

DK 530376

BA_TH1323

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

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

**DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES**

Année 2004-2005

RAPPORT DE STAGE

**LA STERILISATION GONADIQUE PAR
LA TEMPERATURE CHEZ LE TILAPIA
OREOCHROMIS NILOTICUS,
PREMIERS RESULTATS ET
PERSPECTIVES D'ETUDE**



(photo : Zitte)

Par
Marion MICHELAT

**CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet**

Laboratoire d'accueil : ARDA (La Réunion)

Responsable de stage: Damien Desprez

**BA
TH1323**



(photo : Michelat)

CIRAD



000073244

Remerciements

Je voudrais remercier tout d'abord l'ensemble de l'équipe de l'ARDA ainsi que les différents stagiaires pour leur accueil si chaleureux et pour les moments inoubliables passés avec eux.

Je tiens à remercier également le directeur, Pierre Bosc, d'avoir bien voulu m'accepter au sein de son organisme.

Un grand merci à Damien Desprez, mon formidable maître de stage et directeur de la station d'eau douce qui m'a permis de réaliser un stage très enrichissant tant sur le plan professionnel que sur le plan humain.

Merci beaucoup à Yohann Bellemène, qui m'a aidé dans la réalisation et le bon déroulement de mes expériences.

Je remercie enfin Jean François Baroiller du CIRAD Baillarguet, mon tuteur de stage pour son aide et ses conseils précieux.

Sommaire

Résumé et mots-clés

Introduction	1
1. Cadre de l'étude	5
1.1. Température et stérilisation des gonades	5
1.2. Objectif de notre étude	8
1.3. Description de la structure d'accueil	9
2. Matériel et méthode	12
2.1. Le modèle biologique : <i>Oreochromis niloticus</i>	12
2.1.1. Les principales caractéristiques de l'espèce	12
2.1.2. Régime alimentaire	13
2.1.3. Reproduction	14
2.2. La structure expérimentale	15
2.2.1. Le circuit fermé	15
2.2.2. L'alimentation des poissons	16
2.2.3. Le protocole expérimental	16
2.2.4. Paramètres étudiés	18
3. Résultats et discussion	19
3.1. Caractérisation du circuit fermé à 36°C	19
3.2. Survie	20
3.3. Effet de la température sur les gonades	21

3.3.1. Observation des tissus mâles et femelles	21
3.3.2. Sex-ratios	39
3.3.3. Diamètre ovocytaire des poissons post-DS	40
3.3.4. Indice gonado-somatique des poissons post-DS	41
3.4. Effet de la température sur la croissance	41
3.5. Lots de poissons post-DS traités à 36°C puis transférés à 24°C	44
3.5.1. Observation des tissus des gonades	44
3.5.2. Indice gonado-somatique	48
Conclusion	50
Bibliographie	
Annexes	

Résumé

Chez certains Poissons tels que *Odonthestes bonariensis* il a été montré que sous l'effet de la température les cellules germinales dégénèrent. Dans nos expériences, nous avons testé chez le Tilapia *Oreochromis niloticus* l'effet d'une température élevée (36°C) pendant une période de 45 à 60 jours sur des alevins non différenciés sexuellement et surtout de 15 à 90 jours sur des poissons sexuellement différenciés afin de déterminer si cette température pouvait induire une stérilité gonadique. Nous avons ensuite transféré ces poissons à 24°C pour tester la réversibilité du phénomène. Chez les poissons non différenciés sexuellement nous avons obtenu, conformément aux résultats attendus, une population presque exclusivement mâle. Chez les poissons différenciés sexuellement nous avons observé, à partir de 45 jours : chez les mâles, une atteinte de la structure lobulaire avec des cystes vides et l'absence de cellules à un stade avancé de la spermatogenèse ; chez les femelles, des anomalies au niveau des ovocytes ; et l'apparition d'individus intersexués. A 75 et 90 jours il n'y avait plus de femelles. L'indice gonado-somatique des poissons traités 75 jours et plus était significativement inférieur à celui du lot témoin. Après avoir été replacés à 24°C il y a eu recolonisation (plus ou moins importante) par les ovocytes chez certains individus supposés intersexués et les gonades mâles ont retrouvé pour la plupart une constitution normale même si un retard dans la spermatogenèse a été observé par rapport au témoin. L'indice gonado-somatique est cependant resté inférieur à celui du témoin et a même diminué. Le taux de survie est acceptable pour un contexte de production, même s'il est inférieur à celui du témoin, et la croissance a été retardée. Cependant, il reste à savoir si cette dernière serait compensée par l'absence de maturité en cas de stérilisation effective mais d'autres expériences sont auparavant nécessaires pour déterminer si ces poissons sont bien stériles et dans le cas contraire pour améliorer le protocole.

MOTS-CLES : stérilisation gonadique-température-Tilapia-*Oreochromis niloticus*-sexe-intersexué-spermatogenèse-ovocyte-croissance

Introduction

En 2002, les captures de pêche de représentaient 93,2 millions de tonnes et la production aquacole 41,9 millions de tonnes (FAO 2002). Alors que les captures de pêche se stabilisent, la production aquacole ne cesse d'augmenter de façon notable depuis le début des années 1980.

Par ailleurs, la population mondiale a augmenté plus rapidement que la production totale de poisson destiné à l'alimentation, d'où une diminution des disponibilités mondiales par habitant qui sont passées de 14,6 kg en 1987 à 13,1 kg en 2000 (FAO 2002).

Face à l'épuisement des stocks de pêche, l'aquaculture peut en partie satisfaire cette demande croissante. Les techniques de production et de gestion doivent constamment être améliorées afin d'obtenir de meilleurs rendements et un produit de qualité, tout en préservant au mieux l'environnement et la santé du consommateur.

Parmi les espèces piscicoles produites dans le monde, le groupe des Tilapias arrive au second rang après celui des carpes : 1,6 millions de tonnes pour les Tilapias contre 17,2 pour les Carpes (FAO 2005). Les Tilapias sont caractérisés par une croissance rapide, une reproduction naturelle aisée ainsi que par une résistance aux manipulations et aux maladies (Mélard et Philippart, 1981 a et b). De plus, ils tolèrent de larges gammes de conditions environnementales ce qui explique leur large diffusion dans le monde.

Les espèces du genre *Oreochromis* représentent plus de 95 % de la production mondiale de Tilapias (FAO 2002). Ces espèces sont caractérisées notamment par une maturité sexuelle précoce et une reproduction efficace (garde parentale), ce qui entraîne en élevage une rapide surpopulation (Baroiller et Jalabert, 1989). Cette surpopulation induit une compétition alimentaire, une augmentation de l'agressivité, une baisse de la croissance et une dégradation des conditions d'élevage. Ces espèces présentent également un dimorphisme sexuel de croissance en faveur des mâles (Hanson *et al.*, 1983).

Une des solutions consiste à produire des populations monosexes mâles. Les poissons étant tous théoriquement de sexe mâle, il y a absence de partenaire sexuel et donc de fécondation. Les principales techniques utilisées sont l'inversion hormonale du sexe (Vera-Cruz et Mair, 1994 ; Desprez *et al.*, 2003a) et la production de lignées de géniteurs homozygotes au niveau du génotype sexuel (Beardmore *et al.*, 2001 ; Desprez *et al.*, 2003b).

Toutefois, la maturation sexuelle n'est pas supprimée et elle s'accompagne d'une baisse globale des performances zootechniques à l'origine d'une baisse de la rentabilité économique de l'exploitation piscicole. En effet, lors de la maturation une grande partie de l'énergie est dirigée vers le développement des gonades et on assiste à un ralentissement de la croissance et à une dégradation de la qualité de la chair due à la perte des lipides musculaires.

Le terme "stérilité gonadique" est défini comme l'impossibilité pour un individu d'avoir une descendance (Chevassus *et al.*, 1979).

En théorie, l'élevage d'individus stériles permettrait d'éviter toutes ces contraintes liées à la maturation sexuelle. De plus, en cas d'échappement dans le milieu naturel, les poissons stériles ne pourraient ni s'implanter dans une niche écologique ni s'hybrider avec les populations locales, ce qui contribuerait à la préservation de la biodiversité. Ceci est très intéressant notamment dans le cas des espèces introduites, sélectionnées ou améliorées. Enfin la stérilité éviterait la surpopulation de poissons dans les étangs. Cette stérilisation représente donc un véritable enjeu pour la pisciculture.

Différentes méthodes de stérilisation existent chez les poissons, cependant toutes présentent des inconvénients et aucune n'est totalement fiable :

- L'administration d'hormones stéroïdes (naturelles ou de synthèse) à des alevins sexuellement indifférenciés permet d'orienter leur différenciation sexuelle dans le sens mâle ou femelle selon l'hormone utilisée (Hunter et Donaldson, 1983 ; Baroiller *et al.*, 1999). Alors que de faibles doses (environ 50 mg/kg d'aliment chez les Tilapias) suffisent pour l'inversion du sexe, seules des doses massives peuvent induire la stérilité. Toutefois, de telles doses sont toxiques pour le consommateur et pour le poisson et induisent un taux élevé de mortalité au cours de l'élevage. En outre, cela poserait également le problème du traitement et de l'élimination des eaux contaminées par de telles doses (Baroiller et Jalabert, 1989).

- L'hybridation, qui consiste à croiser deux individus d'espèces proches, peut produire des descendants stériles mais la stérilité des hybrides chez les Poissons n'est pas une règle générale (Chevassus, 1983). Ainsi, les hybrides de saumons ne sont pas tous stériles et chez les Tilapias aucune stérilité n'est observée chez les hybrides. Cette technique n'est donc pas toujours fiable (Chourrout *et al.* 1987; Jalabert *et al.*, 1971 et 1974).

- La technique la plus employée pour stériliser est la triploïdisation. Chez les Poissons, l'ovule est naturellement bloqué en métaphase. L'application d'un choc thermique (chaud ou froid) ou d'un choc de pression permet d'empêcher l'expulsion du deuxième globule polaire. L'ovule est donc "2n" et non "n" et à l'issue de la fécondation avec un spermatozoïde "n" on obtiendra un individu "3n" donc triploïde. Une autre voie possible pour obtenir un individu triploïde est le croisement entre un spermatozoïde de mâle tétraploïde, obtenu par l'application d'un choc thermique ou de pression, et un ovule de diploïde (Figure I). Cette voie est moins évidente que la première car il y a un problème de compatibilité de taille, le spermatozoïde "2n" étant trop gros pour le micropyle (point d'entrée du spermatozoïde dans l'ovule). De plus, il est difficile d'obtenir des mâles tétraploïdes viables, et si de tels individus ont par exemple été obtenus chez la truite (Chourrout *et al.*, 1986), en revanche, chez les Tilapias, aucune survie n'a été obtenue après la résorption vitelline (Avtalion et Don, 1990).

La stérilisation par triploïdisation présente plusieurs inconvénients. En effet, le traitement par choc thermique ou de pression est une méthode drastique dont le taux de survie n'est que de 10 %. De plus, chez la plupart des espèces cette méthode n'est

vraiment efficace que chez les femelles. En effet, les mâles triploïdes possèdent un testicule au sein duquel peut se dérouler une spermatogenèse et des spermatozoïdes sont produits. Toutefois, ces spermatozoïdes sont généralement considérés comme étant incapables de féconder des ovules. Cependant, le débat reste ouvert, puisque des alevins ont été trouvés dans des étangs de mâles et femelles triploïdes de Tilapia, de même que des femelles triploïdes incubant des œufs. La gamétogenèse des triploïdes de Tilapia présente clairement un retard dans le temps, par rapport à celle des diploïdes. Toutefois, chez 10 % des mâles et plus de 15 % des femelles, des RGS (rapport gonado-somatique) équivalents à ceux rencontrés chez les diploïdes sont observés, de même que des testicules fluants (Brämick *et al.*, 1995). La stérilité totale de tels triploïdes est donc soulevée. En outre, chez certaines espèces, des populations triploïdes sont observées dans le milieu naturel, suggérant que des méioses restent possibles (bien qu'on en ignore les mécanismes) chez de tels individus.

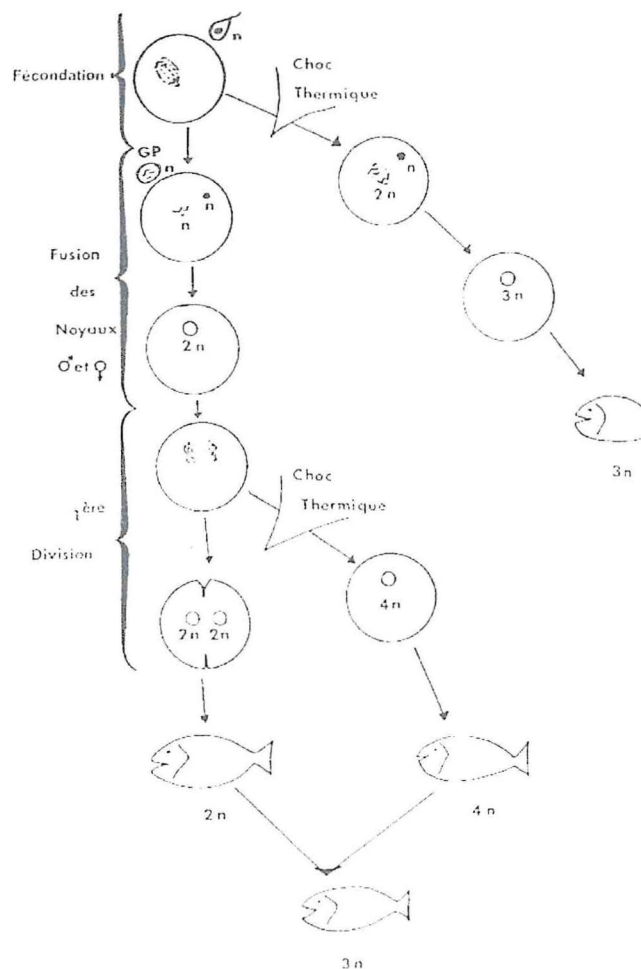


Figure I. Induction de la triploïdie chez les Poissons.

L'application d'un choc thermique (ou d'un choc de pression) 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 dernière méthode explorée pour produire des individus stériles est la transgénèse. Cette méthode consiste à introduire, dans l'embryon, un gène antisens du gène de la GnRH, hormone qui stimule la production des gonadotrophines (FSH et LH) par l'hypophyse, pour empêcher de façon réversible la production du décapeptide GnRH (Uzbekova *et al.*, 2000 ; Hew et Fletcher, 2001). Les gonadotrophines, qui agissent sur certains tissus participant à l'élaboration directe ou indirecte des produits sexuels (notamment les tissus de la gonade), ne sont alors théoriquement pas produites et on devrait obtenir des individus stériles. Chez la truite, certaines lignées obtenues par cette technique sont stériles, d'autres non (Uzbekova *et al.*, 2000). Chez la carpe et chez le Tilapia, des animaux stériles semblent pouvoir être ainsi produits (revue de Baroiller et D'Cotta, 2004). Quoiqu'il en soit, cette technique, du fait de sa complexité, reste du domaine de la recherche ou de centres de production très spécialisés et uniquement compatibles avec des espèces à fortes valeurs marchandes. De plus, il s'agit d'organismes génétiquement modifiés, or en l'état actuel des choses, les OGM ne bénéficient pas d'une bonne image auprès des consommateurs.

1 CADRE DE L'ETUDE

1.1 TEMPERATURE ET STERILISATION DES GONADES

Les résultats d'études menées chez les Mammifères (Shikone *et al.*, 1994 ; Socher *et al.*, 1997) qui portent sur les conséquences d'une élévation de température dans les gonades ont conduit à des études similaires chez les Poissons.

Chez les Mammifères 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 chez les Mammifères.

L'effet de la température sur la différenciation sexuelle est un phénomène désormais bien connu chez les Poissons (Tilapia du genre *Oreochromis*, *Menidia menidia*, *Dicentrarchus labrax*, *Ictalurus punctatus*, *Poecilia melanogaster*,...) (Baroiller *et al.*, 1995 ; Baroiller et D'Cotta, 2001). En fonction des espèces, la température induit une augmentation significative d'un des deux sexes pouvant conduire dans certains cas à des populations monosexes.

En outre, lors de leurs travaux sur ce phénomène, Strüssmann *et al.* (1997) ont pu constater chez *Odonthestes bonariensis* que l'exposition prolongée à une température élevée (29°C) pendant la différenciation sexuelle des gonades peut conduire à une déficience en cellules germinales.

D'autres études ont suivi, notamment l'induction expérimentale, par exposition à de fortes températures, de la disparition des cellules germinales réalisée sur des larves et des juvéniles d'*Odonthestes bonariensis* et de *Patagonina hatcheri* mâles et femelles, au début de la gonadogenèse (Strüssmann *et al.*, 1998). Les résultats obtenus 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 ces 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 celles relevées dans les expériences sur les testicules de Mammifères. En fait, il se pourrait que cette sensibilité à la température soit une caractéristique commune chez les Vertébrés, bien qu'à des seuils de température différents. L'étude réalisée par Strüssmann *et al.* (1998) a également mis en évidence que les cellules germinales de l'ovaire en développement de ces poissons, contrairement à celles des Mammifères, sont aussi sensibles à la chaleur que celles du testicule en développement.

En ce qui concerne les dynamiques et les mécanismes de disparition des cellules germinales chez *Odonthestes bonariensis*, 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 des poissons larves et juvéniles à 29°C en général a entraîné immédiatement une apparition ou une augmentation du nombre de cellules histologiquement anormales et une diminution du nombre de cellules normales (Ito *et al.*, 2003). 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 cette température pour des périodes de 8 à 12 semaines mais aucun traitement n'a produit 100% de poissons stériles.

