



CIRAD EMVT
Département d'Élevage et
de Médecine Vétérinaire
du CIRAD



PROGRAMME DE RECHERCHE- DEVELOPPEMENT SUR LE TILAPIA *OREOCHROMIS AUREUS*

Convention ARDA - CIRAD - Région Réunion

Rapport final 1996

Novembre 1996



Oreochromis aureus

Réalisation du rapport : Desprez D. et Hoareau M.C. - Décembre 1996

Equipe de recherche : Baroiller J.F. (CIRAD EMVT), Carteret Y. (ARDA), Desprez D. (ARDA), Hoareau M.C. (ARDA).

Sommaire

<u>I. Introduction générale</u>	1
<u>II. Matériel biologique</u>	3
<u>1. Position systématique de l'espèce <i>O. aureus</i>.</u>	3
<u>2. Présentation de l'espèce <i>Oreochromis aureus</i></u>	3
2.1. Répartition géographique (voir Figure II.2)	3
2.2. Coloration	5
2.3. Tolérance à la salinité	5
2.4. Tolérance à la température	5
2.5. Reproduction	6
<u>3. Protocole de production des pseudofemelles</u>	6
3.1. Définition d'une pseudofemelle	6
3.2. Protocole d'obtention des pseudofemelles utilisées au CRAA	8
3.2.1. Première génération (pseudofemelles F1) :	8
3.2.2. Deuxième génération (Pseudofemelles F2) :	9
3.2.3. Troisième génération (pseudofemelle F3) :	10
3.2.4. Stock actuel de pseudofemelles au CRAA	10
<u>III. Essai de production massive de populations monosexes mâles au moyen de pseudofemelles F3 <i>O. aureus</i></u>	10
<u>1. Introduction</u>	10
<u>2. Méthode</u>	11
2.1. Mise en charge et contrôle des géniteurs	11
2.2. Détermination du pourcentage de mâles dans les populations issues de pseudofemelles F3.	11
2.3. Croissance	11
2.3.1. Élevage larvaire	12
2.3.2. Élevage des juvéniles (Prégrossissement)	12
2.3.3. Élevage en cage	12
<u>3. Résultats</u>	13
3.1. Croissance des géniteurs	13
3.2. Évolution du nombre de pontes au cours de la saison de reproduction	14
3.3. Production d'alevins.	15
3.4. Pourcentage de mâles dans les populations <i>O. aureus</i> issues de pseudofemelles F3.	15

3.5. Données préliminaires sur la croissance d'individus mâles issus de pseudofemelles F3.	16
3.5.1. <u>Élevage larvaire</u>	16
3.5.2. <u>Élevage des juvéniles (prégrossissement)</u>	17
3.5.3. <u>Élevage en cage</u>	18
<u>4. Discussion de conclusion</u>	19
4.1. Croissance des géniteurs	19
4.2. Évolution des pontes au cours du temps.	20
4.3. Production de populations à fort pourcentage de mâles.	21
<u>IV. Le déterminisme génétique du sexe chez <i>O. aureus</i>.</u>	22
<u>1. Introduction</u>	22
<u>2. Matériel et méthode</u>	23
2.1. Reproduction et élevage des juvéniles	23
2.2. Identification des géniteurs	23
<u>3. Détermination du sexe-ratio.</u>	23
<u>4. Résultats</u>	23
<u>5. Discussion</u>	24
<u>V. Données préliminaires sur la fécondité des pseudofemelles <i>O. aureus</i></u>	25
<u>1. Introduction</u>	25
<u>2. Matériel et méthode</u>	26
<u>3. Résultats et discussion</u>	26
<u>VI. Production de pseudofemelles F4 par inversion hormonale du sexe à la 17α éthynyloestradiol</u>	27
<u>1. Introduction</u>	27
<u>2. Matériel et méthode.</u>	27
2.1. Traitement hormonal	27
2.2. Sexage	27
<u>3. Résultats et discussion</u>	28
<u>V. Conclusion et perspectives pour la saison de reproduction 1996 / 1997</u>	29
Bibliographie	31

I. Introduction générale

Les tilapias présentent de grandes potentialités pour la pisciculture, en partie liées à l'extrême facilité de leur élevage: une reproduction naturelle aisée en captivité, une croissance rapide, une grande résistance au manque d'oxygène, aux agents chimiques, aux maladies et aux manipulations fréquentes (Mélard et Philippart, 1981 a et b). L'existence d'un large éventail d'espèces adaptées à des environnements variés, y compris l'eau saumâtre et l'eau de mer (Philippart et Ruwet, 1982), a conduit à leur introduction dans de nombreux pays. Ce groupe est présent non seulement en Afrique (29 pays) mais aussi en Asie (14 pays), dans les Caraïbes (6 pays), en Amérique latine (9 pays), dans les pays Méditerranéens (6 pays) et également aux USA, en URSS, en Belgique, dans les îles Fidji et Guam (Pullin, 1993) et dans les DOM TOM, alors que la répartition originelle des espèces de tilapia se limitait à l'Afrique (sauf Madagascar) et à Israël. La production mondiale annuelle varie, selon les auteurs, entre 400 000 tonnes (Sweetman, 1993, chiffres pour l'année 1990) et 500 000 tonnes (Lazard, 1990), ce qui place les tilapias parmi les espèces les plus exploitées en aquaculture d'eau douce, après les carpes (5 000 000 de tonnes) et les salmonidés (600 000 tonnes) (Sweetman, 1993). Pullin (1993) prévoit un doublement de la production mondiale de tilapias dans les dix prochaines années.

Les tilapias du genre *Oreochromis*, caractérisés par un comportement d'incubation buccale maternelle des jeunes (Trewavas, 1983), représentent 95 % de la production mondiale de tilapia (Pullin, 1993). La grande efficacité de la reproduction des espèces de ce groupe éco-éthologique ainsi que leur maturité précoce (Ruwet et al, 1976; Philippart et Ruwet, 1982, Baroiller et Jalabert, 1989) constituent des avantages certains en pisciculture mais conduisent également, en milieu confiné comme l'étang, à une rapide surpopulation qui entraîne une diminution de la croissance par manque de nourriture et d'oxygène. Les étangs sont alors peuplés de poissons de petite taille, peu utilisables pour la commercialisation. Un contrôle de la reproduction s'est donc révélé nécessaire. Plusieurs solutions furent envisagées comme, par exemple, l'élevage mixte avec une espèce piscivore afin de diminuer, par prédation, la densité des tilapias de petite taille (Guerrero, 1982 ; Huner et al, 1983 ; Bedawi, 1985 ; Middendorp, 1995). Cette technique, outre une réduction de la production globale de tilapias, implique d'entretenir un stock de prédateurs. L'existence chez les tilapias d'un dimorphisme sexuel de la croissance jouant en faveur des mâles (Hickling, 1968 ; Hanson et al, 1983 ; Mélard 1986) orienta rapidement les recherches vers l'obtention de populations monosexes mâles, afin de supprimer toute reproduction incontrôlée et d'améliorer les performances globales du système de production (augmentation de la croissance, réduction de l'agressivité par diminution de la territorialité). Actuellement la principale voie d'obtention de populations monosexes mâles reste l'inversion hormonale du sexe au moyen de

stéroïdes artificiels (voir Hunter et Donaldson, 1983 ; Pandian and Sheela, 1995). L'utilisation de stéroïdes artificiels sur des individus destinés à la consommation est, en principe prohibée dans les pays industrialisés. Et ce, même si les travaux de Goudie et al (1986) ont montré que 3 semaines après l'arrêt des traitements, la radioactivité totale dans l'animal entier, et donc la concentration en hormone, avait diminué de 99 %. De plus, la commercialisation du tilapia n'a généralement lieu que suite à une période de croissance de 12 à 14 mois.

De nouvelles voies de production de populations monosexes mâles ont cependant été explorées, comme par exemple l'utilisation d'un stéroïde naturel, la 11 bêta-hydroxy-androsténédione, dont l'efficacité sur la différenciation du sexe, en condition expérimentale, a été montrée chez 4 espèces de tilapia (Baroiller et al, 1996). Nos travaux, en conditions intensives, ont mis en évidence la capacité de cette hormone à produire des populations à fort pourcentage de mâle (Desprez et Carteret, 1995) chez le tilapia rouge Red florida. Cette technique constitue cependant plus une alternative qu'une véritable solution de remplacement.

Une approche, basée sur le déterminisme génétique du sexe a été étudiée, chez les 2 principales espèces de tilapia exploitées en aquaculture, à savoir *O. niloticus* et *O. aureus*. Cette voie génétique se caractérise par la constitution et l'utilisation de géniteurs mâles et femelles à descendances théoriquement monosexes mâles (géniteurs YY chez *O. niloticus* et ZZ chez *O. aureus*). Chez *O. aureus*, plusieurs travaux relatent la possibilité de produire massivement des populations à fort pourcentage de mâles en descendance à partir d'individus ZZ (Lahav, 1993 ; Desprez et al, 1995 ; Mélard et al, 1995).

Le développement des Hauts de l'île de la Réunion, où de basses températures peuvent être enregistrées, a imposé le choix d'une espèce de tilapia plus résistante à ces conditions thermiques que le tilapia rouge. L'espèce *O. aureus* répond à ce critère de sélection. Le CIRAD dispose, à Montpellier, d'un stock de géniteurs femelles ZZ (ou pseudofemelles) *O. aureus* dont une partie a été transféré à la Réunion afin de :

- poursuivre les travaux de recherche sur le déterminisme génétique du sexe ;
- tester la viabilité technique et économique de ce procédé de production de populations monosexes mâles dans conditions commerciales.

Les expérimentations entreprises depuis septembre 1995 et destinées à répondre aux problématiques évoquées ci-dessus, nous ont permis de produire suffisamment d'individus pour effectuer, dès juillet 1996, des tests de survie et de croissance dans les retenues collinaires des Hauts de l'île mais également dans les infrastructures expérimentales du CRAA.

II. Matériel biologique

1. Position systématique de l'espèce *O. aureus*.

Embranchement : Vertébrés

Famille : Cichlidae

Classe : Osteichtyens

Genre : Oreochromis

Super Ordre : Acanthopterygiens

Espèce : aureus

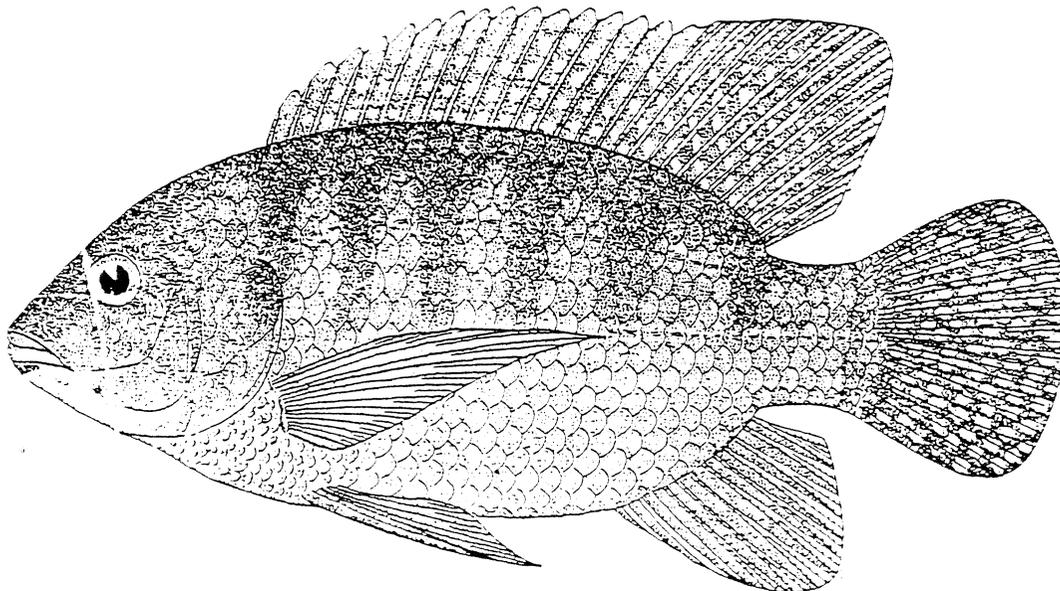
Ordre : Perciformes

Souche : Lac Manzalla (Egypte)

Sous Ordre : Percoïdes

Nom commun : tilapia bleu

Figure II 1 : *Oreochromis aureus* (Steindachner, 1864) d'après Daget, 1954.

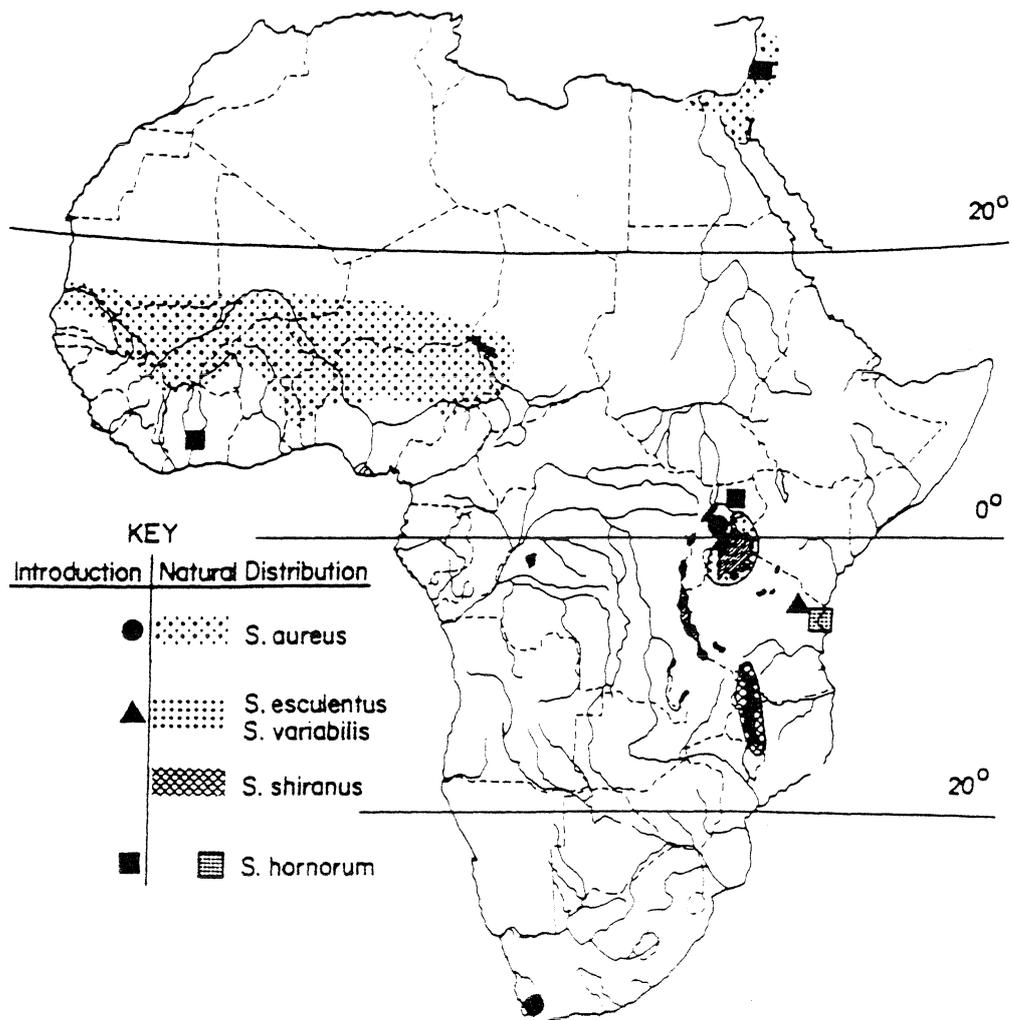


2. Présentation de l'espèce *Oreochromis aureus*

2.1. Répartition géographique (voir Figure II.2)

Les tilapias sont originaires du continent africain (Madagascar exclus) et de la Palestine. L'espèce *Oreochromis aureus* était originellement présente en Afrique (fleuve Sénégal, le moyen Niger, les affluents du fleuve Bénin, le lac Tchad et le bas Shari, le fleuve

Figure II.2. Distribution naturelle et introductions de *S. aureus*, *S. esculentus*, *S. variabilis*, *S. shiranus* and *S. hornorum* (tiré de Philippart and Ruwet, 1982).



Logone, la Basse Egypte, (du Caire au Delta du Nil inclus) et en Palestine (rivière Na'amén et Yarkon, les lacs Huleth et Tiberia, le fleuve Jourdan et ses affluents, l'oasis d'Ain Fashkha et les bords de la mer morte) (Trewavas, 1983).

L'espèce a ensuite été disséminée au cours des dernières décennies pour les besoins de l'aquaculture. La production de l'espèce *O. aureus* est localisée à Taiwan (hybride *O. aureus* x *O. niloticus*), Cuba, le Nicaragua, Panama, l'Egypte, Israël (hybride *O. aureus* x *O. niloticus*) (Pullin, 1983), la Belgique (Mélard et al, 1995), le Salvador, Puerto Rico, les E.U. et Chypre (Philippart et Ruwet, 1982).

2.2. Coloration

L'espèce *O. aureus* se distingue facilement de l'espèce *O. niloticus* car sa nageoire caudale est dépourvue de bandes régulières verticales ; la partie distale est en outre souvent pourvue d'une bande rose-rouge. Les jeunes poissons sont blanc-jaune et possèdent des bandes verticales sur les flancs ainsi que la tache "tilapienne", qui disparaît vers une taille de 10 cm. Les adultes ont le corps bleu-gris / vert-gris plus foncé sur le dos, pâle sur le ventre. Chez des spécimens en état de stress, des bandes verticales foncées apparaissent sur les flancs et les exemplaires préservés ont parfois une bande latérale noire sur les flancs.

2.3. Tolérance à la salinité

Plusieurs espèces de tilapia, comme *Sarotherodon melanotheron*, *Oreochromis mossambicus*, *Tilapia guineensis*, sont euryhalines et supportent des taux de salinité supérieurs à 30 pour mille. Les espèces *O. niloticus*, *O. aureus* et *T. zillii* sont moins euryhalines que les précédentes mais sont capables de se maintenir dans des zones où la salinité est proche de 30 pour mille. L'espèce *O. aureus* se rencontre donc en eau douce mais également en eau saumâtre comme dans le Delta du Nil (Trewavas, 1983) et le lac Qarun (salinité variant de 11 à 29 pour mille) (Fryers and Iles, 1972). D'après Chervinsky, 1966 (in Trewavas, 1983), l'augmentation de la salinité entre 300 et 10 000 mg/l n'affecte pas la croissance d'*O. aureus*.

2.4. Tolérance à la température

L'espèce *O. aureus* supporterait une gamme de température variant de 8 à 42 °C (Philippart et Ruwet, 1982). En condition expérimentale, des mortalités importantes sont observées à 8-9 °C (Sarig, 1969). *O. aureus* stopperait sa croissance lorsque la température descend en dessous de 14 °C (Sarig, 1969). Mac Bay (1961) a observé une moins bonne résistance des juvéniles aux basses températures (limite thermique basse : 9 °C). Les individus adultes (à partir de 100 - 150 g) peuvent supporter les basses

températures nocturnes sur une longue période à condition d'enregistrer une augmentation de la température en journée. Cependant une température de 5 °C pendant plusieurs jours entraîne des mortalités mêmes chez les adultes (Mac Bay, 1961).

2.5. Reproduction

Le genre *Oreochromis*, auquel appartient *O. aureus*, est caractérisé par une incubation maternelle des progénitures ce qui le différencie du genre *Sarotherodon* où l'incubation est paternelle, ou mixte, et des pondeurs sur substrat du genre *Tilapia*

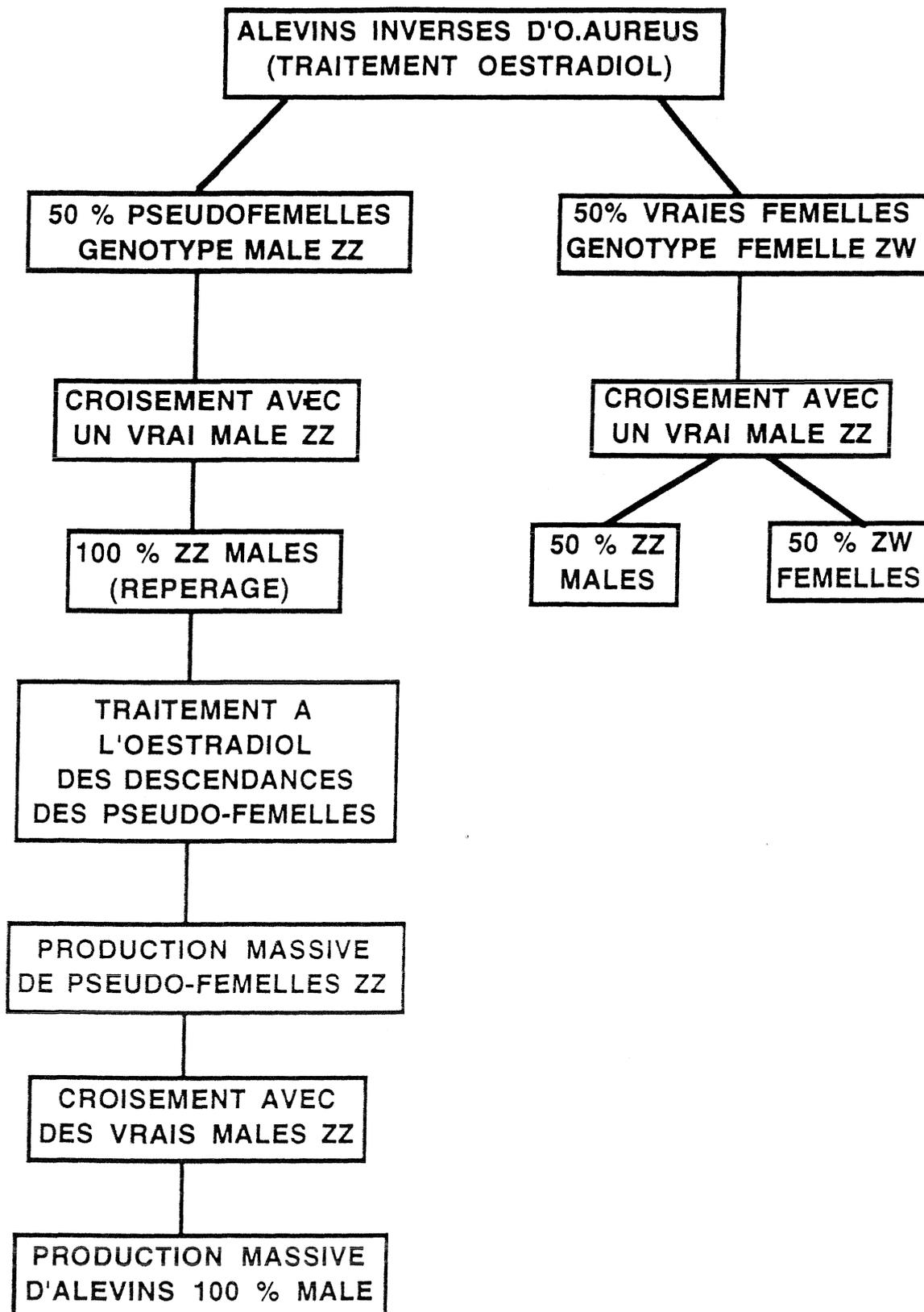
Le mâle *O. aureus* construit un nid dans des zones peu profondes (40 cm à 1 m) et établit un territoire qu'il défendra en exprimant un comportement agressif (combats de bouches, attaques latérales...) vis à vis des intrus (Fishelton, 1967 in Trewavas, 1983). Suite à la parade nuptiale (description Skoufas....), la femelle dépose ses oeufs dans le nid du mâle, ce dernier les féconde puis la femelle les reprend en bouche pour l'incubation. La femelle quitte ensuite le nid pour rejoindre des zones plus profondes et le mâle peut se reproduire avec une autre femelle (Trewavas, 1983).

3. Protocole de production des pseudofemelles

3.1. Définition d'une pseudofemelle

L'espèce *O. aureus* est caractérisée par un déterminisme de type oiseaux, à savoir une homogamétie mâle ZZ et une hétérogamétie femelle ZW. L'inversion hormonale du sexe, au moyen de la 17 α -éthynylœstradiol (hormone féminisante), d'une descendance normale permet d'obtenir des individus transsexuels, ou pseudofemelles, à phénotype femelle et à génotype mâle ZZ. Le croisement d'une pseudofemelle (génotype ZZ) avec un vrai mâle (génotype ZZ) produit théoriquement 100 % de mâles à génotype ZZ sans inversion hormonale du sexe (Jensen et Shelton, 1979) (Figure II.3). La première étape de cette technique consiste à repérer les pseudofemelles au sein de la population sexuellement inversée par croisement de ces pseudofemelles avec un vrai mâle. Le croisement d'une vraie femelle (génotype WZ) avec un vrai mâle (génotype ZZ) donne en théorie 50 % de mâles (génotype ZZ) et 50 % de femelles (génotype WZ) alors qu'une pseudofemelle

Figure II.3 : Schéma des opérations permettant la détection et la multiplication des pseudofemelles d'*O. aureus* (Mélard, 1986).



(génotype ZZ) croisée avec un vrai mâle (génotype ZZ) donne, toujours en théorie, 100 % de mâles (génotype ZZ) (Mélard, 1995). Afin de constituer rapidement un stock de pseudofemelles, les alevins issus d'une descendance 100 % mâle de géniteurs pseudofemelles F1, détectés comme indiqué précédemment, sont inversés au moyen de la 17 α -éthynyloestradiol (Figure II.3, Mélard, 1986). Cette deuxième opération d'inversion sexuelle à la 17 α -éthynyloestradiol ne s'effectue que sur les descendances de pseudofemelles F2 qui donnent systématiquement 100 % de mâles dans leurs descendances. Lors d'une telle manipulation, chaque ponte est toujours divisée en un lot témoin, qui permet une ultime vérification de la proportion de mâles, et en un lot traité permettant de produire des pseudofemelles de deuxième génération (F2). Seuls les alevins inversés issus des pontes présentant 100 % de mâles dans le lot témoin sont conservés (Mélard, 1995). Sur le même principe les générations suivantes (F3, F4...) de pseudofemelles peuvent être produites.

3.2. Protocole d'obtention des pseudofemelles utilisées au CRAA

3.2.1. Première génération (pseudofemelles F1) :

Trois descendances *O. aureus*, issues de vraies femelles et de vrais mâles, ont été inversées à la 17 α -éthynyloestradiol à une dose de 125 mg.kg⁻¹ d'aliment. La durée du traitement était de 45 jours.

Tableau II.1 : Résultat de l'étape de repérage des pseudofemelles F1 par testage individuel

Identificarion de la femelle	Nombre de mâles	Nombre de femelles	Pourcentage de mâles	Génotype sexuel
1	26	24	52	WZ
<u>2</u>	37	0	<u>100</u>	<u>ZZ</u>
<u>3</u>	<u>204</u>	0	<u>100</u>	<u>ZZ</u>
4	51	16	76	WZ
<u>5</u>	<u>51</u>	0	<u>100</u>	<u>ZZ</u>
<u>6</u>	<u>39</u>	0	<u>100</u>	<u>ZZ</u>
<u>7</u>	<u>195</u>	0	<u>100</u>	<u>ZZ</u>
<u>8</u>	<u>84</u>	0	<u>100</u>	<u>ZZ</u>
9	151	44	77	WZ
10	36	50	42	WZ
11	7	21	25	WZ

Suite à ce traitement féminisant, 11 femelles ont été testées individuellement en aquarium par reproduction avec un vrai mâle ZZ et ce afin de déterminer leur génotype sexuel. Sur ces 11 individus, 6 présentent des descendance monosexes mâles et un génotype ZZ a été attribués à ces individus. Ces poissons sont identifiées comme étant des pseudofemelles (Tableau II.1).

3.2.2. Deuxième génération (Pseudofemelles F2) :

Suite à cette phase de repérage, les pseudofemelles F1 numéro 3 et 5 ont été reproduites individuellement pour confirmation du premier testage puis production d'une seconde génération de pseudofemelles. La pseudofemelle numéro 5 a produit 3 descendance monosexes mâles, dont deux ont été partiellement inversées à la 17 α -éthynyloestradiol (125 mg.kg⁻¹ pendant 45 jours) dans l'objectif de produire un nombre conséquent de pseudofemelles F2 (voir Figure II.2). Le pourcentage de femelles après féminisation des descendance 2 et 3 de la pseudofemelle numéro 5 était respectivement de 59 et 72 % (Tableau II.2)

Tableau II.2 : Production de pseudofemelles F2 par inversion à la 17 α -éthynyloestradiol (125 mg.kg⁻¹ ; durée 45 jours) d'une descendance 100 % mâle de pseudofemelle F1.

Descendance	Nombre de mâles	Nombre de femelles	Pourcentage de mâles	Pourcentage de femelles après inversion
<u>Pseudofemelle 5</u>				
Testage 1	51	0	100	
Testage 2				
Lot témoin	129	0	100	
Lot inversé	48	69	41	59
Testage 3				
Lot témoin	130	0	100	
Lot inversé	64	165	28	72
<u>Pseudofemelle 3</u>				
Testage 1	204	0	100	
Testage 2				
Lot témoin	52	1	98	2
Lot inversé	11	46	19	81
Testage 3				
Lot témoin	30	4	88	12
Lot inversé	18	151	11	89

Dans les descendance 2 et 3 de la pseudofemelle numéro 3, le pourcentage de femelle était de 2 et 12 % (lot témoin) (Tableau II.2). Les lots inversés à la 17 α -éthynyloestradiol, issus de cette pseudofemelle, n'ont pas été conservés pour la constitution du stock de pseudofemelles F2.

3.2.3. Troisième génération (pseudofemelle F3) :

Parmi les 165 pseudofemelles F2 issues de l'inversion de la descendance de la pseudofemelle F3, 5 individus ont été testés individuellement en reproduction avec un mâle. Toutes les descendance étaient monosexes mâles. Sur le même principe que précédemment, une des descendance a été inversée à la 17 α -éthynyloestradiol (125 mg.kg⁻¹ pendant 45 jours). Le lot témoin de cette inversion était 100 % mâle. Un stock de pseudofemelle F3 a ainsi été constitué.

3.2.4. Stock actuel de pseudofemelles au CRAA

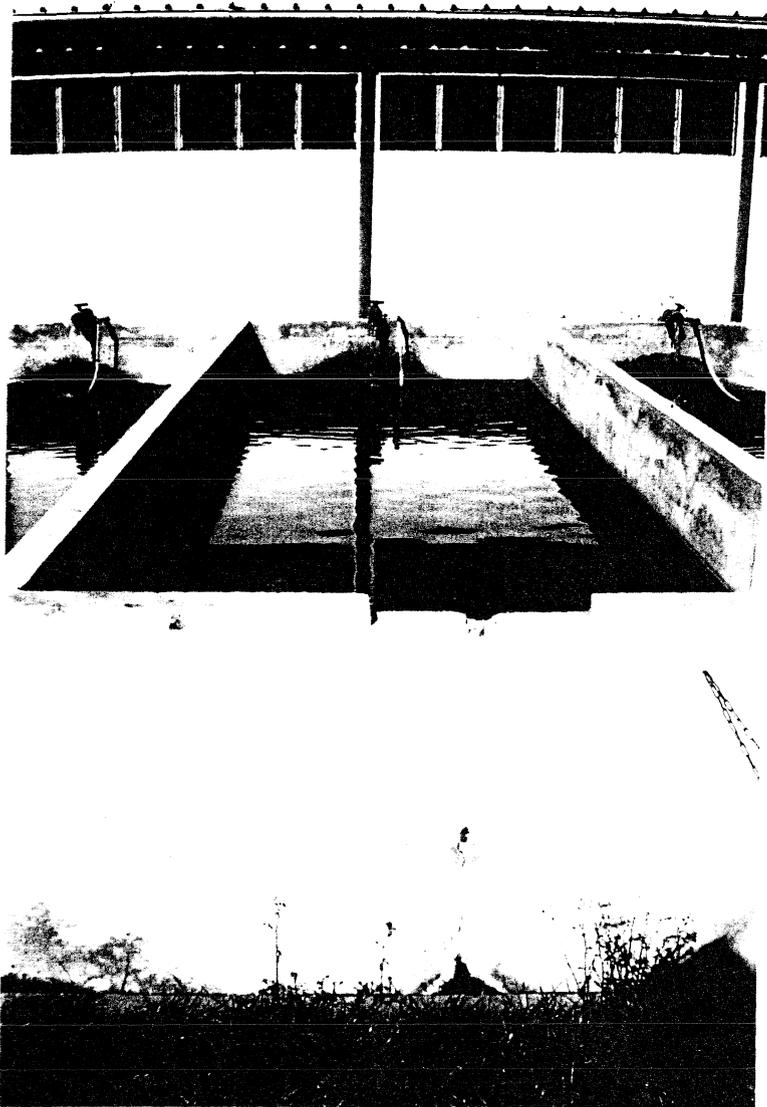
Un premier lot de pseudofemelles F3 (n = 85) et de mâles (n = 65) a été transféré de Montpellier à la Réunion en janvier 1995. Compte tenu du faible poids des poissons à leur arrivée (4,5 g pour les mâles et 44,0 g pour les femelles), les expérimentations sur cette souche n'ont débuté qu'en septembre 1995.

