacité est très élevée) et la transgénèse (l'efficacité n'est pas vraiment démontrée à ce jour). La triploïdisation reste pour l'instant la technique la plus maîtrisée. Pour une efficacité optimale elle est associée à l'élevage de populations monosexes femelles.

Cependant, une nouvelle voie est envisagée pour la stérilisation des poissons. En effet, il a été démontré que les cellules germinales des gonades des poissons, tout comme celles des testicules des Mammifères, sont sensibles à la chaleur. Une augmentation de la température de l'eau des bassins permettrait ainsi d'obtenir des individus stériles de façon plus naturelle que par les méthodes citées précédemment.

BIBLIOGRAPHIE

AGUILAR-MAHECHA A., HALES B.F., ROBAIRE B. 2001. *Expression of stress response genes in germ cells during spermatogenesis.* Biol. Reprod. **65** : 119-127.

BARNABE G., BAUDIN-LAURENCIN F., BELLON-HUMBERT C., LUBET P., VAN VORMHOUDT A., VIGNEULLE M. 1991. *Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture.* Paris : LAVOISIER-TEC&DOC, 499 p.

BRAMICK U., PUCKHABER B., LANGHOLZ H.J., HORGSTEN-SCHWARK G. 1995. *Testing of triploid tilapia (*Oreochromis niloticus*) under tropical pond conditions.* Aquaculture, **137** : 343-353.

BRETON B., PRUNET P. OGM et environnement : Quelles précautions imposerait la présence de poissons transgéniques dans les élevages ? INRA [On line]. [Janvier 2005] <URL:

<http://www.inra.fr/Internet/Directions/DIC/ACTUALITES/DOSSIERS/OGM/breton.htm>>

BRETON B., QUILLET E., JALABERT B. 1996. *Contrôle de la reproduction et du sexe chez les poissons d'élevage.* INRA Productions Animales. [On line]. **Hors série** : 17-26. <URL : <http://www.inra.fr/productions-animales/hs1996/bb96h.htm>>

CHEVASSUS B. 1979. *Hybridization in Salmonids : Results and perspectives.* Aquaculture, **17** : 113-128.

CHEVASSUS B. 1983. *Hybridization in Fish.* Aquaculture, **33** : 245-262

CHEVASSUS B., CHOURROUT D, JALABERT B. 1979. *Le contrôle de la reproduction chez les poissons. I. Les populations "monosexes".* Bull. Fr. Pisc., **274** : 18-31.

CHEVASSUS B., CHOURROUT D, JALABERT B. 1979. *Le contrôle de la reproduction chez les poissons. II. Reproduction différée et stérilité.* Bull. Fr. Pisc., **274** : 32-46.

CHOURROUT D. 1980. *Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.).* Reprod. Nutr. Develop., **20** :727-733.

CHOURROUT D. 1987. *Genetic manipulations in fish : review of methods.* Proc. World Symp. On Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture. Bordeaux 27-30 May, 1986. Berlin, Vol. II, 111-126.

COULIBALY N.D. 1990. *Influence de la température sur les poissons d'eau douce.* Synthèse bibliographique. DESS Productions animales en régions chaudes. Année universitaire 1989-1990, IEMVT/ENVA, Maisons-Alfort (FRA)/INAPG, Paris (FRA)/Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (FRA), Maisons-Alfort, France, 24p.

COURTENS J.L., PLÖEN L. 1999. *Improvement of spermatogenesis in adult cryptorchid rat testis by intratesticular infusion of lactate.* Biol. Reprod., **61** : 154-161.

DANNO S., ITOH K., MATSUDA T., FUJITA J. 2000. *Decreased expression of mouse Rbm3, a cold-shock protein, in Sertoli cells of cryptorchid testis.* Am. J. Pathol., **156** : 1685-1692.

FAROOQUI S.M., AL-BAGDADI F., O'DONNELL J.M., STOUT R. 1997. *Degenerative changes in spermatogonia are associated with loss of glucose transporter (Glut 3) in abdominal testis of surgically induced unilateral cryptorchidism in rat.* Biochem. Biophys. Res Commun., **236** : 407-412.

FONTAINE P., LE BAIL P-Y. 2004. *Domestication et croissance chez les poissons.* INRA Productions animales. [On line] .17 : 217-225.
<URL : <http://www.inra.fr/Internet/Produits/PA/an2004/num243/fontai2/p2f243.htm>>

FUGISAWA M., MATSUMOTO O., KAMIDONO S., HIROSE F., KOJIMA K., YOSHIDA S. 1989. *Changes of enzymes in DNA synthesis in the testes of cryptorchid rats.* J. Reprod. Fertil., **84** : 123-130.