Par ailleurs l'exposition à cette température élevée n'a pas empêché la gonade de poursuivre sa croissance, même si celle-ci était un peu plus lente que celles des témoins.

Après avoir replacé les poissons à des températures normales, les cellules germinales ayant résisté aux fortes températures ont rapidement proliféré et recolonisé les gonades, chez les mâles comme chez les femelles. Ceci suggère d'une part que certaines cellules n'ont pas été endommagées après l'exposition prolongée à la chaleur et d'autre part, que les cellules qui forment la base somatique et régulent le développement des cellules germinales (cellules de Sertoli et de Leydig pour les mâles, cellules folliculaires pour les femelles) sont très peu ou pas affectées par la chaleur. Les cellules somatiques seraient donc moins affectées par la chaleur que les cellules germinales.

Une autre hypothèse est que toutes les cellules germinales sont détruites par les fortes températures et que de nouvelles cellules germinales se différencient à partir de cellules souches.

En ce qui concerne les Tilapias, les expériences d'élevage à des températures élevées portent essentiellement sur la différenciation du sexe. Il a ainsi été montré que chez des alevins d'*Oreochromis niloticus* âgées de 9 à 13 jours après fertilisation et élevées à des températures supérieures à 34°C, le sex-ratio est significativement dévié vers le sexe mâle, chez certaines descendances au moins, comparé au contrôle à 27°C (Baroiller *et al.*, 1993).

Des résultats similaires ont été obtenus chez des alevins élevés pendant leurs 28 premiers jours après résorption de la vésicule vitelline à des températures élevées (Baras *et al.*, 2000). En effet, alors que les sex-ratios des alevins élevés entre 20°C et 33°C n'étaient pas déviés en comparaison avec les lots témoins à 27°C, les sex-ratios des poissons élevés à 35°C et à 37°C étaient orientés en faveur des mâles (78 à 100 % de mâles). Les poissons élevés à 39°C sont tous morts en 3 semaines. En fait, à partir de 38,5-39°C les Tilapias juvéniles commencent à mourir.

D'autres expériences menées à La Réunion sur des alevins (Desprez, résultats non publiés) vont également dans le sens d'un rôle de la température dans l'inversion du sexe. Quelques uns des résultats significatifs obtenus sont répertoriés dans le Tableau I.

Tableau I. Effet de la durée du traitement à haute température (35-36°C) sur la survie et le déterminisme du sexe chez le Tilapia *Oreochromis niloticus*

Couple (MxF)	Durée du traitement (jours)	Température d'élevage (°C ± ET)	Pourcentage de mâles (%)	Taux de survie après traitement (%)
M2 x F4	Témoin	26,8 ± 1,2	50	98
	28	35,4 ± 0,5	71	97,5
M2 x F5	Témoin	24,6 ± 1,6	51	96,7
	28	34,6 ± 0,6	75	89,3
M4 x F7	Témoin	28,1 ± 0,6	56	83,7
	28	34,4 ± 1,1	70	32,7
M4 x F8	Témoin	28,1 ± 0,6	57	87,9
	28	35,4 ± 1,0	81	55,1
M2 x F9	Témoin	30,7 ± 1,2	51	99,1
	7	35,9 ± 0,8	75	88,5
	14	35,5 ± 0,8	70	88,5
	21	35,1 ± 0,6	87	84
	28	35,8 ± 0,8	83	83,5
M5 x F10	Témoin	24,4 ± 1,4	62	51,7
	7	35,9 ± 0,4	85	55,4
	14	35,5 ± 0,6	75	61,4
M5 x F11	Témoin	28,7 ± 1,4	53	52,5
	21	35,5 ± 1,6	66	51,7
	28	35,8 ± 1,7	62	45,3
M5 x F12	Témoin	25,1 ± 1,3	47	66,4
	7	36,0 ± 1,1	75	87,3
	28	34,7 ± 1,7	61	82,1
M6 x F12	Témoin	31,0 ± 1,2	44	92,5
	21	34,4 ± 0,7	62	97
M6 x F13	Témoin	27,2 ± 1,4	41	35,2
	7	34,9 ± 0,7	57	68,6
M6 x F15	Témoin	26,6 ± 1,6	61	89,9
	7	34,4 ± 0,6	75	99,2
M6 x F16	Témoin	28,8 ± 1,4	51,5	88,5
	14	35,0 ± 0,8	70	85,4
	28	35,5 ± 1,5	69,1	91,1

Chez *Oreochromis niloticus* une température de 35-36°C, même sur une durée aussi courte que 7 jours, peut influencer significativement la différenciation sexuelle, puisque le sex-ratio est dévié vers le sexe mâle (Tableau I). Ces données confirment des résultats déjà publiés chez cette espèce (Baroiller *et al.*, 1995).

1.2 OBJECTIF DE NOTRE ETUDE

La stérilisation par la température pourrait donc constituer une voie de contrôle de la reproduction chez le Tilapia.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'effet des températures élevées (34-36°C) pendant 7 à 30 jours au cours de la différenciation sexuelle est un phénomène bien caractérisé.

L'objectif de nos expériences est de tester chez *Oreochromis niloticus* l'effet d'une température élevée (36°C) pendant une période plus longue (45 à 90 jours) sur des alevins non différenciés sexuellement et surtout sur des poissons sexuellement différenciés.

Nous allons également tenter de déterminer si cette stérilité est réversible ou non ; c'est-à-dire si des cellules germinales recolonisent ultérieurement les gonades après un arrêt du traitement.

L'influence de la température sur les gonades sera évaluée à partir de critères tels que l'analyse de squashes gonadiques, du diamètre ovocytaire et de l'indice gonadosomatique. L'effet de la température sur la survie et la croissance sera également abordé dans le cadre de ce travail.

L'objectif final est de déterminer si la température de 36°C peut induire une stérilité gonadique chez le Tilapia *Oreochromis niloticus*.

1.3 DESCRIPTION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL

Ce stage s'est déroulé à la station d'aquaculture continentale de l'ARDA (Association Réunionnaise pour le Développement de l'Aquaculture) à l'île de La Réunion. L'ARDA est une association de loi 1901 créée en 1991 à l'initiative du Conseil Régional de La Réunion dans le but de valoriser le développement des activités aquacoles dans l'île.

L'ARDA comprend deux pôles d'activités :

- un pôle "Ecologie des Eaux Douces et Environnement" avec un laboratoire d'écologie, des structures d'accueil de scolaires ;
- un pôle "Aquaculture" avec deux stations de Recherche et Développement, une Station d'Aquaculture Marine située au Port (nord-ouest de l'île) et une Station d'Aquaculture d'Eau Douce à Etang-Salé (sud de l'île).

A la station marine se trouvent une écloserie marine polyvalente et une ferme pilote d'élevage en cage en mer.

La station d'eau douce (Figure II) se compose, pour sa part, d'étangs de production, d'une station d'alevinage "Eclosia" et d'infrastructures expérimentales où ont été réalisées nos expériences (Figure III).



Figure II. Vue aérienne de la station d'aquaculture continentale d'Etang-Salé (source : www.arda.fr).



Figure III. Infrastructures expérimentales de la station d'aquaculture continentale d'Etang-Salé (source : www.arda.fr).

Depuis sa création l'ARDA, en partenariat avec les professionnels et les structures locales d'animation rurale (Chambre d'Agriculture, APR) a mis en œuvre plusieurs programmes de transfert/développement, axés chacun sur une espèce : le Tilapia rouge souche Red Florida ; le black-bass, *Micropterus salmoides* ; les Tilapias, *O.aureus*, *O. niloticus* ; la carpe, *Cyprinus carpio* ; l'ombrine tropicale, *Sciaenops ocellatus* ; le cobia, *Rachycentron canadum*,...

Le but de ces programmes est d'une part de concevoir de modèles techniques de production destinés à être transférés au secteur privé, après avoir vérifié leur viabilité technico-économique et, d'autre part, d'identifier les éventuels points de blocage techniques et scientifiques nécessitant d'engager à court ou moyen terme un partenariat avec les organismes de recherche concernés. C'est ainsi qu'après avoir initié des mesures d'accompagnement telles que, la formation des candidats à l'installation, la structuration des premiers circuits de distribution ou l'élaboration d'un programme sectoriel de filière, les transferts aux secteurs privés peuvent être engagés.

Aujourd'hui les actions de recherche et développement de l'ARDA en aquaculture continentale se basent sur trois axes :

- **conforter l'appareil productif existant** par l'installation de nouvelles unités de production, l'approvisionnement des producteurs en alevins de qualité et des programmes de recherche d'accompagnement sur le Tilapia (contrôle de la reproduction et monosexage) ;
- **identifier et transférer de nouvelles filières de production** par des programmes de recherche tels que ceux concernant la maîtrise de l'élevage du black-bass *Micropterus salmoides* ou de la carpe *Cyprinus carpio* ;
- **s'insérer dans une dynamique régionale de développement.**

C'est dans le premier axe que s'insèrent nos expériences menées chez *O. niloticus* sur l'effet des températures élevées (36°C) sur les gonades.

2 MATERIEL ET METHODE

2.1 LE MODELE BIOLOGIQUE : *OREOCHROMIS NILOTICUS*

Nos expériences sont réalisées sur le Tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus* (Linné 1758) qui appartient à l'Ordre des Perciformes, à la Famille des Cichlidés et qui est originaire des rivières d'Afrique du Nord et Centrale mais dont la distribution s'étend dans toute la zone tropicale et intertropicale.

La souche *O. niloticus* utilisée pour nos expériences provient de la Station Piscicole de Bouaké-Institut des Savanes (Côte d'Ivoire). Cette souche a été transférée en 1990 dans les infrastructures du Cirad à Montpellier et à l'Ile à la Réunion en 1994.

2.1.1 Les principales caractéristiques de l'espèce

Les critères morphologiques permettant de discriminer cette espèce sont le nombre de rayons mous (29 à 31) et de rayons durs (16 à 18) sur la nageoire dorsale et la présence de barres verticales noires sur la queue (Figure 1 et Figure 2).

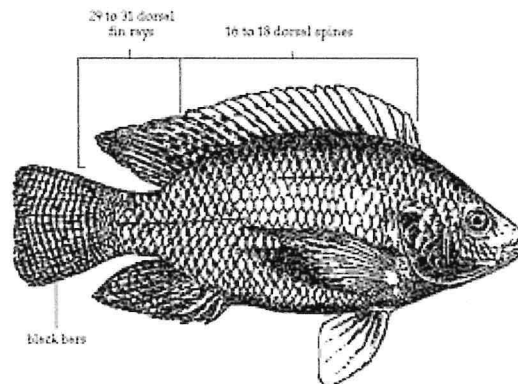


Figure 1. Le Tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* (source : www.ag.auburn.edu/fish/icaae/reprobiology.htm).

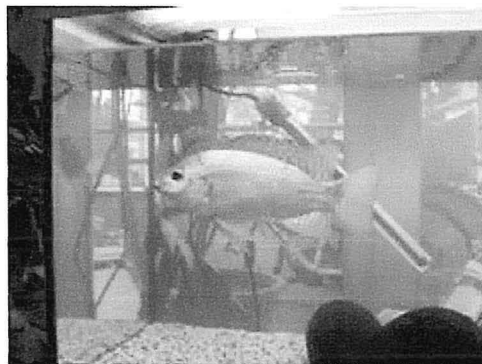


Figure 2. Le Tilapia du Nil *Oreochromis niloticus*, mâle élevé en aquarium (6 ans) et originaire du Cameroun (source web).

En outre *Oreochromis niloticus* présente un dimorphisme sexuel de croissance en faveur du sexe mâle.

O. niloticus est une espèce eurytherme. En effet, la gamme de températures qu'il tolère est large puisqu'elle va de 7°C à 42°C, les températures de 40 à 42°C étant des températures représentant le seuil limite de tolérance physiologique (Balarin et Hatton, 1979).

Cette espèce est euryhaline puisqu'elle vit en eau douce et en eau saumâtre. On trouve des populations de Tilapias du Nil dans des milieux de salinité 13 ‰ jusqu'à près de 30 ‰ (29 ‰) (Philippart et Ruwet, 1982).

O. niloticus supporte un taux d'oxygène dissous (DO) minimum de 0,1 ppm (Mélard et Philippart, 1981 a et b). Il peut donc vivre et se reproduire dans des endroits dans lesquelles de fortes désoxygénations se produisent ponctuellement (lacs peu profonds, marais,...). En outre *O. niloticus* supporte des forts taux de CO₂.

Les Tilapias supportent les fortes turbidités et sont plutôt tolérants à la pollution par des substances toxiques (organiques ou inorganiques, naturelles ou artificielles). Ils sont également très résistants aux manipulations, aux maladies et au stress.

2.1.2 Régime alimentaire

Oreochromis niloticus a un régime alimentaire opportuniste et omnivore, il colonise ainsi avec une grande rapidité toutes les eaux assez chaudes pour lui. Ce régime alimentaire a deux composantes : l'une végétale, dominante, composée d'algues, de phytoplancton, de débris végétaux, l'autre animale, composée de zooplancton et d'organismes benthiques (larves d'insectes, crustacés, mollusques). Le Tilapia fouille les sédiments fins riches en diatomées et bactéries. Le Tilapia du Nil se nourrit également de cyanobactéries qui constituent une grande réserve en carbone.

Les alevins ont un régime alimentaire diversifié : ils extraient des petites particules organiques des sédiments (phytoplancton, diatomées, périphyton, zooplancton et organismes benthiques). (Philippart et Ruwet, 1982).

2.1.3 Reproduction

Théoriquement *O. niloticus* atteint la maturité sexuelle à l'âge de 4 à 6 mois pour un poids de 50 à 100 g et une longueur de 10 à 12 cm.

La température minimale requise pour la reproduction est de 21°C mais la température optimale se situe entre 25°C et 30°C. La saisonnalité est donc un facteur important pour la reproduction.

Une femelle *O. niloticus* peut produire de 200 à 3500 œufs par ponte (Mélard, 1986). Une femelle de 200 g peut produire 250 à 500 alevins toutes les 4 à 5 semaines.

Après la parade nuptiale, la femelle dépose ses œufs dans le nid préparé et défendu ardemment par le mâle (territorialité importante) et celui-ci vient les fertiliser. La femelle reprend ensuite ses œufs en bouche et les incube pendant 10 jours environ, jusqu'à leur éclosion. Les jeunes alevins restent 5 à 7 jours de plus auprès de leur mère et rentrent dans sa bouche en cas de danger. Pendant tout le temps de l'incubation la femelle ne se nourrit pas. La vésicule vitelline se résorbe en 10 jours environ à une température d'environ 27°C (Figure 3).

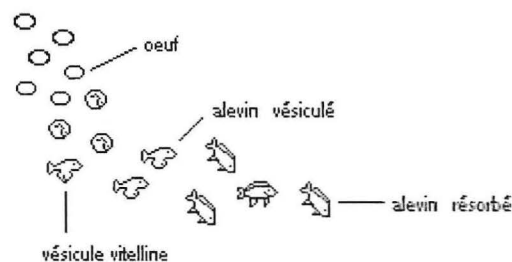


Figure 3. Les différents stades de développement chez le Tilapia (source web).

Alors que le sexe génétique est déterminé dès la fécondation, le sexe phénotypique ne commence à se différencier qu'après la résorption de la vésicule vitelline. Les expériences sur l'inversion hormonale du sexe montrent que la période hormono-sensible débute à partir de 10-14 jours post-fécondation, le traitement devant durer 4 semaines. Les traitements hormonaux qui débutent après 14 jours post-fécondation n'influencent plus la différenciation sexuelle (Baroiller et Toguyeni, 1996).

La taille des œufs est d'environ 2,8 mm, à l'éclosion les larves vésiculées mesurent environ 4,5 mm. Les alevins nagent au bout de 11 jours lorsqu'ils atteignent la taille de 8 mm environ. Ces caractéristiques ont été obtenues en aquarium à une température de 26-27°C (Hanon, 1975).

La reproduction naturelle d'*Oreochromis niloticus* tout comme celle du genre *Oreochromis* est aisée en captivité ce qui, ajouté à sa grande résistance et à sa rapidité de croissance, lui confère de grandes potentialités pour la pisciculture.

2.2 LA STRUCTURE EXPERIMENTALE

2.2.1 Le circuit fermé

Les expériences de traitement à 36°C sont réalisées dans un circuit fermé. Ce circuit se compose de 4 bassins carrés d'une contenance de 100 L chacun, d'un grand bassin circulaire conique de 1 600 L et d'un bac tampon contenant une pompe, des résistances chauffantes et une masse filtrante (corail mort) (Figure 4 et Figure 5).



Figure 4. Vue générale du circuit fermé thermo-régulé à 36°C (photo : Michelat).



Figure 5. Vue sur les bassins d'élevage de 100 l du circuit fermé à 36°C (photo : Michelat).

Dans chaque bassin un bulleur permet d'oxygéner l'eau.

La température et le taux d'oxygène sont relevés matin et soir manuellement à l'aide d'un oxymètre. De plus, un appareil « Tiny-tag », placé dans un des bacs, est programmé pour enregistrer la température toutes les 30 minutes dans le circuit fermé.

Tous les bassins du circuit fermé à 36°C sont recouverts d'une bâche plastique pour limiter les pertes de chaleur et la perte d'eau par évaporation. Chaque jour un renouvellement de 5 % du circuit est réalisé par un apport d'eau du réseau agricole (eau non chlorée). Lors des prélèvements de poissons, un renouvellement plus important (environ 10 %) est réalisé. Les renouvellements d'eau se font très progressivement afin d'éviter de fortes variations de température dans le circuit.