En juin 1996, un nouveau lot de 54 pseudofemelles F3, de même origine parentale que les premières, a été accueilli dans les infrastructures expérimentales du CRAA. Ces individus seront utilisés au cours de la saison de reproduction 1996-1997, pour la production massive de populations monosexes mâles.

III. Essai de production massive de populations monosexes mâles au moyen de pseudofemelles F3 *O. aureus*

1. Introduction

L'objectif de cet essai était de tester la capacité des géniteurs pseudofemelles *O. aureus* à produire massivement des descendance monosexes mâles. Nous nous sommes conformés, en ce qui concerne la densité de mise en charge et le sexe-ratio des géniteurs, aux données techniques en application à l'ARDA pour la production de tilapia rouge (Bosc, 1993 ; Desprez et Carteret, 1995).



Race-ways de reproduction (surface 12 m²)

2. Méthode

2.1. Mise en charge et contrôle des géniteurs

Le 26 septembre 1995, 45 pseudofemelles F3 d'un poids moyen de 118 ± 29 g et 15 mâles d'un poids moyen de 160 ± 36 g ont été placés dans un race-way en béton de 12 m² (6 x 2 m), soit une densité de 5 géniteurs.m⁻² à un sexe ratio (mâle : femelle) de 1 : 3. Afin d'éviter une contamination du stock initial de géniteurs, tous les mâles et toutes les pseudofemelles ont été identifiés par coupure des nageoires pelviennes. Ce marquage est renouvelés lors de chaque contrôle, si nécessaire.

Tous les 10 jours, la bouche des femelles est inspectée. Les oeufs et les alevins sont récoltés puis transférés dans un bouteille de type Zug (volume 5 litres) de l'écloserie. Tous les individus issus d'un même contrôle de géniteurs constitue un lot. La température de l'écloserie est thermorégulée à $28 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

Lors des contrôle de géniteurs, tous les stades de développement (oeufs, oeillés, alevins vésiculés et résorbés) sont récoltés en nombre variable. Afin de ne pas biaiser l'estimation sur le nombre d'individus produits, le nombre d'alevins est déterminé en sortie de bouteilles d'incubation de type Zug.

2.2. Détermination du pourcentage de mâles dans les populations issues de pseudofemelles F3.

A l'âge de 2 mois minimum, 200 poissons par lot, sont prélevés, disséqués et les gonades sont examinées au microscope après squash (Guerrero and Shelton, 1974). A cet âge, les caractéristiques histologiques de la gonade sont bien en place (structure lobulaire pour les mâles et présence d'ovocytes prévitellogéniques ou vitellogénique (Baroiller, 1988)), ce qui permet de différencier les mâles des femelles et de déterminer ainsi le sexe-ratio du lot.

2.3. Croissance

Les faibles productions d'alevins lors de certains contrôles, associé à un manque d'infrastructures, ne nous ont pas permis de tester les potentialités de croissance de cette espèce en condition d'élevage intensive. Des données préliminaires ont cependant été récoltées et sont présentées dans ce rapport à titre indicatif. Des expériences complémentaires, sur les aspects de la croissance, sont programmées pour la saison 1996/1997. Nous disposerons alors d'un plus grand nombre de géniteurs et donc d'alevins et des infrastructures adaptées seront mises à disposition pour ces essais.

2.3.1 Élevage larvaire

Au stade pélagique (± 10 jours post fécondation), les alevins sont récupérés dans un tamis à la sortie de la bouteille et transférés dans un bac de 200 litres alimenté par l'eau de la lagune de la ferme du Gol. Le nombre d'alevins récoltés en sortie d'incubateur est estimé (échantillonnage de 500 individus et pesée totale).

Tous les 15 jours, un contrôle de poids moyen est effectué par échantillonnage de 500 poissons ce qui permet de réajuster la ration alimentaire. Cette dernière est calculée suivant le schéma de rationnement établi par Mélard (1986). L'aliment (Gheerbrandt, 56 % de protéines) est distribué au moyen d'un nourrisseur automatique à tapis fonctionnant sur une période de 12 heures par jour.

Le renouvellement d'eau sur ces bacs est de l'ordre de 500 % par heure. L'alimentation en eau est interrompue toutes les 30 minutes pendant une période variable de 10 à 20 minutes. Ces coupures sont inhérentes au système de pompage et de remplissage de la fosse de captage de la lagune. Une oxygénation complémentaire est assurée par des diffuseurs. Le contrôle du taux d'oxygène et de la température est effectué deux fois par jour (le matin à 8 heures et le soir à 16 heures).

2.3.2. Élevage des juvéniles (Prégrossissement)

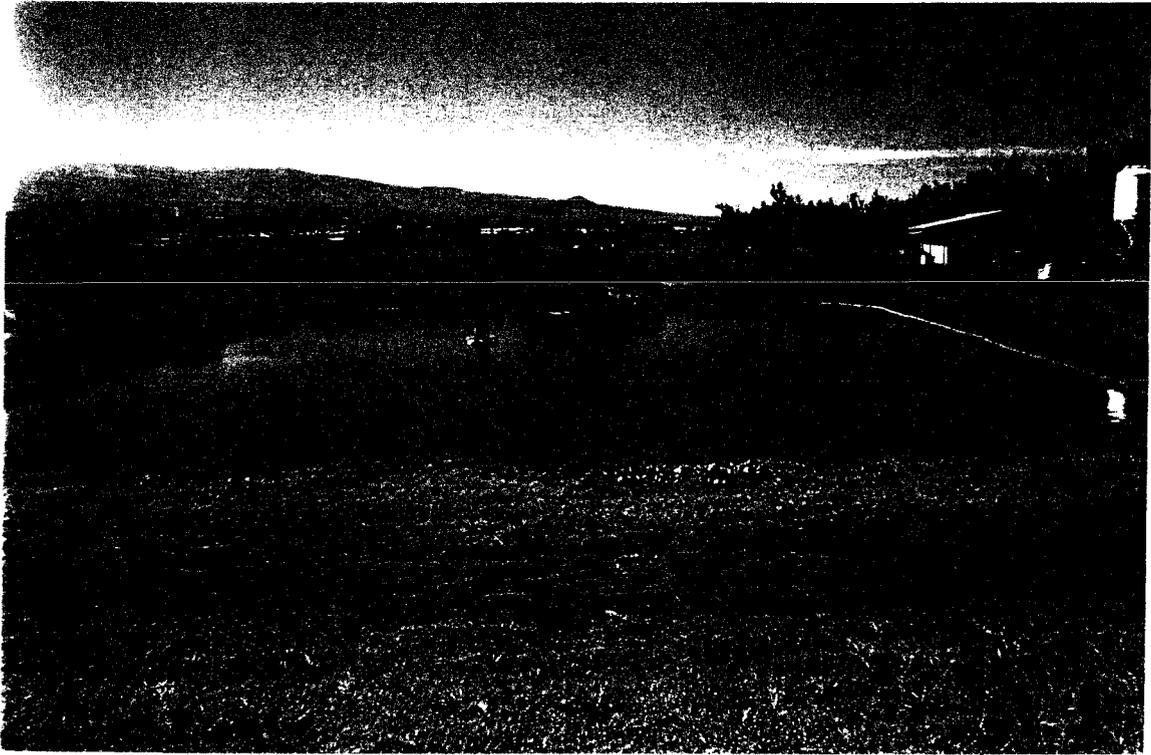
Après une période d'élevage en bac de 200 litres variant de 45 à 75 jours, les juvéniles sont transférés dans des bacs de 5 m³ alimenté en continu par pompage dans la lagune. Le nombre d'alevins au moment du transfert est estimé (échantillonnage sur 500 poissons et pesée totale). La ration est comme précédemment calculée suivant le schéma de nourrissage établi par Mélard (1986) et réajustée tous les 15 jours suite au contrôle du poids moyen.

Les alevins sont nourris manuellement 3 à 4 fois par jour avec un aliment (Gheerbrandt, 56 % de protéines) dont la granulométrie est adaptée à leur taille.

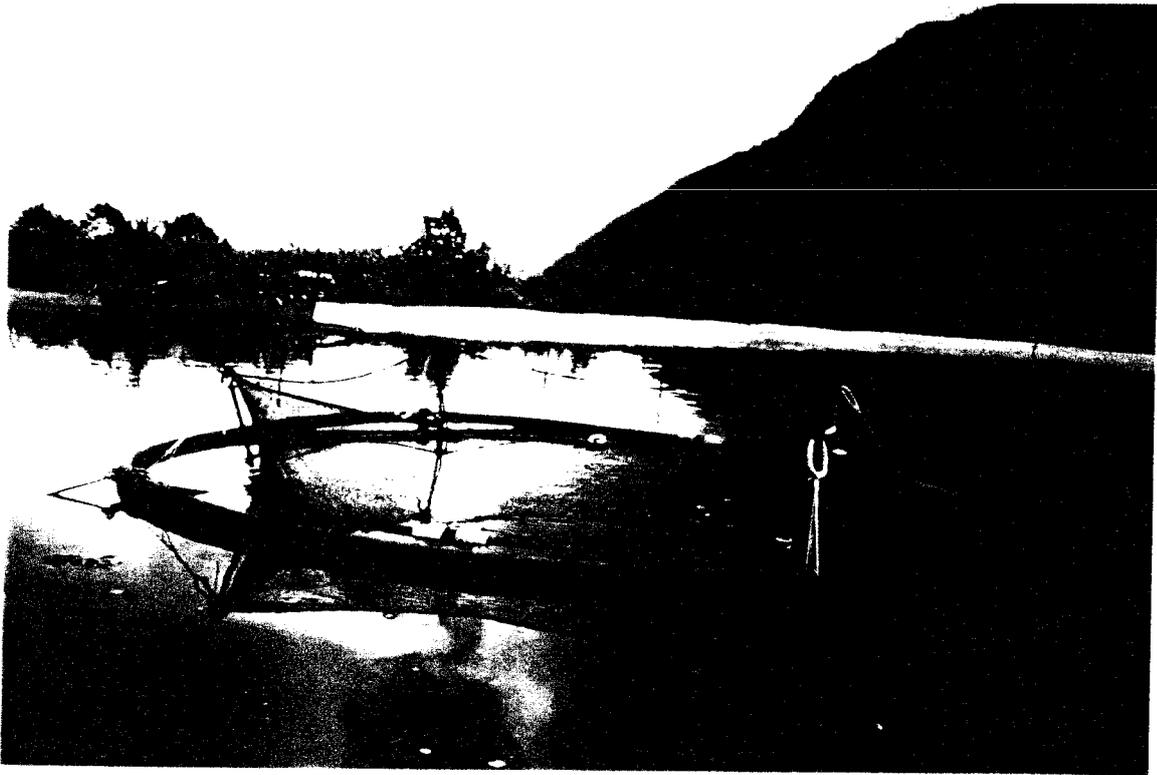
Le taux d'oxygène et la température sont contrôlés 2 fois par jour (le matin à 8 heures et le soir à 16 heures).

2.3.3. Élevage en cage

A partir d'un poids moyen minimum de 20 g, des essais de croissance en cage ont été mis en place. En ce qui concerne le contrôle des poids moyen, le calcul de la ration alimentaire et la distribution de l'aliment, le protocole suivi est identique à celui du prégrossissement. Ces cages, d'un volume utilisable de 10 m³ en fonction des dimensions, sont disposées dans un étang de 600 m² alimenté par l'eau de la lagune de la ferme du Gol. L'alimentation en eau est effective de 0 à 6 heures et de 12 à 18 heures sur des périodes



Etang bâché de 600 m² du Centre de Recherche et
d'Application Aquacole (Ile de la Réunion)



Cage flottante de 10 m³ en place dans une retenue collinaire

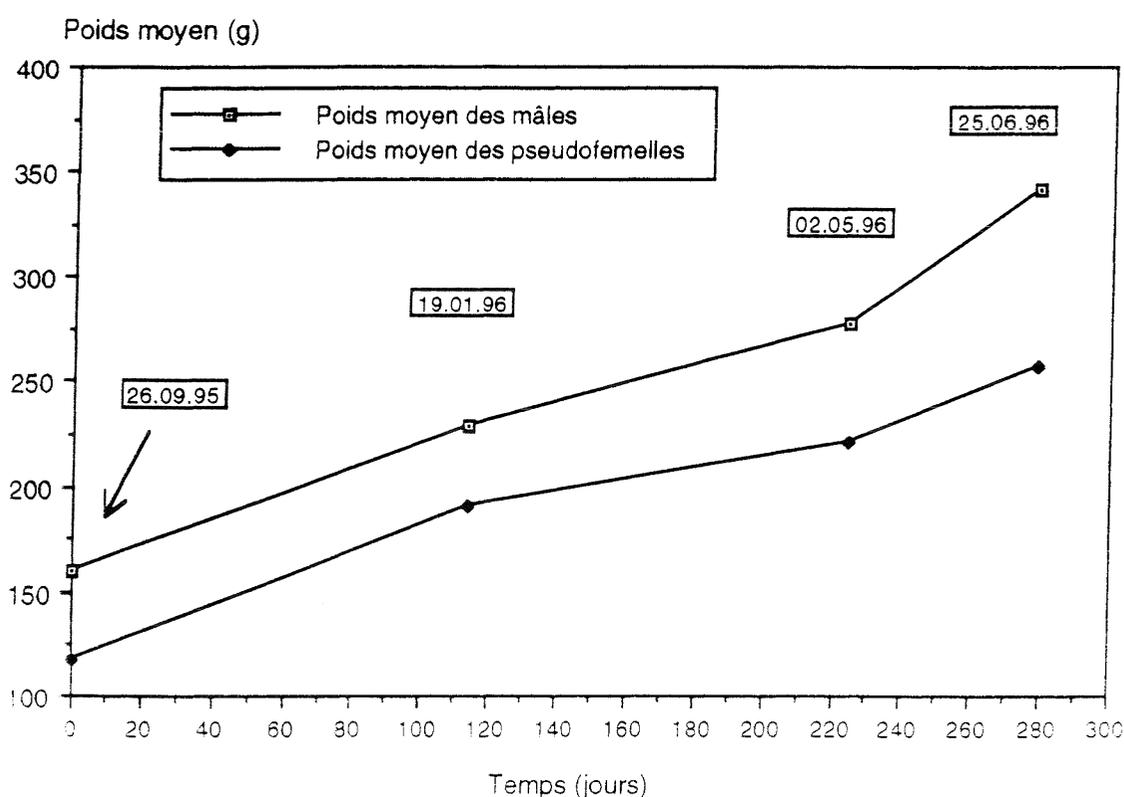
de 15 minutes. Une aération complémentaire est assurée par un aérateur pendant la nuit.

L'aliment (Gheerbrandt, 47 % de protéines) est distribué manuellement en 3 à 4 fois par jour.

3. Résultats

3.1. Croissance des géniteurs

Figure III.1 : Courbes de croissance des géniteurs mâles et pseudofemelles *O. aureus* en race-way de reproduction.



Les géniteurs pseudofemelles et mâles ont été pesés individuellement à la mise en charge (26 septembre 1995) ainsi que le 19 janvier 1996, le 2 mai 1996 et le 25 juin 1996.

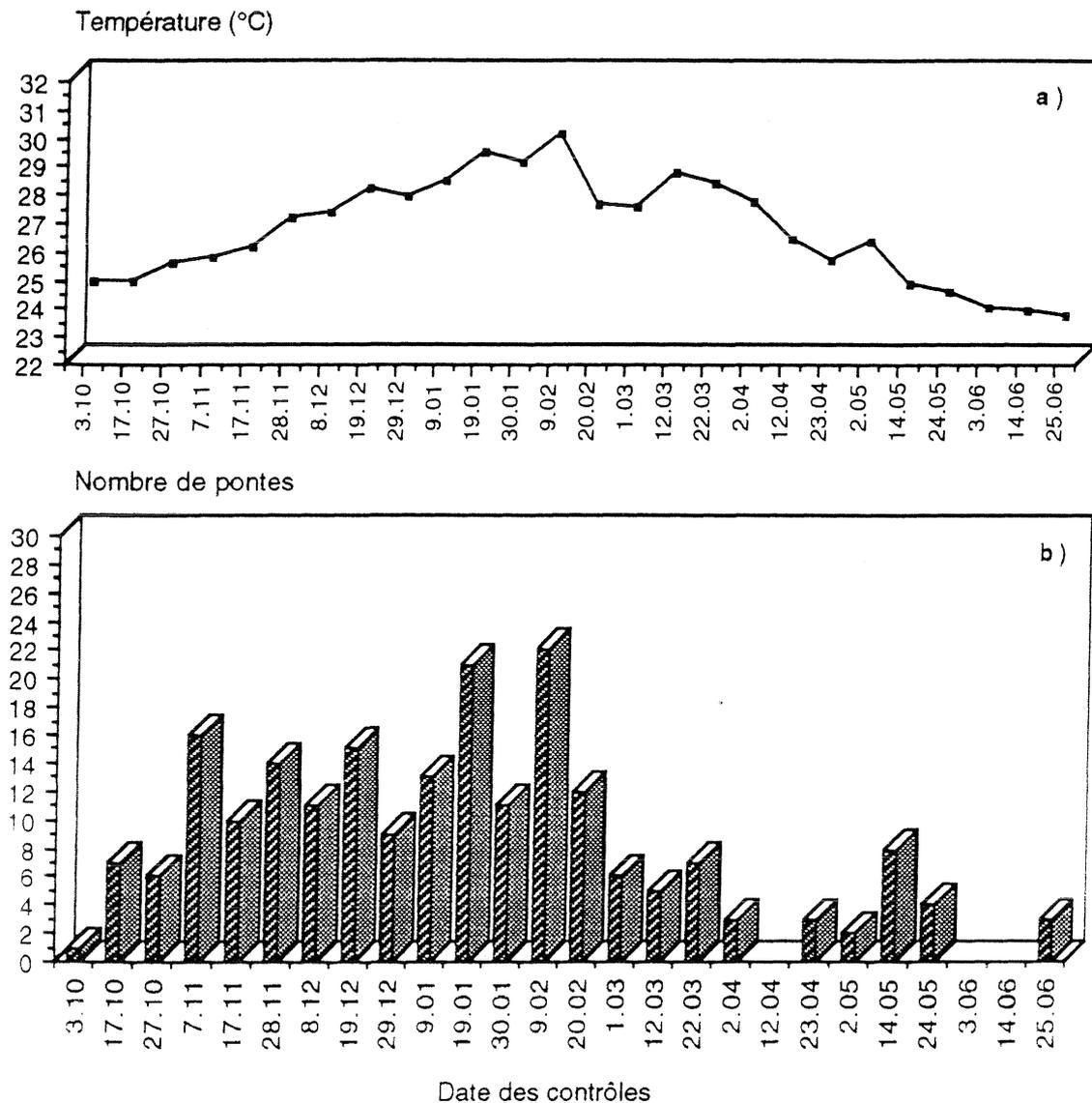
Lors du sexage manuel du stock de pseudofemelles F3, effectué le 26 septembre 1995, 4 individus présentaient une papille indifférenciée (ni mâle, ni femelle). Ces individus ont reçu un marquage spécifique et ont été suivis au cours de la saison de reproduction. Sur ces 4 poissons, un s'est avéré être une femelle. Pour les 3 autres, le sexe n'a toujours pas été déterminé. Aucun de ces 3 individus n'a pondu au cours de la saison.

Le 25 juin 1996, le poids moyen des mâles et des pseudofemelles étaient respectivement de 341 ± 51 g et de 257 ± 45 g ce qui représente une croissance individuelle journalière moyenne de 0,65 g pour les mâles et de 0,5 g pour les pseudofemelles.

Le taux de survie est de 100 % pour les mâles et de 93 % pour les pseudofemelles (3 morts)

3.2. Évolution du nombre de pontes au cours de la saison de reproduction

Figure III.2 : a) Répartition par contrôle des pontes de pseudofemelles *O. aureus* en race-way entre le 3 octobre 1995 et le 25 juin 1996
b) Courbe de la température de l'eau dans le race-way pour la période du 3 octobre 1995 au 25 juin 1996.



La première ponte de pseudofemelle a été observée le 3 octobre 1995 lors du premier contrôle suivant la mise en reproduction des géniteurs. Le maximum de ponte récoltées est de 21 et 22, respectivement pour les contrôles du 19 janvier et du 9 février, correspondant aux pics de température (respectivement 29,1 et 29,8 °C) (Figure III.2). Entre le 3 octobre et le 25 juin 1996, 209 pontes ont été récoltées, soit en considérant un cheptel de 42 pseudofemelles (les 3 individus, dont le sexe est indéterminé, non pas été

pris en compte), une moyenne de 5 pontes par pseudofemelle.

L'augmentation progressive de la température entre le 3 octobre et le 9 février se caractérise par un nombre moyen de 11 pontes par contrôle, à l'opposé entre le 20 février et le 25 juin lors de la diminution de la température moyenne dans le race-way de reproduction, le nombre moyen de ponte par contrôle est de 4,1. Aucune ponte n'a été observée lors des contrôles du 3 et 14 juin, les températures moyenne pour ces deux périodes étaient respectivement de 23,7 et 23,6 °C. Le 25 juin 1996, 3 pontes ont été observées à une température moyenne de 23,4 °C.

3.3. Production d'alevins.

La production totale d'alevins au cours de la saison, après incubation artificielle en bouteille de type zug, est de 78300, soit 402 alevins par ponte. Une pseudofemelle a produit en moyenne 1740 alevins entre le 26 septembre 1995 et le 25 juin 1996 (Tableau III.1). En raison d'un problème technique avec l'incubateur, nous avons subi une perte totale des pontes du 9 janvier 1996. Le nombre d'alevins produits n'a donc pu être déterminé. Les 14 pontes récoltées lors de ce contrôle n'ont pas été prises en considération dans les résultats présentés dans le tableau 3.

Tableau III.1. Résultats sur la production d'alevins en race-ways par des pseudofemelles F3 *O. aureus*.

(*) : les 3 individus dont le sexe est indéterminé n'ont pas été pris en considération dans ce résultats

(**) : Les résultats du contrôle du 9 janvier 1996 (mortalité pendant la phase d'incubation) n'ont pas été pris en considération pour cette donnée.

Date de mise en charge	26 septembre 1995
Nombre de pseudofemelles	45
Nombre de mâles	15
Sexe-ratio (mâles : femelles)	1 : 3
Nombre total de pontes récoltées	195
Nombre total d'alevins récoltés	78 300
Alevins par pseudofemelle (*)	1740
Alevins par ponte (**)	402
Alevins.j ⁻¹ .m ⁻² .	23

3.4. Pourcentage de mâles dans les populations *O. aureus* issues de pseudofemelles F3.

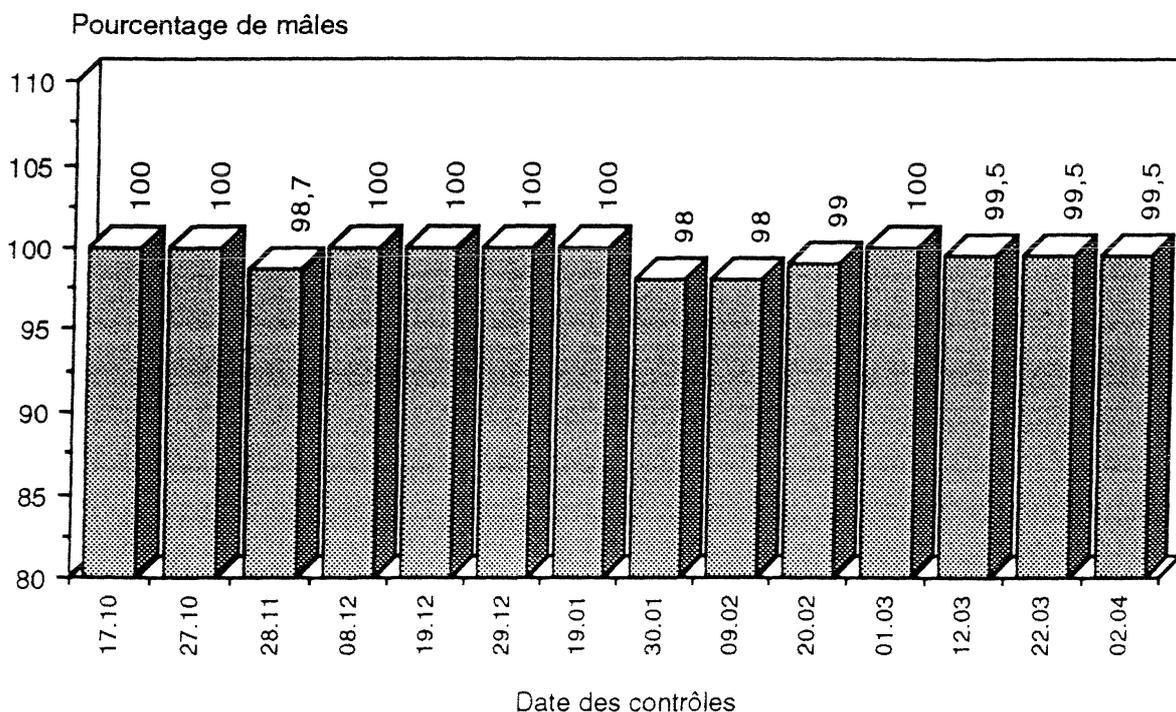
En raison d'un problème de disponibilité en infrastructures, les lots récoltés lors des contrôles du 7 et 17 novembre n'ont pu être conservés individuellement ce qui explique

l'absence de résultat, tout comme pour les contrôles postérieurs au 2 avril 1996.

Le pourcentage de mâles dans les lots *O. aureus* varie de 98 à 100 %. Des populations monosexes mâles ont été obtenues lors de six contrôles (17 et 27.10 ; 8, 19 et 29.12 ; 19.01 et 01.03) (Figure III.3).

Figure III.3 : Sexe-ratio des populations *O. aureus* issues de pseudofemelles F3.

(Taille des échantillons au sexage : 200 poissons par lot excepté pour le contrôle du 28.11 où seulement 156 poissons ont été examinés).

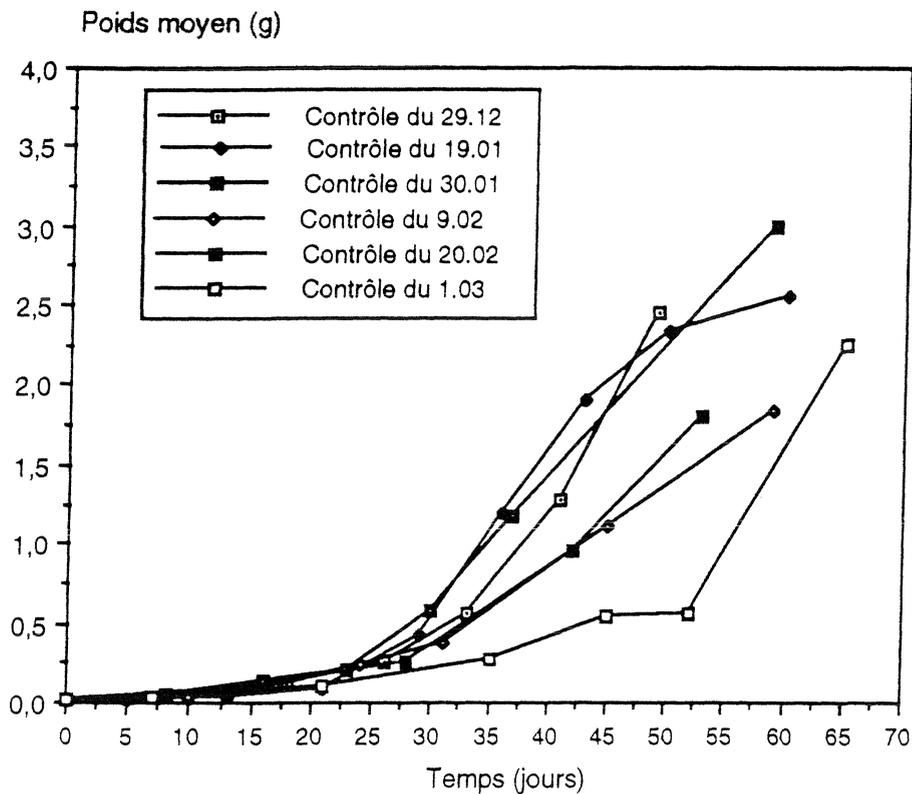


3.5. Données préliminaires sur la croissance d'individus mâles issus de pseudofemelles F3.

3.5.1. Élevage larvaire

Les courbes d'élevage larvaire sont présentées sur la figure III.4. A 30 et 60 jours, le poids moyen des poissons varie respectivement de 0,26 g (contrôle du 20.02) à 0,58 g (contrôle du 30.01) et de 1,84 g (contrôle du 09.02) à 3,00 g (contrôle du 30.01). Les résultats obtenus sur cette phase sont variables. Des expériences complémentaires sont programmées pour novembre 1995, dans les infrastructures du CRAA, afin de standardiser et optimiser l'élevage larvaire d'*O. aureus*.

Figure III.4. Courbes de croissance des lots en bacs de 200 litres / 1 m². Température d'élevage comprise entre 26,2 ± 1,8 °C (contrôle du 1.03) et 28,3 ± 1,7 °C (contrôle du 29.12).



3.5.2. Élevage des juvéniles (prégrossissement)

Deux essais ont été entrepris en bassin de 5 m³ avec deux lots de poids initial différent : 5,1 g pour le lot 1 et 1,1 g pour le lot 2. Tous les résultats sur la croissance et la survie de ces 2 lots sont repris dans le tableau III.2. La vitesse de croissance individuelle moyenne est de 0,31 g.j⁻¹.ind⁻¹ (lot 1) et de 0,17 g.j⁻¹.ind⁻¹ (lot 2). Les taux de conversion pour les lots 1 et 2 sont respectivement de 1,1 et 1,2.

Tableau III.2. : Synthèse des résultats du suivi de la croissance en bassin de 5 m³ d'individus mâles *O. aureus* issus de pseudofemelles F3.

Lots expérimentaux	Lot 1	Lot 2
Date de mise en charge	16 avril 1996	6 avril 1996
Nombre initial	4000	3929
Poids moyen initial (g)	5,1	1,1
Biomasse initial (kg)	20,3	4,4
Temps (jours)	61	72
Nombre final	3609	3341
Poids moyen final (g)	23,9	13,3
Biomasse finale (kg)	86,4	44,3
Biomasse (kg.m ⁻³)	17,3	8,9
Croissance (g.ind ⁻¹ .j ⁻¹)	0,31	0,17
Production (kg.m ⁻³)	13,2	8,0
Coefficient de conversion	1,2	1,1
Survie (%)	90,2	85,0
Température (°C ± ET))	24,0 ± 1,8	24,2 ± 1,7

3.5.3. Élevage en cage

Les résultats de l'élevage en cage d'individus mâles *O. aureus* sont synthétisés dans le tableau III.3. Sur une période de croissance de 98 jours, le poids moyen des poissons est passé de 21,3 à 114,5 g, soit une vitesse de croissance individuelle moyenne de 0,96 g.j⁻¹.ind⁻¹ et un taux de conversion de 1,40 (Lot 1). Sur la deuxième cage, le poids moyen est passé de 41,6 à 109,5 en 70 jours, soit une vitesse de croissance individuelle moyenne de 0,98 g.j⁻¹.ind⁻¹ et un taux de conversion de 1,49 (Lot 2). La survie en cage des lots 1 et 2 est respectivement de 97,4 (62 morts) et 99,6 % (7 morts).

Tableau III.3 : Synthèse des résultats de l'expérience de croissance en cage de 10 m³ d'individus mâles *O. aureus* issus de pseudofemelles F3.