FUGISAWA M., HAYASHI A., OKADA H., ARAKAWA S., KAMIDONO S. 1997. *Enzymes involved in DNA synthesis in the testes are regulated by temperature in vitro.* Eur. Urol., **31** : 237-242.

HARVEY B., HOAR W.S. 1980. *La reproduction provoquée chez les poissons : Théorie et pratique.* IDCR, Ottawa, Canada, 48 p.

HENRICKSEN K., HAKORVIRTA H., PARVINEN M. 1995. *In-situ quantification of stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium : effects of short-term experimental cryptorchidism.* Int. J. Androl., **18** : 256-262.

HEW C.L., FLETCHER G.L. 2001. *The role of aquatic biotechnology in aquaculture.* Aquaculture, **197** : 191-204.

HOCHEREAU-DE-REVIERS M.T., LOCATELLI A., PERREAU C., PISSELET C., SETCHELL B.P. 1993. *Effects of a single brief period of moderate heating of the testes on seminiferous tubules in hypophysectomized rams treated with pituitary extract.* J. Reprod. Fertil., **97** : 381-387.

HOFFMANN A.M., BERGH A., OLIVECRONA T. 1989. *Changes in testicular cholesteryl ester hydrolase activity in experimentally cryptorchid rats.* J. Reprod. Fertil., **86** : 11-18.

ITO L.S., YAMASHITA M., STRÜSSMANN C.A. 2002. *Dynamics of heat-induced germ cell loss in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*.* Fisheries Science **68** (supplement) : 1313-1314.

ITO L.S., YAMASHITA M., STRÜSSMANN C.A. 2003. *Histological process and dynamics of germ cell degeneration in pejerrey *Odontesthes bonariensis**. J. Exp. Zool., **297** A : 169-179.

IZU H., INOUE S., FUJIMOTO M., SHIRAISHI K., NAITO K., NAKAI A. 2003. *HSF1 is involved in quality control mechanism in male germ cells*. BOR Papers in Press. DOI : 10.1095/biolreprod.103.020065.

JALABERT B., MOREAU J., PLANQUETTE P., BILLARD R. 1974. *Déterminisme du sexe chez *Tilapia nilotica* et *T. macrochir* : action de la méthyltestostérone dans l'alimentation des alevins sur la différenciation sexuelle ; obtention de mâles "inversés" fonctionnels et proportion des sexes dans la descendance*. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., **14** : 729-739.

JALABERT R., BILLARD R., CHEVASSUS B. 1975. *Preliminary on sex control in trout ; production of sterile fishes and simultaneous self-fertilizable hermaphrodites*. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., **15** : 19-28.

KARPE B., PLOËN L., HAGENÅS L., RITZÉN E.M. 1981. *Recovery of testicular functions after surgical treatment of experimental cryptorchidism in the rat*. Int. J. Androl., **4** : 145-160.

LE BAIL P-Y. 1988. *Growth-reproduction interaction in salmonids*. In : Zohar Y. and Breton (eds), Reproduction in fish, Basic and applied aspects in endocrinology and genetics, INRA Editions, Paris, collection Les colloques de l'INRA n° **44** : 91-108.

LE GAC F., BLAISE O., FOSTIER A., LE BAIL P-Y., LOIR M., MOUROT B., WEIL C. 1993. *Growth hormone (GH) and reproduction : a review*. Fish Physiol. Biochem., **11** : 219-232.

LEE J., RICHBURG J.H., SHIPP E.B., MEISTRICH M.L. 1999. *The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in sertoli cells versus germ cell injury in the testis*. Endocrinology., **140** : 852-858.

LINCOLN R.F. 1981. *Sexual maturation in triploide male plaice (*Pleuronectes platessa*) and plaice × flounder (*Platichthys flesus*) hybrids*. J. Fish. Biol., **19** : 415-426.

LUE Q., GORE M., ZHANG Q., CAMENISCH T. BOAST S., CASAGRANDA F., LAI C., SKINNER MK., KLEIN R., MATSUSHIMA G.K., EARP S., GOFF SP., LEMKE G. 1999. *Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis*. Nature, **398** : 723-728.

LU Y-H., SINHA HIKIM A.P., SWERDLOFF R.S., IM P., SENG TAING K., BUI T., LEUNG A., WANG C. 1999. *Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats : role of intratesticular testosterone on stage specificity*. Endocrinol. : **140** (4) : 1709-1717.