Nous avons conservé une photopériode naturelle tout au long des expériences.

2.2.2 L'alimentation des poissons

Les poissons sont nourris avec de l'aliment Legouessant (54 % de protéines) dont le calibre (taille des particules alimentaires) varie en fonction du stade de développement des poissons. La composition de l'aliment est donnée en annexe 1.

La table de rationnement optimal du Tilapia (Mélard, 1986), valable de 18°C à 30°C nous a servi de référence pour le calcul des rations (exemple de calcul de ration en annexe 2).

La ration est toutefois réajustée chaque jour en fonction de la consommation des poissons. La ration journalière est fractionnée en 5 repas. Pendant les week-ends les poissons reçoivent une demi-ration par jour, distribuée en 3 fois.

2.2.3 Le protocole expérimental

- **Poissons post-différenciation sexuelle ("poissons post-DS") :**

Dans le bassin de 1 600 L sont placés 500 poissons post-DS d'un poids moyen de 2,7 g (**lot 1**).

Des prélèvements de 50 poissons sont effectués dans ce lot après 15, 30, 45, 60, 75 et 90 jours de traitement (Tableau 1). Ces individus sont sacrifiés, mesurés et pesés, leurs gonades prélevées (voir paragraphe 2.2.4).

Tableau 1. Design des expériences d'élevage à 36°C des Tilapias *O. niloticus* post-DS

Lot expérimental	Nombre initial de poissons	Durée de traitement à 36°C (jours)
lot 1	500	15, 30, 45, 60, 75, 90
lot 2	150	15, 45, 75, 90
lot 3	150	15, 45, 75
lot A (témoin à 24°C)	500	Témoin

Poids moyen initial de 2,7 g

Après 75 et 90 jours de traitement 50 poissons supplémentaires du lot 1 sont prélevés et placés dans un aquarium en circuit fermé dont la température s'abaissera progressivement (en 24 heures) pour atteindre 24°C (température témoin) (**lot 1'** à 75 jours, **lot 1''** à 90 jours) (Tableau 2). Le **lot 1'** est sacrifié 30 jours après la fin du traitement, le **lot 1''** 12 jours après la fin du traitement.

Tableau 2. Design des expériences d'élevage à 36°C puis à 24°C des Tilapias *O. niloticus* post-DS

Lot expérimental	Nombre initial de poissons	Durée de traitement à 36°C (jours)	Durée d'élevage à 24°C (jours)
lot 1'	50	75	30
lot 1''	34	90	12
lot 2-3'	50	75	30

Parallèlement deux lots de 150 poissons post-DS de 2,7 g de poids moyen sont placés dans deux des bassins de 100 L (**lots 2 et 3**). Vingt-cinq individus de chaque lot sont prélevés après 15, 45 et 75 jours de traitement. Dans le **lot 2**, 25 poissons sont également prélevés à 90 jours (Tableau 1).

Après 75 jours de traitement, 25 poissons du **lot 2** et 25 poissons du **lot 3** ont été prélevés pour un retour à 24°C (**lot 2-3'**). Le **lot 2-3'** est sacrifié 30 jours après la fin du traitement (Tableau 2).

Le lot témoin (**lot A**) comprend 500 poissons post-DS d'un poids moyen de 2,7 g et est élevé parallèlement dans un bassin alimenté en eau par le réseau de lagunage de la station ($23,5 \pm 2,2^\circ\text{C}$). Cinquante de ces poissons sont sacrifiés à 15, 30, 45, 60, 75 et 90 jours et subissent le même protocole que les individus des lots traités (Tableau 1).

- **Poissons pré-différenciation sexuelle ("poissons pré-DS") :**

Les lots sont constitués à partir de deux pontes provenant de deux femelles différentes. Les alevins vésiculés sont collectés dans la bouche des femelles. Chaque ponte est divisée en deux lots : un lot traité et un lot témoin.

Le **lot 4** de 300 poissons pré-DS d'un poids moyen de 0,011 g est mis en élevage dans un des bassins de 100 L du circuit fermé à 36°C. Le lot témoin (**lot B**) de 200 poissons pré-DS (0,011 g) est mis en élevage dans un aquarium d'un circuit fermé à 24°C.

Les poissons du **lot 4** sont prélevés après 45 jours de traitement à 36°C et élevés dans un aquarium à 24°C pendant 60 jours avant d'être sacrifiés en même temps que le **lot B**. A ce stade, les poissons ont atteint une taille suffisante pour la réalisation de squashes gonadiques (Tableau 3).

Tableau 3. Design des expériences d'élevage à 36°C puis à 24°C des Tilapias *O. niloticus* pré-DS

Lot expérimental	Nombre initial de poissons	Durée de traitement à 36°C (jours)	Durée d'élevage à 24°C (jours)
lot 4	300	45	60
lot B (témoin à 24°C)	200		
lot 5	167	60	40
lot C (témoin à 24°C)	150		

Poids moyen initial de 0,011 g

Suivant le même protocole d'élevage, le **lot 5** de 167 poissons pré-DS d'un poids moyen de 0,011 g est placé dans le dernier bassin de 100 l du circuit fermé. Le lot témoin (**lot C**) comprend 150 individus. Les poissons du **lot 5** sont conservés à 36°C pendant 60 jours puis élevés pendant 40 jours à 24°C avant d'être sacrifiés, en même temps que le **lot C**.

Les poissons de ces 4 lots (**lots 4, 5, B et C**) sont comptés et pesés dès la fin du traitement puis tous les 15 jours après l'arrêt du traitement à 36°C. Ces contrôles permettent de suivre la croissance et la survie pendant et après le traitement.

2.2.4 Paramètres étudiés

Les poissons sont prélevés à l'aide d'une épuisette et placés dans un récipient contenant du phénoxy-2-éthanol, un anesthésique. Une fois mort, chaque individu est mesuré et pesé puis les gonades sont prélevées.

- **Observation des gonades et de leurs tissus (squash gonadique)**

Les gonades sont prélevées et placées entre lame et lamelle. Les lames sont observées sous microscope à un grossissement $\times 40$ pour réaliser un sexage.

Un appareil photo numérique fixé sur le microscope permet de prendre une photo des tissus pour chaque individu sexé (poissons traités et poissons témoins). Nous pouvons ainsi suivre l'évolution des gonades mâles et femelles des poissons traités par la température.

- **Diamètres ovocytaires**

Pour chaque femelle, le diamètre de 50 ovocytes est mesuré grâce au logiciel ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). Ceci permet d'obtenir un diamètre moyen des ovocytes pour chaque femelle des lots traités et du lot témoin.

- **Indice gonado-somatique**

A partir de 60 jours de traitement à 36°C, les gonades sont de taille suffisante pour être pesées afin de calculer l'indice gonado-somatique (IGS). Cet IGS correspond au rapport de la masse des deux gonades sur la masse totale de l'individu, ramené en pourcentage.

- **Suivi de la survie et de la croissance**

- Survie: le taux de survie correspond au rapport du nombre d'individus restants dans le lot sur le nombre d'individus présents au départ, ramené en pourcentage.

- Croissance: les poids individuels et les poids moyens réalisés au cours des expériences permettent de suivre la croissance des Tilapias élevés à 36°C et à 24°C.

- Rapport poids/longueur: les rapports poids/longueur des Tilapias traités et témoins sont déterminés grâce aux mesures de poids et longueur réalisées au cours des expériences.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 CARACTERISATION DU CIRCUIT FERME A 36°C

- La température

La température moyenne du circuit fermé était de $36,1 \pm 0,8^\circ\text{C}$. Au cours d'une journée normale où seul un renouvellement de 5 % de l'eau du circuit était effectué, la température restait quasi constante. Les jours où un prélèvement était effectué, le renouvellement étant plus important (10 % de l'eau du circuit), la température chutait au moment du prélèvement (le matin vers 9h00). La température remontait ensuite progressivement jusqu'à retrouver sa valeur initiale en soirée (Figure 6).

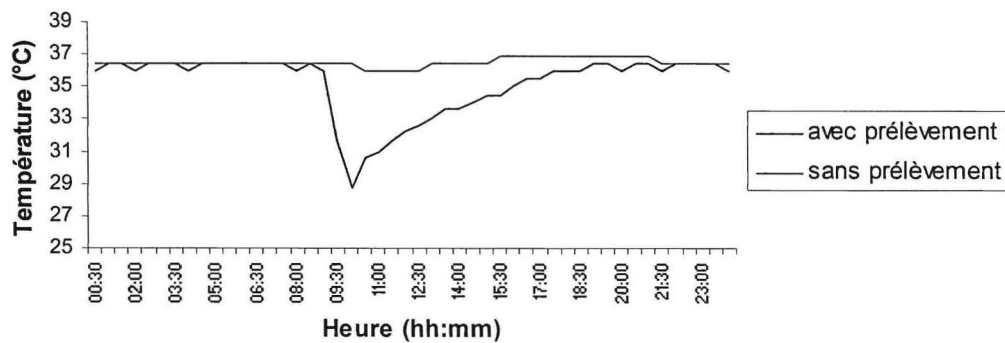


Figure 6. Évolution de la température du circuit fermé à 36°C au cours d'une journée avec prélèvement de poissons (renouvellement de 10 % de l'eau du circuit) et d'une journée sans prélèvement (renouvellement de 5 % de l'eau du circuit).

- **L'oxygène**

La moyenne du taux d'oxygène du circuit fermé était de $3,4 \pm 0,7$ mg/l avec un minimum de 2,3 mg/l et un maximum de 5,1 mg/l (Figure 7).

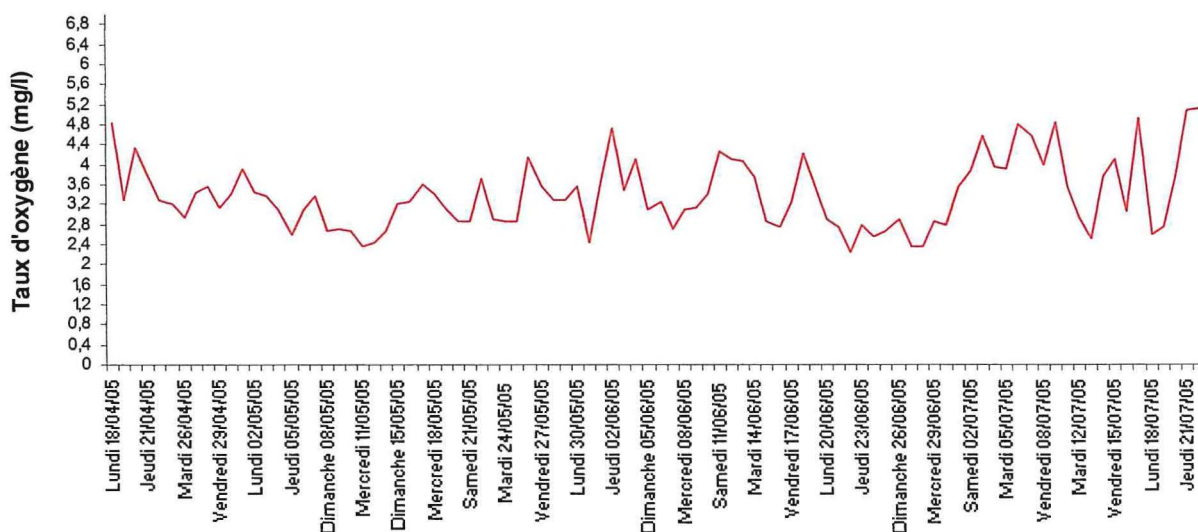


Figure 7. Variation du taux d'oxygène du circuit fermé à 36°C au cours de l'expérience.

3.2 SURVIE

- **Poissons post-DS**

Le taux de survie lors du traitement à 36°C est de 76,8 % pour le lot 1, et de 66,0 % pour les lots 2 et 3. Le témoin (lot A) présente un taux de survie de 89,0 % (Tableau 4). Les mortalités des poissons des lots traités sont notamment dues à de l'hydropisie abdominale (œdème).

Tableau 4. Survie des poissons post-DS au traitement à 36°C

Lot expérimental	Nombre initial	Nombre final après traitement	Survie lors du traitement (%)
lot A (témoin à 24°C)	500	445	89,0
lot 1 (à 36°C)	500	385	76,8
lot 2 (à 36°C)	150	99	66,0
lot 3 (à 36°C)	150	99	66,0

En ce qui concerne les taux de survie post-traitement des poissons transférés à 24°C après le traitement à 36°C, ils sont de 100 % pour le lot 1, 85,3% pour le lot 1" et 94,3 % pour le lot 2-3' (Tableau 5).

Tableau 5. Survie post-traitement des poissons post-DS traités à 36°C et remis à 24°C

Lot expérimental	Nombre au début du post-traitement	Nombre à la fin du post-traitement	Survie au post-traitement (%)
lot 1'	50	50	100,0
lot1''	34	29	85,3
lot 2-3'	50	47	94,3

- **Poissons pré-DS**

Le taux de survie au traitement du lot 4 est de 44 % contre 52,5 % pour le lot témoin (lot B). Celui du lot 5 est de 44,9 % contre 78,7 % pour le lot témoin (lot C). Les résultats obtenus chez les lots traités ne sont cependant pas significativement différents de ceux obtenus chez les lots témoins (Mann-Whitney : $U = 0$; $P > 0,05$; $n_1 = 2$; $n_2 = 2$) (Tableau 6).

Le taux de survie post-traitement du lot 4 est de 73,5 % contre 98,1 % pour le lot témoin (lot B). Celui du lot 5 est de 64% contre 94,1 % pour le lot témoin (lot C) (Tableau 6).

Tableau 6. Survie des poissons pré-DS au traitement à 36°C et post-traitement

Lot expérimental	Nombre initial	Nombre final après traitement	Survie au traitement (%)	Nombre à la fin du post-traitement	Survie au post-traitement (%)
lot B (<i>témoin</i>)	200	105	52,5	103	98,1
lot 4	300	132	44,0	97	73,5
lot C (<i>témoin</i>)	150	118	78,7	111	94,1
lot 5	167	75	44,9	48	64,0

3.3 EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LES GONADES

3.3.1 Observation des tissus mâles et femelles

- **Poissons post-DS**

- ❖ Après 15 et 30 jours de traitement

Après 15 et 30 jours de traitement les squashes gonadiques réalisés chez les individus mâles (Figure 8 et Figure 9) et femelles (Figure 10 et Figure 11) du lot témoin et des lots traités ne montrent pas de différence. A cette durée de traitement il n'y a donc pas d'effet visible des fortes températures sur les tissus des gonades.

Chez les mâles on commence à distinguer les structures lobulaires qui contiennent les cystes. Les cellules germinales contenues dans les cystes ont un aspect granuleux mais sont ici peu visibles, car elles sont très petites et que leur noyau n'est pas assez condensé.

Par ailleurs nous avons remarqué chez les mâles traités comme chez les témoins la présence de très nombreux mélanocytes organisés en ligne qui bordent les vaisseaux sanguins et ce phénomène est peu fréquent et très peu marqué chez les femelles.

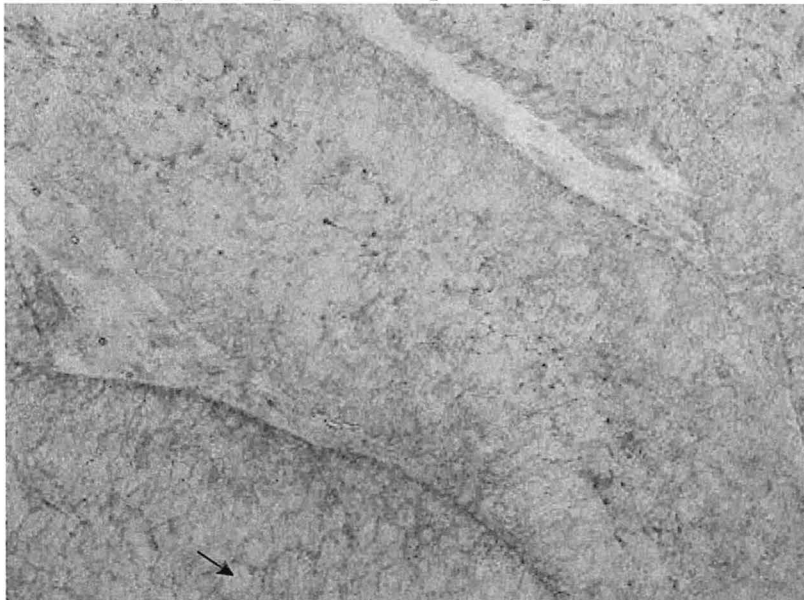


Figure 8. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS témoin à 30 jours (grossissement x40) (la flèche indique un cyste).

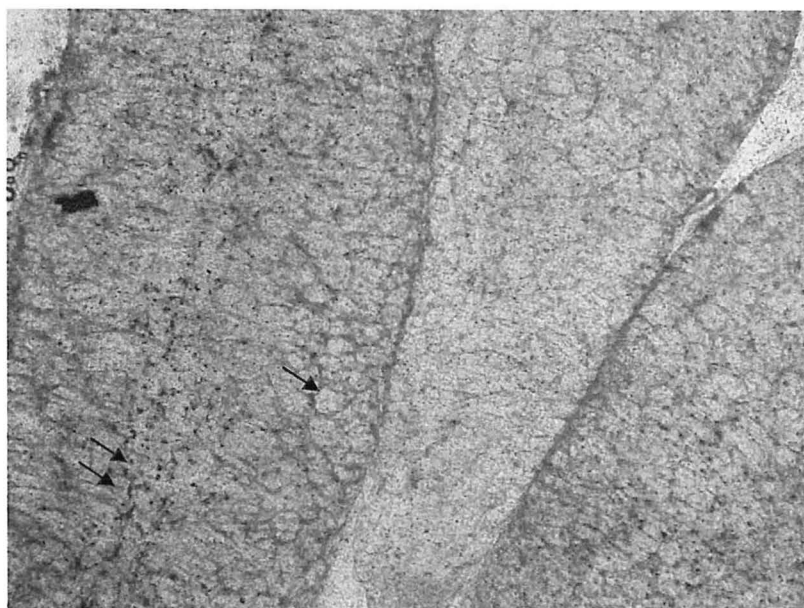


Figure 9. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS traité 30 jours (grossissement x40) (la flèche simple indique un cyste, la double flèche indique la ligne de mélanocytes).