Lots expérimentaux	Cage 1	Cage 2
Date de mise en charge	21 février 1996	20 mars 1996
Nombre initial	2345	1654
Poids moyen initial (g)	21,3	41,6
Biomasse initial (kg)	56,3	68,8
Temps (jours)	98	70
Nombre final	2283	1647
Poids moyen final (g)	114,5	109,5
Biomasse finale (kg)	261,3	180,3
Biomasse (kg.m ⁻³)	26,1	18,0
Croissance (g.ind ⁻¹ .j ⁻¹)	0,96	0,98
Production (kg.m ⁻³)	20,5	11,2
Coefficient de conversion	1,40	1,49
Survie (%)	97,4	99,6
Température (°C ± ET)	27,2 ± 2,5	26,3 ± 2,3
Taux d'oxygène (mg.l ⁻¹ ± ET)	6,4 ± 2,6	6,2 ± 2,6

4. Discussion de conclusion

4.1. Croissance des géniteurs

Le dimorphisme sexuel de la croissance en faveur du sexe mâle est un phénomène bien connu chez le genre *Oreochromis* (Pruginin et al, 1967, Mélard et al, 1989). Après 500 jours de croissance, le poids moyen (720 g) des mâles *O. aureus* et *O. niloticus* est beaucoup plus élevé que celui des femelles *O. aureus* (480 g) et *O. niloticus* (380 g) (Mélard et al, 1989). Little et al (1993) observent chez *O. niloticus* en période de reproduction (en race-way), une croissance individuelle moyenne de 0,6 g à 1,2 g.j⁻¹ chez les femelles et de 1,9 g.j⁻¹ pour les mâles. Dans les mêmes conditions, la croissance individuelle des mâles et des femelles de tilapia rouge red florida est respectivement de 1,2 et 0,4 g.j⁻¹ (Carteret, 1995). Chez *O. aureus*, la croissance de femelles et de pseudofemelles en reproduction dans le même bassin, est de 0,6 et 0,7 g.j⁻¹ (Desprez, 1992). Il ressort de nos résultats sur la croissance des mâles et des femelles *O. aureus*

que la croissance, en comparaison avec les autres études, est relativement faible surtout pour les mâles ($0,65 \text{ g.j}^{-1}$). De plus la différence de croissance individuelle moyenne entre les mâles et les femelles ($0,50 \text{ g.j}^{-1}$) n'est que de $0,15 \text{ g.j}^{-1}$.

Le dimorphisme de croissance entre mâle et femelle peut avoir plusieurs origines. La production d'oeufs par la femelle monopolise une grande partie de l'énergie pendant la période de reproduction. L'effet de la reproduction sur la croissance est d'autant accru que pendant la période d'incubation buccale de la progéniture, la femelle ne s'alimente pas. Chez *O. niloticus*, la perte de poids pendant l'incubation et la durée d'incubation sont corrélées (Little, 1989). Ce constat doit être cependant nuancé, en effet d'après Bromage and Robert (1995), une femelle peut croître de 1 g.j^{-1} même en période de reproduction. Une femelle *O. mossambicus*, après libération de sa progéniture, serait en mesure de consommer jusqu'à 40 % de son poids vif en 48 heures (Macintosh in Bromage and Roberts, 1995, données non publiées) ce qui compenserait le retard de croissance lié à l'incubation et reconstituerait les réserves d'énergie nécessaires à la reproduction suivante.

Le mâle, en période de reproduction, adopte un comportement de protection de son nid et de ce fait s'alimenterait moins (Baroiller et Jalabert, 1989). Cependant, pendant cette même période, les femelles incubent et de ce fait la disponibilité en aliment est plus grande et la compétition alimentaire diminue entre mâle et femelle.

La composante comportementale ne suffit pas à expliquer ce dimorphisme sexuel de la croissance. En effet, même en condition intensives d'élevage, conditions qui ne sont pas favorables à la reproduction, les femelles grandissent moins vite que les mâles chez *O. niloticus* (Hanson et al, 1983). L'avantage de croissance des mâles sur les femelles pourrait être relié aux différences observées au niveau du métabolisme des androgènes et des hormones thyroïdiennes entre les deux sexes (Toguyeni, 1993). Le dimorphisme sexuel de la croissance pourrait donc avoir une base génétique comme le suggère Fryer et Isle (1972). Si tel est le cas, cette base génétique pourrait expliquer la faible différence de croissance entre les mâles et les pseudofemelles *O. aureus* compte tenu que les deux sexes possèdent le même génotype ZZ. L'écart de croissance serait lié à la différence d'énergie investie dans la reproduction entre mâle et femelle (voir ci-dessus).

4.2. Évolution des pontes au cours du temps.

La répartition des pontes au cours du temps pourrait, d'après nos résultats, être corrélée à l'évolution de la température de l'eau. En effet, le maximum de pontes est observé alors que la température est maximale. Suite à ce pic une diminution du nombre de pontes et de la température est enregistrée.

La température dans le race-way est toujours supérieure à la température seuil de reproduction ($20\text{-}22 \text{ }^{\circ}\text{C}$) d'où l'observation de pontes en juin, mais certes en nombre plus

faible ce qui peut s'expliquer d'une part par une maturation plus lente des femelles liée aux basses températures mais également par un phénomène d'épuisement des géniteurs qui sont en reproduction depuis septembre 1995.

4.3. Production de populations à fort pourcentage de mâles.

La masculinisation par incorporation d'hormone dans l'aliment constitue la voie classique de production de populations monosexes mâles chez les espèces de tilapia. De nombreux travaux relatent, en conditions expérimentales (nombre d'individus traités compris entre 50 et 200), l'obtention d'un fort pourcentage de mâles suite à une inversion hormonale du sexe au moyen d'un androgène (Clemens and Inslee, 1968 ; Guerrero, 1974 et 1975 ; Sanico, 1975 ; Shelton et al, 1978 ; Tayamen and Shelton, 1978 ; Owusu-Frimpong and Nijjhar, 1981 ; Obi and Shelton, 1983 ; Rothbard et al, 1983 ; Buddle, 1984 ; Berger and Rothbard, 1985 ; McGeachin et al, 1987 ; Jo et al, 1988 ; Pandian and Varadaraj, 1988 ; Lone and Ridha, 1993). Quelques études font état d'essais d'inversion sur un grand nombre d'individus et fortes densités d'élevage (Tableau III.4). Une dose de 60 mg.kg⁻¹ d'aliment appliquée pendant 25 à 28 jours permet d'obtenir des populations mâles entre 91,2 et 99,4 % chez *O. niloticus* (Cruz and Mair, 1994), 96,0 et 100,0 % chez l'hybride *O. niloticus* x *O. aureus* (Buddle, 1984 ; Rothbard, 1983), 97,3 et 100,0 % chez le tilapia rouge red Taiwan (Rothbard et al, 1983 ; Berger and Rothbard, 1985), et entre 83,0 et 97,0 % et chez *O. aureus* (Mélard et al, 1995). Des doses plus faibles (30 mg.kg⁻¹ appliquée pendant une période de 21 jours permettent d'obtenir 99 % de mâles chez *O. niloticus* (Guerrero and Guerrero, 1988). L'augmentation des doses d'hormone n'induit pas un meilleur taux d'inversion (Berger and Rothbard, 1985 ; Mélard et al, 1995), à l'inverse l'augmentation de la densité d'élevage aurait un effet positif sur le taux d'inversion (Cruz and Mair, 1995) (Tableau III.4).

Des travaux sur la voie génétique de production de populations monosexes mâles ont été, par ailleurs, conduits chez *O. aureus* (individu pseudofemelles ZZ) et *O. niloticus* (super mâle YY), ces études ont été menées avec l'objectif de supprimer l'emploi de stéroïdes sur des poissons destinés à la consommation.. Chez *O. niloticus*, un individu mâle YY croisé avec 7 femelles XX différentes a donné systématiquement 100 % de mâles en descendance (Scott et al, 1989). A ce jour aucune étude, en condition de production, n'a été effectuée avec des individus YY. Chez *O. aureus*, Lahav (1993) obtient en étang des populations à fort pourcentage de mâles (entre 98 et 100 %) avec un lot de 185 pseudofemelles F2. Entre 1992 et 1994, 4 essais de production d'alevins à partir d'un même stock de pseudofemelles F2 ont été réalisés en étang de 200 m² (Desprez et al, 1995). Le pourcentage de mâles varie de 87,0 (essai 2) à 95,7 % (essai 4) avec une moyenne de 92,1 % sur les 4 essais, pour une production totale d'alevins de 42.570 à 155.256 en fonction de l'essai.

Tableau III.4 : Données bibliographiques sur les traitements masculinisants par un androgène en conditions intensives de production.
 MT : méthyltestostérone - ET : éthinyltestostérone - ind : individu

Espèce	Androgène	Dose (mg.kg ⁻¹)	Durée du traitement	Pourcentage de mâles	Structures utilisées pour l'inversion et données techniques	Auteurs
<i>O. niloticus</i>	17 α MT	60 mg.kg ⁻¹	25 jours	91,2 %	Hapa 1m ² - 0,5 m ³ Densité : 2000.m ⁻³	Cruz and Mair, 1994
				96,7	Hapa 1m ² - 0,5 m ³ Densité : 6000.m ⁻³	idem
				99,4	Hapa 1m ² - 0,5 m ³ Densité : 6000.m ⁻³	idem
<i>O. niloticus</i>	17 α MT	30 mg.kg ⁻¹	21 jours	99,0 %	Densité de 100 ind.m ⁻² les 7 premiers jours de traitement 500 à 750 ind.m ⁻² pour les 14 jours suivants 1.081.300 alevins inversés (survie : 78,1 %)	Guerrero and Guerrero, 1988
<i>O. aureus</i>	17 α MT	60 mg.kg ⁻¹	31 jours	97,0 %	Etang de 200 m ² Production de 60.000 à 100.000 alevins	Mélard et al, 1995
		100 mg.kg ⁻¹	31 jours	93,0 %		
		150 mg.kg ⁻¹	31 jours	83,0 %		

Tableau III.4 (suite) : Données bibliographiques sur les traitements masculinisants par un androgène en conditions intensives de production
 MT : méthyltestostérone - ET : éthinyltestostérone - ind : individu

Espèce	Androgène	Dose (mg.kg ⁻¹)	Durée du traitement	Pourcentage de mâles	Structures utilisées pour l'inversion et données techniques	Auteurs
Red Taiwan	17 α ET	60 mg.kg ⁻¹	28 jours	97,3 %	Cage de 1,5x1,0x0,9m 3500 alevins par cage soit 4000 ind.m ⁻³ ou 2300 ind.m ⁻²	Berger and Rothbard, 1987
		120 mg.kg ⁻¹	28 jours	99,7 %		
Hybride <i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i>	17 α ET	60 mg.kg ⁻¹	25 à 28 jours	96,0 %	400 alevins par cage	Buddle, 1984.
				99,0 %	1800 alevins par bac	
				98,0 % 99,0 % 99,0 %	600 à 650.000 alevins par bac de 8,5 m ³ soit 70 à 76.500 ind.m ⁻³	
Hybride <i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i> Red Taiwan	17 α ET	60 mg.kg ⁻¹	28 à 29 jours	98,0 à 100,0 %	Inversion en bac de 28 m ³ Densité : 8 à 17.000 alevins. m ⁻³ ou 15.600.m ⁻² .	Rothbard et al, 1983

Le pourcentage de mâles dans les populations produites par inversion hormonale du sexe (entre 91,2 et 100,0 %) est équivalent à celui obtenu avec des pseudofemelles *O. aureus* (92,1 et 100,0 %). Les pseudofemelles répondent donc à la nécessité de produire des populations à fort pourcentage de mâles sans avoir recours à des stéroïdes de synthèse, dont l'utilisation, sur des individus destinés à la consommation humaine, est en principe prohibé. Cette technique, basée sur le déterminisme du sexe, implique un suivi rigoureux, notamment lors des phases de sélection et de multiplication des stocks de géniteurs, afin d'éviter toute contamination génétique des lots de géniteurs ce qui pourrait se traduire par une dérive du pourcentage de mâles.

Nous avons observé (Desprez et al, données non publiées obtenues à l'Université de Liège - Belgique) une diminution du pourcentage de mâles dans les descendance des pseudofemelles F3 (66 à 100 % de mâles). En ce qui concerne notre souche, le pourcentage de mâles dans les descendance de pseudofemelles F3 est très élevé (98 à 100,0 %), nous testerons en 1996/1997 les pseudofemelles F4. Afin de se prémunir d'une éventuelle dérive du pourcentage de mâles au cours des génération successives de pseudofemelles, il est préconisé de reconstituer régulièrement, à partir d'individus classiques *O. aureus*, une génération F1 de pseudofemelles. Cette opération de production de nouveaux stocks initiaux de pseudofemelles permettra également de maintenir et d'augmenter la diversité génétique du stock de géniteurs.

IV. Le déterminisme génétique du sexe chez *O. aureus*.

1. Introduction

L'espèce *O. aureus* est caractérisée, comme nous l'avons évoqués dans l'introduction, par un déterminisme du sexe de type oiseau à homogamétie mâle ZZ et à hétérogamétie femelle ZW. Les pseudofemelles, individus transsexuels présentant un génotype et un phénotype mâle, donnent théoriquement en descendance 100 % de mâles lors du croisement avec des mâles classiques ZZ. Nos résultats, obtenu lors des essais de production intensive, montrent qu'un faible pourcentage de femelle (< 2%) est observé dans certaines populations. Cette apparition de femelles dans des descendance théoriquement monosexue mâle, pourrait être lié à une contamination des populations par l'apport d'alevins de tilapias gris de souche locale via le réseau hydraulique. Cependant des femelles sont régulièrement observées dans les descendance de pseudofemelles tant en milieu contrôlé (circuits fermés, aquariums..) (Mair et al, 1991 b ; Mélard, 1995 ; Mélard et al, 1995) qu'en milieu extérieur (étang..) (Lahav, 1993 ; Desprez et al, 1995). Depuis septembre 1995, 7 femelles ont été testées individuellement en aquarium par reproduction avec 3 mâles classiques ZZ afin de déterminer le pourcentage de mâles dans

les descendances de pseudofemelles F3. Ces croisements sont également destinés à repérer des couples produisant des descendances monosexes mâles dans l'objectif d'inverser à la 17α éthinylestradiol une partie des progénitures et constituer ainsi un stock de pseudofemelles F4.

2. Matériel et méthode

2.1. Reproduction et élevage des juvéniles

Les reproductions ont lieu dans un aquarium de 500 litres, thermorégulé à 28 ± 1 °C, au moyen d'une résistance, dans lequel sont placés 1 mâle et 5 pseudofemelles *O. aureus*. Lorsqu'une pseudofemelle incube (l'incubation buccale se caractérise par une déformation de la cavité bucco-pharyngienne et la présence d'oeufs dans la bouche), elle est isolée de ces congénères dans un compartiment de l'aquarium. Après 10 jours d'incubation, les alevins sont récoltés dans la bouche de la femelle, comptés et placés dans un aquarium de 200 litres d'un circuit fermé thermorégulé à 28 °C. Les alevins sont nourris manuellement à satiété 6 fois par jour au moyen d'un aliment pour truites (Gheerbrandt, 56 % de protéines) dont la granulométrie est adaptée à leur taille.

2.2. Identification des géniteurs

Les individus mâles et pseudofemelles sont identifiés par un transpondeur porteur d'un code et implanté dans la musculature dorsale (système Indexel, commercialisation Rhône Mérieux France).

3. Détermination du sexe-ratio.

Suite à une période d'élevage de 2 mois post-fécondation, un échantillon de 100 poissons est prélevé. Ces individus sont disséqués et les gonades examinées au microscope après squash (Guerrero and Shelton, 1974).

4. Résultats

Ces résultats confirment la capacité des pseudofemelles F3 à produire des populations monosexes mâles. Le pourcentage de mâles, au sein des 19 descendances étudiées, varie de 96,0 (femelle E71 x mâle 346) à 100,0 % (Tableau IV.1). Sur les 19 couples testés, 15 présentent des descendances monosexes mâles. Une légère déviation du sexe-ratio est observés sur 3 descendances successives du couple "femelle A42 x mâle 346" et sur la descendance du couple "femelle E71 x mâle E08". Ce dernier cas excepté, le pourcentage de mâles dans les descendances successives des pseudofemelles D2E et 63A est stable à

Tableau IV.1. : Sexe-ratio des descendances de pseudofemelles F3 *O. aureus*.

100:0 : le nombre d'individus disséqués pour la détermination du sexe-ratio est inférieur à 100:0

(*) : test du χ^2 ; sexe-ratio statistiquement différent de 100:0 à $p < 0,05$

Code	Pseudofemelle	C4D	D2E	E47	A42	63A	E71	D1F
Mâle								
40D		100:0	100:0	<u>100:0</u>	<u>100:0</u>	<u>100:0</u>	<u>100:0</u>	100:0
E08			100:0 100:0 98:2		100:0	100:0 100:0	96:4 (*)	
346			<u>100:0</u> 100:0 100:0	100:0 100:0	<u>99:1</u> <u>98:2</u> 97:3 <u>100:0</u>		<u>100:0</u>	

100 %. Une seule pseudofemelle (D2E) a pu être croisée avec les 3 mâles, dans tous les cas, les descendance de cette pseudofemelle, étaient monosexes mâles.

5. Discussion

Comme nous l'avait laissés présager les résultats sur la production massive de population monosex mâle (Chapitre III), une légère déviation du pourcentage initial de mâle est apparue dans 3 descendance dont deux issues du couple pseudofemelle A42 x mâle 346. Dans les travaux de Mair et al, 1991 b, des déviations plus importantes du pourcentage de mâle sont observées dès la première génération de pseudofemelles (66,7 à 100,0 % de mâles) mais aussi en deuxième génération (51,6 à 100,0 %), lors du croisement avec des mâles classiques. Des déviations sont également signalées par Mélard (1995) tant en F1 (72,7 à 100,0 %) qu'en F2 (85,0 à 100,0 %). Il ressort des nombreuses études sur le déterminisme génétique du sexe que le modèle monofactoriel de déterminisme du sexe n'est pas suffisant pour expliquer la totalité des sexe-ratios même lors du croisement entre individus classiques. Des couples (vraies femelles et vrais mâles) peuvent produire, chez *O. aureus*, des descendance monosexes mâles ou monosexes femelles (Shelton et al, 1983). Dans cette étude, 20 % des individus testés dévient significativement du sexe-ratio 1 : 1. Mair et al (1991 b) mettent également en évidence des sexe-ratios non théoriques (entre 20 et 65 % de femelles) chez des vraies femelles ce qui conduit les auteurs à proposer un modèle de déterminisme du sexe impliquant les chromosomes sexuels et un couple de gènes autosomaux récessifs (F, f). Le double récessif "ff" conduit à l'obtention d'un individu femelle, quelque soit le couple de chromosomes sexuels (WZ ou ZZ). Cette théorie fait ainsi apparaître des sexe-ratios mendéliens non théoriques dans les descendance issues de femelles (1 : 3 ; 3 : 5) et de pseudofemelles (3 : 1 ; 1 : 1). Cette hypothèse sur le déterminisme du sexe de l'espèce *O. aureus*, ne permet cependant pas d'expliquer les faibles variations du pourcentage de mâles dans les descendance de pseudofemelles. Chez *O. niloticus*, des sexes-ratios non théoriques sont également observés (Shelton et al, 1983 ; Wolfarth et Wedekind, 1992 ; Mair et al, 1991 a). Le sexe-ratio est un caractère héritable en descendance, ce qui a permis à Wolfarth et Wedekind (1992) de sélectionner des géniteurs *O. niloticus* donnant de forts pourcentages de mâles en descendance. Un effet paternel sur le sexe-ratio a été mis en évidence par Shelton et al (1983) sur *O. aureus* et par Wolfarth et Wedekind (1992) sur *O. niloticus*. A l'opposé, Mair et al (1991 a) montrent l'existence d'un effet maternel sur le sexe-ratio chez *O. aureus*. Les légères variations du sexe-ratio dans les descendance de certains couples pourraient s'expliquer par un effet parental. Des expériences complémentaires doivent cependant être réalisées afin de mettre en évidence cet effet.

Le modèle monofactoriel constituerait la base du système génétique du déterminisme du sexe chez les tilapias. Les déterminants génétiques multiples seraient regroupés sur une

paire de chromosomes nommés chromosomes sexuels qu'il n'est pas possible d'observer par des techniques de caryotypage et de coloration différentielle (Trombka et Avtalion, 1993). Cependant l'influence d'autres déterminants, localisés sur des autosomes, pourraient intervenir sur la détermination du sexe d'où la théorie de l'influence autosomale émise dès 1971 par Jalabert et al. La notion d'influence autosomale a donné lieu à l'élaboration de plusieurs théories (Hammerman et Avtalion, 1979 ; Mair et al, 1991 b). Cependant, et malgré ces théories complémentaires au modèle mendélien, des déviations du sexe-ratio restent inexplicables. Des influences paternelles ou maternelles sur le sexe-ratio pourraient également exister et expliquer une partie de la variabilité (Wolfarth et Wedekind, 1992 ; Shelton et al, 1983 ; Mair et al, 1991 b). L'apport de techniques plus récentes, comme la gynogénèse, laisse également suspecter l'existence de crossing-over.

Les facteurs génétiques ne sont peut être pas les seuls impliqués dans la détermination du sexe. Des travaux récents ont démontré l'effet de la température sur la différenciation sexuelle du tilapia *O. niloticus* (Baroiller et al, 1993, 1994). Chez les reptiles, les mécanismes d'un tel déterminisme seraient basés sur l'existence d'un facteur thermosensible qui interviendrait dans la régulation de la synthèse d'enzymes spécifiques de la production de certains stéroïdes (Desvages et al, 1991, 1992). Certains facteurs environnementaux supplanteraient donc l'expression des facteurs génétiques ce qui pourrait expliquer une partie des déviations observées. Le sexe des tilapias résulterait de l'expression des déterminants sexuels localisés sur les gonosomes mais également de l'expression de régulateurs génétiques, situés les autosomes, et environnementaux.

V. Données préliminaires sur la fécondité des pseudofemelles *O. aureus*

1. Introduction

Les pseudofemelles sont obtenues suite à une inversion hormonale du sexe au moyen d'un stéroïde de synthèse, la 17 α éthynylœstradiol (125 mg.kg⁻¹ d'aliment) mais conservent un génotype mâle ZZ. Les études sur les pseudofemelles (Mair et al, 1987 ; 1991 b ; Mélard, 1995 ; Desprez et al, 1995 ; notre étude) ont montré l'efficacité de l'inversion hormonale du sexe à produire des individus viables et fonctionnels pour la reproduction. Une étude comparée de la biologie de femelles et de pseudofemelles *O. aureus* (Desprez et al, 1995) n'a mis aucune différence en évidence sur le plan de la fécondité, du poids des oeufs et de de l'indice gonado-somatique entre les deux types génétiques de géniteurs. Une plus faible fréquence de ponte des pseudofemelles est cependant apparue mais uniquement lorsque ces individus se trouvent en élevage mixte avec des femelles.

Parallèlement à l'étude sur le déterminisme du sexe, la fécondité relative et absolue des pseudofemelles *O. aureus* ont été déterminées. L'alternance de périodes de reproduction et de périodes de stabulation (donc sans mâles) pour les géniteurs pseudofemelles ne nous ont pas permis d'étudier des paramètres comme la fréquence de pontes et l'intervalle de temps entre deux pontes successives de pseudofemelles.

2. Matériel et méthode

Comme défini dans le chapitre précédent, les reproductions ont lieu dans un aquarium de 500 litres, thermorégulé à 28 °C, au moyen d'une résistance, dans lequel sont placés 1 mâle et 5 pseudofemelles *O. aureus*.

Lorsqu'une pseudofemelle incube (l'incubation buccale se caractérise par une déformation de la cavité bucco-pharyngienne et la présence d'oeufs dans la bouche), elle est isolée de ces congénères dans un compartiment de l'aquarium. Après 10 jours d'incubation, les alevins sont récoltés dans la bouche de la femelle, comptés et placés dans un aquarium de 200 litres d'un circuit fermé thermorégulé à 28 °C. La pseudofemelle est ensuite pesée au gramme près, puis son code est détecté. La fécondité absolue est définie comme étant le nombre d'alevins récoltés dans la bouche de la pseudofemelle, la fécondité relative comme le nombre d'alevins par ponte et par kg de poisson (alevins.ponte⁻¹.kg⁻¹).

3. Résultats et discussion

La fécondité absolue des pseudofemelles F3 *O. aureus* varie de 54 à 1143 alevins avec une moyenne de 426 ± 322 alevins par ponte. Sur l'ensemble des pontes observées, 4 se sont avérées être non-viables et sont caractérisées par l'absence d'alevins dans la bouche du géniteur suite à la période d'incubation de 10 jours.

La fécondité relative varie de 535 alevins.ponte⁻¹.kg⁻¹ pour une pseudofemelle de 101 g à 8084 alevins.ponte⁻¹.kg⁻¹ pour un individu de 95 g.

Pour des pseudofemelles F2, Desprez et al (1995) ont déterminé une fécondité absolue de 520 ± 305 oeufs et une fécondité relative variant de 181 oeufs.ponte⁻¹.kg⁻¹ à 7326 oeufs.ponte⁻¹.kg⁻¹. Pour les femelles la fécondité absolue est de 523 ± 236 oeufs et la fécondité relative varie de 172 à 4781 oeufs.ponte⁻¹.kg⁻¹. D'après Dadzie (1970), une femelle *O. aureus* pond en moyenne 719 oeufs pendant la saison favorable avec un minimum de 325 oeufs et un maximum de 4392. D'après Desprez (1992), le nombre moyen d'oeufs produits par une femelle et une pseudofemelle au cours de la saison est respectivement de 2285 (variation individuelle de 156 à 4287) et 1325 (variation individuelle de 99 à 3347). En ce qui concerne notre étude, la moyenne est de 426 alevins par ponte, soit avec une moyenne de 5 pontes par pseudofemelles par saison (chapitre 3),

un total de 2130 alevins par pseudofemelle et par saison. Les résultats obtenus avec les pseudofemelles à la Réunion sont donc en accord avec ces données.

VI. Production de pseudofemelles F4 par inversion hormonale du sexe à la 17 α éthynyloestradiol

1. Introduction

L'inversion hormonale du sexe d'une descendance monosexue mâle de génotype ZZ, issue d'une pseudofemelle, conduit à l'obtention d'une nouvelle génération de géniteurs pseudofemelles. Afin de renouveler et d'accroître notre stock de pseudofemelles, plusieurs essais de féminisation de descendance, issues de pseudofemelles F3, ont été menés entre février et mai 1996.

2. Matériel et méthode.

2.1. Traitement hormonal

L'inversion est réalisée sur des lots de poissons placés dans des aquariums de 200 litres d'un circuit fermé thermorégulé à 28 °C. Les descendance de pseudofemelles F3 sont inversées à la 17 α éthynyloestradiol (17 α EE) à raison de 150 mg de 17 α EE.kg⁻¹ d'aliment pendant 40 jours. L'hormone est incorporée dans l'aliment (Gheerbrandt, 56 % de protéines) au moyen d'éthanol à 95 %. La ration alimentaire des lots témoins et des lots inversés est calculée sur base de la formule suivante : 0,18 x temps (jours) ^{1.16} (Mélard, 1995). L'aliment est distribué par un nourrisseur automatique à tapis sur 8 heures par jour.

Les lots témoins sont nourris avec un aliment classique (marque gerhbrant). Après l'inversion, les alevins sont nourris avec un aliment classique.

2.2. Sexage

A 60 jours d'âge, un échantillon de 100 poissons par lot témoin et 30 poissons par lot inversé est prélevé. Ces individus sont disséqués et les gonades examinées au microscope après squash (Guerrero and Shelton, 1974).

3. Résultats et discussion

Tableau VI.1. : Résultats de l'inversion de descendance de pseudofemelles F3 à la 17 α -éthynyoestradiol (150 mg d'hormone.kg⁻¹ d'aliment ; durée 45 jours).

Origine de la descendance	Survie (%)	Mâles (%)	Femelles (%)
Pseudofemelle : 63A			
Mâle : 346			
Lot témoin	83,3	88,0	12,0
Lot inversé	77,8	6,5	93,5
Origine parentale inconnue (ponte du race way)			
Lot témoin	81,4	88,0	12,0
Lot inversé	80,0	3,0	97,0
Pseudofemelle : D2E			
Mâle : 346			
Lot témoin (aqua)	65,1	100,0	0,0
Lot témoin (typex)	64,0	100,0	0,0
Lot inversé	92,0	13,3	86,7
Pseudofemelle : A42			
Mâle : 346			
Lot témoin	75,5	97,0	3,0
Lot inversé	78,4	21,4	78,6

Le pourcentage de mâles dans le lot témoin des deux premières descendance inversées étaient de 88 % de mâles. ce qui est faible au regard des résultats obtenus lors de l'étude sur le déterminisme du sexe (Chapitre 3). Cependant les lots traités et les lots témoins étaient élevés dans le même circuit fermé. Une recirculation de la 17 α EE dans tout le circuit n'est pas à exclure, ce qui pourrait expliquer la présence de 12 % de femelles dans les lots témoins. Afin de tester cette éventualité de recirculation, pour la troisième descendance, deux lots témoins ont été constitués, un dans le circuit aquarium dans lequel était placé le lot traité et le second lot témoin dans le circuit typex dans lequel aucun traitement hormonal n'est effectué. Dans les deux lots témoins, nous avons obtenu 100 % de mâles, ce qui tend à infirmer une recirculation d'hormone. Désormais et afin d'éviter tout risque éventuel de recirculation, les inversions hormonales sont effectuées dans des aquariums indépendants.

Sur les 4 descendance inversées, seules la troisième présentait 100 % de mâles dans le lot témoin. Les individus de cette descendance, inversés à la 17 α EE, constitueront donc le nouveau stock de pseudofemelles F4, soit 273 individus.

Le testage des pseudofemelles résultant de la 4^{ème} inversion (lot témoin 97 % de mâles) nous permettra également de déterminer si la déviation de sexe-ratio en F3 est un trait de

caractère hérité par les pseudofemelles F4. Si il s'avérait que ces pseudofemelles produisaient des descendance à très fort pourcentage de mâles, elles seraient alors utilisées comme géniteurs pour la production massive de juvéniles *O. aureus*.

De nouvelles inversions de descendance monosexes mâles à la 17 α EE sont programmées afin de disposer d'un stock de géniteurs suffisants pour répondre à la demande des éleveurs en juvéniles. Nous disposons désormais d'une bonne caractérisation de certains couples (Chapitre IV) en terme de sexe-ratio, ce qui nous permet dès lors d'effectuer des inversions sur des descendance issues de parents donnant systématiquement 100 % de mâles.

V. Conclusion et perspectives pour la saison de reproduction 1996 / 1997

Nous avons démontré la capacité des pseudofemelles à produire des populations à très fort pourcentage de mâles (98 à 100 %). Chez *O. aureus*, la voie génétique, basée sur un déterminisme monofactoriel du sexe, est donc viable et permet de répondre à la principale problématique d'élevage du tilapia, à savoir la production de populations monosexes mâles. En comparaison, la technique classique d'inversion hormonale du sexe, couramment employé chez le tilapia, conduit à des résultats équivalents avec cependant le problème majeur d'utiliser des stéroïdes de synthèse sur des individus destinés à la consommation humaine.

L'utilisation de pseudofemelles impose cependant un suivi rigoureux surtout lors des phases de multiplication des stocks afin principalement d'éviter toute contamination, ce qui pourrait se traduire par une diminution du pourcentage de mâles en descendance.

Une nouvelle génération de pseudofemelles (pseudofemelles F4) a été produite en 1996. Les pseudofemelles F4 seront testées en reproduction individuelle et intensive sur leur capacité à produire des populations monosexes mâles, et ce afin de s'assurer de l'absence de dérive du sexe-ratio au cours des générations successives de pseudofemelles, ce phénomène ayant déjà été observé sur ce type de géniteurs (Mélard, 1995 ; Mélard et al. 1995 ; Desprez et al, 1995).

Les individus *O. aureus*, produits à partir de pseudofemelles, sont destinés à alimenter les élevages en retenues collinaires dans le cadre du programme de développement de l'aquaculture dans ces zones d'altitude. Dès cette année, et à partir des individus disponibles, des essais seront menés afin d'établir les limites thermiques de cette espèce pour la survie et la croissance dans les conditions d'élevage en retenue collinaire. Comme nous l'avons évoqués dans la discussion du chapitre 3, aucune technique, que ce soit la voie génétique (pseudofemelles) ou la voie hormonale, ne permet d'obtenir des populations systématiquement 100 % mâles. Dans les descendance de pseudofemelles,

un faible nombre d'individus présente des caractéristiques phénotypiques (organes sexuels) femelles, ces individus sont donc susceptibles de se reproduire même dans des structures de type cage, comme celles installées dans les retenues collinaires. Deux options se présentent pour contrôler les reproductions anarchiques qui risquent de conduire à une surpopulation en tilapia dans les retenues :

1) un tri manuel de tous les individus avant la mise en charge dans les cages. Ce type de manipulation est long et coûteux en temps et en main d'œuvre.

2) l'élevage mixte avec un prédateur, le black-bass, élevé directement dans la retenue. Les premiers résultats d'un essai réalisé dans les infrastructures du CRAA sont très prometteurs. L'élevage du black-bass, outre le fait de contrôler les reproductions, permettra de valoriser le potentiel des retenues par la production d'une seconde espèce.