MASSOU A.M., PANFILI J., LE BAIL P.-Y., LAË R., MIKOLASEK O., FONTENELLE G., BAROILLER J.F. 2004. *Evidence of perturbations induced by reproduction on somatic growth microincrement deposition in Oreochromis niloticus otoliths.* J. Fish Biol., **64** : 380-398.

MIEUSSET R., BUJAN L. 1995. *Testicular heating and its possible contributions to male fertility : a review.* Int. J. Androl., **18** : 169-184.

MUI W.M., HOWARD R.D. 1999. *Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success : Sexual selection and the Trojan gene hypothesis.* PNAS, **96** (Issue 24) : 13853-13856.

NA-NAKORN U., RANGSIN W., BOON-NGAM J. 2004 *Allotriploidy increases sterility in the hybrid between Clarias macrocephalus and Clarias gariepinus.* Aquaculture, **237** : 73-88.

NISHIYAMA H., DANNO S., KANEKO Y., ITOH K., YOKOI H., FUKUMOTO M., OKUNO H., MILLAN J.L., MATSUDA T., YOSHIDA O., FUJITA J. 1998. *Decreased expression of cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) in male germ cells at elevated temperature.* Am. J. Pathol., **152** (1) : 289-296.

QUILLET E., CHEVASSUS B., BLANC J.M., KRIEG F., CHOURROUT D. 1988. *Performances of auto and allotriploids in salmonids. 1- Survival and growth in freshwater farming.* Aquat. Liv. Resources, **1** : 29-43.

SHIKONE T., BILLIG H., HSUEH A.J. 1994. *Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis.* Biol. Reprod., **51** : 865-872.

SOCHER S.A., YIN Y., DEWOLF W.C., MORGENTALER A. 1997. *Temperature-mediated germ cell loss in the testis is associated with altered expression of the cell-cycle regulator.* J. Urol., **157** (5) : 1986-1989.

STRÜSSMANN C.A., SAITO T., USUI M., YAMADA H., TAKASHIMA F. 1997. *Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, Odonthestes bonariensis and Patagonina hatcheri.* J. Exp. Zool., **278** (3) : 167-177.

STRÜSSMANN C.A., SAITO T., TAKASHIMA F. 1998. *Heat-induced Germ Cell Deficiency in the Teleosts Odonthestes bonariensis and Patagonina hatcheri.* Comp. Biochem. Physiol., **119A** (2) : 637-644.

SUZUKI R., FUKUDA Y. 1972. *Growth and survival of F1 hybrids among salmonids fishes.* Bull. Freshwater Fish Res. Lab., **21** : 117-138.

SUZUKI R., FUKUDA Y. 1973. *Appearance and numerical characters of F1 hybrids among salmonids fishes.* Bull. Freshwater Fish. Res. Lab., **23** : 5-32.

SWARUP H. 1956. *Production of heteroploidy in the three spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.).* Nature, **178** : 1124-1125.

TACON P., BAROILLER J.F., LE BAIL P-Y., PRUNET P., JALABERT B. 2000. *Effect of egg deprivation on sex steroids, gonadotropin, prolactin, and growth hormone profiles during the reproductive cycle of the mouthbrooding cichlid fish Oreochromis niloticus.* Gen. Comp. Endocrinol., **117** : 54-65.

TANIGAWA T., MIMATA H., TAKESHITA M., OGATA J. 1990. *Membrane fluidity and lipid composition of rat testicle in experimental cryptorchidism.* Urol. Int., **45** : 302-309.

THORGAARD G.H. 1983. *Chromosome set manipulation and sex control in fish.* In: Fish Physiology, Hoar W.S., RANDALL D.J. DONALDSON E.M. (eds). Vol. **9B**, Academic Press, New York, NY, 405-434.

TOGUYENI A., BAROILLER J.F., FOSTIER A., LE BAIL P-Y., KÜHN E.R., MOL K.A., FAUCONNEAU B. 1996. *Consequences of food restriction on short-term growth variation and on plasma circulating hormones in Oreochromis niloticus in relation to sex.* Gen. Comp. Endocrinol., **103** : 167-175.

TOMASINI J.A. 2005. Cours: *La Reproduction chez les Poissons.* Université Montpellier II, 10 p.

YIN Y., DEWOLF W.C., MORGENTALER A. 1998. *Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathway in mice.* Biol. Reprod., **58** : 492-496.

YIN Y., HAWKINS K.L., DEWOLF W.C., MORGENTALER A. 1997. *Heat stresses causes testicular germ cell apoptosis in adult mice.* J. Androl., **18**: 159-165.

YOUNG W.C., 1927. *The influence of high temperature on the guinea-pig testis.* J. Exp. Zool., **49** : 459-499.