Chez les femelles les ovocytes sont ronds (mis à part les déformations dues au squash gonadique) et semblent être au stade prévitellogénèse puisque le cytoplasme est plutôt clair.

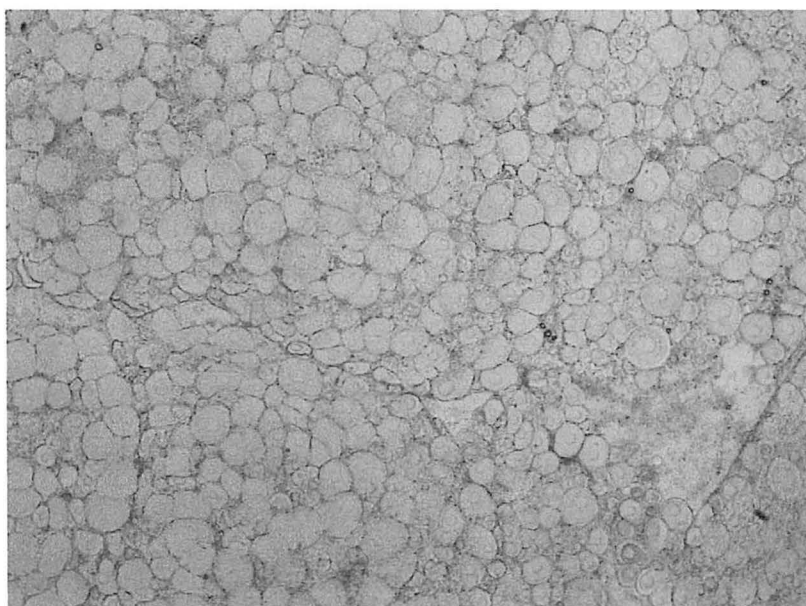


Figure 10. Observation microscopique d'une gonade femelle du lot post-DS témoin à 30 jours (grossissement x40).

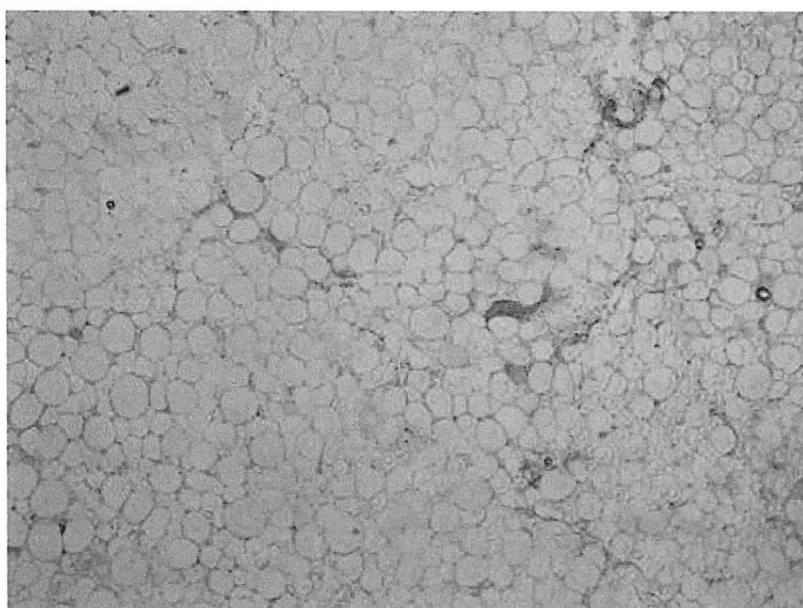


Figure 11. Observation microscopique d'une gonade femelle du lot post-DS traité 30 jours (grossissement x40).

❖ Après 45 et 60 jours de traitement

A partir de 45 jours de traitement, on observe une dégradation de la structure lobulaire chez les mâles des lots traités, on a l'impression que certains cystes se sont vidés de leur contenu (Figure 13, Figure 14 et Figure 15). Chez les mâles du lot témoin, les cystes sont bien structurés et on voit des points ou des taches sombres (brunes) : ce sont des cellules à des stades avancés de la spermatogenèse, soit des spermatocytes II soit des spermatides (Figure 12). Contrairement aux cellules des premiers stades, ces cellules sont visibles car elles ont un noyau condensé. Chez les mâles des lot traités, on n'observe pas ces points sombres ce qui laisse supposer qu'il n'y a pas de spermatocytes II ou de spermatides (Figure 13, Figure 14 et Figure 15).

Les squashes des femelles des lots traités, par rapport à ceux des femelles du lot témoin (Figure 16), montrent des ovocytes anormaux (Figure 17) voire peut-être en atresie, et à des stades plus précoces que ceux des femelles du lot témoin. En effet, chez les femelles du lot témoin une des deux vagues d'ovocytes est en vitellogenèse (Figure 18).

Par ailleurs, l'analyse des squashes gonadiques révèle, dans les lots traités, la présence d'individus intersexués puisque les gonades comportent quelques ovocytes dans un tissu qui semble être un tissu mâle (Figure 19 et Figure 20), une hypothèse notamment renforcée par le fait que l'on retrouve chez ces individus la ligne très marquée de mélanocytes que nous avons observé chez les mâles à 15 et 30 jours.

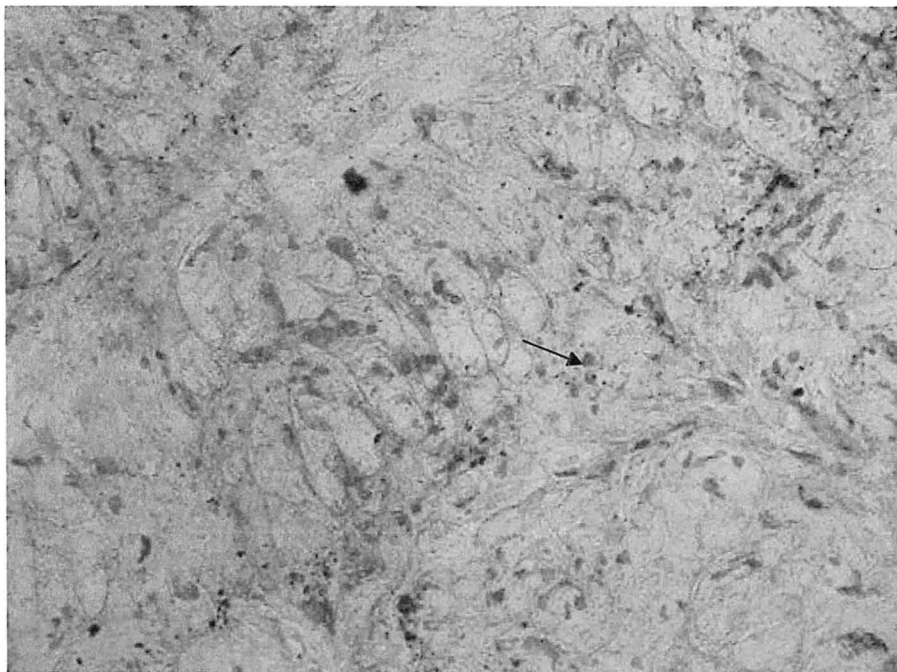


Figure 12. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS témoin à 60 jours (grossissement x40) (la flèche indique un spermatocyte II ou un spermatide).

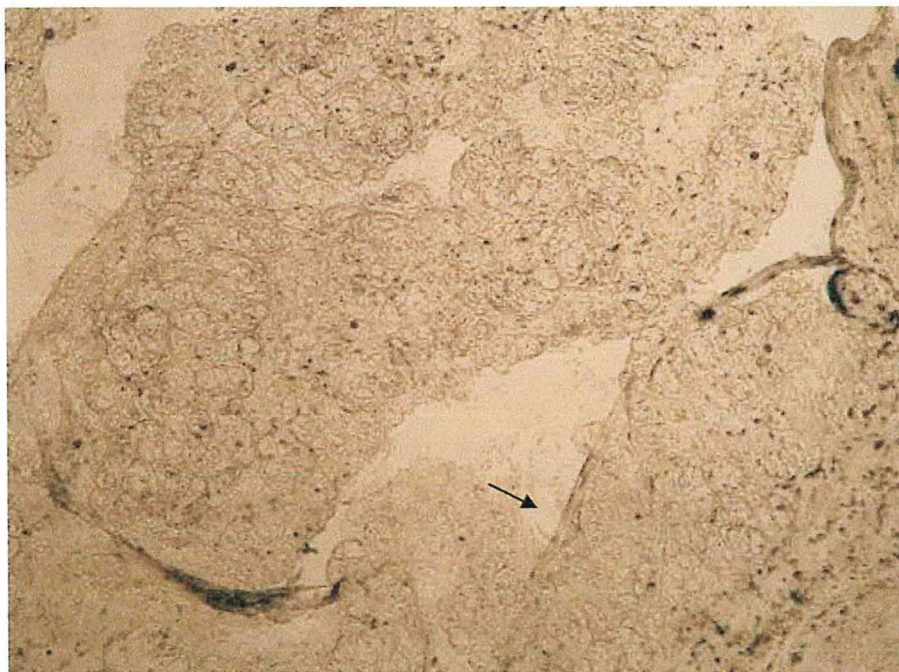


Figure 13. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS traité 60 jours (grossissement x40) (la flèche indique un cyste vide).



Figure 14. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS traité 60 jours (grossissement x40).



Figure 15. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS traité 60 jours (grossissement x40) (la flèche indique un cyste vide).

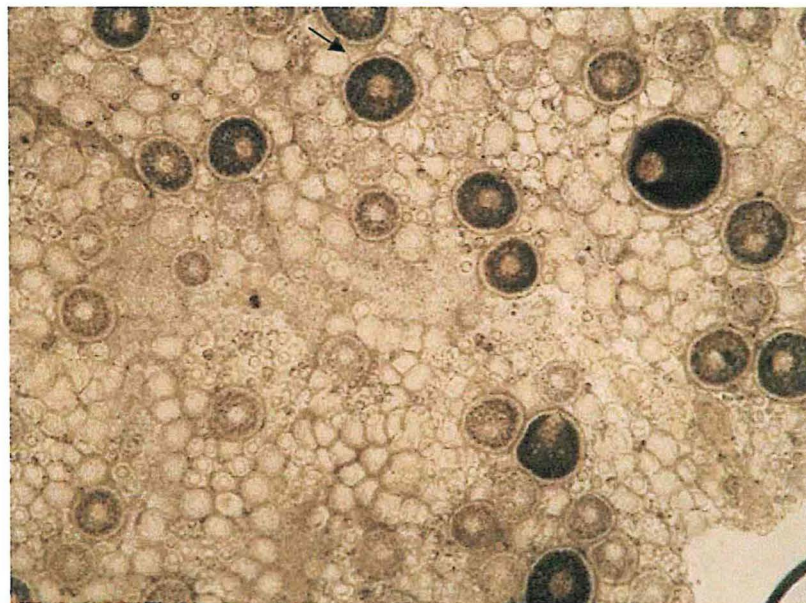


Figure 16. Observation microscopique d'une gonade femelle du lot post-DS témoin à 60 jours (grossissement x40) (la flèche indique un ovocyte en vitellogénèse).

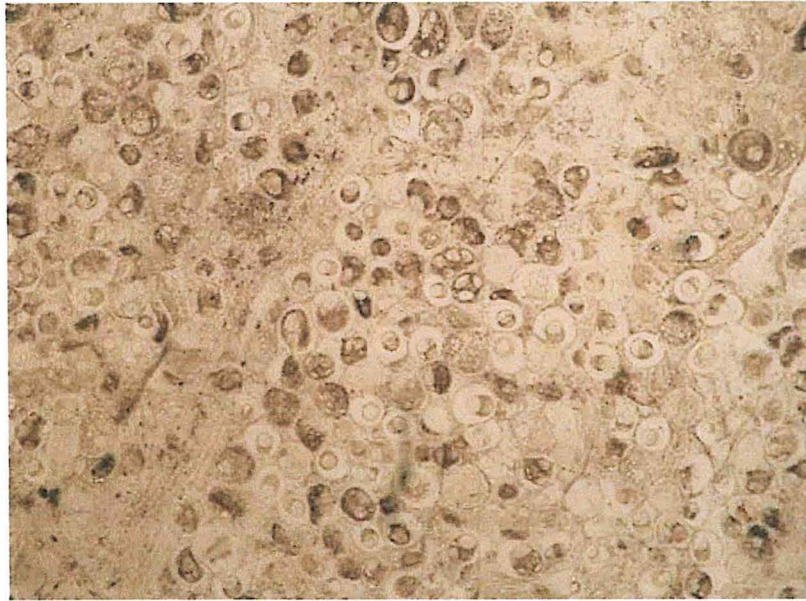


Figure 17. Observation microscopique d'une gonade femelle du lot post-DS traité 60 jours (grossissement x40).



Figure 18. Observation microscopique d'une gonade femelle du lot post-DS traité 60 jours (grossissement x40) (la flèche indique un ovocyte en atresie).



Figure 19. Observation microscopique d'une gonade d'un individu intersexué du lot post-DS traité 60 jours (grossissement x 40) (les flèches simples indiquent des ovocytes, les flèches doubles la ligne de mélanocytes).

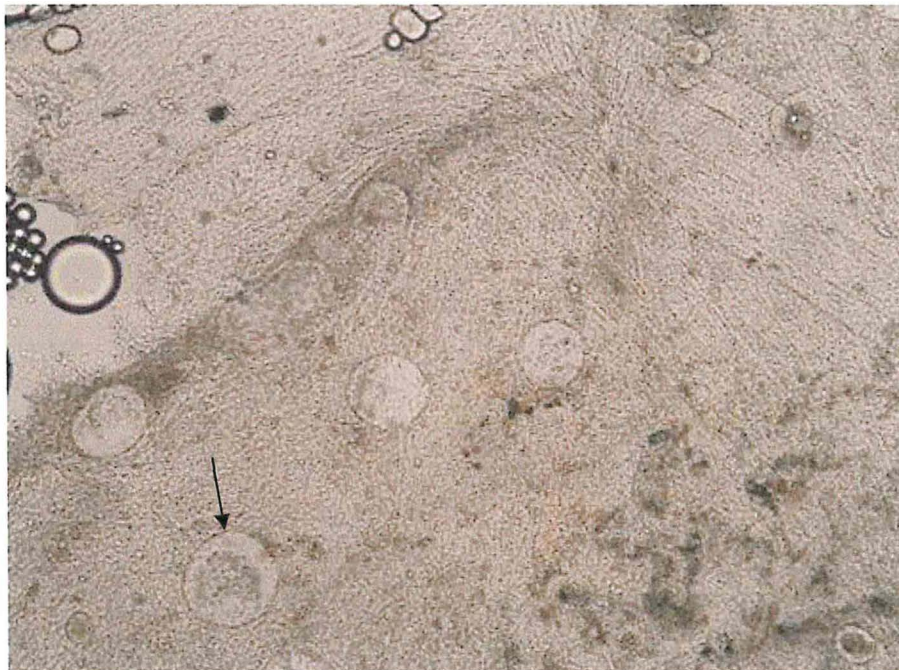


Figure 20. Observation microscopique d'une gonade d'un individu intersexué du lot post-DS traité 60 jours (grossissement x 100) (la flèche indique un ovocyte).

❖ Après 75 jours de traitement

Chez les mâles on retrouve les mêmes caractéristiques qu'à 45 et à 60 jours. En effet, chez certains mâles des lots traités, on retrouve une dégradation de la structure des lobules, les contours des cystes sont présents mais ils sont complètement vides (Figure 22). Chez les mâles du lot témoin, on voit toujours ces taches sombres qui marquent la présence de spermatocytes II ou de spermatides (Figure 21), cellules qui sont toujours absentes chez les mâles des lots traités (Figure 23).

A partir de 75 jours, il n'y a plus de femelles dans les lots traités, il ne reste que des mâles et des individus intersexués (Figure 25 et Figure 26).

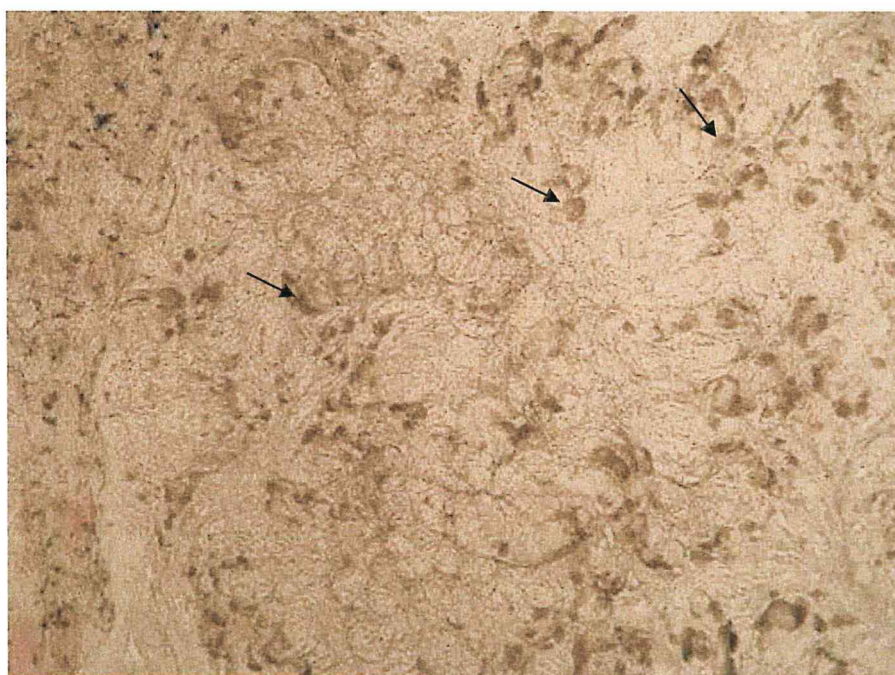


Figure 21. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS témoin à 75 jours (grossissement x40) (les flèches indiquent des spermatocytes II ou des spermatides).