VI. Références bibliographiques

- Baroiller, J.F.. 1988 - Etude corrélée de l'apparition des critères morphologiques de la différenciation de la gonade et de ses potentialités stéroïdogènes chez *Oreochromis niloticus*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, 70 pages.
- Baroiller, J.F. et 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. et Jalabert, B., 1993 - Effets des fortes températures d'élevage sur le sex-ratio de descendances issues de néomâles d'*Oreochromis niloticus*. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kotias and D. Pauly, (eds) "Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture". 11-16 novembre 1991, Abidjan, Côte d'Ivoire. ICLARM Conf. Proc. 41. Sous presse.
- Baroiller, J.F., Desprez, D., Toguyeni, A., Mélard, C., Hoareau, M.C. and Bosc, P., 1996 - Use of a natural steroid, 11 β hydroxyandrosténédione for the production of male monosex population in 4 tilapias species, *Oreochromis niloticus*, *O. aureus*, *Sarotherodon melanotheron*, and the red hybrid "Red Florida". Soumis pour publication à Aquaculture.
- Baroiller, J.F., Chourrout, D., Fostier, A. and Jalabert, B., 1995 a - 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. and Geraz, E., 1995 b - Temperature sex determination in two tilapia species *Oreochromis niloticus* and the red tilapia (red Florida strain) : effect of high or low temperature. In Proceedings of the Reproductive Physiology of Fish, 5th International Symposium, July 2-8, 1995. Austin, Texas, sous presse.
- Mc Bay, K.R., 1961. The biology of *Tilapia nilotica*. *Proc. Annu. Conf. SouthEast Assoc. Game Fish Comm.* 15: 208-218.
- Bedawi, R.M., 1985 - Recruitment control and production of market-size *Oreochromis niloticus* with the predator *Lates niloticus* L. in the Sudan. *J. Fish Biol.*, 26 : 459-464.

- Berger, A; and Rothbard, S., 1987. Androgen induced sex-reversal of red tilapia fry stocked in cages within ponds. *Bamidgeh*, 39: 49-57.
- Bosc, P., 1993 - Rapport d'activité 1993 de l'Association Réunionnais de Développement de l'Aquaculture (ARDA). 51 pages + annexes.
- Bromage, R.N. and Roberts, R.J., 1995 - Broodstock management and egg and larval quality. R.N. Bromage and R.J. Roberts (eds), Blackwell Science Ltd Oxford 424 pages.
- Buddle, C.R., 1984 - Androgen induced sex-inversion of *Oreochromis* (Trewavas) hybrid fry stocked into cages standing in an earthen pond. *Aquaculture*, 40: 233-239.
- Carteret, Y., 1995 - Caractéristiques de la reproduction et élevage larvaire du tilapia rouge du genre *Oreochromis* et de souche Red Florida. Rapport de fin d'étude ISPA / ENSAR, 53 pp.
- Clemens, H.P. and Inslee, T., 1988 - The production of unisexual broods by *Tilapia mossambica* sex-reversed with methyltestosterone. *Trans Amer. Fish Soc.*, 97(1): 18-21.
- Cruz, E.M.V. and Mair, G.C., 1994 - Conditions for effective androgen sex-reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 122: 237-248.
- Dadzie, S., 1970. Laboratory experiment on the fecundity and frequency of spawning in *Tilapia aurea*. *Bamidgeh*, 22: 14-18.
- Desprez, D., 1992. Etude comparée de la reproduction de femelles et de pseudofemelles chez le tilapia *Oreochromis aureus*. Mémoire de Licence, Université de Liège, 52 pages.
- Desprez and Carteret, 1995 - Rapport du programme de recherche sur l'aquaculture du tilapia sur l'île de la Réunion. 58 pp + annexes.
- Desprez, D., Mélard, C., and Philippart, J.C., 1995 - Production of a high percentage of male offspring with 17 α -ethynylestradiol sex reversed *Oreochromis aureus*. II. Comparative reproductive biology of females and F2 pseudofemales and large scale production of male progeny. *Aquaculture*, 130: 35-41.

- Desvage, G. and Pieau, C., 1991 - Steroid metabolism in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 39(2): 203-213.
- Desvage, G. and Pieau, C., 1992 - Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function in the incubation temperature of eggs. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 41(3): 851-853.
- Fryer, G. and Isles, T.D., 1972. The cichlid fishes of the great lakes of Africa: their biology and evolution. T.F.H. Publ, Neptune City, New Jersey, Iso published by Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Mac Geachin, R., Robinson, E.H. and Neill, W.H., 1987 - Effect of feeding high levels of androgens on the sex-ratio of *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 61: 317-321.
- Goudie, C.A., Shelton, W.L. and Parker, N.C., 1986. Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to sexually undifferentiated blue tilapia. *Aquaculture*, 58: 215-226.
- Goudie, C.A., Shelton, W.L. and Parker, N.C., 1986. Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to adult blue tilapia. *Aquaculture*, 58: 227-240.
- Guerrero, R.D., 1974 - The use of synthetic androgens for the production of monosex male *Tilapia aurea* (Steindachner). Ph.D. Dissertation, Auburn University, Auburn, Ala. 97 pp.
- Guerrero, R.D., 1975 - Use of androgens for the production of all male *Tilapia aurea* (Steindachner). *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 104(2): 342-348.
- Guerrero III, R.D., 1982 - Control of tilapia reproduction. In: A.S.V. Pullin and R.H. Lowe McConnell (Editors), the Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings, 7, 432 pages, Manila, Philippines, pp. 309-316.
- Guerrero, R.D. and Shelton, W.L., 1974 - An aceto-carmin squash method for sexing juvenile fishes. *Prog. Fish Cult.*, 36(1): 56
- Guerrero, R.D. and Guerrero, L.A., 1988 - Feasibility of commercial production of sex reversed Nile tilapia fingerlings in the Philippines. In R.S.V. Pullin, T. Buckhaswan and J.L. Maclean (Editors), The Second International Symposium on Tilapia in

Aquaculture. ICLARM, Manila, Philippines, pp: 183-186.

Hammerman, I.S. and Avtalion, R.R., 1979 - Sex determination in *Sarotherodon* (tilapia) part 2 : the sex-ratio as a tool for the determination of genotype. A model of autosomal and gonosomal influence. *Theor. Appl. Genet.*, 55: 177-187.

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

Hickling, C.F., 1968 - Fish hybridization. *FAO Fish Rep.*, 44 : 1-11.

Huner, J.V., Miltner, M., Bean, R.A. et Avault Jr, J.W., 1983 - Survival and reproduction of blue tilapia (*Oreochromis aureus* ; Cichlidae) in ponds stocked with bowfin (*Amia calva* ; Amiidae) to serve as predators (Pisces). *Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Auton. México*, 10(1) : 11-16.

Hunter, G.A. and Donaldson, E.M., 1983 - Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fish. In W.S. Hoar and D.J. Randall (eds), *Fish Physiology*, Vol 9b, Academic press, New York pp 351-413.

Jalabert, B, Kammacher, P. and Lessent, P., 1971. Déterminisme du sexe chez les hybrides entre *Tilapia macrochir* et *Tilapia nilotica*. Etude de la sexe-ratio dans les retrocroisements des hybrides de premières génération par les espèces parentes.

Jensen, G.L. et Shelton, W.L., 1979 - Effects of estrogens on *Tilapia aurea* : implications for production of monosex genetic male tilapia. *Aquaculture*, 16 : 233-242.

Jo, J.Y., Smitherman, R.O. and Behrends, L.L., 1988 - Effect of dietary 17 α methyltestosterone on sex reversal and growth on *Oreochromis aureus*. In "the second International Symposium on Tilapia in Aquaculture, eds R.S.V. Pullin, T. Bhukaswan, K. Tonguthai and J.L. Maclean) pp. 203-207. ICLARM Conference Proceeding 15, International Center of Aquatic Ressources Management, Manila, Philippines.

Lahav, E., 1993 - Use of sex-reversed females to produce all-male tilapia (*Oreochromis aureus*) fry. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 45(3) : 131-136.

- Lazard, J., 1990 - Transfert de poissons et développement de la production piscicole. Exemple de 3 pays d'Afrique subsaharienne. Rev. Hydrobiol. Trop., 23(3) : 251-265.
- Little, D.C., 1989 - An evaluation of strategies for production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fry suitable for hormonal treatment. Ph. D. dissertation, Institute of Aquaculture, University of Sterling.
- Little, D.C., Macintosh, D.J. and Edwards, P., 1993 - Improving spawning synchrony in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture and Fisheries management, 1993 (24): 399-405.
- Lone, K.P. and Ridha, M.T., 1993 - Sex reversal and growth of *Oreochromis spirulus* (Günther) in brackish and sea water by feeding 17 α methyltestosterone. Aquaculture and Fisheries Management, 24: 593-602.
- Mair, G.C., Penman, D.J., Scott, A., Skibinski, D.O.F. and Beardmore, J.A., 1987. Hormonal sex-reversal and the mechanism of sex determination in *Oreochromis*. In: K. Tiews (Editor), Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture. Vol.2. Heenemann, Berlin, pp. 301-312.
- Mair, G.C., Scott, A.G., Penman, D.J., Skibinski, D.O.F. and Beardmore, J.A., 1991a - Sex determination in the genus *Oreochromis*. 1. Sex reversal, gynogenesis and triploidy in *O. niloticus*(L). Theor. Appl. Genet., 82: 144-152.
- Mair, G.C., Scott, A.G., Penman, D.J., Skibinski, D.O.F. and Beardmore, J.A., 1991b - Sex determination in the genus *Oreochromis*. 2. Sex reversal, hybridisation, gynogenesis and triploidy in *O. aureus* Steindachner. Theor. Appl. Genet., 82: 153-160.
- Mélard, C., 1986 - Recherches sur la biologie d'*Oreochromis niloticus* L. (Pisces Cichlidae) en élevage expérimental : reproduction, croissance, bioénergétique. Cah. Ethol. Appl., 6(3): 224 pages.
- Mélard, C., 1995 - Production of a high percentage of male offspring with 17 α -ethynylestradiol sex reversed *Oreochromis aureus*. I. Estrogen sex reversal and production of F2 pseudofemales. Aquaculture, 130: 25-34.
- Mélard, C. et 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 and Recirculations systems, Stavanber 28-30 may, pp : 637-658.

Mélard, C. et 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 pages.

Mélard, C., Ducarme, C., Phillipart, J.C. and Lasserre, J., 1989 - The commercial intensive culture of tilapia in Belgium. In N. De Pauw, E. Jaspers, H. Ackeford and E. Wilkins (Editors), Aquaculture: a Biotechnology in Progress. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium. pp 225-232.

Mélard, C., Desprez, D. and Philippart, J.C., 1995 - Le contrôle du sexe chez les tilapias: bilan et perspective de recherche à la station de Tihange. Cahiers d'Ethologie, 13(4): 421-434.

Middendorp, A.J., 1995 - Pond farming of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in northern Cameroon. Controlling a sexing error of 1 % in hand sexed male tilapia monosex culture by african catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Aquaculture Research, 26: 739-747.

Obi, A. and Shelton, W.L., Androgen and estrogen sex reversal in *Tilapia hornorum*. In International symposium on tilapia in Aquaculture compiled by Fishelton and Yaron, Tel Aviv, pp 425-434.

Owusu-Frimpong, M. and Nijjhar, B., 1981 - Induced sex-reversal in *Tilapia nilotica* (Cichlidae with methyltestosterone. Hydrobiologia, 78: 157-160.

Pandian, T.J. and Sheela, S.G., 1995 - Hormonal induction of sex-reversal in fish. Aquaculture, 138 : 1-22.

Pandian, T.J. and Varadaraj, K., 1988 - Techniques for producing all male and all triploid *Oreochromis mossambicus*. In "the second International Symposium on Tilapia in Aquaculture, eds R.S.V. Pullin, T. Bhukaswan, K. Tonguthai and J.L. Maclean) pp. 203-207. ICLARM Conference Proceeding 15, International Center of Aquatic Ressources Management, Manila, Philippines.

Philippart, J.C. and Ruwet, J.C., 1982 - Ecology and distribution of tilapias. In : A.S.V. Pullin and R.H. Lowe McConnell (Editors), the Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings, 7, 432 pages, Manila, Philippines, pp. 15-59.

- Pruginin, Y., Rothbard, S., Wohlfarth, G., Halevy, A., Moav, R. et Hulata, G., 1975 - All-male broods of *Tilapia nilotica* x *Tilapia aurea* hybrids. *Aquaculture*, 6: 11-21.
- Pullin, R.S.V., 1993 - World tilapia culture and its future prospects. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kotias and D. Pauly, (eds) "Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture". 11-16 novembre 1991, Abidjan, Côte d'Ivoire. ICLARM Conf. Proc. 41. Sous presse.
- Rothbard, S., Solnik, E., Shabbath, S., Amado, R. and Grabie, I., 1983 - The technology of mass production of hormonally sex-inversed all male tilapias. In International symposium on tilapia in Aquaculture compiled by Fishelton and Yaron. Tel Aviv, pp 425-434.
- Ruwet, J.C., Voss, J., Hanon, L. et Micha, J.C., 1976 - Biologie et élevage du tilapia, p. 332-364. In "Symposium on Aquaculture in Africa, CIFA Tech. Pap., 4(1): 791 pages.
- Sanico, A.F., 1975 - Effect of 17 alpha ethynyltestosterone and estrone on sex ratio and growth of *Tilapia aurea* (Steindachner). *The Philippine Journal of Fisheries*, 13(1): 1-17.
- Sarig, S., 1969. Winter storage of Tilapia. *FAO Fish Cult. Bull.* 2(2): 8-9.
- Scott, A.G., Penman, D.J., Beardmore, J.A. and Skibinski, D.O.F., 1989 - The YY supermale in *Oreochromis niloticus* (L.) and its potential in aquaculture. *Aquaculture*, 78: 237-251.
- Shelton, W.L., Hopkins, K.D. and Jensen, G.L., 1978 - Use of hormones to produce monosex tilapia for aquaculture. In "Culture of exotic Fish Symposium Proceedings. Fish culture section". (R.O. Smitherman and W.L. Grover, eds). Am. Fish Soc., Auburn, al: 10-33.
- Shelton, W.L., Meriwether, F.H., Kenneth, J.S. and Calhoun, E.W., 1983 - Progeny sex-ratio from intraspecific pair spawning of *Tilapia aurea* and *Tilapia nilotica*, 270-280. In L. Fishelson and Z. Yaron (Eds), *Proceeding of the International Symposium on tilapia Aquaculture*, Tel Aviv, Eel Aviv University, 624 pp.
- Sweetman, J.W., 1993 - Perspectives and critical success factors in the present farming of fish. In : *World Aquaculture '93*, Torremolinos, Spain, May 26-28.

- Tayamen, M.M. and Shelton, W.L., 1978 - Inducement of sex-reversal in *Sarotherodon niloticus*. *Aquaculture*, 14: 349-354.
- Toguyeni, A., 1992. Etude des facteurs physiologiques liés au sexe phénotypique dans le déterminisme du dimorphisme sexuel de la croissance chez *Oreochromis niloticus*.
Mem DEA Biologie Aquacole, Université de Rennes 1, 34 pages.
- Trewavas, E., 1983 - Tilapia fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* et *Danakilia*. British Museum (Natural History). Londres, 583 pages.
- Trombka, D. and Avtalion, R., 1993 - Sex determination in tilapia, a review. *The Israeli J. of Aquaculture Bamidgeh*, 45(1): 214-222.
- Wolfarth, G.W. and Wedekind, H., 1991 - The heredity of sex determination in tilapias. *Aquaculture*, 92: 143-156.



CIRAD EMVT
Département d'Elevage et
de Médecine Vétérinaire
du CIRAD



PROGRAMME DE RECHERCHE SUR LE TILAPIA ROUGE RED FLORIDA

Convention ARDA CIRAD Région Réunion

Rapport final 1996

Novembre 1996



Tilapia rouge Red Florida
Centre de Recherche et d'Application Aquacole - Ile de la Réunion

Réalisation du rapport : Desprez D - Novembre 1996

Equipe de recherche : Baroiller J.F. (CIRAD EMVT), Desprez D. (ARDA), Hoareau M.C. (ARDA).

Sommaire

<u>Préambule</u>	1
<u>Présentation du modèle biologique : le tilapia rouge Red Florida ou Gueule Rouge.</u>	3
<u>Chapitre 1 : Optimisation et transfert d'une technique d'inversion du sexe par un stéroïde naturelle la 11β 4 hydroxyandrosténédione</u>	5
I. Introduction générale	5
II. Détermination de la dose et de la durée optimale de traitement à la 11βOHA4 chez le tilapia rouge Red Florida.	5
1. Introduction	6
2. Matériel et méthode	6
2.1. Reproductions	6
2.2. Traitements hormonaux	7
2.3. Elevage et sexage des alevins.	7
2.4. Traitement statistique des données	7
3. Résultats et conclusion	7
3.1. Survie des alevins	7
3.2. Efficacité du traitement d'inversion	9
III. Application du protocole d'inversion à la production intensive de tilapia rouge Red Florida	9
1. Introduction	9
2. Matériel et méthode	10
2.1. Production d'alevins	10
2.2. Traitement hormonal	10
2.3. Contrôle du pourcentage de mâles dans les lots inversés	11
2.4. Essai d'optimisation de la durée du traitement	11
3. Résultats	11
3.1. Survie	11
3.2. Pourcentage de mâles	11
3.3. Essai d'optimisation de la durée d'inversion	12
4. Discussion	12

IV. Effet de la 11β hydroxyandrosténédione et des tris en fin d'inversion sur la croissance du tilapia rouge, Red Florida.	14
1. Introduction	14
2. Matériel et méthode	14
2.1. Constitution des lots expérimentaux	14
2.2. Méthode	15
3. Résultats	15
4. Discussion	18
5. Conclusion	20
V. Application d'un tri précoce à la production intensive	20
1. Introduction, matériel et méthode	20
2. Résultats	21
VI Conclusion générale	21

Chapitre 2 : Etude du déterminisme génétique du sexe : Proposition d'un modèle monofactoriel à 4 chromosomes

I. Présentation d'un modèle de déterminisme génétique monofactoriel du sexe chez le tilapia rouge Red Florida.	22
II. Matériel et méthode	25
1. Géniteurs	25
2. Identification des géniteurs	25
3. Reproductions.	25
4. Récupération et élevage des descendances.	25
5. Nourrissage des alevins	26
6. Suivi de la température	26
7. Sexage	26
8. Schéma de croisements des géniteurs F1	26
9. Schéma de croisements des géniteurs F2	27
III. Résultats	28
1. Survie	28
2. Analyse du sexe-ratio des descendances	28
IV. Discussion et conclusion	31

Chapitre 3 : Effet de la température d'élevage sur la différenciation sexuelle du tilapia rouge Red Florida

I. Introduction générale	34
II. Matériel et méthode	35
III. Résultats	36
1. Survie	36
2. Sexe-ratio des descendances.	36
IV Discussion et conclusion.	38
<u>Conclusion générale</u>	40
<u>Références bibliographiques</u>	41

Préambule

Les tilapias présentent de grandes potentialités pour la pisciculture, en partie liées à l'extrême facilité de leur élevage: une reproduction naturelle aisée en captivité, une croissance rapide, une grande résistance au manque d'oxygène, aux agents chimiques, aux maladies et aux manipulations fréquentes (Mélard et Philippart, 1981 a et b). L'existence d'un large éventail d'espèces adaptées à des environnements variés, y compris l'eau saumâtre et l'eau de mer (Philippart et Ruwet, 1982), a conduit à leur introduction dans de nombreux pays. Ce groupe est présent non seulement en Afrique (29 pays) mais aussi en Asie (14 pays), dans les Caraïbes (6 pays), en Amérique latine (9 pays), dans les pays Méditerranéens (6 pays) et également aux USA, en URSS, en Belgique, dans les îles Fiji et Guam (Pullin, 1993) et dans les DOM TOM, alors que la répartition originelle des espèces de tilapia se limitait à l'Afrique (sauf Madagascar) et à Israël. La production mondiale annuelle varie, selon les auteurs, entre 400 000 tonnes (Sweetman, 1993, chiffres pour l'année 1990) et 500 000 tonnes (Lazard, 1990), ce qui place les tilapias parmi les espèces les plus exploitées en aquaculture d'eau douce, après les carpes (5 000 000 de tonnes) et les salmonidés (600 000 tonnes) (Sweetman, 1993). Pullin (1993) prévoit un doublement de la production mondiale de tilapias dans les dix prochaines années.

Les tilapias du genre *Oreochromis*, caractérisés par un comportement d'incubation buccale maternelle des jeunes (Trewavas, 1983), représentent 95 % de la production mondiale de tilapia (Pullin, 1993). La grande efficacité de la reproduction des espèces de ce groupe éco-éthologique ainsi que leur maturité précoce (Ruwet et al, 1976; Philippart et Ruwet, 1982, Baroiller et Jalabert, 1989) constituent des avantages certains en pisciculture mais conduisent également, en milieu confiné comme l'étang, à une rapide surpopulation qui entraîne une diminution de la croissance par manque de nourriture et d'oxygène. Les étangs sont alors peuplés de poissons de petite taille, peu utilisables pour la commercialisation. Un contrôle de la reproduction s'est donc révélé nécessaire. Plusieurs solutions furent envisagées comme, par exemple, l'élevage mixte avec une espèce piscivore afin de diminuer, par prédation, la densité des tilapias de petite taille (Guerrero, 1982 ; Huner et al. 1983 ; Bedawi, 1985). Cette technique, outre une réduction de la production globale de tilapias, implique d'entretenir un stock de prédateurs. L'existence chez les tilapias d'un dimorphisme sexuel de la croissance jouant en faveur des mâles (Hickling, 1968 ; Hanson et al, 1983 ; Mélard 1986) orienta rapidement les recherches vers l'obtention de populations monosexes mâles, afin de supprimer toute reproduction incontrôlée et d'améliorer les performances globales du système de production (augmentation de la croissance, réduction de l'agressivité par diminution de la territorialité).

Le développement de l'aquaculture du tilapia rouge à la Réunion est également soumis à cette problématique de contrôle de la reproduction et de production de populations monosexes mâles par des techniques autres que celles utilisant une hormone de synthèse (17α méthyltestostérone) dont l'usage est en principe prohibé dans certains pays industrialisés comme ceux de la CEE.

Trois voies ont été étudiées pour répondre à ces deux problématiques majeures de l'élevage du tilapia rouge :

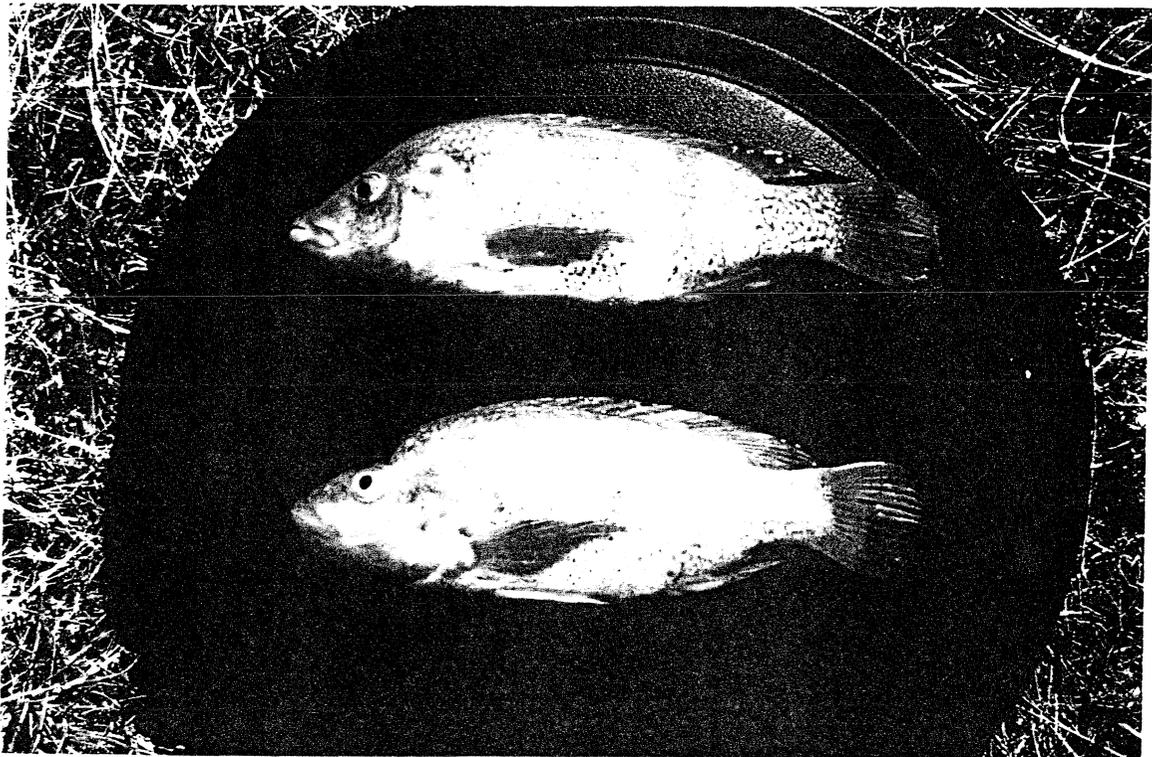
1) la voie hormonale qui consiste en l'utilisation d'une hormone naturelle pour les traitements d'inversion du sexe. Cette technique peut constituer une alternative à l'emploi des stéroïdes de synthèse. Cette voie déjà expérimentée avec succès chez plusieurs espèces de tilapia, devait être testée chez le tilapia rouge.

2) la voie génétique : par le biais d'inversion hormonale du sexe, des géniteurs homozygotes mâles dans leur génotype sexuel peuvent être produits. Leur croisement conduit alors en théorie à l'obtention de descendance monosexes mâles. Chez le tilapia rouge, l'étude du déterminisme génétique du sexe était un préalable afin d'évaluer la pertinence de cette voie pour la production de populations monosexes mâles.

3) la voie environnementale : les fortes températures d'élevage chez *O. niloticus* et *O. aureus* dévient le sexe-ratio en faveur du sexe mâle. Une thermosensibilité de la différenciation du sexe chez le tilapia rouge sera recherché.

Ces trois voies de recherche sont étudiées depuis 1994 dans le cadre du programme développé par l' ARDA et le CIRAD à La Réunion sur l'aquaculture du tilapia. Ce rapport est destiné à présenter les résultats et les conclusions des 3 années d'expérimentations sur le tilapia rouge Red Florida.

Présentation du tilapia rouge Red Florida



Présentation du modèle biologique : le tilapia rouge Red Florida ou Gueule Rouge.

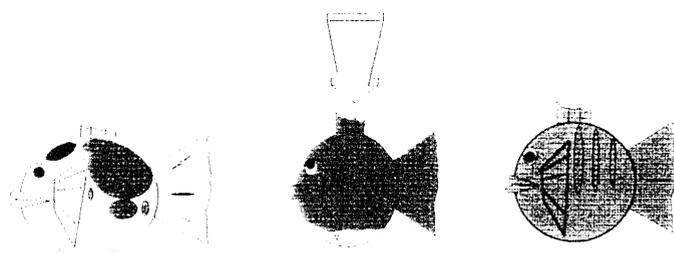
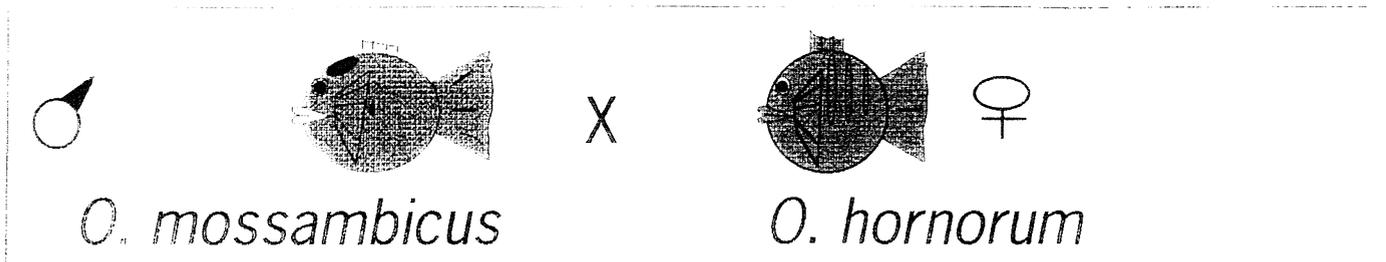
La souche de tilapia rouge Red Florida a été initialement développée par l'américain Sipe dans les années 1970 (Sipe, 1979) et résulte du croisement d'un mâle *Oreochromis mossambicus* mutant rouge (ou blond selon l'appréciation de l'observateur...) et d'une femelle *Oreochromis hornorum* de phénotype couleur sauvage. La première génération d'individus issus de cette hybridation présente un faible taux de survie (entre 59 et 63 %), une maturité précoce (2 à 3 mois) une faible croissance et les individus sont relativement peu résistants à des températures d'élevage inférieures à 18 °C (Behrends et al, 1982). Afin d'améliorer le potentiel de cet hybride initial, un programme d'hybridation avec *Oreochromis aureus* et *Oreochromis niloticus* a été élaboré par la Tennessee Valley Authority et l'Université d'Auburn suivant deux voies (Behrends and Smitherman, 1984) :

- 1) une double hybridation impliquant *O. aureus* et *O. niloticus* et destinée à développer la résistance aux basses températures
- 2) une hybridation suivie d'une introgression (backcross répétés) impliquant *O. niloticus* destinés à améliorer les performances de croissance.

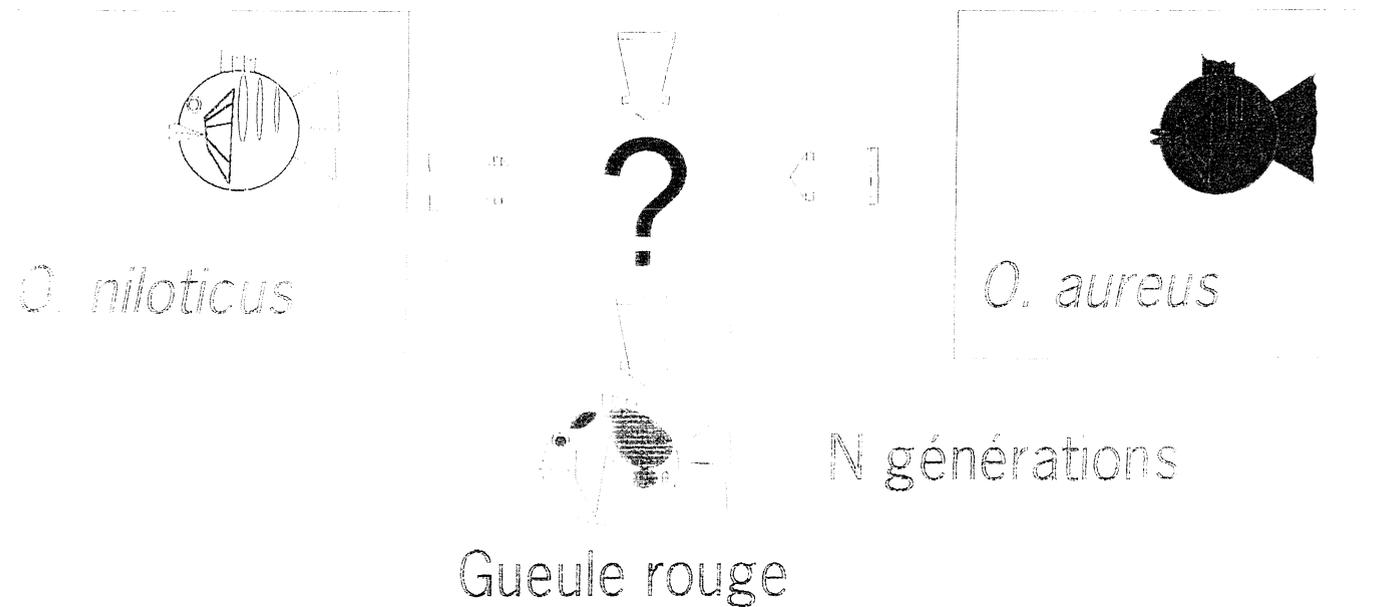
Cette hybride 4 voies, résultat de la double hybridation, a été transféré à la Jamaïque auprès de la Sunfish Hatcheries. Cette société commerciale a ensuite réalisé une nouvelle introgression, suivant le schéma de Behrends et al (1987), par *O. aureus* avec en résultat final. un hybride "Red aureus" composé à 90,625 %, d'après Sunfish Hatcheries, du patrimoine génétique de l'espèce *O. aureus*. Ces individus "Red aureus" auraient ensuite été recroisés avec du Red Florida initial (mâle *O. mossambicus* mutant rouge x femelle *O. hornorum*). Ces informations sont cependant à considérer avec grande précaution car elles émanent d'une publication commerciale de la société Sunfish Hatcheries. Ce rapide historique montre la grande confusion quant-aux différents croisements qui ont conduit à la souche dénommé actuellement Red Florida.

Les premiers individus Red Florida introduits à la Réunion en 1990 provenaient de la Jamaïque via la Martinique. En 1991, un deuxième transfert est effectué mais directement de Jamaïque. Les deux populations d'origine martiniquaise et jamaïcaine ont ensuite été hybridées dans les infrastructures du CRAA. Une caractérisation génétique par analyse du polymorphisme enzymatique révèle que les tilapias rouges Red Florida présents à la Réunion, résultent du croisement entre *O. mossambicus* et *O. hornorum* avec toutefois une faible introgression génétique par *O. niloticus* et *O. aureus* (Rognon, 1993) ce qui est en désaccord avec une composition à 90,625 % d'*O. aureus* annoncée par la Sunfish Hatcheries.

Once upon a time ...
The "Gueule Rouge" story



Souche Red Florida



Le tilapia rouge Red Florida est caractérisé comme toutes les espèces du genre *Oreochromis* par une incubation buccale maternelle et un dimorphisme sexuel de la croissance en faveur du sexe mâle.

Chapitre 1

**Optimisation et transfert
d'une technique
d'inversion du sexe par un
stéroïde naturel, la 11 β 4
hydroxyandrosténédione.**

I. Introduction générale

L'inversion hormonale du sexe est basée sur la possibilité d'inverser le sexe d'alevins encore indifférenciés (Yamamoto, 1959) par apport de stéroïdes caractéristiques soit du sexe mâle (17 α méthyltestostérone, 17 α éthyntestostérone, 11 β hydroxyandrosténédione), soit du sexe femelle (17 α éthyntestostérone, oestrone). Les espèces de tilapia du genre *Oreochromis* sont caractérisées par une maturité précoce et une grande efficacité de la reproduction (Baroiller et Jalabert, 1989) et l'existence d'un dimorphisme sexuel de la croissance en faveur du sexe mâle a orienté les recherches vers la production de populations monosexes mâles (Baroiller et Jalabert, 1989). L'inversion hormonale du sexe reste à ce jour la technique la plus rentable et la plus efficace pour atteindre cet objectif. Néanmoins, l'utilisation de stéroïdes artificiels comme la 17 α -méthyltestostérone, sur des animaux destinés à la consommation humaine reste interdite dans de nombreux pays industrialisés.

Les travaux de Baroiller (1988) sur *O. niloticus* ont permis l'identification d'hormones mâles naturelles pendant les étapes précoces de la mise en place du testicule du jeune alevin. Les potentialités masculinisantes de l'un de ces androgènes, la 11 β hydroxy 4 androsténédione (11 β OHA4), ont été montrées chez 3 espèces de tilapia, *O. niloticus*, *O. aureus* et *Sarotherodon melanotheron* (Baroiller et al, 1996). Cet androgène présente des potentialités masculinisantes équivalentes à celle de la 17 α méthyltestostérone (Baroiller et Toguyeni, 1993) et les doses minimales permettant l'obtention de populations 100 % mâles sont de 10 mg d'hormone.kg⁻¹ d'aliment chez *O. niloticus* et 50 mg.kg⁻¹ chez *O. aureus*. Des populations monosexes mâles sont cependant régulièrement obtenues suite à des traitements variant de 30 à 50 mg.kg⁻¹ de 11 β OHA4 appliqués pendant 21 à 45 jours chez *O. niloticus* et *S. melanotheron*. Chez *O. aureus*, seul un traitement à 50 mg.kg⁻¹ pendant 26 jours conduit à une population monosexes mâle. Une réaction spécifique au traitement hormonale à la 11 β OHA4 est suggérée par les auteurs (Baroiller et al. 1996).

Le marquage radioactif de la 17 α méthyltestostérone, chez *O. mossambicus*, a permis de constater que la radioactivité reste élevée dans les 8 à 12 premières heures après l'arrêt de la distribution de l'hormone principalement dans les viscères (95 %). Chez cette même espèce, le taux de radioactivité est inférieur à 1 % après l'arrêt du traitement (Johnstone et al, 1983). Chez *O. aureus* des résultats similaires ont été obtenus par Goudie et al, 1986 a et b), 21 jours après la fin du traitement, il reste moins de 1 % de la radioactivité initiale (Goudie et al, 1986 a et b). L'inversion hormonale du sexe chez le tilapia intervient au cours des 3 à 4 premières d'élevage, la taille commercialisable est atteinte après 12 à 14 mois de croissance minimum. Goudie et al (1986 a et b) concluent donc à l'absence de risques pour la santé des personnes consommant des poissons hormonalement traités au stade d'alevins. Néanmoins, le suivi de la radioactivité ne reflète qu'en partie la

dégradation de l'hormone et ne renseigne pas sur la vitesse d'élimination des différents métabolites de l'hormone, leur toxicité pour le poisson ainsi que pour le milieu naturel. La $11\beta\text{OHA}_4$ existe chez le tilapia (Baroiller et al, 1988) qui peut donc plus facilement et rapidement la dégrader, de plus, les produits de dégradation de l'hormone existe dans le milieu naturel contrairement aux résidus issus d'une hormone de synthèse comme la 17α méthyltestostérone. Un androgène naturel comme la $11\beta\text{OHA}_4$ constitue donc une alternative intéressante à l'utilisation de stéroïdes artificiels dans l'attente de la mise au point de nouvelles techniques basées essentiellement sur le déterminisme du sexe.

Le développement de l'élevage du tilapia rouge dans les îles est lié à sa ressemblance avec des poissons marins comme la brème de mer ou le Lutjan, mais aussi pour sa bonne croissance et sa capacité d'adaptation à l'eau de mer. La Réunion, comme tous les autres pays producteurs de tilapia, s'est trouvée confrontée à la nécessité de produire des populations monosexes mâles par une technique autre que l'inversion hormonale du sexe au moyen de stéroïdes artificiels. Il a donc été proposé dans le cadre du programme de recherche sur le tilapia rouge à la Réunion de mettre au point et de transférer au secteur privé un protocole d'inversion du sexe par un androgène naturel, la $11\beta\text{OHA}_4$. Ce transfert a été précédé par une phase expérimentale destinée à déterminer la dose et la durée de traitement optimale à la $11\beta\text{OHA}_4$ pour le tilapia rouge Red Florida

II. Détermination de la dose et de la durée optimale de traitement à la $11\beta\text{OHA}_4$ chez le tilapia rouge Red Florida.

1. Introduction

Comme nous l'avons signalé ci dessus, la réponse à la $11\beta\text{OHA}_4$ serait spécifique à chaque espèce de tilapia (Baroiller et al. 1996). Dès lors la détermination de la dose et de la durée optimale de traitement pour le tilapia rouge étaient des préalables nécessaires à tout transfert. Les premiers essais ont été réalisés à Montpellier, en 1994, sur des descendance issus de géniteurs originaires de la Réunion. Les résultats, repris dans ce rapport à titre d'information et pour assurer la cohérence avec les expérimentations effectuées à la Réunion, sont tirés du mémoire d'Eddie Géraz (1994).

2. Matériel et méthode

2.1. Reproductions

Les géniteurs, marqués par un transpondeur, sont placés dans des aquariums de 200 litres à un sexe-ratio de 2 femelles pour 1 mâles. Les reproductions sont détectées par l'apparition du comportement maternel d'incubation qui se caractérise par une

déformation de la cavité buccale. Neuf jours post-fécondation, les alevins sont prélevés de la bouche de la femelle. La progéniture est divisée en 2 à 6 lots de taille égale et ce en fonction du nombre d'alevins. Les lots sont ensuite transférés en aquarium de 200 litres thermorégulés à 27 °C.

2.2. Traitements hormonaux

La 11β OHA₄, est incorporée dans l'aliment au moyen d'éthanol absolu. Des doses de 20 à 50 mg d'hormone .kg⁻¹ d'aliment ont été testées. Les témoins sont nourris avec le même aliment sans ajout d'hormone. Durant la première semaine, les alevins sont nourris manuellement 6 fois par jour, 7 jours par semaine. Puis progressivement, l'aliment est distribué à l'aide d'un distributeur automatique durant les 12 heures de photophase, toujours 7 jours par semaine. Les alevins sont traités pour des durées comprises entre 10 et 35 jours.

2.3. Elevage et sexage des alevins.

A la fin du traitement, les alevins sont élevés dans les mêmes conditions et dans les mêmes aquariums mais nourris avec de l'aliment classique.

Entre 60-90 jours post fécondation, quand les caractéristiques histologiques de la différenciation de la gonade sont déjà en place (Baroiller 1988), tous les alevins de chaque lot ont été disséqués, les gonades prélevées et examinées après squash (Guererro et Shelton, 1974).

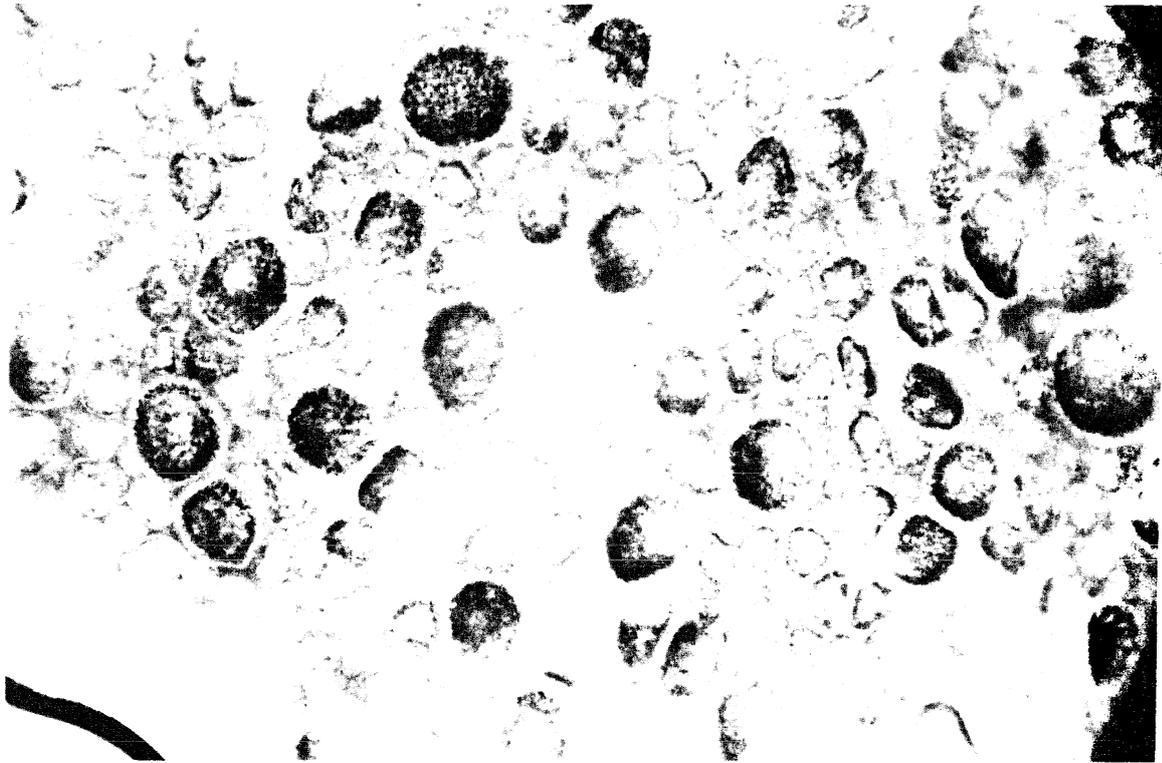
2.4. Traitement statistique des données

L'efficacité des traitements hormonaux a été analysée statistiquement par comparaison des pourcentages des lots traités et de leurs témoins respectifs par un test du χ^2 .

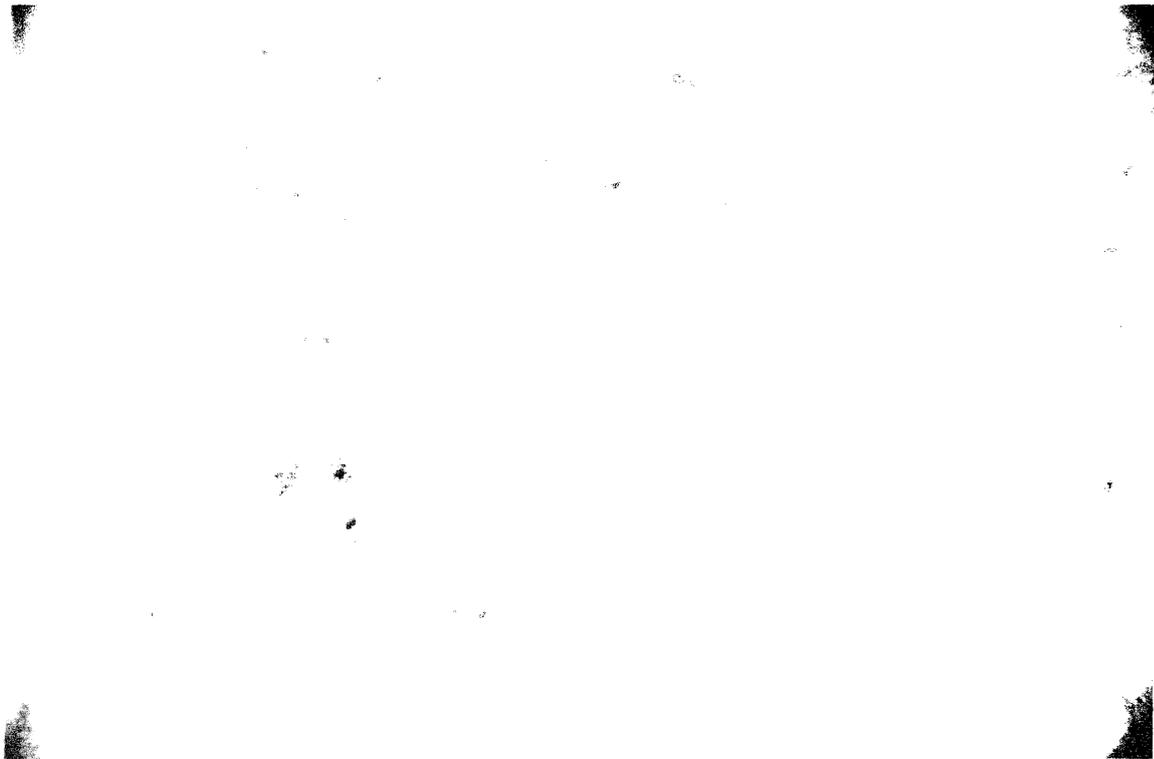
3. Résultats et conclusion

3.1. Survie des alevins

La moyenne des taux de mortalité enregistrés est de 12,6 %. En moyenne, les lots traités présentent des taux de mortalité comparables à ceux des témoins, avec respectivement 12,1 et 14,5 % (Tableau 1).



Squash d'ovaires de tilapia rouge, Red Florida,
âge 60 jours, x 100



Squash de testicules de tilapia rouge, Red Florida,
âge 60 jours, x 100

Tableau 1 : Résultats des traitements à la 11 β hydroxyandrosténédione sur le tilapia rouge

<u>Caractéristiques du traitement</u>		<u>Survie (%)</u>	<u>Nombre de mâles</u>	<u>Nombre de femelles</u>	<u>Pourcentage de mâles</u>	
<u>Dose</u>	<u>Durée</u>					
50	35	86	86	0	100	*
50	28	89	88	1	98	*
Témoin		66	39	27	59	
50	35	74	73	1	98	*
50	21	42	34	8	80	*
Témoin		84	41	43	48	
50	28	67	67	0	100	*
50	21	52	52	0	100	*
50	14	98	78	20	79	
50	10	82	52	30	63	
Témoin		72	51	21	70	
40	35	83	66	17	79	*
40	28	97	60	37	61	*
40	21	73	34	39	46	
40	14	91	33	58	36	
40	10	97	22	75	22	
Témoin		96	32	64	33	
40	35	100	99	1	99	*
40	28	100	72	28	72	*
40	21	76	42	34	55	
Témoin		100	44	56	44	
40	21	100	66	34	66	*
40	14	100	47	53	47	
40	10	100	41	59	41	
Témoin		100	43	57	43	
30	35	100	51	49	51	
30	28	100	57	43	57	
30	21	100	69	31	69	
30	14	89	48	41	53	
Témoin		92	54	38	58	
20	35	100	48	52	48	
20	28	100	59	41	59	
20	21	88	53	35	60	
Témoin		76	39	37	51	

* : le pourcentage de mâle dans le lot traité diffère statistiquement ($p < 0,05$) de celui du lot témoin.

3.2. Efficacité du traitement d'inversion

Un traitement de 50 mg de $11\beta\text{OHA}4.\text{kg}^{-1}$ appliqué pendant 28 ou 35 jours conduit, dans ces conditions expérimentales, à l'obtention de 98 à 100 % de mâles (Tableau 1). Une diminution de la durée du traitement à 21 jours se traduit par une variabilité de la réponse puisque dans un cas 100 % de mâles sont obtenus et dans le second seulement 80 %. Pour une dose de 40 mg de $11\beta\text{OHA}4.\text{kg}^{-1}$ d'aliment, le pourcentage de mâles des lots traités (61 à 99 %) est significativement supérieur ($p < 0,05$) à celui des lots témoins (33 à 44) pour des durées de traitement de 28 à 35 jours. Un seul traitement a cependant permis d'obtenir une population proche du monosex avec 99 % de mâles ; ce résultat n'a pu être reproduit sur un deuxième lot soumis aux mêmes conditions (79 % de mâles). Une durée de 21 jours conduit à une légère augmentation du pourcentage de mâles (66 %) par rapport au témoin (43 %) pour un des deux lots soumis à cette durée de traitement. Pour des doses de 40 mg de $11\beta\text{OHA}4.\text{kg}^{-1}$ appliquées pendant 10 ou 14 jours et pour des doses de 30 mg de $11\beta\text{OHA}4.\text{kg}^{-1}$, le traitement hormonal n'a pas d'effet sur le sexe-ratio des lots inversés. Cette hétérogénéité des réponses pour des doses inférieures à 50 mg de $11\beta\text{OHA}4.\text{kg}^{-1}$, indépendamment de la durée du traitement, suggère que les conditions de traitement arrivent à leur seuil critique. Il ressort de ces expérimentations sur le tilapia rouge Red Florida qu'un traitement à 50 mg de $11\beta\text{OHA}4.\text{kg}^{-1}$ d'aliment pendant une durée de 28 à 35 jours permet d'obtenir un pourcentage de mâles compris entre 98 et 100 %.

III. Application du protocole d'inversion à la production intensive de tilapia rouge Red Florida

1. Introduction

Les travaux effectués à Montpellier (Géraz, 1994) ont permis de déterminer la dose optimale de traitement, à savoir 50 mg de $11\beta\text{OHA}4.\text{kg}^{-1}$ d'aliment, pour l'obtention de populations à fort pourcentage de mâles (98 à 100 %). Afin de limiter la consommation d'hormone, principalement en raison de son prix élevé (1500 FF le gramme), une durée de traitement de 28 jours a été retenue pour le protocole à appliquer à la production intensive. Afin d'optimiser la technique, des durées intermédiaires de traitement (22 et 25 jours) ont été testées.

2. Matériel et méthode

2.1. Production d'alevins

Suivant le protocole établi par l'ARDA (Bosc, 1993), les géniteurs sont mis en reproduction dans des race-ways de 12 m² à raison de 6 individus au m² à un sexe-ratio mâle : femelle de 1 : 3. Tous les 10 jours, entre le 28 septembre 1994 et le 15 juin 1995, les oeufs et les alevins sont récoltés dans la bouche des femelles puis incubés dans des bouteilles de type Zug (volume : 5 litres) d'une écloserie thermorégulée à 28 °C. Les alevins résorbés lors du contrôle des géniteurs sont éliminés, seuls les stades oeufs, oeillets et vésiculés sont conservés pour l'inversion hormonale du sexe. Au stade pélagique les alevins passent, par sur-verse, dans des paniers où ils sont récoltés et transférés dans des bacs de 1m² / 200 l (planche 1) à une densité variant de 8000 à 14600 alevins par bac soit de 40 à 73 alevins.l⁻¹. Le nombre initial et final d'alevins en bac est estimé. Les bacs sont alimentés par l'eau de la lagune de la ferme du Gol. Le renouvellement en eau est de 500 %.h⁻¹. Une oxygénation complémentaire est assurée par des diffuseurs. Un contrôle de température et de l'oxygène est effectué deux fois par jour.

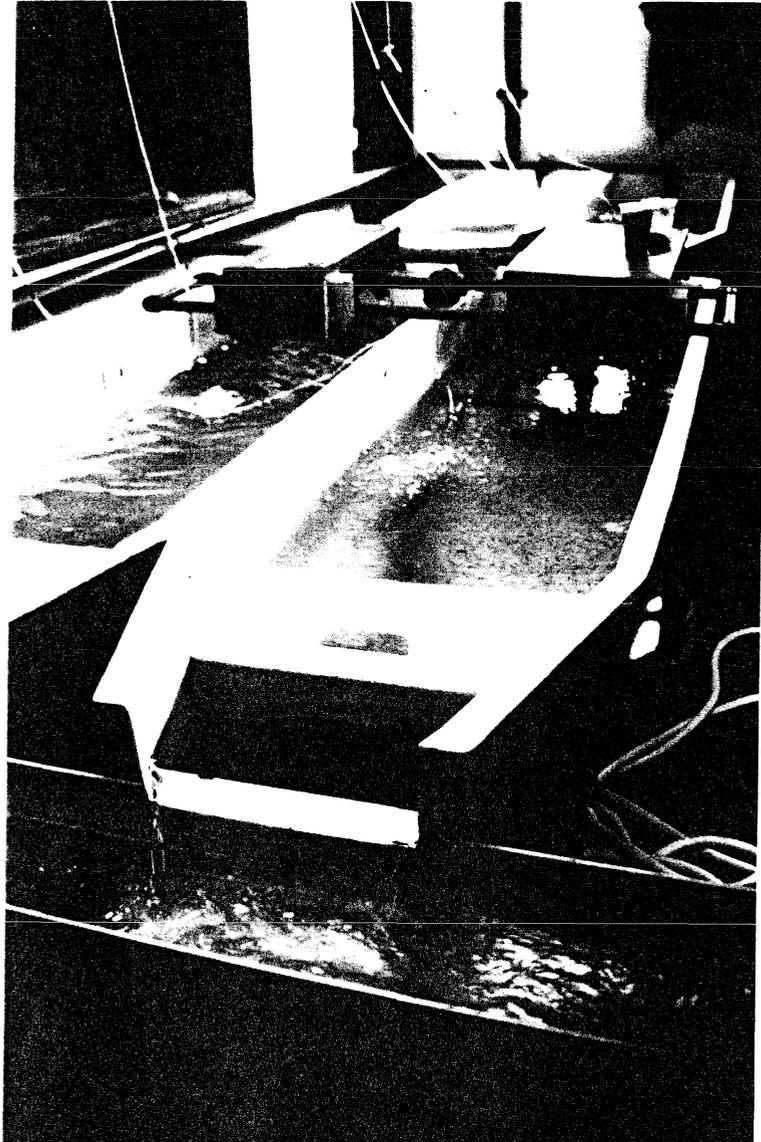
Il est à signaler que les reproductions ont été bloquées, par séparation des mâles et des femelles, en janvier et février 1995 et ce pour des raisons inhérentes à la demande locale en juvéniles.

2.2. Traitement hormonal

La 11βOHA4 est incorporée dans un aliment pour truite (Gheerbrandt, 56 % de protéines) avec de l'éthanol obtenu à partir de la distillation de la canne à sucre, à 0,6 litre d'alcool.kg⁻¹ d'aliment et 50 mg de 11βOHA4.kg⁻¹ d'aliment. L'aliment est distribué au moyen d'un nourrisseur automatique à tapis fonctionnant sur 8 heures par jour, 7 jours sur 7, et ce dès le premier jour de l'inversion. Le traitement est appliqué pendant 28 jours. La ration alimentaire est calculée sur base du poids moyen des alevins. Un contrôle du poids moyen et de la biomasse est effectuée toutes les semaines et la ration réajustée en conséquence.

Suite au traitement hormonal, tous les juvéniles issus d'un même contrôle de géniteurs, sont regroupés dans des bacs extérieurs de 5 m³ (bacs de pré-grossissement) alimentés également par l'eau de la lagune de la ferme du Gol. L'alimentation en eau des bacs (inversion et pré-grossissement) est interrompue toutes les 30 minutes pendant une période variable de 10 à 20 minutes. Ces coupures sont inhérentes au système de pompage et de remplissage de la fosse de captage de la lagune.

Pendant la phase de pré-grossissement, les alevins sont nourris avec un aliment normal (Gheerbrandt, 56 % de protéines) dont la granulométrie est adaptée à leur taille.



Bassins d'inversion équipés d'un nourrisseur automatique à tapis (Volume 200 litres, surface 1 m²)

Tableau 2 : Densité d'élevage, survie et sexe-ratio des lots inversés de tilapias rouges Red Florida à la 11 β hydroxyandrostenedione (traitement : dose de 50 mg d'hormone.kg⁻¹ d'aliment appliquée pendant 28 jours)

Lot	Nombre d'alevins inversés	Densité (alevins.l ⁻¹)	Survie (%)	Température (°C) pendant le traitement hormonal	Mâle (%) avant le tri	Mâle (%) (poids < 5g)	Mâle (%) (poids 5-6 g)	Mâle (%) (poids > 6g)
1	46000	40 à 50	85.6	25.6 ± 0.9	98.0	99.0	99.2	99.6
2	38800	40 à 52	82.6	25.5 ± 1.0	99.4	96.8	99.6	99.6
3	71600	42 à 52	79.7	25.3 ± 1.2	99.6	98.8	99.6	100.0
4	54200	53 à 58	83.5	25.9 ± 1.4	99.4	99.2	100.0	99.6
5	41000	50 à 55	77.9	26.4 ± 1.3	98.6	98.4	99.2	100.0
6	27500	45 à 46	85.3	27.2 ± 1.1	99.6	----	----	----
7	53100	51 à 57	86.1	27.4 ± 1.2	99.6	99.2	100.0	100.0
8	40300	50 à 52	79.5	27.6 ± 1.0	99.2	98.4	99.2	100.0
9	43700	54 à 57	86.2	27.0 ± 1.5	99.6	99.2	99.6	99.2
10	29000	45 à 50	87.6	26.4 ± 1.2	98.6			
11	18000	45	89.1	25.7 ± 1.4	99.6			
12	40200	46 à 53	89.0	24.9 ± 1.4	97.4			
13	28400	42 à 50	69.0	24.2 ± 0.9	98.4			
14	23400	57 à 60	72.6	24.1 ± 1.0	98.8			
15	14600	73	59.7	23.7 ± 0.9	97.6			
Total	569 800		85,0		99,0	98,4	99,6	99,7

Tableau 3 : Poids moyen, survie et sexe-ratio de populations de tilapias rouges Red Florida inversées à la 11 β hydroxyandrosténédione (durée de traitement : 22 ou 25 jours , dose du traitement 50 mg d'hormone.kg⁻¹ d'aliment).

(*) : p < 0,01 (test χ^2 , ddl = 1).

Caractéristiques du traitement		Caractéristiques des alevins lors du sexage		Survie (%) après inversion	Sexe-ratio (%) (100 poissons examinés)		Pourcentage de femelles inversées par rapport au lot témoin
Hormone	Durée (jours)	Poids moyen (g \pm Ecart type)	Age (jours)		Mâles	Femelles	
Témoin		2,1 \pm 1,4	84	80,8	31,0	69,0	
11 β OHA4	22	2,6 \pm 1,6	84	85,0	98,5	1,5 (*)	98,0
11 β OHA4	22	3,6 \pm 2,2	84	86,3	98,5	1,5 (*)	98,0
11 β OHA4	25	3,2 \pm 1,8	84	72,6	99,0	1,0 (*)	99,0
11 β OHA4	25	3,6 \pm 2,0	84	77,0	96,5	3,5 (*)	95,0

mâles à 99,0 %, ont été produits par inversion hormonale du sexe à la $11\beta\text{OHA}_4$ au cours de la saison 1994-1995.

Le pourcentage de mâles sur les 15 lots, avant tri, varie de 97,4 (lot 12) à 99,6 % (lot 3,6,7,9,11). Après tri, le pourcentage de mâles dans la classe queue de lot (de 96,8 à 99,2 %) est plus faible que celui observé dans la classe intermédiaire (99,2 à 100,0 %) et la classe tête de lot (99,2 à 100,0 %). Dans ces deux dernières classes, nous avons observé des pourcentages des populations monosexes (100,0 %) mâles.

3.3. Essai d'optimisation de la durée d'inversion

Le pourcentage de mâle dans le lot témoin est de 31 % (Tableau 3). L'application du traitement pendant une durée de 22 jours conduit à l'obtention de 98,5 % de mâles dans les deux lots. Pour une durée de traitement de 25 jours, le pourcentage de mâles, varie de 96,5 à 99,0 %. Une diminution de la durée de traitement à la $11\beta\text{OHA}_4$ se traduit donc par une variabilité de l'efficacité de l'inversion. Ainsi, et en accord avec les résultats acquis lors du suivi de l'inversion massive à la $11\beta\text{OHA}_4$ de populations de tilapia rouge, le traitement optimal d'inversion hormonale du sexe est de 50 mg de $11\beta\text{OHA}_4.\text{kg}^{-1}$ d'aliment pendant 28 jours.

4. Discussion

L'objectif de l'expérience était de déterminer la dose et la durée minimale de traitement à la $11\beta\text{OHA}_4$ conduisant à la production de populations monosexes mâles. Aux vues des résultats, il s'avère qu'une dose minimale de 50 mg d'hormone. kg^{-1} d'aliment appliquée pendant 28 jours minimum soit requise pour obtenir des populations monosexes mâles chez le tilapia rouge, donc une dose équivalente à celle déterminée pour *S. melanotheron* et *O. aureus* et plus élevée que pour *O. niloticus* (Baroiller et al., 1996).

Suite à cette première phase expérimentale, les modalités de traitement ont été appliquées à la production intensive de tilapia rouge. Les résultats démontrent, avec une moyenne sur la saison de production de 99,0 % de mâles, l'efficacité de la $11\beta\text{OHA}_4$ à produire massivement des populations à forts pourcentages de mâles chez le tilapia rouge.

Dans les 8 lots, où des échantillons par classe de poids ont été effectués, le pourcentage de mâles dans la classe queue de lot est systématiquement plus faible que dans les deux autres classes. Des différences de croissance apparaissent dès les premières semaines d'élevage dans les bacs d'inversion, et la diminution du taux d'inversion dans la classe queues de lot pourrait être liée à la mise en place de relations de dominants-dominés. Les plus petits individus ayant, du fait de leur statut de dominé, plus difficilement accès à la zone d'alimentation, cette dernière étant occupée par les individus plus gros. Dès lors les petits individus ingèrent une plus faible quantité d'aliment hormoné d'où un plus faible

taux d'inversion. Ces différences de croissance augmentent également les risques de cannibalisme. Suite à l'incubation en bouteilles de Zug, la mise en charge d'un bac pour l'inversion peut, en fonction de la disponibilité en alevins résorbés, s'étaler sur deux jours. La différence d'âge des alevins en début d'inversion dans les bacs pourrait expliquer ces croissances différentielles lors des premières semaines d'élevage. La mise en place d'un deuxième nourrisseur sur le bac d'inversion outre le fait de diminuer les effets du cannibalisme (Watanabe et al, 1993) pourrait également atténuer les différences de croissance et améliorer le taux d'inversion des plus petits individus.

A ce jour aucune étude ne fait état d'inversion massive par la $11\beta\text{OHA}_4$, en revanche quelques données existent sur l'utilisation de stéroïdes artificiels (Tableau 4). A l'exception de l'étude de Guerrero and Guerrero (1988) sur *O. niloticus*, les caractéristiques des traitements conduisant à l'obtention de pourcentage de mâles supérieurs à 98 % sont respectivement comprises entre 60 et 120 mg d'hormone.kg⁻¹ pour une durée variant de 25 à 28 jours. Une dose de 30 mg d'hormone.kg⁻¹ d'aliment pendant 21 jours chez *O. niloticus* est suffisante pour obtenir 99,0 % de mâles (Guerrero and Guerrero, 1988). Cependant même avec la $11\beta\text{OHA}_4$, l'espèce *O. niloticus* requière des doses et des durées de traitement plus faibles comparativement aux espèces *O. aureus* et *S. melanotheron* (Baroiller et al, 1996).

La densité d'élevage pendant la phase d'inversion influencerait le pourcentage final de mâles d'après Cruz and Mair (1994) qui observent, pour des densités respectives de 1000 et 3000 alevins.m⁻², un pourcentage de mâles de 91,2 et 99,4. En ce qui concerne notre étude, les densités d'élevage étaient en moyenne de 10 000 alevins.m². La plus faible disponibilité en aliment naturel, de par la forte densité d'élevage, contraindrait les alevins à consommer préférentiellement l'aliment artificiel hormoné d'où un meilleur taux d'inversion. A l'inverse, l'inversion directement en étang de reproduction, où la quantité d'aliment naturel est importante, se traduit par une diminution du pourcentage de mâles et ce malgré l'augmentation des doses appliquées (83,0 à 97,0 % pour des doses respectives de 150 à 60 mg de $17\alpha\text{MT.kg}^{-1}$) (Mélard et al, 1995). Sur le tilapia rouge Red Taiwan (hybride résultant du croisement entre *O. niloticus* et *O. mossambicus* mutant rouge), un traitement à 60 mg de $17\alpha\text{ET}$ pendant 28 jours en bac d'élevage conduit à l'obtention de 98,0 à 100,0 % de mâles (Rothbard et al, 1983). En revanche en cage, seul un doublement de la dose (120 mg.kg⁻¹) donne des résultats équivalents (Berger and Rothbard, 1987).