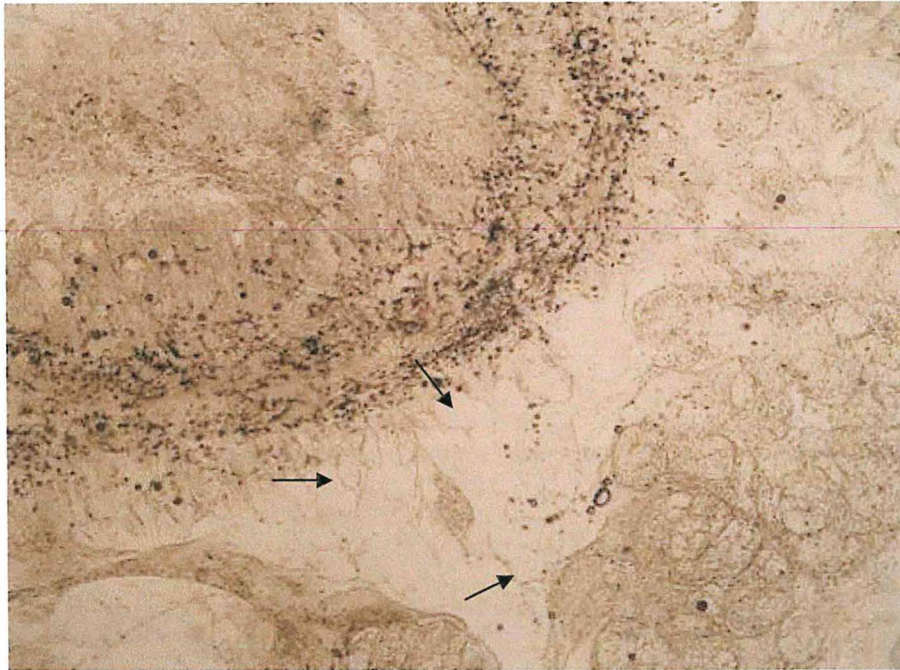


Figure 22. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS traité 75 jours (grossissement x40) (les flèches indiquent des cystes vides).

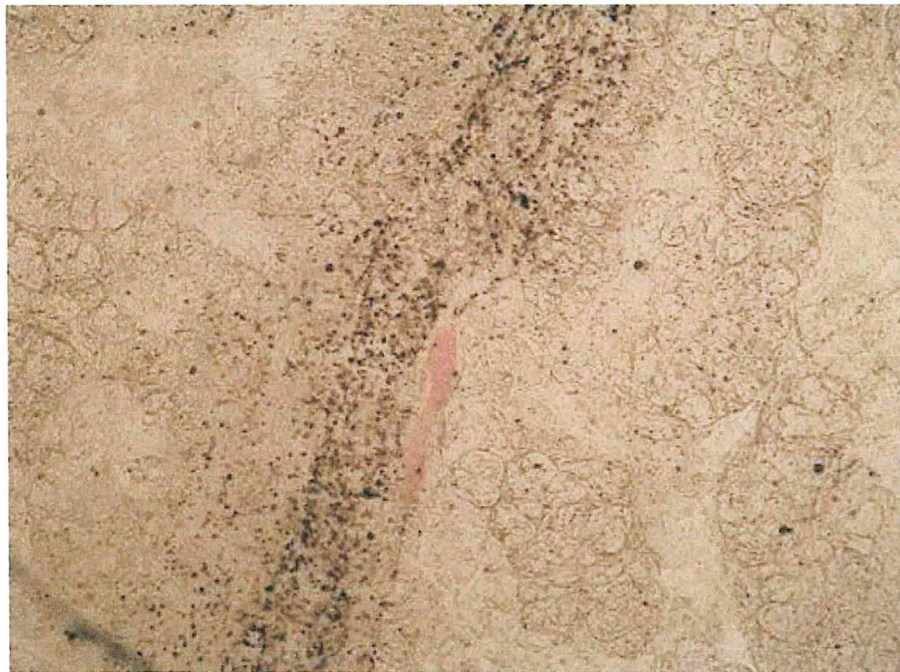


Figure 23. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS traité 75 jours (grossissement x40).

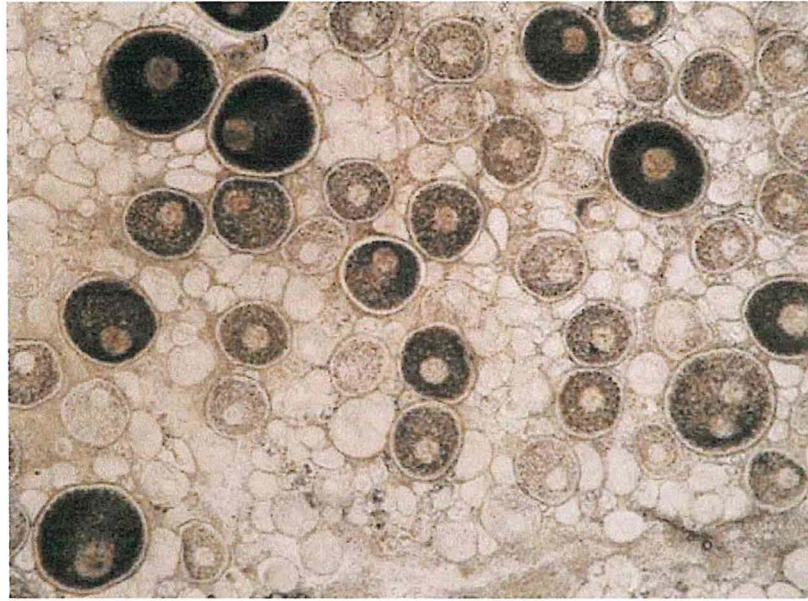


Figure 24. Observation microscopique d'une gonade femelle du lot post-DS témoin à 75 jours (grossissement x40).

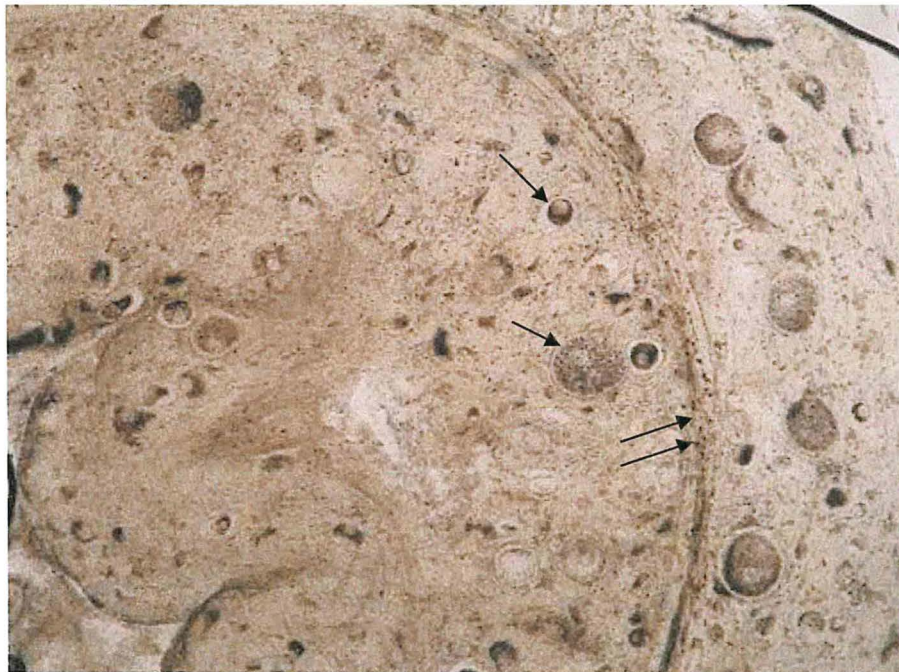


Figure 25. Observation microscopique d'une gonade d'un individu intersexué du lot post-DS traité 75 jours (grossissement x 40) (les flèches simples indiquent des ovocytes, les flèches doubles indiquent la ligne de mélanocytes).

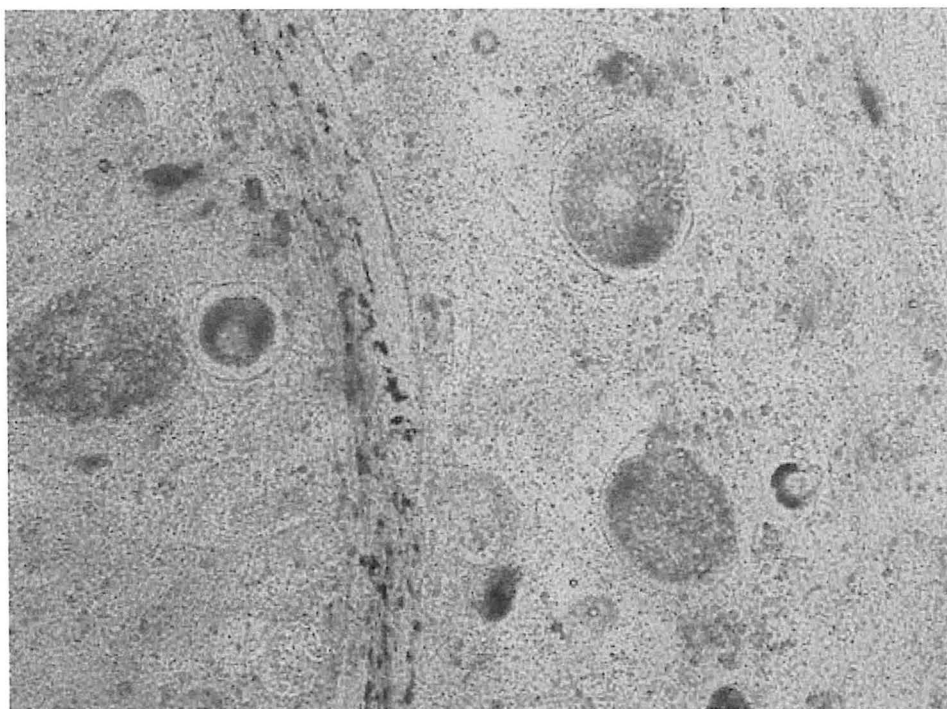


Figure 26. Observation microscopique d'une gonade d'un individu intersexué du lot post-DS traité 75 jours (grossissement x 100).

❖ Après 90 jours de traitement

Après 90 jours de traitement il n'y a que des mâles (Figure 28 et Figure 29) et des individus intersexués (Figure 31 et Figure 32). Les squashes gonadiques du lot témoin (Figure 27) et des individus traités présentent les mêmes caractéristiques que ceux réalisés à 75 jours.

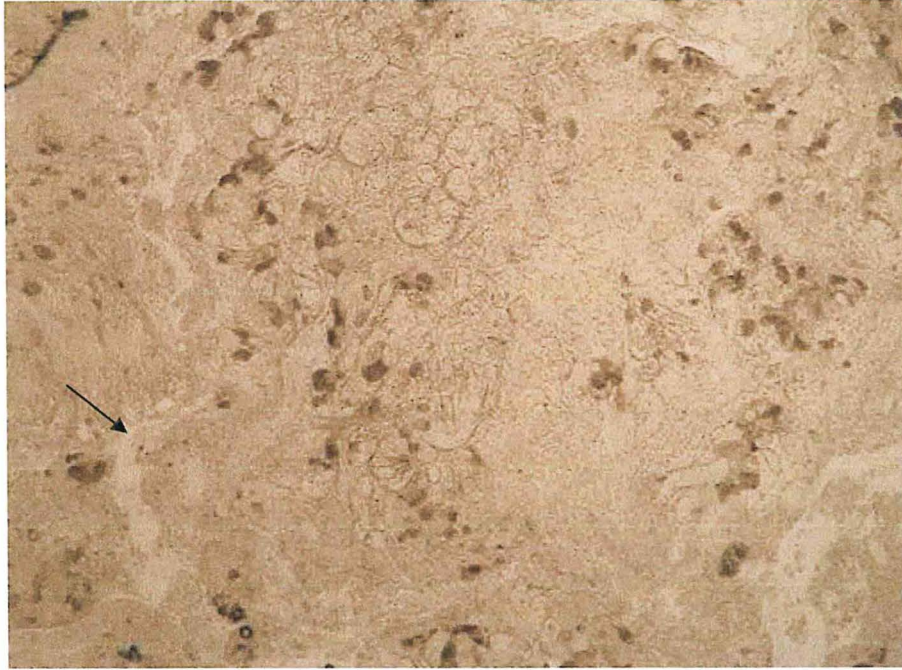


Figure 27. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS témoin à 90 jours (grossissement x40) (la flèche indique une lumière).

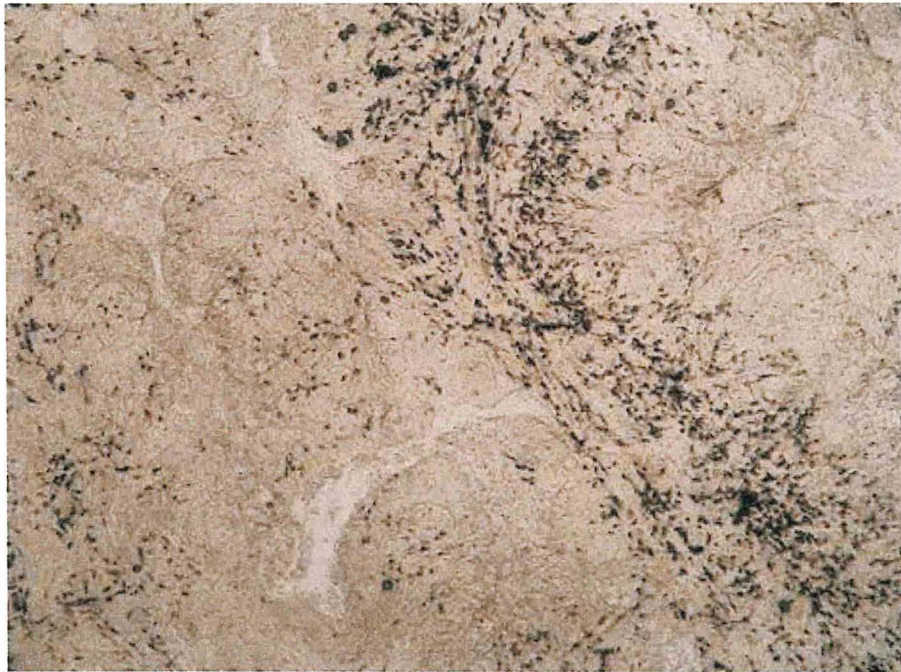


Figure 28. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS traité 90 jours (grossissement x40).

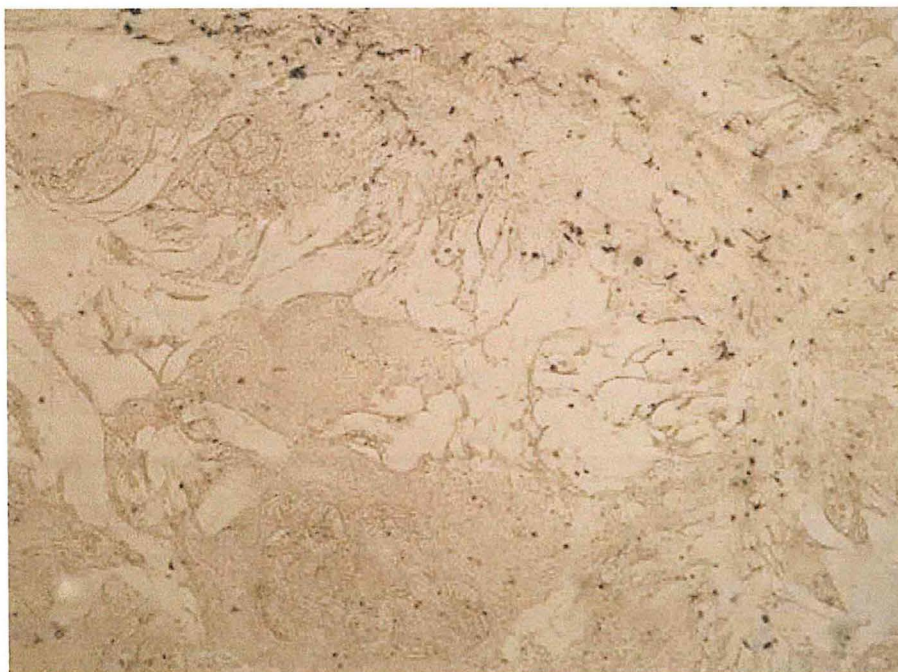


Figure 29. Observation microscopique d'une gonade mâle du lot post-DS traité 90 jours (grossissement x40).