Ces données bibliographiques démontrent que la $11\beta\text{OHA}_4$ présente, en production intensive, les mêmes potentialités masculinisantes que les stéroïdes de synthèse pour des doses et des durées de traitements identiques. La $11\beta\text{OHA}_4$ constitue, pour les pays où l'utilisation des stéroïdes de synthèse est prohibée, une alternative viable.

Tableau 4 : Données bibliographiques sur les traitements masculinisants par un androgène en conditions intensives de production.
 MT : méthyltestostérone - ET : éthinyltestostérone - ind : individu

Espèce	Androgène	Dose (mg.kg ⁻¹)	Durée du traitement	Pourcentage de mâles	Structures utilisées pour l'inversion et données techniques	Auteurs
<i>O. niloticus</i>	17 α MT	60 mg.kg ⁻¹	25 jours	91,2 %	Hapa 1m ² - 0,5 m ³ Densité : 2000.m ⁻³	Cruz and Mair, 1994
				96,7	Hapa 1m ² - 0,5 m ³ Densité : 6000.m ⁻³	idem
				99,4	Hapa 1m ² - 0,5 m ³ Densité : 6000.m ⁻³	idem
<i>O. niloticus</i>	17 α MT	30 mg.kg ⁻¹	21 jours	99,0 %	Densité de 100 ind.m ⁻² les 7 premiers jours de traitement 500 à 750 ind.m ⁻² pour les 14 jours suivants 1.081.300 alevins inversés (survie : 78,1 %)	Guerrero and Guerrero, 1988
<i>O. aureus</i>	17 α MT	60 mg.kg ⁻¹	31 jours	97,0 %	Etang de 200 m ² Production de 60.000 à 100.000 alevins	Mélard et al, 1995
		100 mg.kg ⁻¹	31 jours	93,0 %		
		150 mg.kg ⁻¹	31 jours	83,0 %		

Tableau 4 (suite) : Données bibliographiques sur les traitements masculinisants par un androgène en conditions intensives de production
 MT : méthyltestostérone - ET : éthyntestostérone - ind : individu

Espèce	Androgène	Dose (mg.kg ⁻¹)	Durée du traitement	Pourcentage de mâles	Structures utilisées pour l'inversion et données techniques	Auteurs
Red Taiwan	17 α ET	60 mg.kg ⁻¹	28 jours	97,3 %	Cage de 1,5x1,0x0,9m 3500 alevins par cage soit 4000 ind.m ⁻³ ou 2300 ind.m ⁻²	Berger and Rothbard, 1987
		120 mg.kg ⁻¹	28 jours	99,7 %		
Hybride <i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i>	17 α ET	60 mg.kg ⁻¹	25 à 28 jours	96,0 %	400 alevins par cage	Buddle, 1984.
				99,0 %		
				98,0 %		
				99,0 % 99,0 %		
Hybride <i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i> Red Taiwan	17 α ET	60 mg.kg ⁻¹	28 à 29 jours	98,0 à 100,0 %	Inversion en bac de 28 m ³ Densité : 8 à 17.000 alevins. m ⁻³ ou 15.600.m ⁻² .	Rothbard et al, 1983

IV. Effet de la 11 β hydroxyandrosténédione et des tris en fin d'inversion sur la croissance du tilapia rouge, Red Florida.

1. Introduction

A l'âge de deux mois, les lots inversés à la 11 β OHA4 présentaient une forte disparité de poids ce qui justifiait le tri en 3 classes de poids. A ce stade, les queues de lot étaient éliminées des circuits de production ce qui représentait une perte d'environ 30 à 40 % d'individus inversés. Les pertes sont accentuées par le cannibalisme, en effet des différences de croissance apparaissaient dès les premières semaines d'élevage et sans qu'aucun tri ne soit effectué avant 2 mois. Nous avons dès lors proposés de tester l'effet d'un tri précoce, en fin d'inversion, sur la croissance et la survie des têtes et des queues de lots d'individus inversés et non inversés (témoins).

Suite à cette première phase, les mâles et les femelles des lots témoins sont séparés par sexage manuel. L'effet anabolisant de l'hormone a pu être apprécié par comparaison de la croissance des mâles témoins et des mâles inversés à la 11 β OHA4.

2. Matériel et méthode

Pour la production d'alevins, nous avons utilisé les mêmes géniteurs et la même technique que celle décrite pour sur l'inversion hormonale du sexe à la 11 β OHA4.

2.1. Constitution des lots expérimentaux

- phase 1 :

Cette phase s'est déroulée entre le 3 février et le 9 juin 1995.

Deux bacs de 200 l / 1m². sont mis en charge à une densité initiale estimée de 10 000 alevins résorbés par bac. Un des 2 lots est inversé à la 11 β OHA4 (50 mg.kg⁻¹ pendant 28 jours) suivant le même protocole que celui décrit précédemment. Le deuxième lot est nourri avec un aliment normal.

A 30 jours, les deux lots sont triés au moyen d'une grille (grille d'un écartement de 4 mm) en 2 classes de poids. Quatre lots sont ainsi constitués :

Lot 1 : têtes de lot, mâles inversés à la 11 β OHA4

Lot 2 : queues de lot, mâles inversés à la 11 β OHA4

Lot 3 : têtes de lot, individus témoins

Lot 4 : queues de lot, individus témoins

Les lots expérimentaux sont suivis pendant 125 jours.

- phase 2 :

La deuxième phase est mise en place le 29 juin 1995. Entre le 9 et le 29 juin, les poissons ont reçu une ration de maintien. Le 29 juin, les mâles et les femelles des lots 3 et 4 sont séparés par sexage manuel et leur croissance est comparée aux mâles des lots 1 et 2 (mâles inversés). Pour cette deuxième phase, 6 lots sont donc constitués

Lot 1 : têtes de lot, mâles inversés à la $11\beta\text{OHA}_4$

Lot 2 : queues de lot, mâles inversés à la $11\beta\text{OHA}_4$

Lot 3 : têtes de lot, mâles témoins

Lot 4 : queues de lot, mâles témoins

Lot 5 : têtes de lot, femelles témoins

Lot 6 : queues de lot, femelles témoins

Les lots expérimentaux sont suivis pendant 98 jours.

2.2. Méthode

Les conditions initiales de mise en charge (nombre de poissons, densité, poids moyen, sexe-ratio) sont présentées dans le tableau 5 et 6.

Les lots sont élevés en bac de $4\text{m}^2 / 1.3 \text{ m}^3$, alimentés par l'eau de la lagune de la ferme du Gol. L'alimentation en eau des bacs est interrompue toutes les 30 minutes pendant une période variable de 10 à 20 minutes. Ces coupures sont inhérentes au système de pompage et de remplissage de la fosse de captage.

Les lots sont contrôlés (biomasse et nombre total) tous les 15 jours. Les poissons ne sont pas nourris le jour du contrôle.

La ration alimentaire, déterminée sur base des travaux de Mélard (1986), est réajustée à chaque contrôle. La ration est distribuée manuellement en 3 fois par jour.

La température et le taux d'oxygène sont contrôlés 2 fois par jour. Une oxygénation complémentaire est assurée par des diffuseurs d'air.

3. Résultats

- Phase 1 :

La synthèse des résultats est présentée dans le tableau 5.

La survie des queues de lot est plus faible que celle des têtes de lot et ce tant chez les individus inversés (82,9 contre 70,6 %) que chez les individus témoins (83,8 contre 65,5 %).

Tableau 5 : Croissance comparée d'un lot de mâles inversés à la 11 β OH Δ 4 et d'un lot témoin - Tri précoce (30 jours) des lots en deux catégories : têtes et queues de lot. Bassin de 4 m² / 1,3 m³. Température moyenne : 26,5 \pm 2,0

Lot 1 : Têtes de lot mâles inversés 11 β OH Δ 4 - Lot 2 : Queues de lot mâles inversés 11 β OH Δ 4 - Lot 3 : Têtes de lot témoins

Lot 4 : Queues de lot témoins

Lot	1	2	3	4
Date de mise en charge	06.02	06.02	06.02	06.02
Nombre initial	1700	1700	1700	1700
Poids moyen initial (g)	0,52	0,25	0,49	0,25
Biomasse initiale (g)	879,4	430,7	835,4	425,4
Sexe ratio (mâle : femelle)	99 : 1	99 : 1	31 : 69	31 : 69
Durée de l'expérience (jours)	125	125	125	125
Nombre final	1409	1200	1425	1113
Survie (%)	82,9	70,6	83,8	65,5
Poids moyen final (g)	58,2	62,8	43,6	43,9
Biomasse finale (kg)	82,5	75,4	62,1	48,9
Biomasse finale (kg.m ⁻³)	63,5	58,0	47,8	37,6
Croissance individuelle (g.j ⁻¹ .ind ⁻¹)	0,46	0,50	0,34	0,35
Production (g.j ⁻¹ .m ⁻³)	502,3	461,0	377,0	298,3
Taux de conversion	1,6	1,5	2,0	1,8

Le poids corporel des poissons inversés têtes et queues de lot passe en 125 jours respectivement de 0,52 à 58,20 g et de 0,25 à 62,80 g. A 125 jours, pour les lots témoins, le poids moyen des tête et des queues de lot est respectivement de 43,60 et 43,90 pour des poids initiaux de 0,49 et 0,25 g. Le poids moyen des têtes et des queues des lots inversés n'est pas statistiquement différent ($p < 0,05$) en fin d'expérience, il en est de même en ce qui concerne les têtes et les queues des lots témoins.

En fin d'expérience, le poids moyen des individus inversés (58,20 et 62,80 g) est supérieur à celui des individus témoins (43,60 et 43,90 g) (Figure 1).

Entre le 28^{ième} et 42^{ième} jour d'expérience (Figure 2), les lots inversés (têtes et queues de lot) présentent une croissance individuelle ($0,36$ et $0,31 \text{ g.j}^{-1}$) supérieure à celle des lots témoins ($0,20$ et $0,23 \text{ g.j}^{-1}$).

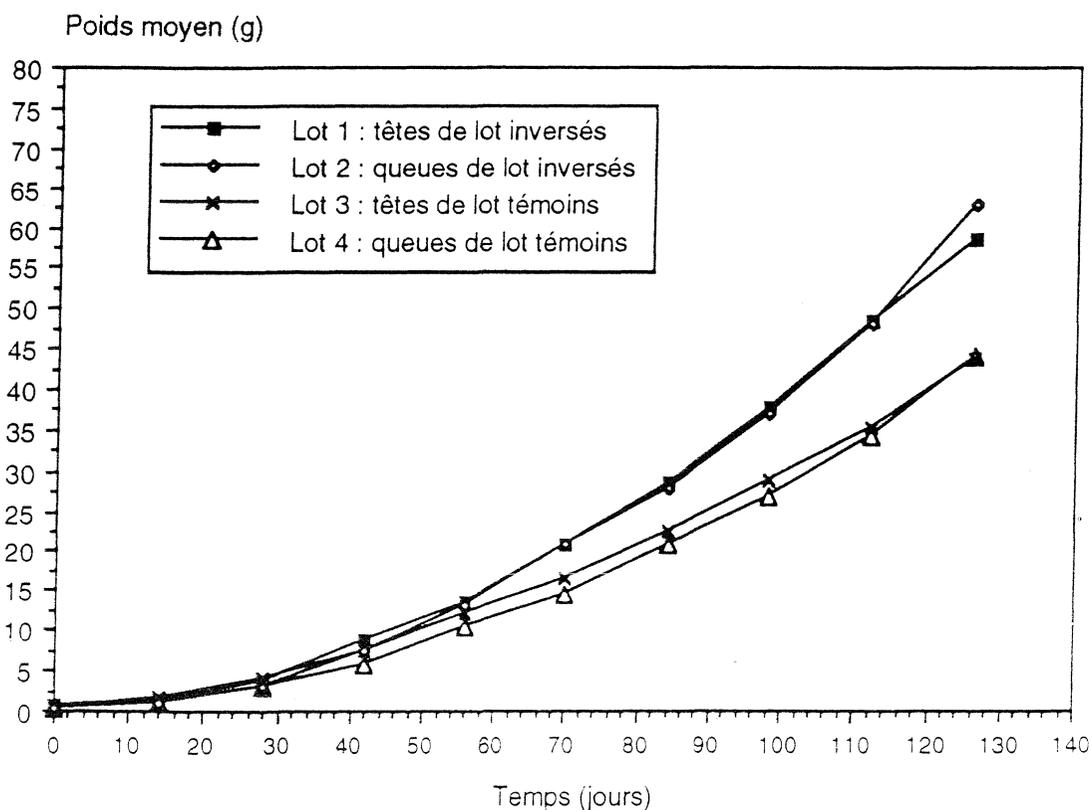


Figure 1 : Courbe de croissance des lots témoins et inversés (têtes et queues de lot) de tilapia rouge Red Florida. Température moyenne : $26,5 \pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

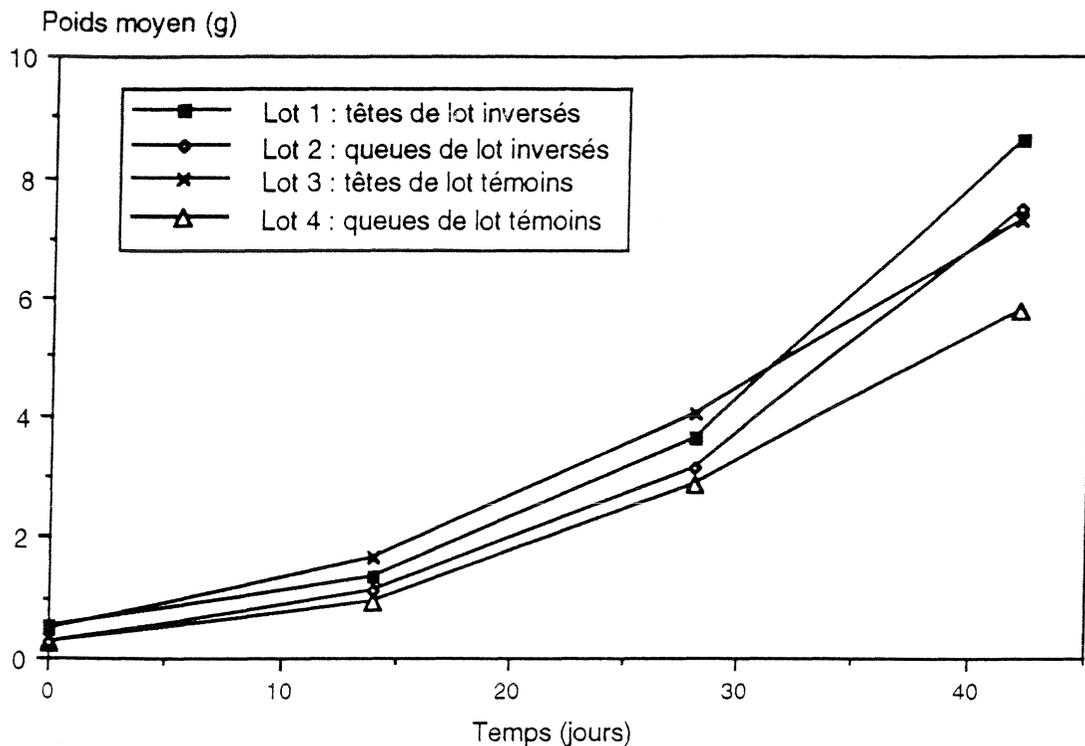


Figure 2 : Mise en évidence de l'effet de la $11\beta\text{OHA4}$ sur la croissance du tilapia rouge Red Florida. Température moyenne : $26,5 \pm 2,0$ °C.

- Phase 2 :

La synthèse des résultats est présentée dans le tableau 6.

La survie varie de 94,5 (têtes de lot femelles témoins) à 100 % (têtes de lots mâles témoins).

Les individus têtes et queues de lot présentent une croissance similaire dans les 3 groupes (mâles inversés, mâles témoins et femelles témoins) (Figure 3). Au cours des 98 jours d'expérience, la croissance individuelle ($\text{g}\cdot\text{j}^{-1}\cdot\text{individu}^{-1}$) des mâles inversés (1,5 et 1,6) est supérieure à celle des mâles témoins (1,3) et des femelles (0,8) (Tableau 5).

Tableau 6 : Croissance comparée de mâles inversés à la 11 β OH1A4, de mâles et femelles témoins. Tri précoce (30 jours) des lots en deux catégories puis sexage manuel à l'âge de 145 jours. Bassin de 4 m² / 1,3 m³. Température moyenne : 23,8 \pm 1,4 °C.

Lot 1 : Têtes de lot mâles inversés 11 β OH1A4 - Lot 2 : Queues de lot mâles inversés 11 β OH1A4 - Lot 3 : Têtes de lot mâles témoins

Lot 4 : Queues de lot mâles témoins - Lot 5 : Têtes de lot femelles témoins - Lot 6 : Queues de lot femelles témoins

Lot	1	2	3	4	5	6
Date de mise en charge	29.06	29.06	29.06	29.06	29.06	29.06
Nombre initial	200	200	200	200	200	200
Poids moyen initial (g)	74,5	75,0	65,0	66,0	49,0	49,5
Biomasse initiale (kg)	14,9	15,0	13,0	13,2	9,8	9,9
Biomasse initiale (kg.m ⁻³)	11,5	11,5	10,0	10,2	7,5	7,6
Durée de l'expérience (jours)	98	98	98	98	98	98
Nombre final	200	194	193	199	189	191
Survie (%)	100,0	97,0	96,5	99,5	94,5	95,5
Poids moyen final (g)	217,5	224,7	181,9	185,9	124,3	117,8
Biomasse finale (kg)	43,5	43,6	35,1	37,0	23,5	22,5
Biomasse finale (kg.m ⁻³)	33,5	33,5	27,0	28,5	18,1	17,3
Croissance individuelle (g.j ⁻¹ .ind ⁻¹)	1,5	1,6	1,3	1,3	0,8	0,8
Production (kg.m ⁻³)	22,0	22,0	17,0	18,3	10,5	9,7
Production (g.j ⁻¹ .m ⁻³)	224,5	224,5	173,5	186,8	107,5	98,9
Taux de conversion	1,5	1,5	1,8	1,7	2,2	2,4

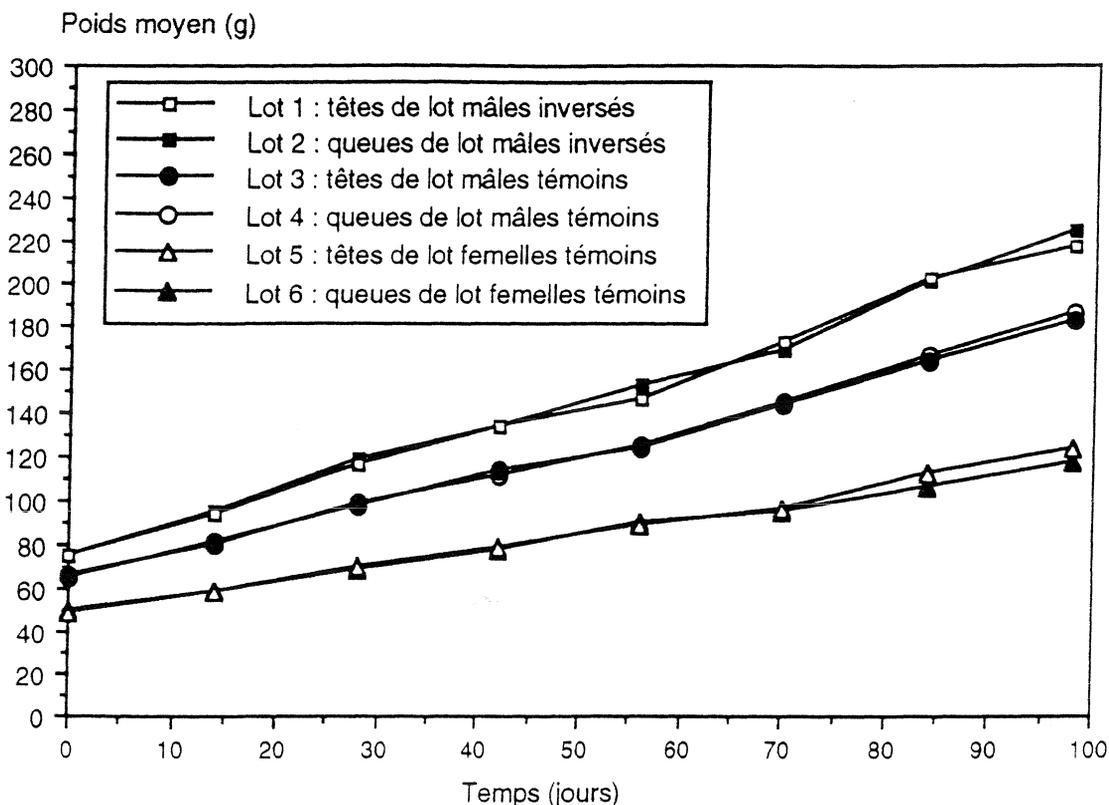


Figure 3 : Courbes de croissance des mâles inversés (11 β OHA4), des mâles témoins et des femelles témoins chez le tilapia rouge, Red Florida. Température moyenne : $23,8 \pm 1,4$ °C.

4. Discussion

La différence de croissance entre les lots inversés et témoins, lors de la phase 1, peut s'expliquer par l'effet anabolisant des androgènes mis en évidence dans plusieurs études (Guerrero, 1975; Ufodike and Madu, 1986 ; Jo et al, 1988). Les androgènes augmentent la croissance en stimulant l'appétit, le taux de conversion, la digestion, l'activité protéique.... Dans notre étude, l'effet de l'hormone sur la croissance apparaît entre le 28^{ième} et le 42^{ième} jour d'expérience (Figure 1), les lots inversés présentant une croissance supérieure aux lots témoins.

La différence de croissance entre les lots inversés et les lots témoins (mâles et femelles), lors de la phase 1, est accentuée par le dimorphisme sexuel de la croissance en faveur du sexe mâle qui se met en place lors de la puberté (Mélard et al, 1989). En effet suite au sexage manuel des lots témoins de la phase 1, le poids des femelles est inférieur au poids des mâles témoins. Le ralentissement de la croissance des femelles, lié à la mise en place des organes de reproduction, se traduit donc par une diminution de croissance au sein des lots témoins. Ce phénomène de dimorphisme sexuel de la croissance en faveur du sexe mâle est également mis en évidence lors de la phase 2 de l'expérience, les femelles

présentant une plus faible croissance individuelle que les mâles normaux (Tableau 6 et Figure 3).

Le dimorphisme sexuel de la croissance en faveur du sexe mâle est un phénomène bien connu chez le genre *Oreochromis* (Pruginin et al, 1975, Mélard et al, 1989). Après 500 jours de croissance, le poids moyen (720 g) des mâles *O. aureus* et *O. niloticus* est beaucoup plus élevé que celui des femelles *O. aureus* (480 g) et *O. niloticus* (380 g) (Mélard et al, 1989). Little et al (1993) observent chez *O. niloticus* en période de reproduction (en race-way), une croissance individuelle moyenne de 0,6 g à 1,2 g.j⁻¹ chez les femelles et de 1,9 g.j⁻¹ pour les mâles. Dans les mêmes conditions, la croissance individuelle des mâles et des femelles de tilapia rouge red florida est respectivement de 1,2 et 0,4 g.j⁻¹ (Carteret, 1995).

Le dimorphisme de croissance entre mâle et femelle peut s'expliquer en partie par une composante comportementale. La production d'oeufs par la femelle monopolise une grande partie de l'énergie pendant la période de reproduction. L'effet de la reproduction sur la croissance est d'autant accru que pendant la période d'incubation buccale de la progéniture, la femelle ne s'alimente pas. Chez *O. niloticus*, la perte de poids pendant l'incubation et la durée d'incubation sont corrélées (Little, 1989). Ce constat doit être cependant nuancé, en effet d'après Bromage and Robert (1995), une femelle peut croître de 1 g.j⁻¹ même en période de reproduction. Une femelle *O. mossambicus*, après libération de sa progéniture, serait en mesure de consommer jusqu'à 40 % de son poids vif en 48 heures (Macintosh in Bromage and Roberts, 1995, données non publiées) ce qui compenserait le retard de croissance lié à l'incubation et reconstituerait les réserves d'énergie nécessaires à la reproduction suivante. Le mâle, en période de reproduction, adopte un comportement de protection de son nid et de ce fait s'alimenterait moins (Baroiller et Jalabert, 1989). Cependant, pendant cette même période, les femelles incubent et de ce fait la disponibilité en aliment est plus grande et la compétition alimentaire diminue entre mâle et femelle.

La composante comportementale ne suffit cependant pas à expliquer ce dimorphisme sexuel de la croissance. En effet, même en condition intensives d'élevage, conditions qui ne sont pas favorables à la reproduction, les femelles grandissent moins vite que les mâles chez *O. niloticus* (Hanson et al, 1983). Dans notre étude, les femelles présentent également une croissance relative plus faible que les mâles et dans des conditions d'élevage défavorable à la reproduction. L'avantage de croissance des mâles sur les femelles pourrait être relié aux différences observées au niveau du métabolisme des androgènes et des hormones thyroïdiennes entre les deux sexes (Toguyeni, 1993). Le dimorphisme sexuel de la croissance pourrait avoir une base génétique comme le suggère Fryer et Isle (1972).

Dans notre étude, les mâles inversés (mâles et femelles génotypiques, mâles phénotypiques) présentent une croissance supérieure à celle des mâles normaux (mâles génotypiques et phénotypiques). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Hanson et al (1983) et Owusu-Frimpong et Nijjhar (1981) sur *O. niloticus*. Hanson et al (1983) suggèrent, pour expliquer ces différences, un effet plus important de l'androgène que du génotype sur la croissance. Jo et al (1988) ont également mis en évidence une relation positive entre l'augmentation de la croissance et la dose de 17α -méthyltestostérone appliquée.

5. Conclusion

Les résultats de ces expérimentations démontrent l'efficacité d'un tri précoce sur la croissance des queues de lots, la survie étant cependant plus faible dans cette dernière catégorie.

Sur le plan technique, le tri précoce conduit donc au maintien, dans les circuits de production, des queues de lots, individus qui étaient jusqu'en juin 1995 éliminés à l'âge de 2 mois. L'application d'un tri systématique en fin d'inversion devrait se traduire par une rationalisation du nombre d'alevins inversés et donc de la consommation d'hormone. Il est toutefois important de préciser, et en accord avec nos résultats sur l'inversion du sexe, qu'une proportion légèrement plus élevée de femelles est à prévoir au sein des populations de plus faible taille suite au tri.

V. Application d'un tri précoce à la production intensive

1. Introduction, matériel et méthode

Au cours de la saison 1995-1996, et en accord avec le protocole décrit ci-dessus, les lots en fin d'inversion sont triés en deux classes de poids. Les têtes de lots issus d'un même contrôle de géniteurs sont regroupés dans le même bac de pré-grossissement. Il est fait de même pour les queues de lot. Les bacs d'élevage, d'un volume de 7 m³, sont alimentés en eau par un pompage en continu dans la lagune de la ferme du Gol.

Un contrôle de poids moyen est effectué tous les 15 jours sur les différents lots permettant ainsi un réajustement de la ration. La ration est distribuée au moyen d'un nourrisseur automatique à tapis sur une période de 8 heures par jour, 6 jours sur 7.

A l'âge de deux mois, un échantillon de 100 poissons par lot est prélevé pour sexage (Guerrero and Shelton, 1974).

Tableau 7 : Survie, croissance et sexe-ratio des populations de tilapias rouges red florida inversées à la 11 β OHA4 (50 mg de 11 β OHA4.kg⁻¹ d'aliment ; 28 jours de traitement) suite à un tri en 2 classes de poids (têtes et queues de lots) en fin d'inversion.

<u>Lot</u>	<u>Nombre initial</u>	<u>Nombre final</u>	<u>Survie (%)</u>	<u>Croissance (g.j⁻¹.ind⁻¹)</u>	<u>Sexe-ratio (%) (Mâle : femelle)</u>
<u>Têtes de lot</u>					
1	15700	15000	95,5	0,13	100 : 0
2	11700	10700	91,5	0,17	100 : 0
3	12600	9300	73,8	0,09	100 : 0
4	10500	9200	87,6	0,18	100 : 0
5	8600	8100	94,2	0,13	100 : 0
6	6500	5600	86,2	0,12	100 : 0
Bilan	65600	57900	88,3	0,14	100 : 0
<u>Queues de lot</u>					
1	17200	16300	94,9	0,12	98 : 2
2	14300	14000	97,5	0,11	97 : 3
3	23400	23000	98,3	0,09	99 : 1
4	21000	15000	71,7	0,10	99 : 1
5	18000	12600	70,1	0,08	97 : 3
6	11300	10400	91,7	0,09	98 : 2
Bilan	105200	91300	86,8	0,10	98 : 2

2. Résultats

Après tri, la croissance individuelle des queues de lot ($0,10 \text{ g.j}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) reste inférieure à celle des têtes de lots ($0,14 \text{ g.j}^{-1}.\text{ind}^{-1}$) (Tableau 7). En revanche, la survie moyenne est équivalente dans les deux groupes (88,3 % pour les têtes de lot et 86,8 % pour les queues de lot). La survie moyenne totale, têtes et queues de lot confondus, est de 87,4 % ce qui est nettement supérieur aux 42,6 % obtenus, au même stade, lors de la saison 1994-1995 où aucun tri n'était effectué en fin d'inversion. Ces résultats démontrent la nécessité d'un tri précoce chez le tilapia rouge en fin de période d'inversion du sexe.

Les résultats sur le sexe-ratio confirment les données acquises en 1994-1995, à savoir l'obtention de populations monosexes mâles chez les têtes de lots et d'un pourcentage plus faible (98 % de mâles) chez les queues de lot.

VI Conclusion générale

Les principaux points mis en évidence au cours de cette étude sont les suivants :

- La dose et la durée optimale de traitement pour l'inversion hormonale du sexe chez le tilapia rouge Red Florida sont respectivement de 50 mg de $11\beta\text{OHA}_4$ $\cdot\text{kg}^{-1}$ d'aliment pendant 28 jours.

- L'inversion massive de populations de tilapias rouges à la $11\beta\text{OHA}_4$ conduit à l'obtention de 99,0 % de mâles

- Un tri précoce s'avère nécessaire afin d'augmenter la rentabilité des phases d'élevage suite au traitement hormonal.

Chapitre 2

**Etude du déterminisme
génétique du sexe :
Proposition d'un
modèle monofactoriel à
4 chromosomes sexuels**

I. Présentation d'un modèle de déterminisme génétique monofactoriel du sexe chez le tilapia rouge Red Florida.

Les espèces du genre *Oreochromis* possèdent la particularité de présenter les 2 systèmes monofactoriels de déterminisme génétique du sexe. Un groupe (*O. niloticus*, *O. mossambicus*..) est caractérisé par une homogamétie femelle (XX) et une hétérogamétie mâle (XY), un deuxième groupe (*O. aureus*, *O. hornorum*...) par une hétérogamétie femelle (WZ) et une homogamétie mâle (ZZ) (Hickling, 1968 ; Jalabert et al, 1974 ; Chen, 1969 ; Mair et al, 1991 a et b).

Le tilapia rouge résulte du croisement entre des espèces à homozygotie femelle XX (*O. niloticus* et *O. mossambicus*) et des espèces à homozygotie mâle ZZ (*O. aureus* et *O. hornorum*). L'objectif de l'étude est d'évaluer la viabilité d'un modèle monofactoriel, impliquant les 4 gonosomes (W, X, Y et Z), régissant la détermination du sexe chez le tilapia rouge.

Le croisement initial réalisé par Sipe impliquait un mâle *O. mossambicus* mutant rouge (génotype XY) par une femelle *O. hornorum* (génotype ZW). Les 4 gonosomes (chromosomes sexuels), X, Y, Z et W, existant chez les espèces du genre *Oreochromis* sont donc présents dès la première génération. Une ségrégation mendélienne simple des gonosomes des deux parents permet de déduire le génotype des individus de la F1. En théorie le résultat de cette première hybridation conduit à un sexe-ratio biaisé avec 75 % de mâles de génotypes YW, YZ et XY et 25 % de femelle (WX). Il n'existe cependant aucune publication scientifique relatant cette hybridation. L'analyse des 3 génotypes mâles montrent que les 4 gonosomes W, X, Y, Z peuvent exister chez le mâle.

Suite à ce premier croisement, les individus F1 ont été recroisés entre eux mais également avec les espèces pures *O. aureus* et *O. niloticus*. Ces croisements ultérieurs destinés à améliorer les performances de croissance et de résistance aux basses températures introduiront à nouveau les 4 gonosomes (X et Y par *O. niloticus* ; W et Z par *O. aureus*). Les gonosomes pouvant donc exister chez les femelles sont W et X (hybridation initial) mais également Z (génotype WZ chez *O. aureus*).