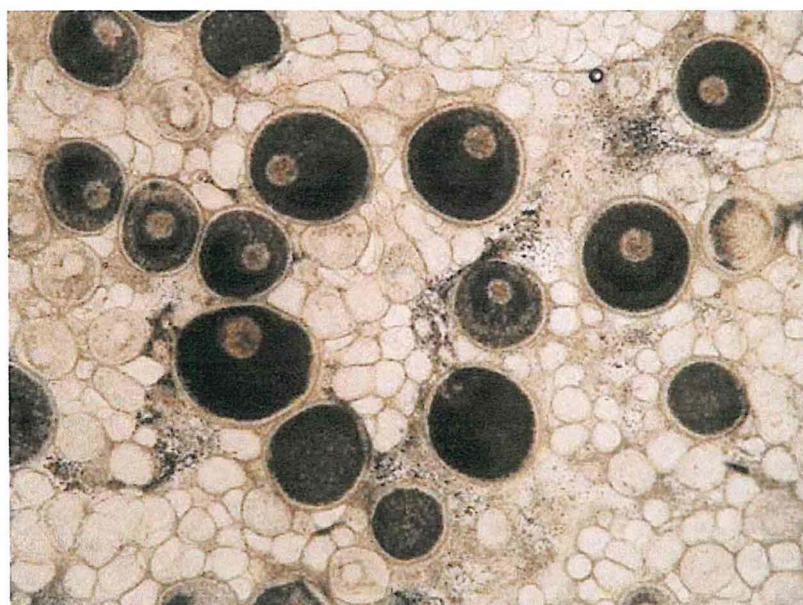


Figure 30. Observation microscopique d'une gonade femelle du lot post-DS témoin à 90 jours (grossissement x40).

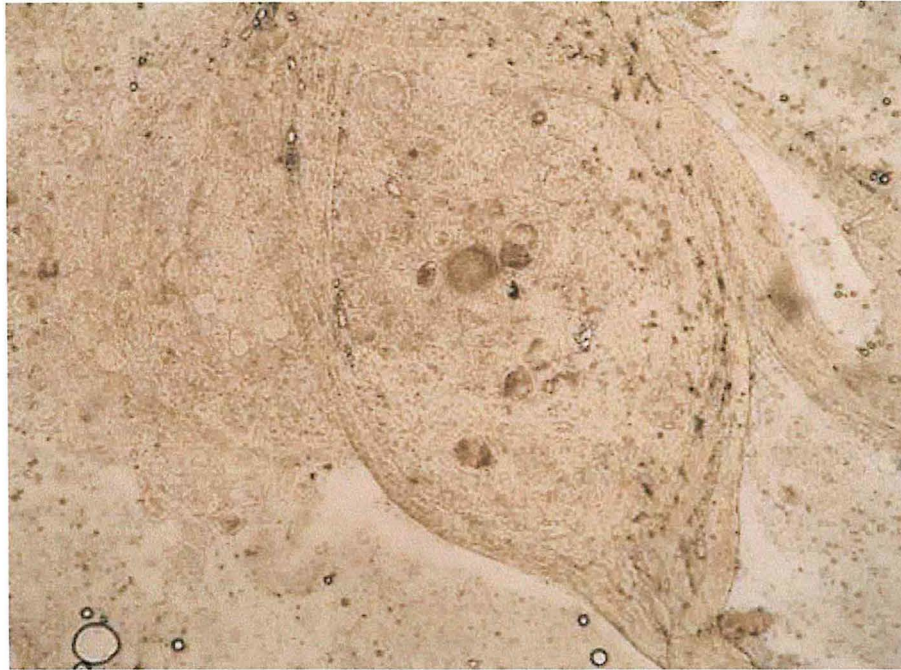


Figure 31. Observation microscopique d'une gonade d'un individu intersexué du lot post-DS traité 90 jours (grossissement x 40).

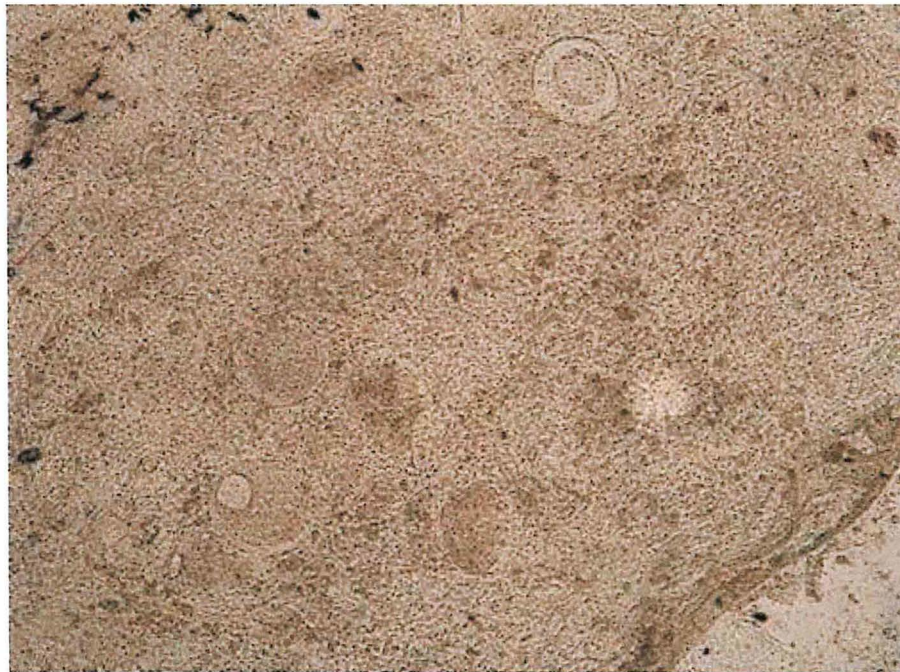


Figure 32. Observation microscopique d'une gonade d'un individu intersexué du lot post-DS traité 90 jours (grossissement x 100).

- **Poissons pré-DS**

Après 45 jours (lot 4) ou 60 jours (lot 5) de traitement à 36°C suivis d'un retour à 24°C, comparé au lot témoin (Figure 33 et Figure 34), on n'observe que des tissus mâles et aucun tissu gonadique femelle (Figure 35) sauf chez un seul individu dont le tissu gonadique est mâle mais contient quelques ovocytes (Figure 36 et Figure 37).

- ❖ Lot témoin



Figure 33. Observation microscopique de la gonade d'un individu mâle du lot témoin pré-DS (grossissement x 40).

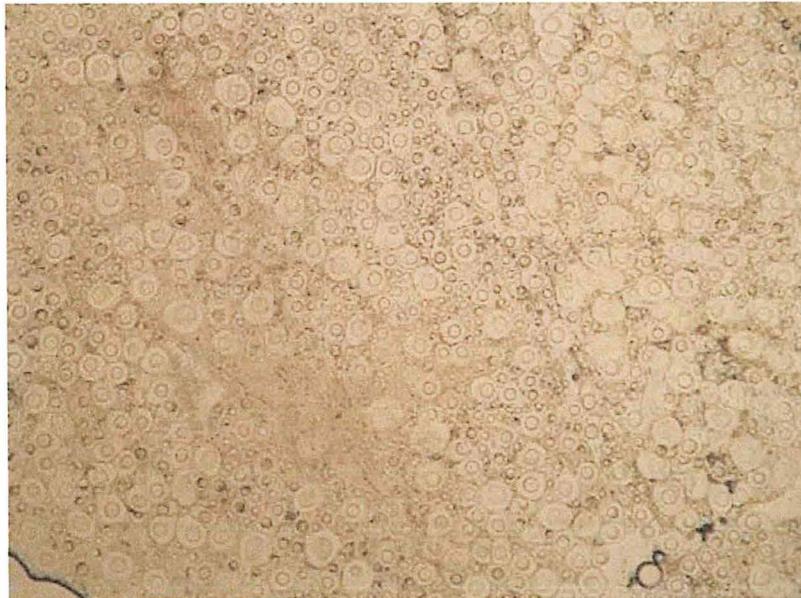


Figure 34. Observation microscopique de la gonade d'un individu femelle du lot témoin pré-DS (grossissement x 40).

❖ Lot traité



Figure 35. Observation microscopique de la gonade d'un individu mâle du lot pré-DS traité à 36°C puis remis à 24°C (grossissement x 40).

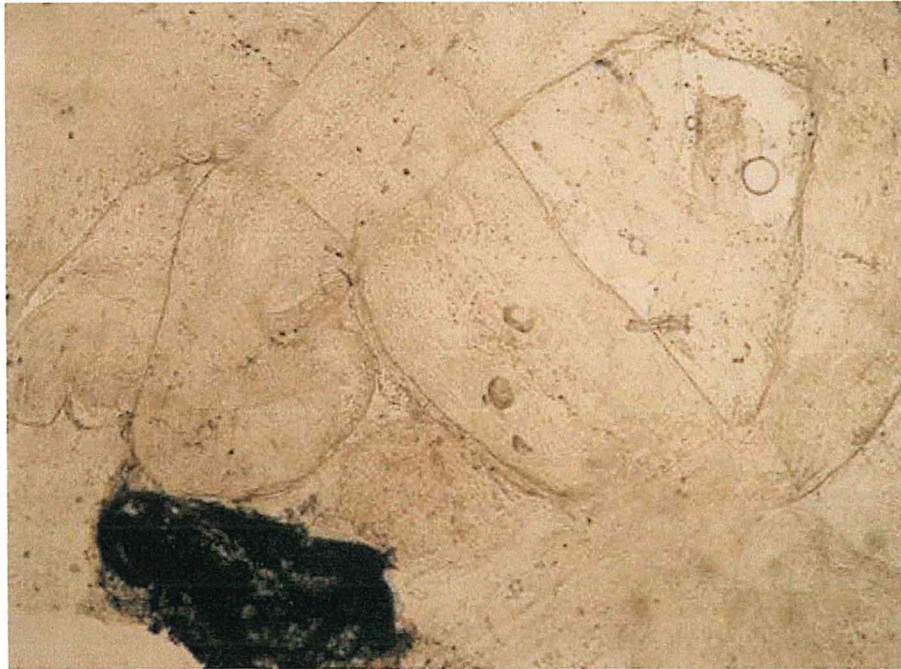


Figure 36. Observation microscopique de la gonade d'un individu intersexué du lot pré-DS traité à 36°C puis remis à 24°C (grossissement x 40).



Figure 37. Observation microscopique de la gonade d'un individu intersexué du lot pré-DS traité à 36°C puis remis à 24°C (grossissement x 100).

3.3.2 Sex-ratios

- **Poissons post-DS**

Les sex-ratios des lots traités à 36°C et du lot témoin, obtenus lors des sexages à 15, 30, 45, 60, 75 et 90 jours, sont répertoriés dans le Tableau 7.

A 15 jours on observe 28 % de femelles dans le lot 1, 16 % dans le lot 2, 48% dans le lot 3 et 26 % dans le lot témoin.

A 30 jours on observe 22 % de femelles dans le lot 1 et 34 % dans le lot témoin.

A 45 jours il y a apparition d'un certain pourcentage d'individus intersexués dans les lots traités. On a ainsi 14 % de femelles et 6 % d'intersexués dans le lot 1, 24 % de femelles et 4 % d'intersexués dans le lot 2 et 16 % de femelles et 12 % d'intersexués dans le lot 3. Le lot témoin pour sa part présente 16 % de femelles.

A 60 jours les individus intersexués sont toujours présents dans le lot traité (lot 1) : ils représentent 10 % contre 8 % pour les femelles. Dans le lot témoin on a 20 % de femelles.

A partir de 75 jours il y a absence de femelles dans les sex-ratios des lots traités, il ne reste plus que des individus mâles et des intersexués.

A 75 jours on a donc 16 % d'intersexués dans les lots 1 et 2 et 15 % dans le lot 3.

A 90 jours il y a 10 % d'intersexués dans le lot 1 et 12 % dans le lot 2.

Il est intéressant de noter qu'au fur et à mesure du traitement, la part de mâles augmente par rapport à la part femelles et intersexués.

Tableau 7. Sex-ratios des poissons post-DS traités à 36°C

Lot expérimental	Durée du traitement (jours)					
	15j	30j	45j	60j	75j	90j
lot A (témoin à 24°C)						
mâles (%)	74	66	84	74	73	69
femelles (%)	26	34	16	26	27	31
lot 1 (à 36°C)						
mâles (%)	72	78	80	82	84	90
femelles (%)	28	22	14	8	0	0
intersexués (%)	0	0	6	10	16	10
lot 2 (à 36°C)						
mâles (%)	74		72		84	88
femelles (%)	16		24		0	0
intersexués (%)	0		4		16	12
lot 3 (à 36°C)						
mâles (%)	52		72		85	
femelles (%)	48		16		0	
intersexués (%)	0		12		15	

- **Poissons pré-DS**

Les sex-ratios des lots traités à 36°C et des lots témoins sont présentés dans le Tableau 8.

Dans le lot traité 4 on observe 100 % de mâles contre 96 % dans le lot témoin (lot B). Dans le lot 5 on observe 98 % de mâles (et 2 % d'intersexués) contre 82 % de mâles dans le lot témoin (lot C).

Les résultats des lots traités sont significativement différents de ceux des lots témoins ($\chi^2 = 4,08$ pour les lots 4 et B, $\chi^2 = 14,22$ pour les lots 5 et C, $ddl = 1$, $P < 0,05$).

Tableau 8. Sex-ratios des poissons pré-DS

Lot expérimental	mâles (%)	femelles (%)	intersexués (%)	Statistique
lot B (témoin à 24°C)	96	4	0	$\chi^2 = 4,08^*$
lot 4 (à 36°C)	100	0	0	
lot C (témoin à 24°C)	82	18	0	$\chi^2 = 14,22^*$
lot 5 (à 36°C)	98	0	2	

* : différence significative à $p < 0,05$

χ^2 : les valeurs sont calculées sur la base du sex-ratio du lot témoin, $ddl = 1$

3.3.3 Diamètre ovocytaire des poissons post-DS

On observe au sein du lot témoin comme au sein des lots traités (sauf en l'absence de femelles) une augmentation du diamètre ovocytaire au cours du temps : de $95 \times 10^{-3} \mu\text{m}$ à $172 \times 10^{-3} \mu\text{m}$ dans le lot témoin et de $102 \times 10^{-3} \mu\text{m}$ à $149 \times 10^{-3} \mu\text{m}$ dans le lot traité 1 (Tableau 9).

Les diamètres ovocytaires des femelles lots traités ne sont pas significativement différents de ceux des femelles du lot témoin (F de 0,68 à 2,72 ; ddl de 16 à 44 ; $P > 0,05$).

Tableau 9. Diamètre ovocytaire des poissons post-DS au cours du traitement à 36°C (diamètre $\times 10^{-3} \mu\text{m}$)

Lot expérimental	Durée du traitement (jours)					
	15j	30j	45j	60j	75j	90j
lot A (témoin à 24°C)	95 ± 31	96 ± 27	117 ± 46	154 ± 83	162 ± 72	172 ± 80
lot 1 (à 36°C)	102 ± 26	102 ± 29	125 ± 32	149 ± 37	absence de femelle	absence de femelle
lot 2 (à 36°C)	100 ± 30		143 ± 62		absence de femelle	absence de femelle
lot 3 (à 36°C)	104 ± 31		119 ± 29		absence de femelle	

3.3.4 Indice gonado-somatique des poissons post-DS

On observe une diminution de l'indice gonado-somatique chez les lots traités entre 75 et 90 jours alors que chez le lot témoin l'indice augmente (Tableau 10).

A 60 jours dans le lot 1 l'IGS est de 1,1 % alors que dans le lot témoin il est de 2 %. L'IGS du lot traité n'est cependant pas significativement différent de celui du lot témoin ($F = 0,68$; $ddl = 73$; $P > 0,05$).

A 75 jours en ce qui concerne les lots traités, l'IGS est de 1,1 % pour le lot 1, 0,8 % pour le lot 2 et de 0,7 pour le lot 3. Le lot témoin a un IGS de 2,2 %.

A 90 jours les lots traités ont un IGS de 0,9 % pour le lot 1 et de 0,7 pour le lot 2. Le lot témoin a un IGS de 2,6 %.

A 75 et 90 jours les IGS des lots traités sont significativement inférieurs à ceux du lot témoin (F de 15,87 à 45,29 ; ddl de 75 à 102 ; $P < 0,05$).

Tableau 10. Indice gonado-somatique des poissons post-DS au cours du traitement à 36°C

Lot expérimental	Durée du traitement (jours)		
	60j	75j	90j
lot A (témoin à 24°C)	2 ± 2,1 %	2,2 ± 1,1%	2,6 ± 1,7 % *
lot 1 (à 36°C)	1,1 ± 0,8 %	1,1 ± 1,1 % *	0,9 ± 0,7 % *
lot 2 (à 36°C)		0,8 ± 0,6 % *	0,7 ± 0,4 % *
lot 3 (à 36°C)		0,7 ± 0,5 % *	

* : différence significative à $p < 0,05$ (ANOVA)

3.4 EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE

- **Poissons post-DS**

- ❖ Poids moyen

A 15 jours le poids moyen du lot traité est de 4,9 g, celui du lot témoin est de 5,3 g (Tableau 11). Ces deux résultats ne sont pas significativement différents ($F = 3,01$; $ddl = 99$; $P > 0,05$).

A partir de 30 jours les poids moyens du lot traité sont significativement inférieurs à ceux du lot témoin (F de 34,47 à 168,55 ; ddl de 99 à 102 ; $P < 0,05$) : de 6,8 à 14,7 g pour le lot traité et de 5,3 à 32,6 g pour le lot témoin (Tableau 11 et Figure 38).

Tableau 11. Poids moyen des poissons post-DS au cours du traitement à 36°C et du lot témoin à 24°C

Lot expérimental	Durée du traitement (jours)						
	0j	15j	30j	45j	60j	75j	90j
lot A (témoin à 24°C)	2,7 g	5,3 ± 1,1 g	9,2 ± 2,2 g	15,9 ± 3,5 g	22,9 ± 6,0 g	29,0 ± 8,1 g	32,6 ± 11,3 g
lot 1 (à 36°C)	2,7 g	4,9 ± 1,2 g	6,8 ± 1,8 g *	8,3 ± 2,6 g *	10,2 ± 3,4 g *	13,6 ± 3,8 g *	14,7 ± 4,5 g *

* : différence significative à $p < 0,05$ (ANOVA)

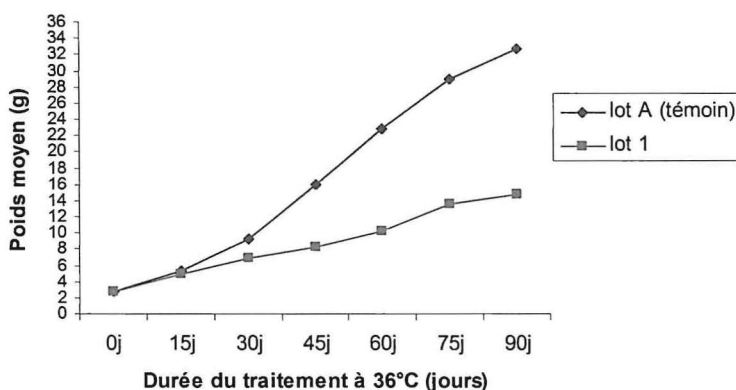


Figure 38. Évolution du poids moyen des poissons post-DS au cours du traitement à 36°C et du lot témoin à 24°C.

❖ Rapport poids/longueur

Tout au long du traitement à 36°C les rapports poids/longueur du lot traité sont significativement inférieurs à ceux du lot témoin (F de 4,58 à 155,21 ; ddl de 99 à 102 ; $P < 0,05$) : de 0,75 à 1,61 pour le lot traité et de 0,81 à 2,63 pour le lot témoin (Tableau 12 et Figure 39).

Tableau 12. Rapport poids/longueur des poissons post-DS au cours du traitement à 36°C

Lot expérimental	Durée du traitement					
	15j	30j	45j	60j	75j	90j
lot A (témoin à 24°C)	0,81 ± 0,13 g	1,19 ± 0,20 g	1,71 ± 0,27 g	2,16 ± 0,41 g	2,50 ± 0,52 g	2,63 ± 0,70 g
lot 1 (à 36°C)	0,75 ± 0,13 g *	0,94 ± 0,18 g *	1,09 ± 0,27 g *	1,26 ± 0,32 g *	1,50 ± 0,30 g *	1,61 ± 0,35 g *

* : différence significative à $p < 0,05$ (ANOVA)

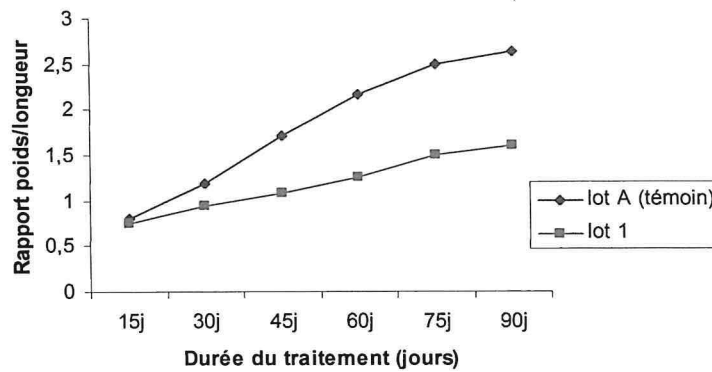


Figure 39. Évolution du rapport poids/longueur des poissons post-DS au cours du traitement à 36°C et du lot témoin à 24°C.

• Poissons pré-DS

Le poids moyen du lot traité 4 est de 6,4 g, celui du lot témoin B est de 7,0 g. Le rapport poids/longueur moyen du lot traité 4 est de 0,88, celui du lot témoin B est de 0,95.

Le poids moyen et le rapport poids/longueur moyen du lot traité 4 ne sont cependant pas significativement différents de ceux du lot témoin B ($F = 0,57$; $ddl = 99$; $P > 0,05$ pour le poids et $F = 0,99$; $ddl = 99$; $P > 0,05$ pour le rapport poids/longueur).

Le poids moyen et le rapport poids/longueur moyen du lot traité 5 sont significativement inférieurs à ceux du lot témoin C ($F = 14,21$; $ddl = 96$; $P < 0,05$ pour le poids et $F = 12,72$; $ddl = 96$; $P < 0,05$ pour le rapport poids/longueur) : poids moyen de 3,7 g pour le traité 5 contre 5,5 g pour le lot témoin C, rapport poids/longueur moyen de 0,64 pour le lot traité 5 contre 0,81 pour le lot témoin C.

Tableau 13. Poids moyen et rapport poids /longueur des poissons pré-DS à la fin de l'expérience

	Lot B (témoin à 24°C)	Lot 4 (à 36°C)	Lot C (témoin à 24°C)	Lot 5 (à 36°C)
Poids moyen	7,0 ± 3,0 g	6,4 ± 4,2 g	5,5 ± 2,7 g	3,7 ± 1,8 g *
Rapport poids/longueur moyen	0,95 ± 0,28	0,88 ± 0,38	0,81 ± 0,27	0,64 ± 0,21 *

* : différence significative à $p < 0,05$ (ANOVA)

3.5 LOTS DE POISSONS POST-DS TRAITES A 36°C PUIS TRANSFERES A 24°C

3.5.1 Observation des tissus des gonades

Après 75 ou 90 jours à 36°C puis 30 jours à 24°C, on trouve quelques individus mâles qui présentent des cystes vides (Figure 40), d'autres n'ont pas de spermatoocytes II ni de spermatides (Figure 41), la majeure partie a des spermatoocytes II (Figure 42) mais une spermatogenèse retardée par rapport aux individus du lot témoin à 90 jours. Quelques individus intersexués sont encore présents (Figure 43) et chez certains individus les tissus sont recolonisés par des ovocytes (recolonisation plus ou moins importante selon les individus) (Figure 44, Figure 45 et Figure 46).



Figure 40. Observation microscopique de la gonade d'un individu mâle du lot post-DS traité à 36°C puis remis à 24°C (grossissement x 40) (la flèche indique un cyste vide).

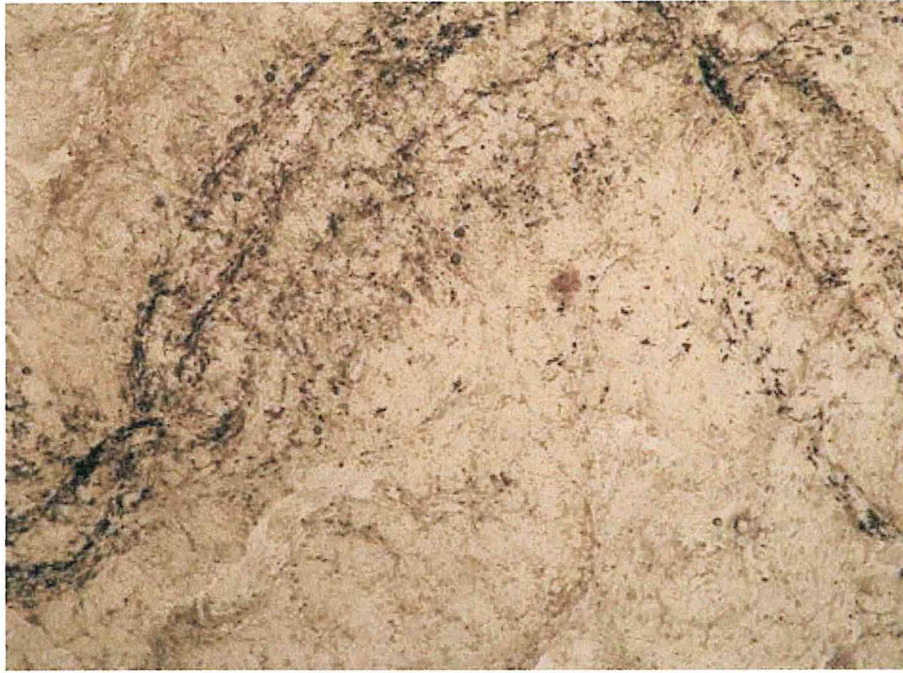


Figure 41. Observation microscopique de la gonade d'un individu mâle du lot post-DS traité à 36°C puis remis à 24°C (grossissement x 40).

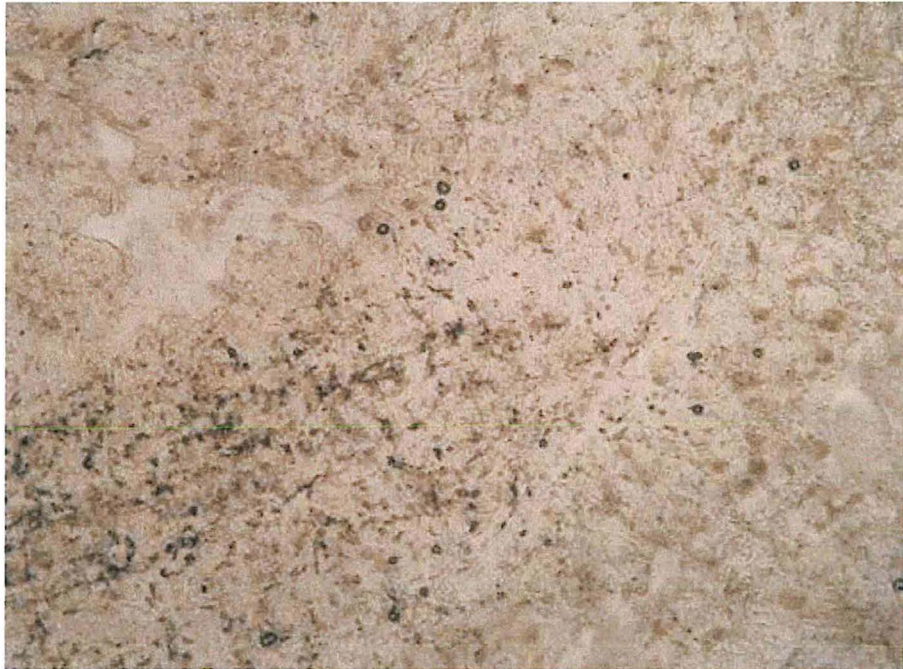


Figure 42. Observation microscopique de la gonade d'un individu mâle du lot post-DS traité à 36°C puis remis à 24°C (grossissement x 40).



Figure 43. Observation microscopique de la gonade d'un individu intersexué du lot post-DS traité à 36°C puis remis à 24°C (grossissement x 40).

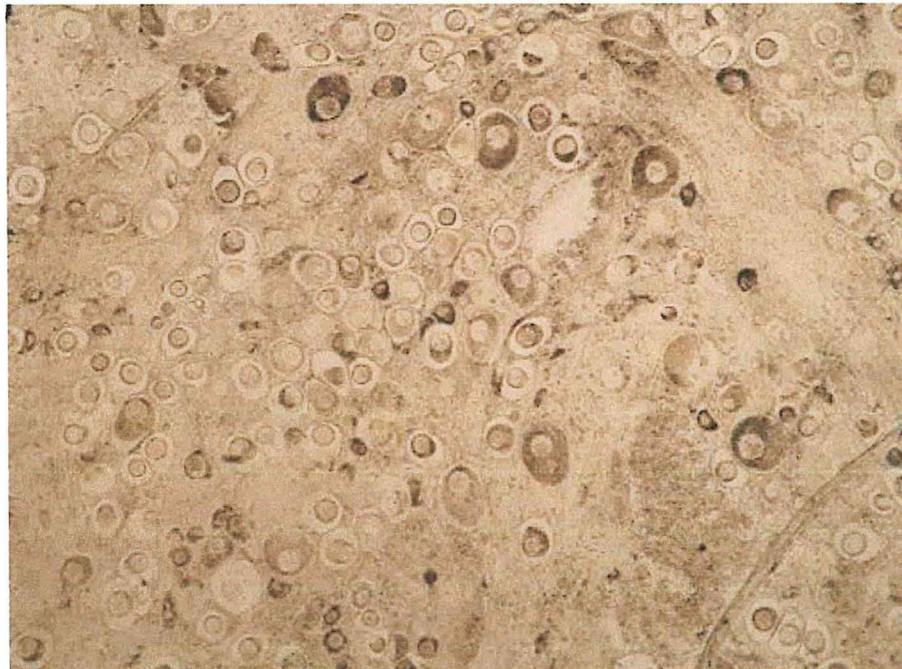


Figure 44. Observation microscopique de la gonade d'un individu intersexué du lot post-DS traité à 36°C puis remis à 24°C : recolonisation par des ovocytes (grossissement x 40).



Figure 45. Observation microscopique de la gonade d'un individu du lot post-DS traité à 36°C puis remis à 24°C : recolonisation par des ovocytes (grossissement x 100).

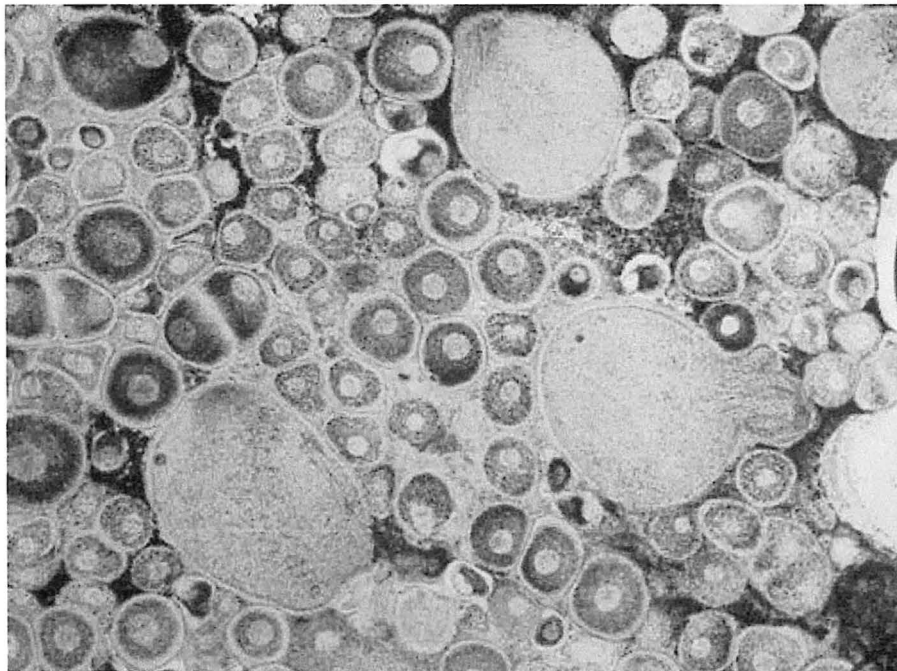


Figure 46. Observation microscopique de la gonade d'un individu intersexué du lot post-DS traité à 36°C puis remis à 24°C : recolonisation par des ovocytes (grossissement x 40).

3.5.2 Indice gonado-somatique

Même après le transfert à 24°C, l'indice gonado-somatique des poissons des lots traités continue à diminuer.

En effet l'IGS du lot traité 1' est de 1,1 % à 75 jours de traitement à 36°C et de 0,5 % après 30 jours à 24°C (l'IGS du lot témoin est de 2,2 % à 75 jours et de 3,1 % 30 jours plus tard). L'IGS du lot traité 1" est de 0,9 % à 90 jours de traitement à 36°C et de 0,5 % après 12 jours à 24°C (l'IGS du lot témoin est de 2,6 % à 90 jours et de 3,1 % 12 jours plus tard) (Tableau 14).

Tableau 14. Indice gonado-somatique des poissons post-DS traités à 36°C puis transférés à 24°C

75j à 36°C + 30j à 24°C	IGS (%)	
	75j	+ 30j
lot témoin (à 24°C)	2,2 ± 1,1	3,1 ± 3,8
lot 1'	1,1 ± 1,1	0,5 ± 0,3
90j à 36°C + 12j à 24°C	90j	+ 12j
lot témoin (à 24°C)	2,6 ± 1,7	3,1 ± 3,8
lot 1"	0,9 ± 0,7	0,5 ± 0,4

3.6 DISCUSSION

Les taux de survie supérieurs à 65 % obtenus chez les poissons post-DS à l'issue du traitement à 36°C pendant 90 jours sont inférieurs à ceux des lots témoins (le taux de survie du témoin est à 89 %) mais restent acceptables dans un contexte de production aquacole. Il est donc possible d'élever des poissons post-DS à une température de 36°C sans qu'il y ait un effet majeur sur la survie. Il serait par conséquent envisageable de tester des températures d'élevage supérieures. Baras *et al.* (2001), lors de leurs expériences sur l'effet de la température sur des juvéniles d'*Oreochromis niloticus* avaient obtenu des taux de survie de 41,9 % pour des poissons élevés à 37°C. Par ailleurs, des mortalités ont été observées après 13 jours de traitements sur des alevins d'*O. niloticus* à 10 jours post-fécondation à 38°C (Acosta, Clota et Baroiller, communication personnelle). La température de 38°C semble donc avoir des effets beaucoup plus néfastes sur la survie que la température de 36°C ou 37°C. D'autres expériences devraient être réalisées à 36°C et 37°C pour voir si ces tendances se confirment. La température de 39°C quant à elle correspond à la température létale et n'est donc pas exploitable.