La construction d'un tableau (Tableau 1) de ségrégation mendélienne entre les gonosomes mâles et femelles conduit à l'obtention des génotypes susceptibles d'exister au sein de la population de tilapia rouge Red Florida.

Tableau 1 : Génotypes sexuels susceptibles d'exister dans les populations de tilapia rouge Red Florida déterminés par ségrégation mendélienne des gonosomes mâles et femelles. En gras les génotypes femelles.

	Gonosomes femelles	W	X	Z
Gonosomes mâles				
W		WW	WX	WZ
X		WX	XX	ZX
Y		YW	XY	YZ
Z		WZ	ZX	ZZ

Le tableau 2 présentent le sexe-ratio des descendance issues du croisement entre ces différents génotypes mâles et femelles.

Tableau 2 : Hypothèse sur les génotypes présents dans les croisements de tilapia *Oreochromis* hybride rouge, souche Red Florida, à la Réunion

Génotypes femelles					
		XX	WX	WZ	WW
Génotypes mâles	ZX	50%M-50%F	25%M-75%F	50%M-50%F	100%F
	ZZ	100%M	50%M-50%F	50%M-50%F	100%F
	YW	50%M-50%F	50%M-50%F	50%M-50%F	50%M-50%F
	XY	50%M-50%F	50%M-50%F	75%M-25%F	50%M-50%F
	YZ	100%M	75%M-25%F	75%M-25%F	50%M-50%F

Cinq sexe-ratios mâles : femelles théoriques peuvent donc être observés lors des croisements entre tilapias rouges Red Florida : 0 : 100 ; 25 : 75 ; 50 : 50 ; 75 : 25 et 100 : 0. La fréquence théorique d'apparition de ces différents sexe-ratios, conformément à l'hypothèse, est la suivante (Tableau 3) :

Tableau 3 : Fréquence théorique d'apparition (%) des différents sexe-ratios dans les descendance de tilapia rouge, conformément à l'hypothèse d'un déterminisme monofactoriel du sexe à 4 gonosomes.

Sexe-ratio (mâle : femelle)	Fréquence d'apparition (%)
0 : 100	10
25 : 75	05
50 : 50	60
75 : 25	15
100 : 0	10

Cette hypothèse repose donc sur une conservation de tous les gonosomes et tous les génotypes au cours des différentes phases d'amélioration de la souche. Cependant compte tenu des différentes sélections effectuées au cours de la constitution de la souche actuelle, tant par des scientifiques que par des professionnels, l'hypothèse de la disparition d'un ou de deux gonosomes ne peut être exclue. La disparition d'un gonosome serait du à la présence sur ce chromosome sexuel de gènes codant pour des couleurs indésirables ou des performances zootechniques médiocres.

L'analyse du sexe-ratios des croisements de tilapias rouge est destiné à vérifier ce modèle monofactoriel à 4 gonosomes pour la détermination génétique du sexe du tilapia rouge Red Florida.

Une première étude a été menée en 1994 au CRAA (Briand, 1994 - Tableau 4 et 5) sur les tilapias rouges Red Florida. La confrontation des sexe-ratios de 37 descendance, résultant du croisement entre 22 femelles et 6 mâles, avec le tableau de sexe-ratios théoriques a permis d'attribuer 3 génotypes différents (WW, WX et WZ) à 10 femelles et 2 génotypes (YZ et ZX) à des mâles. Pour trois individus mâles, 2 génotypes étaient compatibles avec les résultats observés. Ces premiers résultats, outre le fait de confirmer partiellement l'hypothèse d'un déterminisme monofactoriel du sexe chez le tilapia rouge, suggèrent également la conservation de tous les gonosomes.

Une partie des géniteurs ainsi que 7 descendance issues de ces géniteurs ont été conservées suite à l'étude réalisée par Briand (1994). Nos objectifs étaient donc de :

- Confirmer ou infirmer les hypothèses de génotypes proposées par Briand en effectuant les croisements manquants
- S'assurer que les génotypes des descendants sont en accord avec ceux établis d'après les génotypes parentaux.

Tableau 5 : Sexe-ratios (mâles : femelles) observés dans les descendance de géniteurs F1 de tilapia rouge, souche Red Florida (d'après Briand, 1994).

Les génotypes présumés sont indiqués sous les codes des individus.

	Code femelle Génotype (s)	b211 WZ WX	b243 WZ WX	v201 WW	v211 WX	v215	v218 WW	v227 WW	v232	v234	v241 WX WZ	v242 WX
Code mâle (génotype(s))												
212 (XY/YZ)		72:28	71:29						46:54	61:39		
213 (WY-XY)											51:49	
221 (YZ)						89:11	57:43	60:40			73:27	73:27
225 (ZX)				19:81 12:88	20:80			18:82				24:76
239 (WY/XY)						65:35	50:50	42:58				
240 (ZX)				34:66				27:73				

- rechercher Les génotypes absents XX, ZZ, XY, et YW

II. Matériel et méthode

1. Géniteurs

Les études ont donc porté sur deux générations successives de tilapia rouge Red Florida, notées respectivement F1 (individus utilisés par Briand, 1994) et F2. Lors de la mise en reproduction des géniteurs, aucune sélection sur la couleur n'a été effectuée. Les mâles ont été choisis de manière à ce que leur poids soit supérieur à celui des femelles.

2. Identification des géniteurs

Tous les géniteurs mâles et femelles sont identifiés au moyen d'une Pit Tag implantée dans la musculature dorsale.

3. Reproductions.

Les géniteurs sont placés dans des aquariums de reproduction de 500 litres à raison de 1 mâle pour 4 à 6 femelles. Le nombre de femelles par aquarium est fonction de la taille de ces dernières. La présence d'un seul mâle par unité de reproduction nous assure de l'origine paternelle de la descendance récoltée dans la bouche de la femelle.

Chaque aquarium de reproduction est équipé d'un compartiment d'accumulation des matières organiques, d'un filtre biologique sur corail, d'un air-lift assurant la circulation de l'eau et de diffuseurs d'air. La température de l'eau est contrôlée par une résistance de 300 W. Toutes les semaines, 20 % du volume de l'aquarium est renouvelé par de l'eau du réseau d'irrigation agricole desservant la ferme du Gol.

Les reproductions sont détectées par observation quotidienne (8 heures et 16 heures) du comportement incubateur des femelles caractérisées par une déformation bucco-pharyngienne. Dès la détection d'une ponte, la femelle est isolée de ces congénères dans un compartiment de l'aquarium créé suite à la mise en place d'une cloison.

4. Récupération et élevage des descendances.

Dix jours post-fécondation, les alevins sont prélevés dans la bouche de la femelle. La descendance est identifiée par la date de ponte et le code des parents. Les alevins sont alors comptés et transférés dans un bac de 100 litres d'un des 2 circuits fermés.

Chaque circuit fermé est composé :

- de 16 bacs d'élevage d'un volume de 100 litres équipés d'une arrivée d'eau individuelle et d'un diffuseur d'air



Circuits fermés destinés à l'élevage des descendances
(Centre de Recherche et d'Application Aquacole -
Ile de la Réunion)

- 1 bac de filtration de l'eau d'un volume de 600 litres comprenant :
 - 3 compartiments d'accumulation des matières en suspension
 - 1 compartiment de filtration biologique sur un substrat de corail
- 1 bac de charge d'un volume de 1 m³
- 1 pompe d'une capacité de 25 m³ / heure

Une filtration est également assurée par 2 tubes UV de (Type QL 40). Trois résistances de 500 watts maintiennent une température minimum de 27 °C.

Tous les 3 jours, environ 20 % du volume total du circuit est renouvelé par de l'eau du réseau d'irrigation agricole desservant la ferme du Gol.

5. Nourrissage des alevins

Dès le transfert en bac de 100 litres et ce jusqu'au sexage, les alevins sont nourris à satiété et manuellement 6 fois par jour avec un aliment pour truites (Gheerbrandt, 56 % de protéines).

6. Suivi de la température

Deux relevés quotidiens (le matin à 8 heures et le soir à 16 heures) de la température sont effectués dans les aquariums de reproduction (y compris dans les compartiments d'incubation) et les circuits fermés. Des écarts importants de température (entre 27 °C et 32,5 °C) peuvent cependant être enregistrés, lors des 2 relevés quotidiens au cours des journées très ensoleillées. La température n'a cependant jamais dépassé 32,5 °C dans les circuits fermés et 30,6 °C dans les aquariums de reproduction.

7. Sexage

À l'âge de 2 mois post fécondation, tous les individus de la descendance sont sacrifiés dans une limite maximum de 300 poissons par descendance. Ces individus sont disséqués et les gonades examinées au microscope après squash (Guerrero and Shelton, 1974). À cet âge, les oocytes au stade auxocytose ou prévitellogénique sont facilement identifiables alors que des formations lobulaires sont observées dans les testicules (Baroiller 1988).

8. Schéma de croisements des géniteurs F1

Une partie des géniteurs utilisés par Briand (1994) étaient toujours disponibles. Nous nous sommes donc attachés à confirmer ou infirmer les hypothèses émises sur le génotype en effectuant les croisements manquants.

9. Schéma de croisements des géniteurs F2

Les géniteurs F2 ont été prélevés au sein des 7 descendance conservées individuellement par Briand (1994) et dont une hypothèse sur le génotype parental avait été proposée. De ce fait les génotypes susceptibles d'être présents dans ces 7 descendance ont pu être déterminés (Tableau 6).

Tableau 6 : Génotypes sexuels susceptibles présents dans les descendance F2 issues de géniteurs F1

* : d'après Briand, 1994.

** : deux hypothèses de génotype sont proposées par Briand, 1994 pour la femelle 241.

Code et génotype* du mâle F1	Code et génotype* de la femelle F1	Sexe-ratio de la descendance	Génotypes susceptibles d'être présents dans la descendance
225 (ZX)	242 (WX)	24 : 76	mâles : ZX femelles : XX, WX, WZ
225 (ZX)	220 (WX)	28 : 72	mâles : ZX femelles : XX, WX, WZ
240 (ZX)	227 (WX)	27 : 73	mâles : ZX femelles : XX, WX, WZ
225 (ZX)	248 (WW)	05 : 95	femelles : WX, WZ
221 (YZ)	227 (WX)	60 : 40	mâles : YW, ZX, XY femelle : WZ
221 (YZ)	220 (WX)	74 : 26	mâles : YW, ZX, XY femelles : WZ
221 (YZ)	241 (WX) **	73 : 27	mâles : YW, ZX, XY femelles : WZ
	241 (WZ) **	73 : 27	mâles : YW, YZ, ZZ femelles : WZ

Le choix des géniteurs mâles et femelles F2 (prélevés parmi ces 7 descendance) et les croisements effectués ont été fait en considérant que l'hypothèse d'un modèle monofactoriel de détermination du sexe à 4 gonosomes chez le tilapia rouge était admise. Par exemple, les mâles des 3 descendance présentant un sexe ratio proche de 25 : 75 % sont en principe tous ZX. Des femelles WZ peuvent être aisément repérées dans les descendance mâle 221 (YZ) x femelles 220 ou 227 (WX).

Certaines femelles ont également été croisées avec les mâles présents dans la descendance mâle 225 (ZX) x femelle 248 (WW). Cette descendance auraient du, en accord avec l'hypothèse proposée, être monosexue femelle, or 5 % de mâles ont été observés. Ces mâles doivent théoriquement présenter un génotype femelle WZ ou WX. Les sexe-ratios attendus lors du croisement de ces mâles WZ et WX avec des femelles des différents génotypes sont présentés dans le tableau 7:

Tableau 7 : Sexe-ratios attendus lors du croisements de mâles WX et WZ avec des femelles des différents génotypes chez le tilapia rouge Red Florida.

Génotype	Femelle	XX	WX	WZ	WW
Mâle					
WX		0:100	0:100	25:75	0:100
WZ		50:50	25:75	25:75	0:100

III. Résultats

1. Survie

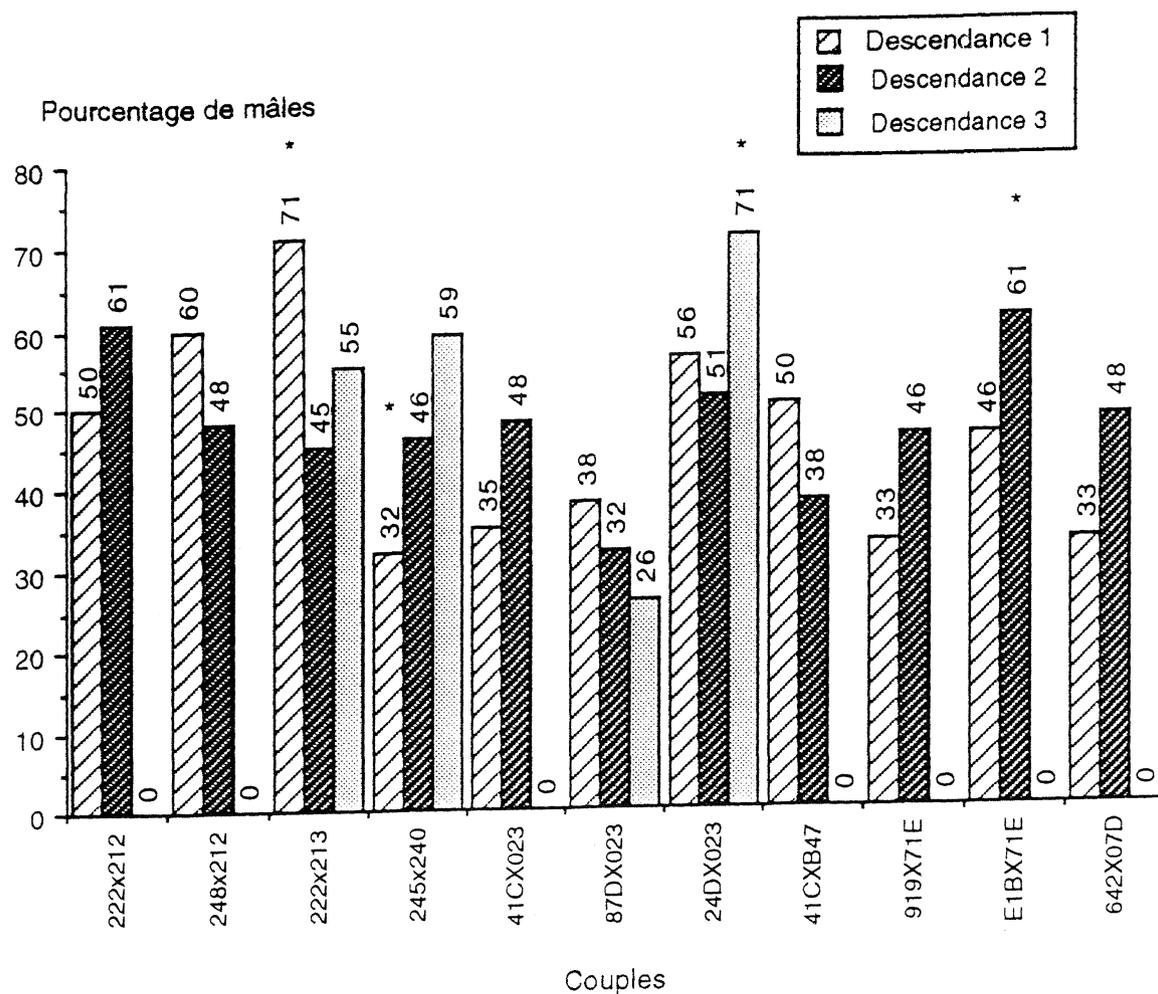
La survie à deux mois post fécondation varie de 12,7 à 100,0 %. Les plus fortes mortalités sont observées à 20-25 jours post fécondation et se caractérisent par l'observation journalière de 1 à 5 morts. Nous n'avons jamais observé de mortalité massive. Pour cette étude nous considérerons que la mortalité touche de façon équivalente les individus de sexe mâle et femelle et n'a donc pas d'effet sur le sexe-ratio final de la descendance.

2. Analyse du sexe-ratio des descendance

L'analyse des résultats du sexe-ratios des descendance F1 et F2 met en évidence les points suivants :

- le sexe-ratio de descendance successives de même origine parentale n'est pas toujours stable. Les croisements multiples de 35 couples différents montrent que pour 11 couples la variation du pourcentage de mâle entre les descendance successives est supérieure à 10 %. Par exemple, la première descendance du couple 213 x 222 était mâle à 71 % (sexe-ratio théorique 75 : 25) alors que dans les 2 descendance suivantes, seulement 45 et 55 % de mâles (sexe-ratio théorique 50 - 50) ont été observés (Figure 1).

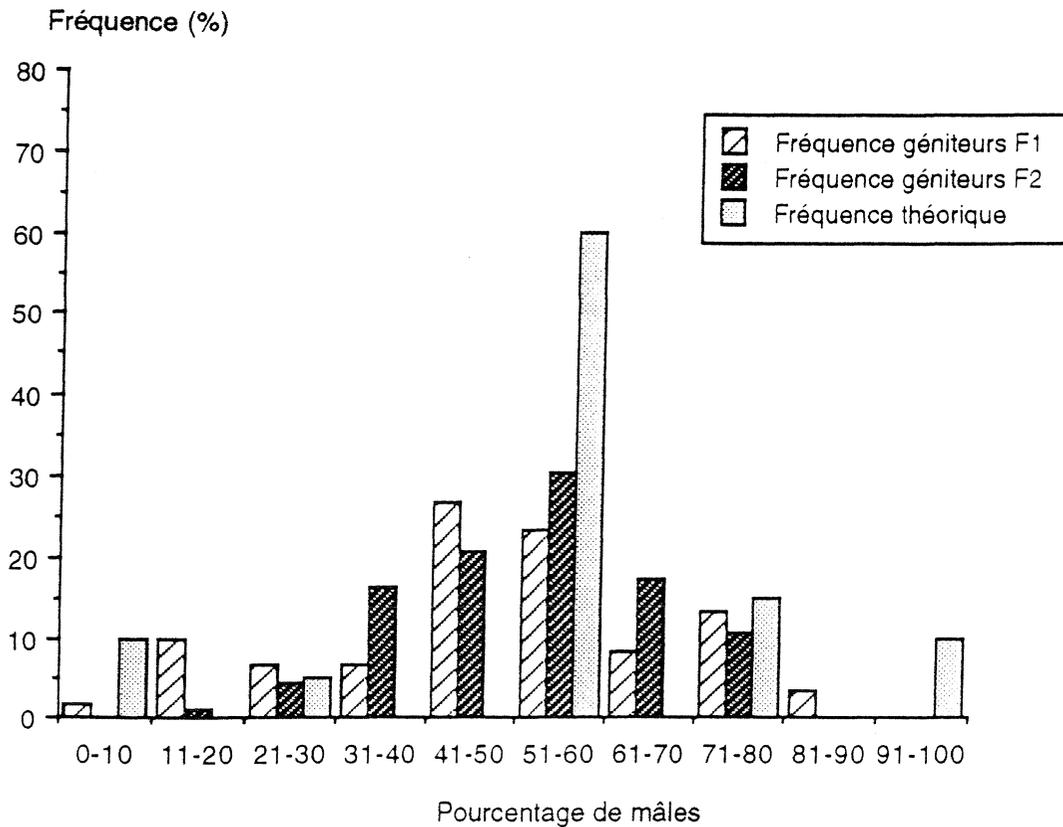
Figure 1 : Variabilité du sexe ratio dans les descendance successives de 11 couples de tilapia rouge Red Florida.



- Des descendance présentent des sexe-ratios non théoriques. Ainsi 10 % des descendance des femelles F1, présentent un pourcentage de mâles compris entre 11 et 20 % qui pourraient, sur base de la théorie proposée, soit correspondre à un sexe-ratio théorique de 0 : 100, soit de 25 : 75 (Figure 2). Les mêmes constatations sont faites pour les descendance dont le pourcentage de mâles est compris entre 30 et 40 % ou entre 60 et 70 % (Figure 2).

- Une descendance monosex mâle n'a jamais été observées (Figure 2).

Figure 2 : Fréquence théorique et observée des sexe ratios dans les croisements de tilapia rouge Red Florida.



Suite à ces premières observations nous avons tenter d'attribuer un génotype aux individus mâles et femelles F1 et F2 en raisonnant sur le sexe ratio des descendance et d'après le modèle monofactoriel à 4 gonosomes proposé pour la détermination génétique du sexe du tilapia rouge Red Florida.

Géniteurs F1

Plusieurs hypothèses de génotypes avaient été émises par Briand (1994) sur des géniteurs mâles et femelles. Une partie des croisements manquants a été effectuée (Tableau 8).

- La multiplication des croisements n'a pas permis d'attribuer un génotype aux géniteurs pour lesquels 2 hypothèses étaient proposées. Pour les femelles 222 et 236. l'analyse des sexe-ratios complémentaires nous a même conduit à émettre une deuxième hypothèse compatible avec les résultats.

- Une déviation en faveur du sexe mâle par rapport au sexe-ratio attendu est observé dans les descendance du mâle 240 (ZX) x les femelles v220 (WX) et 248

Tableau 8 : Sexe-ratios (mâles : femelles) observés dans les descendance de géniteurs F1 de tilapia rouge, souche Red Florida

Les génotypes présumés sont indiqués sous les codes des individus.

50:50 : résultats obtenus par Briand (1994)

50:50 : résultats obtenus en 1995-1996

50:50 : le nombre d'individus examinés pour le sexage est compris entre 50 et 100.

	Code femelle Génotype (s)	b220	v205	v209	v220 WX	v222 WW WX	v233	v236 WX WW	v245 WX	v247 WZ WX	v248 WW
Code mâle (génotype(s))											
212 (XY/YZ)					<u>63:37</u>	50:50 61:39	54:46	<u>53:47</u>		<u>84:16</u>	60:40 48:52
213 (WY-XY)		42:58		44:56		71:29 45:55 <u>55:45</u>		<u>38:62</u>	58:42		46:54 50:50
221 (YZ)					74:26		62:38 66:34		73:21	<u>77:23</u>	55:45
225 (ZX)					28:72	11:89		16:84			5:95
239 (WY/XY)			43:57	43:57			<u>46:54</u>	60:40		58:42	
240 (ZX)			47:53 41:59		53:47 52:48 51:49				32:68 46:54 39:61		22:78

(WW). Dans ce dernier croisement un sexe-ratio théorique de 0 : 100 était attendu, alors que nous avons observé 25 % de mâles en descendance.

Géniteurs F2

Les génotypes ont été attribués uniquement sur l'analyse des sexe-ratios et indépendamment des génotypes parentaux (Tableau 9 et 10).

- Les sexe ratios des couples 64F x A7C ; 068 x 642 ; 023 x 52C et 023 x B2C ne sont pas en accord avec ceux attendu d'après le génotype présumé des parents.

- Un génotype XX aurait été identifié (femelles 41C ; A7C ; 431)

- Les génotypes des individus F2 déterminés par analyse du sexe-ratio et d'après les génotypes parentaux ne sont pas toujours compatibles. Les femelles issues du croisement mâle 221 (YZ) x femelle 220 (WX) devrait en théorie toutes présentées un génotype WZ, or d'après nos résultats les 4 génotypes femelles possibles, XX, WX, WZ, WW sont présents chez ces femelles. Même remarque pour les femelles du couples mâle 225 (ZX) x femelle 248 (WW) où des génotypes WW sont proposés sur des individus théoriquement WX et WZ.

Le mâle 64F (YZ) devait, d'après son origine parentale, présenté un des 3 génotypes suivants : WY, ZX ou XY.

- Les mâles 07D et 71E ne produisent pas des sexe-ratios en accord avec ceux attendus.

IV. Discussion et conclusion

Nos travaux ont mis en évidence la difficulté à caractériser sur le plan du génotype les géniteurs Red Florida d'après le sexe-ratio des descendance. Ainsi pour certaines descendance, deux sexe ratios théoriques sont compatibles avec des sexe-ratios non théoriques. Nous avons identifié des déviations possibles du sexe-ratio par rapport aux résultats attendus notamment avec le mâle 240. La multiplication des croisements effectués sur les géniteurs F1 ne nous ont pas conduit à confirmer définitivement les génotypes proposés. Le résultat inverse à même été obtenu avec proposition d'une deuxième hypothèse possible pour certains géniteurs.

Les nombreuses études réalisées sur *O. aureus* et *O. niloticus* montrent que les modèles monofactoriels de déterminisme du sexe ne s'appliquent pas de manière stricte à tous les résultats observés.

Tableau 9 : Sexe-ratios (mâles : femelles) observés dans les descendance de tilapia rouge x tilapia rouge (souche Red Florida).

Les génotypes supposés sont indiqués en gras.

Les résultats en gras ne sont pas en accord avec les génotypes supposés.

50:50 : Le nombre d'individus examinés lors du sexage est compris entre 50 et 100.

Code mâle (génotype) (Origine parentale)	Origine parentale femelle WX 242 x mâle ZX 225					femelle WX 227 x mâle ZX 225					
	Code femelle (génotype)	41C XX	A7C XX	919	E1B WX	431 XX	35C WX WZ	F1F WX WZ	579 WW	E6E WW	614 WW
023 (ZX) femelle WX 220 x mâle ZX 225		35:65 48:52	43:57 38:62		28:72	39:61					
64F (YZ) femelle WX 227 x mâle YZ 221			<u>74:26</u>		78:22						
068 (YZ) femelle WX 241 x mâle YZ 221							70:30	<u>71:29</u>	54:46	47:53	54:46 60:40
B47 (XY) femelle WX 220 x mâle YZ 221		50:50 <u>38:62</u>	68:32 48:52		58:42 54:46	68:32					50:50
71E femelle WW 248 x mâle ZX 225			<u>55:45</u>	33:67 46:54	46:54		<u>36:64</u>	<u>54:46</u> <u>50:50</u> <u>44:56</u>		29:71	56:44
07D femelle WW 248 x mâle ZX 225								53:47 53:47	35:65	28:72	48:52

Tableau 10 : Sexe-ratios (mâles : femelles) observés dans les descendance de tilapia rouge x tilapia rouge, souche Red Florida.

Les génotypes supposés sont indiqués en gras.

Les résultats en gras ne sont pas en accord avec les génotypes supposés.

50;50 : le nombre d'individus examinés lors du sexage est compris entre 50 et 100

Code mâle (génotype) (origine parentale)	Origine parentale	femelle WW 248 x mâle ZX 225							femelle WX 220 x mâle YZ 221				
	Code femelle (génotype)	80B WW	D65 WW	652 WX/ WZ	944	52C WW	B2C WW	B7B WZ	818 WW	73A WW	87D WX	642 XX	24D WZ
023 (ZX) femelle WX 220 x mâle ZX 225				34:66		17:83	31:69	40:60			38:62 32:68 26:74	46:54 40:60	71:29 56:44 51:49 68:32
64F (YZ) femelle WX 227 x mâle YZ 221					<u>63:37</u>	53:47	53:47 59:41	75:25					
068 (YZ) femelle WX 241 x mâle YZ 221		54:46	<u>58:42</u>	<u>74:26</u> 75:25			52:48		47:53 <u>49:51</u> 50:50	<u>57:43</u> 60:40	71:29 73:27	61:39	
B47 (XY) femelle WX 220 x mâle YZ 221										<u>53:47</u> <u>52:48</u> 50:50	<u>48:52</u> <u>45:55</u>	61:39 <u>54:46</u> 56:44	78:22
07D femelle WW 248 x mâle ZX 225				68:32 61:39								33:67 48:52	

Des hypothèses d'influences autosomales ont été émises pour expliquer les déviations de sexe-ratio tant pour des croisements interspécifiques (Jalabert et al, 1971 ; Hammerman and Avtalion, 1979) qu'intraspécifiques (Mair et al, 1991 a et b ; Wolfarth and Wedekind, 1992). Le modèle proposé par Mair et al (1991 b) incluant un déterminant autosomale conduit à l'obtention de sexe ratio non mendélien de type 3 : 1 et 3 : 5.

Des crossing over au sein des chromosomes sexuels sont également suspectés (Avtalion et Don, 1990 ; Mair et al, 1991 a et b) ce qui peut expliquer une partie des déviations de sexe ratio observées principalement sur des descendances issues d'individus gynogénétiques chez *O. niloticus* et *O. aureus*.

Plusieurs auteurs n'excluent pas l'action possible de facteurs environnementaux qui supplanteraient l'expression des déterminants génétiques et pourrait expliquer une partie des déviations (Baroiller et al, 1995 ; Mires, 1974 ; Mair et al, 1990, 1991 a et b ; Wolfarth et Wedekind, 1992). Un effet des fortes températures sur le déterminisme phénotypique du sexe a déjà été démontré chez *O. niloticus* (Baroiller et al, 1995) et chez *O. aureus* (Desprez et al, soumis pour publication). Nous verrons que ce phénomène existe également chez le tilapia rouge (Chapitre 3).

Des déviations du sexe ratio pourraient avoir une origine parentale (Wolfarth and Wedekind, 1992 ; Baroiller 1993). Les biais du sexe ratio serait un caractère héritable en descendance (Wolfarth and Wedekind, 1992).

Ces hypothèses suggèrent donc que des individus peuvent présenter un sexe phénotypique inverse du sexe génétique. des femelles pourraient alors être caractérisées par des génotypes mâles et inversement. Le testage individuel de mâles présents dans des descendances monosexes femelles n'ont cependant pas produits les sexe ratios attendus (Tableau 9 et 10). Des dérives de sexe-ratios sont observées et facilement repérées chez les espèces pures comme *O. aureus* et *O. niloticus* qui possèdent des modèles monofactoriels à deux chromosomes. Des influences parentale, autosomale ou environnementale, si elles existent chez les espèces pures, doivent également intervenir chez le tilapia rouge mais sont indétectables par une simple analyses du sexe ratio des descendances ou alors après des croisements multiples. Des déviations ont pu ne pas être détectées pour certains croisements de tilapia rouge, ce qui nous a alors conduit à émettre de fausses hypothèses sur les génotypes parentaux. L'incompatibilité, en F2, entre les génotypes déterminés par analyse du sexe-ratio des descendances et sur base des génotypes parentaux, pourrait ainsi s'expliquer.

La méthode empirique d'analyse du sexe-ratio des descendances a montré ses limites

dans le cadre de l'étude du déterminisme du sexe du tilapia rouge Red Florida. La mise au point d'outils scientifiques plus performants tels que la recherche de marqueurs génétiques liés au sexe est un préalable indispensable à la poursuite d'une telle étude. Des travaux sont en cours actuellement, si des marqueurs sont identifiés chez *O. niloticus* ou *O. aureus*, ils pourraient être testés chez le tilapia rouge Red Florida. Les résultats acquis au cours de ces trois années de travaux (1994 - 1996) ne permettent ni de confirmer ni d'infirmer le modèle monofactoriel de détermination du sexe à 4 gonosomes. A ce jour, la difficulté à identifier de manière certaine un génotype individuel exclue la voie génétique pour la production de populations monosexes mâles chez le tilapia rouge Red Florida.

Chapitre 3

**Effet de la température
d'élevage sur la
différenciation sexuelle du
tilapia rouge Red Florida**

I. Introduction générale

Chez les vertébrés supérieurs, le sexe d'un individu est déterminé par génotype sexuel, fixé à la fécondation. Chez plusieurs espèces d'invertébrés (Charnov and Bull, 1977) et de vertébrés inférieur (Dourmon et al, 1990), le sexe est déterminé ultérieurement sous l'influence de facteurs environnementaux. La température est le facteur environnemental majeur de la détermination du sexe chez les vertébrés inférieurs (Bull and Vogt, 1979). Chez ces espèces, le sexe est déterminé par la température d'incubation des embryons (Rimblot et al, 1986 sur la tortue Luth ; Lance and Bogart, 1994 sur l'alligator ; Dourmon et al, 1990 ; Gutzke and Crews, 1988), et le génotype n'aurait qu'un rôle mineur sur le devenir mâle ou femelle de l'individu (Bull and Vogt, 1979 ; 1981).

Chez les poissons, les nombreux travaux sur l'inversion hormonale du sexe (Yamamoto, 1959 ; Hunter and Donaldson, 1983) ont démontré la plasticité de la différenciation gonadique du sexe, indépendamment du génotype. La température et la salinité, ainsi que d'autres facteurs de l'environnement, comme les facteurs trophiques et sociaux, interviennent sur la vitesse de différenciation sexuelle.

Chez les poissons, l'existence d'une influence de la température sur la détermination du sexe a été mise en évidence chez la capucette *Menidia menidia* (Conover and Kynard, 1981 ; Conover, 1984 ; Conover and Fleisher, 1986 ; Conover and Heins, 1987), chez *M. peninsulae* (Middaugh and Hemmer, 1987), chez l'attipa *Hoplosternum littorale* (Hostache et al, 1995), chez la lamproie *Ichthyomizon gagei* (Beamish, 1993), et est suspectée chez la brème blanche *Blicca bjoerkna* (Volodin and Grechanov, 1986).