Il y a bien un effet de la température sur les gonades. En effet, à partir de 45 jours de traitement à 36°C on observe l'apparition d'individus intersexués (individus présentant une structure gonadique apparemment "mâle" avec quelques ovocytes) et la diminution du pourcentage de femelles. Le pourcentage d'intersexués qui apparaissent ne correspond cependant pas au pourcentage de femelles qui disparaissent. A partir de 75 jours de traitement il n'y a plus de femelles, il ne reste que des individus mâles et des individus intersexués.

De plus, à partir de 45 jours de traitement à 36°C, on trouve chez de nombreux mâles des cystes vidés de leur contenu, chez les autres il n'y a pas de spermatozoïdes ni de spermatides contrairement aux individus du lot témoin. Deux hypothèses peuvent expliquer cette absence de cellules à un stade avancé de la spermatogenèse : soit la spermatogenèse est retardée par la température élevée, soit la température élevée a détruit ces cellules. Cette dernière hypothèse est cohérente avec le fait que, chez les Mammifères, les spermatogonies et les spermatozoïdes sont les plus résistants alors que les spermatozoïdes et les spermatides montrent un plus haut degré de sensibilité (Young, 1927, Lue *et al.*, 1999).

Par ailleurs on observe une baisse significative de l'indice gonado-somatique à partir de 75 jours de traitement.

On a donc bien un effet stérilisant de la température, au moins sur les cellules germinales les plus avancées dans leur gamétogenèse. Cependant, la seule approche du "squash gonadique" ne permet évidemment pas de s'assurer de la totale disparition des cellules germinales dans les gonades des individus traités.

Contrairement à ce qu'avaient remarqué Ito *et al.* (2003) chez *Odonthestes bonariensis*, nous avons constaté que l'exposition à 36°C a bloqué la croissance des gonades.

Seuls les diamètres ovocytaires, lorsque les femelles étaient encore présentes dans les lots traités, ne semblent pas avoir été affectés par la température. Les ovocytes sont cependant difformes chez la plupart des femelles.

Cet effet de la température sur les gonades chez *O. niloticus*, tout comme chez *Odonthestes bonariensis* et chez *Patagonina hatcheri* (Ito *et al.*, 1998), a été observé chez les mâles comme chez les femelles alors que chez les Mammifères seules les gonades mâles sont sensibles à la chaleur.

Toutefois, les conséquences de l'exposition des gonades aux fortes températures sont réversibles puisque, lorsque les poissons traités 75 et 90 jours à 36°C sont transférés à la température témoin (24°C) pendant 30 jours, on observe, à l'issue de ces 30 jours, une régénération du tissu chez la plupart mâles (mais toujours un retard dans la spermatogenèse) et une recolonisation par les ovocytes chez d'autres individus (très rapide dans certains cas). Ce phénomène n'est pas surprenant puisqu'il avait été observé chez *Odonthestes bonariensis* (Ito *et al.* 2003). Si les cellules somatiques ne sont pas altérées par la chaleur, ce retour à la normale pourrait être dû soit à la résistance des cellules germinales à la température qui pourraient alors recoloniser les gonades, soit, dans le cas où ces cellules germinales seraient détruites, à la formation de nouvelles cellules germinales à partir de cellules souches (cellules somatiques). Il faudrait

cependant vérifier si après cette recolonisation par les ovocytes et cette régénération du tissu mâle la reproduction peut se dérouler normalement, ou si au contraire, les animaux, bien que présentant des gonades "non stériles" (car possédant des cellules germinales) ne sont pas fonctionnels d'un point de vue reproducteur.

En ce qui concerne la stérilisation et son application à l'aquaculture, le taux de survie élevé est un point positif, cependant la stérilisation (l'effet de la température sur les gonades) est un processus long à mettre en place puisqu'il faut au minimum 75 jours de traitement à 36°C pour obtenir des résultats significatifs. Il semblerait néanmoins qu'à 37°C des résultats visibles soient obtenus dès 41 jours (Acosta, Clota et Baroiller, communication personnelle) mais les taux de survie sont alors bien plus faibles.

De plus un traitement à des températures aussi élevées ne permet pas d'avoir un taux d'oxygène dissout optimal. En effet le taux d'oxygène moyen du circuit fermé à 36°C était de $3,4 \pm 0,7$ mg/l et celui du témoin de $7,3 \pm 1,9$ mg/l.

La présence d'aliments non consommés dans les bassins contribue aussi à la dégradation du milieu d'élevage. En effet, l'alimentation a été aléatoire tout au long du traitement puisque les poissons avaient un appétit très variable (mais presque toujours moindre que celui des poissons du lot traité) et les rations calculées devaient donc être constamment réajustées. La température élevée a donc eu un impact négatif sur la croissance, en partie via une inhibition de la prise alimentaire, les individus grossissant beaucoup moins vite à 36°C qu'à 24°C. Il faudrait savoir ce qui se passe à plus long terme, en particulier en matière de croissance compensatrice : si ces poissons sont bien stériles ils ne devraient pas mûrir et devraient donc consacrer toute leur énergie à leur croissance mais cela suffira-t-il à combler le retard qu'ils ont pris lors du traitement à 36°C.

Par ailleurs ce traitement par la température pose un problème d'applicabilité puisqu'il n'est pas évident sur le plan pratique de maintenir une température aussi élevée et que cela coûte cher (consommation d'eau, d'électricité,...).

Chez les poissons pré-DS, le traitement à 36°C pendant 45 et 60 jours a conduit à une très forte augmentation du nombre de mâles mais nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une mortalité différentielle pour expliquer en partie cette distorsion du sex-ratio (Shirak *et al.*, 2002). Si cette mortalité n'est pas différentielle alors ce que nous avons observé est bien un effet masculinisant des hautes températures chez *O. niloticus* ; or ceci est conforme aux résultats obtenus chez la même espèce par Baroiller *et al.* (1995a) et Abucay *et al.* (1999). Ce phénomène est également bien connu chez *O. aureus* (Desprez et Mélard, 1998) et chez le Tilapia rouge (Baroiller *et al.*, 1995b).

Conclusion

Chez les poissons pré-différenciation sexuelle, conformément aux résultats trouvés dans la littérature, le traitement à 36°C pendant 45 et 60 jours a conduit à l'obtention d'une population entièrement mâle, à l'exception d'un seul individu sur les 145 sexés.

Chez les poissons post-différenciation sexuelle, la température de 36°C a un effet sur les gonades à partir de 45 jours. En effet on constate chez les mâles une absence de spermatoocytes II et de spermatides due soit à un retard dans la spermatogenèse, soit au fait que la température a détruit toutes les cellules à un stade avancé. De plus, chez certains mâles, la structure lobulaire est atteinte puisque certains cystes semblent vidés de leur contenu. Chez les femelles, la majeure partie des ovocytes, bien que de diamètres similaires à ceux du lot témoin, sont difformes et certains semblent même en atresie. A partir de 75 jours de traitement il n'y a plus de femelles dans les lots traités. Par ailleurs, on constate l'apparition d'individus intersexués dès 45 jours mais le pourcentage d'intersexués qui apparaissent ne correspond pas au pourcentage de femelles qui disparaissent. L'indice gonado-somatique pour sa part diminue significativement à partir de 75 jours de traitement à 36°C.

Lorsque les poissons traités pendant 75 et 90 jours sont transférés à 24°C pendant 30 jours, il y a chez certains individus, recolonisation par les ovocytes (recolonisation plus ou moins importante selon les individus), chez d'autres les ovocytes demeurent anormaux. Chez les mâles, dans la plupart des cas les gonades retrouvent une constitution normale même si leur spermatogenèse est moins avancée que celle des individus du lot témoin à 90 jours. Cependant malgré ce transfert à 24°C l'indice gonadique des poissons continue à diminuer par rapport à celui du lot témoin. Il faudrait maintenant vérifier si ces individus sont réellement stériles ou non.

Par ailleurs, puisque tous les cystes n'ont pas été touchés par la température chez les mâles et qu'on observe une variabilité individuelle, il serait intéressant d'augmenter la température pour voir si tous les cystes seraient atteints et si la variabilité individuelle persisterait.

Au vu des relativement bons taux de survie obtenus (même si inférieurs à celui du lot témoin) il est envisageable d'élever des poissons post-différenciation sexuelle à 36°C. Cependant, étant donné le retard de croissance occasionné par une telle température, il faudrait voir si celui-ci serait rattrapé grâce à l'absence de maturité que provoquerait la stérilité.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAMOFF M.D., MAGELHAES P.J., RAM S.J. 2004. *Image Processing with ImageJ*. Biophotonics International, volume 11, issue 7, p.36-42.

AVTALION R.R., DON J. 1990. *Sex-determining genes in tilapia: a model of genetic recombination emerging from sex-ratio results of three generations of diploid gynogenetic *Oreochromis aureus**. J. Fish Biol., 37 : 167-173.

BALARIN J.D, HATTON J.P. 1979. *Tilapia. A guide to their biology and culture in Africa*. Unit of Aquatic Pathobiology, University of Stirling, Scotland.

BARAS E., JACOBS B., MELARD C. 2000. *Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX-XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus**. Aquaculture, 192 : 187-199.

BAROILLER J.F., JALABERT B. 1989. *Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapias*. Aquat. Living Resour., 2 : 105-116.

BAROILLER J.F., FOSTIER A., CAUTY C., ROGNON X., JALABERT B. 1993. *Effects of high rearing temperatures on the sex ratio of progeny from sex-reversed males of *Oreochromis niloticus**. In Pullin R.S.V., Lazard J., Legendre M., Amon Kothias J.B. and Pauly D. (Eds), Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 11-16 Nov. 1991. Abidjan, Côte d'Ivoire. ICLARM Conf. Proc., 41.

BAROILLER J.F., CHOURROUT D., FOSTIER A., JALABERT B. 1995a. *Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus**. J. Exp. Zool., 273 : 216-223.

BAROILLER J.F., CLOTA F., GERAZ E. 1995b. *Temperature sex determination in two tilapias species, *Oreochromis niloticus* and the red tilapia (Red Florida strain) : effect of high or low temperature*. 1996. In : Goetz F.W., Thomas P. (Eds.), Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, 2-8 July, 1995. The University of Texas at Austin, Austin, TX, USA, pp.158-160.

BAROILLER J.F., TOGUYENI A. 1996. *Comparative effects of a natural steroid, 11 β -hydroxy-androstenedione (11 β -OH-A4) and a synthetic androgen, 17 α -Methyl-testosterone (17 α -MT) on sex-ratio in *Oreochromis niloticus**. In Pullin R.S.V., Lazard J., Legendre M., Amon Kothias J.B., Pauly D. (Eds), Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 11-16 Nov. 1991. Abidjan, Côte d'Ivoire. ICLARM Conf. Proc., 41 : 344-351.

BAROILLER J.F., GUIGUEN Y., FOSTIER A., 1999. *Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish*. Cellular and Molecular Life Sciences, 55 : 910-931.

BAROILLER J.F., D'COTTA H. 2001. *Environment and sex determination in farmed fish.* Comp. Biochem. Physiol. Part C, **130** : 399-409.

BAROILLER J.F., D'COTTA H, 2004. *Use of Biotechnology for the Improvement of Tilapia Culture.* Proceedings of the International Symposium on Tropical Agriculture and Agro-biotechnology, Dec. 7-9, 2004. National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, R.O.C., pp. AS 68-1 68-15.

BEARDMORE J.A., MAIR G.C., LEWIS R.I. 2001. *Monosex male population in finfish as exemplified by tilapia applications, problems and prospects.* Aquaculture, **197** : 283-301.

BRÄMICK U., PUCKHABER B., LANGHOLZ H.J., AND HÖRSTGEN-SCHWARK G. 1995. *Testing of triploid tilapia (Oreochromis niloticus) under tropical pond conditions.* Aquaculture, **137**(1-4) : 343-353.

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.

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

CHOURROUT D., CHEVASSUS B., KRIEG F., HAPPE A., BURGER G., RENARD P., 1986. *Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females. Potential of tetraploid fish.* Theor. Appl. Genet., **72**: 193-206.

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.

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.

DESPREZ D., MELARD C. 1998. *Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia, Oreochromis aureus.* Aquaculture, **162**, 79-84.

DESPREZ D., MELARD C., HOAREAU M.C., BELLEMENE Y., BOSC P., BAROILLER J.F. 2003 a. *Inheritance of sex in two ZZ pseudofemales lines of tilapia Oreochromis aureus.* Aquaculture, **218** : 131-140.

DESPREZ D., GERAZ E., HOAREAU M.C., MELARD C., BOSC P., BAROILLER J.F. 2003 b. *Production of high percentage of male offspring with natural androgen, 11 β hydroxyandrostenedione (11 β OHA4), in Florida red tilapia.* *Aquaculture*, **216**: 55-65.

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.

HANON L. 1975. *Adaptations morphologiques et comportementales à l'incubation buccale chez les poissons cichlidés : œufs et alevins.* *Ann. Soc. R. Zool. Belg.* **105** : 169-192.

HANSON T.R., SMITHERMAN R.O., SHELTON W.L., DUNHAM R.A. 1983. *Growth comparisons of monosex tilapia produced by separation of sexes, hybridation, and sex reversal.* In : L. Fishelton et Z. Yaron (Eds), *Proceedings of the International Symposium on the Tilapia in Aquaculture*, Tel Aviv University, 570-579.

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.

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.

HUNTER G.A., DONALDSON E.M. 1983. *Hormonal sex control and its application to fish culture.* *Fish Physiology* (W.S. Hoar, D.J. Randall et E.M. Donaldson Eds), Academic Press, New York, Vol. **9 (B)** : 223-303.

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., SHIRAIISHI 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., KAMMACHER P., LESSENT P. 1971. *Déterminisme du sexe chez les hybrides entre Tilapia macrochir et Tilapia nilotica étude du sexe-ratio dans les croisements des hybrides de première génération par les espèces parentes.* Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., **11** (1) : 155-165 (in French with English abstract).

JALABERT B., MOREAU J., PLANQUETTE P., BILLARD R. 1974. *Déterminisme du sexe chez Tilapia macrochir et Tilapia nilotica : action de la méthyltestostérone dans l'alimentation des alevins sur la différenciation sexuelle ; proportion des sexes dans la descendance des mâles "inversés".* Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., **14** (4-B) : 729-739.

LU 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. *Tyrosine-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis.* Nature, **398** : 723-728.

LOWE (MC CONNELL) R.H. 1958. *Observations on the biology of Tilapia nilotica L. in East African waters.* Rev. Zool. Bot. Afr. **57** : 129-170.

MAGID A., BABIKER M.M. 1975. *Oxygen consumption and respiratory behaviour of three Nile fishes.* Hydrobiologia. **46** : 359-367.

MELARD C., PHILIPPART J.C. 1981 a. *Pisciculture intensive du tilapia Sarotherodon niloticus dans les effluents thermiques d'une centrale nucléaire en Belgique.* In : Proceedings World Symposium on Aquaculture in Heated effluents and Recirculations systems. Stavanber 28-30 may, 637-658.

MELARD C., PHILIPPART J.C. 1981 b. *La production de tilapia de consommation dans les rejets industriels d'eau chaude en Belgique.* Cah. Ethol. Appl., **1** (2) : 122 pp.

MELARD C. 1986. *Recherches sur la biologie d'Oreochromis niloticus L. (Pisces Cichlidae) en élevage expérimental : reproduction, croissance, bio-énergétique.* Cah. Ethol. Appl., **6** (3) : 224 pages.

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

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.

PHILIPPART J.C., RUWET J.C. 1982. *Ecology and distribution of tilapias.* In : R.S.V. Pullin and R.H. Lowe-Mc Connell (eds), The Biology and Culture of tilapias. ICLARM Conference Proceedings, **7**, 432 pages, Manilla, Philippines, pp. 15-59.

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

SHIRAK A., PAITI Y., CNAANI A., KOROI A., HUIATA G., RON M., AVTALION R.R. 2002. *Association between loci with deleterious alleles and distorted sex ratios in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*).* J. Heredity, 93 (4) : 270-276.

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.

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.

UZBEKOVA S., CHYB J., FERRIERE F., BAILHACHE T., PRUNET P., ALESTROM P., BRETON B. 2000. *Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon.* J Mol Endocrinol. 25(3):337-50.

VERA-CRUZ E.M.V., MAIR G.C. 1994. *Conditions for effective androgen sex-reversal in *Oreochromis niloticus*.* Aquaculture, 122 : 237-248.

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.

Annexes

Annexe 1. Composition de l'aliment Legouessant AL3 (Neostart) utilisé pendant l'expérience.

Composition	
Farines de poissons	Blé
Huiles de poissons	Prémélanges (blé et soja extrudés, lactosérum)
Gluten de blé	Agents émulsifiants
Pois	Conservateurs
Teneur en constituants analytiques, vitamines et additifs	
Humidité : 10 %	Vitamines :
Protéines brutes : 58 %	Vit A : 12 000 UI/kg
Matières grasses brutes : 13 %	VitD3 : 2 100 UI/kg
Cellulose brute : 1 %	Vit E : 440 mg/kg
Cendres brutes : 11,8 %	Vit C : 2 200 mg/kg
Phosphore total : 1,65 %	Antioxygène : éthoxyquine
Cuivre : 4 mg/kg	

Annexe 2. Exemple de calcul de ration

Considérons un lot de 500 poissons de poids moyen de 2,7 g. Cela correspond à $2,7 \times 500$ soit 1 350 g de biomasse. Or à 27°C les poissons consomment 8 % de leur biomasse totale donc 8 % de 1350 ce qui donne une consommation journalière de 108 g pour les 500 poissons.