Des déviations de sexe ratio par rapport à un modèle monofactoriel de détermination génétique du sexe sont régulièrement observées chez les espèces du genre *Oreochromis* lors de croisements intraspécifiques. Ces variations sont généralement attribuées à des facteurs autosomaux (Hammerman and Avtalion, 1979 ; Mair et al, 1991 b) ou environnementaux (Mires, 1974 ; Lester et al, 1989 ; Wolfarth and Wedekind, 1991) influençant la différenciation sexuelle. Suite aux travaux de Mair et al (1990) un effet de la température sur la différenciation du sexe avait été suspecté mais les fortes mortalités et le faible nombre d'individus examinés ne permettait pas de conclure. Les effets de la température ont depuis lors été testés chez *O. niloticus* (Baroiller et al, 1995) et *O. aureus* (Desprez et al, soumis pour publication). Une température d'élevage de 36 °C couvrant la période hormono sensible définie par Baroiller et Toguyeni (1993) dévient le sexe-ratio des descendances en faveur du sexe mâles par rapport aux témoins respectifs. Chez *O. niloticus*, des températures inférieures à 32 °C n'ont pas d'effet.

Ces résultats démontrent l'existence d'une thermosensibilité de la différenciation du sexe chez une espèce à homozygotie mâle ZZ (*O. aureus*) et chez une espèce à homozygotie femelle XX (*O. niloticus*). La thermosensibilité pourrait également constituer une voie

possible de production de populations monosexes mâles compte tenu de la déviation en faveur du sexe mâle. L'effet de la température, comme voie de substitution à l'inversion hormonale du sexe, a donc été étudié chez le tilapia rouge Red Florida.

II. Matériel et méthode

Deux femelles (119 et 859) et deux mâles (mâles 239 et 221) sont à l'origine des 5 descendances soumises à un traitement thermique à 36 °C. Les reproductions se sont déroulées comme précédemment en aquarium de 500 litres, avec un mâle par aquarium. Suite à la ponte les femelles étaient isolées dans un compartiment de l'aquarium par la mise en place d'une cloison.

Lors du prélèvement des alevins dans la bouche de la femelle, 10 jours post-fécondation, la ponte est divisée en plusieurs lots de taille variable en fonction de l'importance de cette dernière. Les différents lots de la descendance sont identifiés par la date de ponte, les codes des parents et la température d'élevage (28 ou 36 °C).

Chaque lot est ensuite transféré dans un aquarium de 200 litres équipé d'un filtre biologique sur corail, d'un diffuseur d'air, d'un air lift assurant la circulation de l'eau et d'un biotherm (Biotherm 2000 - KDW Heward - Allemagne) couplé à un thermoplongeur de 500 watts. Le biotherm assure un contrôle de la température avec une précision de l'ordre de 0,2 °C (information fournie par le fabricant). Au moment du transfert, la consigne de température pour tous les aquariums est fixée à 28 °C. Suite au transfert, la consigne des aquariums contenant les lots traités est amenée à 36 °C, l'augmentation de la température est ainsi progressive et la température souhaitée est atteinte en 5 à 6 heures. Les lots témoins sont maintenus à 28 °C.

Dès le transfert en aquarium, les alevins sont nourris manuellement 6 fois par jour avec un aliment pour truites (Gheerbrandt, 56 % de protéines)

Tous les jours, 80 % du volume d'eau des aquariums est remplacée par de l'eau à température adéquate (28 ou 36 °C en fonction des lots) provenant "d'un aquarium-réservoir"

La température dans tous les aquariums est relevée deux fois par jour (le matin et le soir). Le traitement des descendances à 36 °C est appliqué pendant 25 (en référence aux études sur *O. aureus* et *O. niloticus*) ou 28 jours (en référence à l'inversion hormonale du sexe) à partir du prélèvement dans la bouche des femelles (Tableau 1). A la fin du traitement, la consigne de température des lots traités est amenée à 28 °C puis lorsque cette température est atteinte, tous les lots, y compris les lots témoins, sont transférés dans les bacs de 100 litres des circuits fermés (cf description précédemment), et ce jusqu'au sexage. Le sexage intervient à l'âge minimum de 65 jours post fécondation. Pour la descendance 221 x 119 traitée à 36 °C pendant 28 jours, un sexage d'un échantillon de 40 poissons a été effectué à 65 jours post fécondation suivi d'un second à 95 jours post fécondation sur 80

poissons.

Tableau 1 : Méthode d'élevage des descendance de tilapia rouge Red Florida à 36 °C.

Température (°C)	Temps (en jours post-fécondation) (en jours*)				
	Ponte	Début du traitement	Durée du traitement*	Fin du traitement	Sexage
27 °C	0	9	—	—	65 à 75
36 °C	0	9	25	34	65 à 75
36 °C	0	9	28	37	65 à 95

III. Résultats

1. Survie

La survie moyenne des lots témoins ($38,7 \pm 16,2$ %) est inférieure à la survie moyenne ($66,2 \pm 22,5$ %) des lots traités à 36 °C (t-test, $t = 2,81$, $ddl = 14$, $p < 0,05$). De très faibles taux de survie sont observés pour la descendance mâle 221 x femelle 119 tant pour les 2 lots témoins (13,7 et 25,8 %) que pour le lot traité (24,6 %). Les deux lots traités à 36 °C pendant 25 et 28 jours de la descendance mâle 239 x femelle 119 présentent un taux de survie respectif de 92,3 et 97,1 % contre seulement 56,0 % pour le lot témoin (Tableau 2).

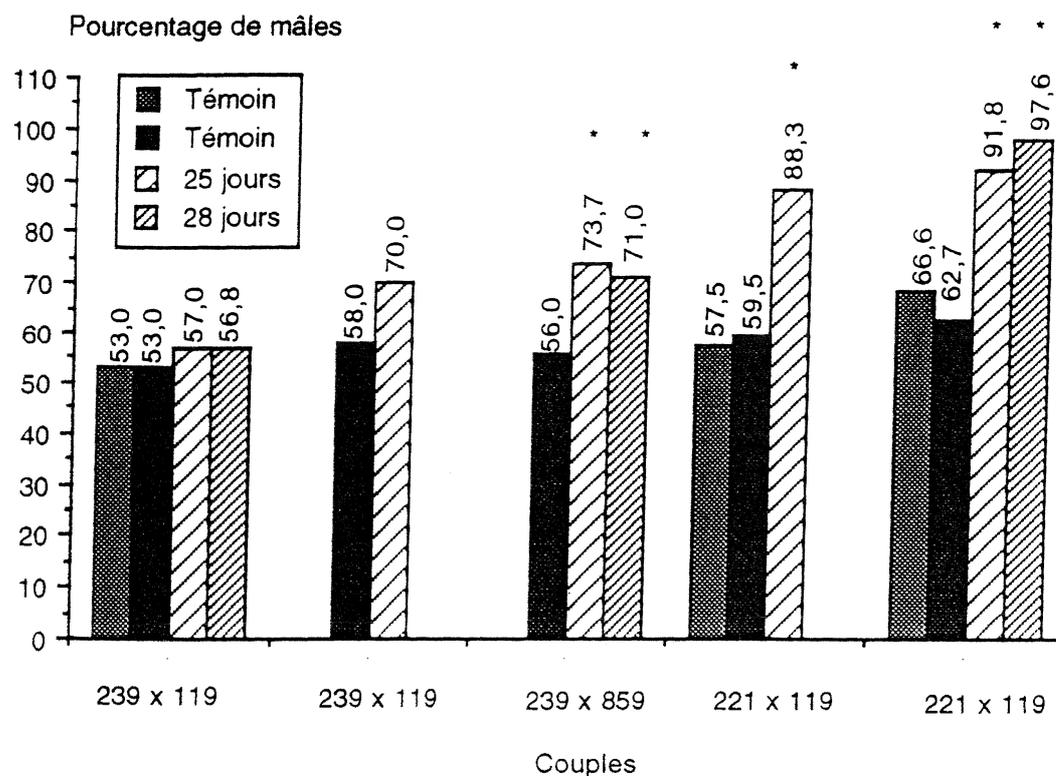
2. Sexe-ratio des descendance.

Le pourcentage de mâle dans les deux lots témoins d'une même descendance est stable (χ^2 compris entre 0 et 0,77, $p > 0,05$).

Sur les 5 descendance soumises à un traitement par la température, 3 descendance présentent des déviations significatives en faveur du sexe mâle par rapport aux lots témoins respectifs (Figure 1). Sur les descendance du couple 239 x 119, la variation de sexe-ratio suite au traitement à 36 °C pendant 28 jours n'est pas significative ($\chi^2 = 3,12$, $p > 0,05$) (Tableau 2 et Figure 1). L'amplitude de la déviation du sexe ratio après traitement à 36 °C varie donc de 3,8 à 31,6 %.

Figure 1 : Effet des fortes températures d'élevage sur le sexe ratio des descendance de tilapia rouge

* : différence statistique à $p < 0,05$.



Deux descendance successives des couples 239 x 119 et 221 x 119 ont été soumises aux mêmes conditions de traitements. Une stabilité de la déviation est observée pour le couple 221 x 119 avec une augmentation respective du pourcentage de mâle de + 29,8 et + 31,6 % dans les deux descendance par rapport aux lots témoins. En ce qui concerne le couple 239 x 119, la déviation est plus faible sur la première descendance (+ 3,8 %) que sur la deuxième (+ 12,0 %) (Figure 1).

L'augmentation de la durée du traitement de 25 à 28 jours n'a pas d'effet significatif sur le sexe ratio (χ^2 compris entre 0,01 et 3,18 ; $p > 0,05$).

Pour la descendance mâle 221 x femelle 119, le sexage effectué à 95 jours post fécondation (92,3 % de mâles) confirme le résultat acquis à 65 jours post-fécondation (97,6 % de mâles) (différence non significative, $\chi^2 = 2,93$, $p > 0,05$).

Tableau 2 : Effet des fortes températures d'élevage (36 °C) sur laTest χ^2 : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Couple (M x F)	Durée du traitement	Nombre initial d'alevins	Température d'élevage (°C)
239 x 119	témoin	350	28,1 ± 1,1
	témoin	350	28,1 ± 1,1
	25 jours	200	35,4 ± 0,5
	28 jours	200	35,3 ± 0,5
239 x 119	témoin	200	28,9 ± 0,7
	25 jours	200	35,9 ± 0,8
239 x 859	témoin	350	28,1 ± 1,1
	25 jours	200	35,6 ± 0,3
	28 jours	200	35,6 ± 0,3
A58 x 119	témoin	350	28,1 ± 1,0
	témoin	350	28,1 ± 1,0
	25 jours	300	35,5 ± 0,2
A58 x 119	témoin	175	28,3 ± 1,0
	témoin	175	28,3 ± 1,0
	25 jours	200	35,3 ± 0,2
	28 jours	200	35,3 ± 0,5
	28 jours	200	35,3 ± 0,5

survie et le sexe-ratio du tilapia rouge Red Florida

Survie (%)	Echantillon pour sexage	Age (jours PI) au sexage	Poids moyen (g) au sexage	Pourcentage de mâles
37,4	100	75	2,8 ± 1,8	53,0
43,4	100	75	1,8 ± 1,2	53,0
62,3	88	75	3,1 ± 1,7	56,8
59,5	100	75	4,2 ± 2,6	54,0
63,5	100	75	3,3 ± 2,2	58,0
60,5	100	75	2,6 ± 2,3	70,0
56,0	100	75	4,7 ± 3,0	56,0
92,3	95	75	7,2 ± 2,5	73,7
97,1	100	75	4,7 ± 4,7	71,0
13,7	40	70	1,9 ± 1,6	57,5
25,8	42	70	2,5 ± 1,4	59,5
24,6	86	70	3,3 ± 2,1	88,3
29,0	51	65	1,6 ± 0,8	62,7
40,6	70	65	1,6 ± 0,9	68,6
73,5	147	65	2,2 ± 1,2	91,8
-----	40	65	3,0 ± 1,1	97,6
60,5	80	95	8,1 ± 4,5	92,3

IV Discussion et conclusion.

Les différents lots témoins et traités présentent de faibles taux de survie avec respectivement 38,7 et 66,2 %. De fortes mortalités sont couramment observées chez les descendances de tilapia rouge Red Florida élevées à des températures 27-28 °C (notre étude sur le déterminisme du sexe, Behrends et al, 1982 ; Behrends and Smitherman, 1984). Nous considérerons donc comme nous l'avons déjà fait pour l'étude sur le déterminisme génétique du sexe, que la mortalité touche de façon équivalente les individus de sexe mâle et femelle et ce pour les 2 températures d'élevage.

Les hautes températures d'élevage (36 °C) dévient donc le sexe-ratio des descendances en faveur du sexe mâle chez le tilapia rouge Red Florida. L'effet de la température d'élevage sur la différenciation du sexe a déjà été mise en évidence chez une espèce à homogamétie femelle XX, en l'occurrence *O. niloticus* (Baroiller et al, 1995 et 1996 b) mais également chez *O. aureus*, espèce caractérisée par une homogamétie mâle ZZ (Desprez et al, soumis pour publication). Le tilapia rouge qui résulte du croisement de 4 espèces dont les 2 citées ci-dessus, a pu hérité de la thermosensibilité de la différenciation du sexe d'un ou des deux parents *O. aureus* et *O. niloticus*. Ce phénomène pourrait également être être un caractère commun à toutes les espèces du genre *Oreochromis*, en effet, Mair et al (1990) ont également suspecté un effet de la température sur le sexe ratio de descendances *O. mossambicus*.

L'amplitude de la déviation du sexe-ratio en faveur du sexe mâle varie de 1,1 à 91 % chez *O. niloticus* (Baroiller et al, 1995 - Travaux sur des descendances monosexes femelles), de 10 à 50 % chez *O. aureus* (Desprez et al. soumis pour publication) et de 3,8 à 31,6 % chez le tilapia rouge. Des populations monosexes mâles suite à un traitement à 36 °C ont été observées chez *O. aureus* (Desprez et al. soumis pour publication). Le pourcentage maximum de mâles obtenus chez le tilapia rouge est de 97,6 %.

La réponse à la température peut varier entre deux descendances de même origine parentale. Dans le cas du couple mâle 239 x femelle 119 la première descendance soumise à 36 °C présentaient une augmentation de 3,8 % par rapport au témoin, pour la deuxième descendance, l'acroissement était de 12 %. A l'opposé les deux descendances du couple mâle 221 x femelle 119 présentent des déviations très proches avec respectivement 29,8 et 31,6 % de mâles en plus par rapport aux témoins. Baroiller et al (1995) avaient émis l'hypothèse d'une origine parentale de la thermosensibilité de la différenciation du sexe chez *O. niloticus*. Des expériences complémentaires sont nécessaires chez le tilapia rouge pour mettre en évidence ce caractère.

Ces premiers résultats démontrent l'existence d'une thermosensibilité de la différenciation du sexe chez le tilapia rouge Red Florida. Le degré de thermosensibilité des descendance est variable ce qui se traduit par des descendance faiblement et fortement thermosensibles. Les études futures devront déterminer si la thermosensibilité est un caractère héritable et pouvant être sélectionné. Dans l'affirmatif, la voie environnementale pourrait alors constituer une alternative possible à l'utilisation de stéroïdes artificiels.

Conclusion générale

Des 3 voies de productions de populations monosexes mâles étudiées sur le tilapia rouge, une seule, l'inversion hormonale du sexe par une hormone naturelle, s'avère actuellement viable dans un contexte de production intensive de type commerciale.

La complexité du déterminisme génétique du sexe rend cette voie inexploitable tant que des outils scientifiques plus performants ne seront pas mis au point.

Nous avons démontré l'existence chez le tilapia rouge d'une thermosensibilité de la différenciation du sexe qui se traduit par une déviation du sexe ratio en faveur du sexe mâle. Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la température, l'origine de ce phénomène...L'objectif de ces travaux seraient de pouvoir sélectionner des géniteurs à descendance à fort degré de thermosensibilité et de produire ainsi des populations à haut pourcentage de mâles. Il est évident que la température ne permettra pas d'obtenir le niveau de performance de l'inversion hormonale du sexe. Un pourcentage plus ou moins important de femelles sera présent au sein des populations issues d'un traitement par la température. L'élevage avec un prédateur comme le Black bass permettrait éventuellement de contrôler les reproductions.

Références
bibliographiques

- Avtalion, R.R. and Don, J., 1990 - Sex determining in tilapia : a model of genetic recombinaison emerging from sex-ratio result of three generation od diploid gynogenetic, *Oreochromis aureus* . J. of Fish Biol., 37, 167-173.
- Baroiller, J.F., 1988 - Etude corrélée de l'apparition des critères morphologiques de la différenciation de la gonade et de ses potentialités stéroïdogènes chez *Oreochromis niloticus*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, 70 pages.
- Baroiller, J.F. et Jalabert, B., 1989 - Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapias. Aquat. Living Resour., 2 : 105-116.
- Baroiller, J.F. et Toguyeni, A., 1993 - Comparaison des effets d'un stéroïde naturel, 11 β -hydroxy-androsténédione (11 β -OH-A4) et d'un androgène de synthèse, 17 α -methyltestostérone (17 α -MT) sur le sex ratio chez *Oreochromis niloticus*. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kotias and D. Pauly, (eds) "Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture". 11-16 novembre 1991, Abidjan, Côte d'Ivoire. ICLARM Conf. Proc. 41. Sous presse.
- Baroiller, J.F., Fostier, A, Cauty, C. et Jalabert, B., 1995 - Effets des fortes températures d'élevage sur le sex-ratio de descendance issues de néomâles d'*Oreochromis niloticus*. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kotias and D. Pauly, (eds) "Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture". 11-16 novembre 1991, Abidjan, Côte d'Ivoire. ICLARM Conf. Proc. 41. Sous presse.
- Baroiller, J.F., Chourrout, D., Fostier, A. and Jalabert, B., 1995 - Temperature and sex chromosomes govern sex-ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. J. Exp. Zool., 273: 216-223.
- Baroiller, J.F., Clota, F. and Geraz, E., 1995 - Temperature sex determination in two tilapia species *Oreochromis niloticus* and the red tilapia (red Florida strain) : effect of high or low temperature. In Proceedings of the Reproductive Physiology of Fish, 5th International Symposium, July 2-8, 1995. Austin, Texas, sous presse.
- Baroiller, J.F., Desprez, D., Toguyeni, A., Mélard, C., Hoareau, M.C. and Bosc, P., 1996 - Use of a natural steroid, 11 β hydroxyandrosténédione for the production of male monosex population in 4 tilapias species, *Oreochromis niloticus*, *O. aureus*, *Sarotherodon melanotheron*, and the red hybrid "Red Florida". Soumis pour publication à Aquaculture.

- Mc Bay, K.R., 1961. The biology of *Tilapia nilotica*. Proc. Annu. Conf. SouthEast Assoc. Game Fish Comm. 15: 208-218.
- Beamish, F.W.H., 1993 - Environmental sex determination in Southern brook lamprey *Ichthyomyzon gagei*. Can. J. Fish Aquat. Sci, 50: 1299-1307.
- Bedawi, R.M., 1985 - Recruitment control and production of market-size *Oreochromis niloticus* with the predator *Lates niloticus* L. in the Sudan. J. Fish Biol., 26 : 459-464.
- Behrends, L.L. and Smitherman, R.O., 1984 - Development of a cold tolerant population of red tilapia through introgressive hybridization. J. World Maricul. Soc., 15: 172-178.
- Behrends, L.L., Kingsley, J.B. and Price III, A.H., 1987 - Two stage hybridization and introgression for improving production traits of red tilapia. In "Genetics in Aquaculture - Proceedings of the 16 th US Japan meeting on aquaculture; 20-21 octobre 1987, Charleston, South Carolina. NOAA Technical Report NMFS 92 (1990).
- Berger, A; and Rothbard, S., 1987. Androgen induced sex-reversal of red tilapia fry stocked in cages within ponds. Bamidgeh, 39: 49-57.
- Bosc, P., 1993 - Rapport d'activité 1993 de l'Association Réunionnaise de Développement de l'Aquaculture (ARDA). 51 pages + annexes.
- Briand, C., 1994 - Etude des ségrégations des déterminants génétiques du sexe et de la couleur chez le tilapia rouge de la Réunion (*Oreochromis sp.*). Mémoire de fin d'étude de l'ENSA Rennes, 35 pages.
- Bromage, R.N. and Roberts, R.J., 1995 - Broodstock management and egg and larval quality. R.N. Bromage and R.J. Roberts (eds), Blackwell Science Ltd Oxford 424 pages.
- Buddle, C.R., 1984 - Androgen induced sex-inversion of *Oreochromis* (Trewavas) hybrid fry stocked into cages standing in an earthen pond. Aquaculture, 40: 233-239.
- Bull, J.J and Vogt, R.C., 1979 - Temperature dependent sex determination in Turtles. Science, 206: 1186-1188.

- Bull, J.J and Vogt, R.C., 1979 - Temperature sensitive periode of sex determination in Emydid turtles. J. Exp. Zool., 218: 435-440.
- Charnov, E.L. and Bull, J.J., 1977 - When is sex envireonmentally determined ? Nature, 266: 828 - 830.
- Chen, F.Y., 1969 - Preliminary studies on the sex-determinig mechanism of *Tilapia mossambica* Peters and *T. hornorum* Trewavas. Verh. Internat. Verein. Limnol., 17 : 719-724.
- Conover, D.O., 1984 - Adaptative signifiacne of temperature dependent sex determination in a fish. Amer. Nat., 123: 297-313.
- Conover,D.O., Fleisher,M.H. 1986 - Temperature-sensitive period of sex-determination in the Atlantic Silverside *Menidia menidia*. in Can.J.Fish.Aquat.Sci. 43, 514-520, 1986.
- Conover,D.O., Heins,S.W. 1987 - Adaptative variation in environmental and genetic sex determination in a fish. in Nature, vol.326, 2 April 1987, pp 496-498.
- Conover,D.O., Kynard,B.E. 1981 - Environmental sex-determination : interaction of temperature and genotype in a fish. in Science, vol.213, 31 July 1981.
- Cruz, E.M.V. and Mair, G.C., 1994 - Conditions for effective androgen sex-reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture, 122: 237-248.
- Dournon C., Houillon. C. et Pieau, C., 1990 - Temperature sex reversal Amphibians and reptiles. Int. J. Dev. Biol., 34: 81-92.
- Fryer, G. and Isles, T.D., 1972. The cichlid fishes of the great lakes of Africa: their biology and evolution. T.F.H. Publ. Neptune City, New Jersey. Iso published by Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Goudie, C.A., Shelton, W.L. and Parker, N.C., 1986. Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to sexually undifferencied blue tilapia. Aquaculture, 58: 215-226.
- Goudie, C.A., Shelton, W.L. and Parker, N.C., 1986. Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to adult blue tilapia. Aquaculture, 58: 227-240.

- Guerrero, R.D., 1975 - Use of androgens for the production of all male *Tilapia aurea* (Steindachner). Trans. Amer. Fish. Soc., 104(2): 342-348.
- Guerrero III, R.D., 1982 - Control of tilapia reproduction. In: A.S.V. Pullin and R.H. Lowe McConnell (Editors), the Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings, 7, 432 pages, Manila, Philippines, pp. 309-316.
- Guerrero, R.D. and Shelton, W.L., 1974 - An aceto-carminic squash method for sexing juvenile fishes. Prog. Fish Cult., 36(1): 56
- Guerrero, R.D. and Guerrero, L.A., 1988 - Feasibility of commercial production of sex reversed Nile tilapia fingerlings in the Philippines. In R.S.V. Pullin, T. Buckhaswan and J.L. Maclean (Editors), The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM, Manila, Philippines, pp: 183-186.
- Gutzke, W.H.N. and Crews, D., 1988 - Embryonic temperature determines adult sexuality in a reptile. Nature, 322 28: 832-834.
- Hammerman, I.S. and Avtalion, R.R., 1979 - Sex determination in *Sarotherodon* (tilapia) part 2 : the sex-ratio as a tool for the determination of genotype. A model of autosomal and gonosomal influence. Theor. Appl. Genet., 55: 177-187.
- Hanson, T.R., Smitherman, R.O., Shelton, W.L. and Dunham, R.A., 1983 - Growth comparisons of monosex tilapia produced by separation of sexes, hybridation, and sex reversal. In : L. Fishelton et Z. Yaron (éditeurs). Proceedings of the International Symposium on the Tilapia in Aquaculture. Tel Aviv University, pp : 570-579.
- Hickling, C.F., 1968 - Fish hybridization. FAO Fish Rep., 44 : 1-11.
- Hostache, G., Pascal, M. and Tessier, C., 1995 - Influence de la température d'incubation sur le rapport mâle : femelle chez l'atipa, *Hoplosternum littorale* Hancock (1828). Can. j. Zool. 73: 1239-1246.
- Huner, J.V., Miltner, M., Bean, R.A. et Avault Jr, J.W., 1983 - Survival and reproduction of blue tilapia (*Oreochromis aureus* ; Cichlidae) in ponds stocked with bowfin (*Amia calva* ; Amiidae) to serve as predators (Pisces). Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Auton. México, 10(1) : 11-16.

- Hunter, G.A. et Donaldson, E.M., 1983 - Hormonal sex control and its application to fish culture. In : Hoar, W.S., Randall, D.J. et Donaldson, E.M. (éditeurs), *Fish physiology*, academic press, New York, 9(B) : 223-303.
- Jalabert, B, Kammacher, P. and Lessent, P., 1971. Déterminisme du sexe chez les hybrides entre *Tilapia macrochir* et *Tilapia nilotica*. Etude de la sexe-ratio dans les retrecroisements des hybrides de premières génération par les espèces parentes.
- Jalabert, B., Moreau, J., Planquette, P. et 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.
- Jo, J.Y., Smitherman, R.O. and Behrends, L.L., 1988 - Effect of dietary 17α methyltestosterone on sex reversal and growth on *Oreochromis aureus*. In "the second International Symposium on Tilapia in Aquaculture, eds R.S.V. Pullin, T. Bhukaswan, K. Tonguthai and J.L. Maclean) pp. 203-207. ICLARM Conference Proceeding 15, International Center of Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.
- Johnstone, R., Simpson, T.H., Youngson, A.F. and Whitehead, C., 1978 - Sex reversal in salmonids culture. Part II. The Progeny of sex reversed rainbow trout. *Aquaculture*, 18: 13-19.
- Lance, V.A. and Bogart, M.H., 1994 - Studies on sex determination in the american alligator *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Zool.*, 270: 79-85.
- Lazard, J., 1990 - Transfert de poissons et développement de la production piscicole. Exemple de 3 pays d'Afrique subsaharienne. *Rev. Hydrobiol. Trop.*, 23(3) : 251-265.
- Lester, L.J., Lawson, K.S., Abella, T.A. and Palada, M.S., 1989 - Estimated heritability of sex-ratio and sexual dimorphism in tilapia. *Aquaculture and Fisheries Management*, 20: 369-380.
- Little, D.C., 1989 - An evaluation of strategies for production of nile tilapia *Oreochromis niloticus* fry suitable for hormonal treatment. Ph. D. dissertation, Institute of Aquaculture, University of Sterling.

- Little, D.C., Macintosh, D.J. and Edwards, P., 1993 - Improving spawning synchrony in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture and Fisheries management*, 1993 (24): 399-405.
- Mair, G.C., Penman, D.J., Scott, A., Skibinski, D.O.F. and Beardmore, J.A., 1987. Hormonal sex-reversal and the mechanism of sex determination in *Oreochromis*. In: K. Tiews (Editor), *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, Vol.2. Heenemann, Berlin, pp. 301-312.
- Mair, G.C., Beardmore, J.A. and Skibinski, D.O.F., 1990 - Experimental evidence for environmental sex determination in *Oreochromis* species. *Proceedings of the Second Asian Fisheries Forum*; Hirano, R. and Hanyu, I., editors. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 991 pp.
- Mair, G.C., Scott, A.G., Penman, D.J., Skibinski, D.O.F. and Beardmore, J.A., 1991a - Sex determination in the genus *Oreochromis*. 1. Sex reversal, gynogenesis and triploidy in *O. niloticus*(L). *Theor. Appl. Genet.*, 82: 144-152.
- Mair, G.C., Scott, A.G., Penman, D.J., Skibinski, D.O.F. and Beardmore, J.A., 1991b - Sex determination in the genus *Oreochromis*. 2. Sex reversal, hybridisation, gynogenesis and triploidy in *O. aureus* Steindachner. *Theor. Appl. Genet.*, 82: 153-160.
- Mélard, C., 1986 - Recherches sur la biologie d'*Oreochromis niloticus* L. (Pisces Cichlidae) en élevage expérimental : reproduction, croissance, bioénergétique. *Cah. Ethol. Appl.*, 6(3): 224 pages.
- Mélard, C. et 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 and Recirculations systems*, Stavanger 28-30 may, pp : 637-658.
- Mélard, C. et 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 pages.
- Mélard, C., Ducarme, C., Philippart, J.C. and Lasserre, J., 1989 - The commercial intensive culture of tilapia in Belgium. In N. De Pauw, E. Jaspers, H. Ackeford and E. Wilkins (Editors), *Aquaculture: a Biotechnology in Progress*. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium. pp 225-232.

- Mélar, C., Desprez, D. and Philippart, J.C., 1995 - Le contrôle du sexe chez les tilapias: bilan et perspective de recherche à la station de Tihange. Cahiers d'Ethologie, 13(4): 421-434.
- Middaugh, P.D. and Hemmer, M.J., 1987 - Influence of environmental temperature on sex ratio in the tidewater silverside, *Menidia peninsulae* (Pisces : Atherinidae). Copeia, 4: 958-964.
- Mires, D., 1974 - On the high percent of tilapia male encountered in captive spawnings and the effect of temperature on this phenomenon. Bamidgeh, 26 : 3-11.
- Philippart, J.C. and Ruwet, J.C., 1982 - Ecology and distribution of tilapias. In : A.S.V. Pullin and R.H. Lowe McConnell (Editors), the Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings, 7, 432 pages, Manila, Philippines, pp. 15-59.
- Pruginin, Y., Rothbard, S., Wohlfarth, G., Halevy, A., Moav, R. et Hulata, G., 1975 - All-male broods of *Tilapia nilotica* x *Tilapia aurea* hybrids. Aquaculture, 6: 11-21.
- Pullin, R.S.V., 1993 - World tilapia culture and its future prospects. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kotias and D. Pauly, (eds) "Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture". 11-16 novembre 1991, Abidjan, Côte d'Ivoire. ICLARM Conf. Proc. 41. Sous presse.
- Rimblot-Baly, F., Lescure, J., Fretey, J. and Pieau, C., 1986 - Sensibilité à la température de la différenciation sexuelle chez la tortue Luth, *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761) ; application des données de l'incubation naturelle à l'étude de la sex-ratio dans la nature. Annales des Sciences Naturelles. Zoologie, Paris, 13è serie, 8: 277-290.
- Rothbard, S., Solnik, E., Shabbath, S., Amado, R. and Grabie, I., 1983 - The technology of mass production of hormonally sex-inversed all male tilapias. In International symposium on tilapia in Aquaculture compiled by Fishelton and Yaron. Tel Aviv, pp 425-434.
- Ruwet, J.C., Voss, J., Hanon, L. et Micha, J.C., 1976 - Biologie et élevage du tilapia. p. 332-364. In "Symposium on Aquaculture in Africa, CIFA Tech. Pap., 4(1): 791 pages.
- Sweetman, J.W., 1993 - Perspectives and critical success factors in the present farming of fish. In : World Aquaculture '93, Torremolinos, Spain, May 26-28.

- Toguyeni, A., 1992. Etude des facteurs physiologiques liés au sexe phénotypique dans le déterminisme du dimorphisme sexuel de la croissance chez *Oreochromis niloticus*. Mem DEA Biologie Aquacole, Université de Rennes 1, 34 pages.
- Trewavas, E., 1983 - Tilapia fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* et *Danakilia*. British Museum (Natural History). Londres, 583 pages.
- Ufodike, E.B.C. and Madu, C.T., 1986 - Effects of methyltestosterone on food utilization and growth of *Sarotherodon niloticus* fry. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52(11): 1919-1922.
- Volodin, V.M. and Grechanov, I.G., 1986 - Effect of temperature on gonadal development and sex ratio in the progeny of a pair of white bream *Blicca bjoerkna*. Scripta Technica, 52-59.
- Watanabe, W.O., Head, W.D., Smith, S.J. and Mueller, K.W., 1993 - Production of Florida red tilapia fry in brackishwater tanks under different stocking densities and feeding regimes. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kotias and D. Pauly, (eds) "Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture". 11-16 novembre 1991, Abidjan, Côte d'Ivoire. ICLARM Conf. Proc. 41. Sous presse.
- Wolfarth, G.W. and Wedekind, H., 1992 - The heredity of sex determination in tilapias. Aquaculture, 92: 143-156.
- Yamamoto, T., 1959 - The effect of estrone dosage level upon the percentage of sex reversal in genetic male of the Medaka *Oryzias latipes*. J. Exp. Zool., 141: 133-154.