

Détermination du début de la période thermosensible pour le déterminisme du sexe chez le tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)

Hassan DRIOUCH^{1*} & Ettine BARAS²

(Recu le 13/04/2001, Révisé le 23/01/2003; Accepté le 07/03/2003)

تحديد دالة افرة الحلة تغيير الجنس الحرارة ندمك يلايا *Oreochromis niloticus*

اهدف ن ذه ادر اة دالة افرة الحلة تغيير الجنس الحرارة المر فعة ن الإثا إلى اذور و أير ما لى دد الجنين ندمك يلايا *Oreochromis niloticus* بنت لئج ذه ادر اة لى أن قليص المدة از نية ن 28 إلى 21 و م تحت رارة رفعة (37 درة) لاؤ ر لى دد الجنين. بي ميع المجمو ات ابي تم اعمال الحرارة المرفعة (37 درة) لابين 0 و 11 و م عد هالة اغذة المنية. ل الأماك ن نس اذور (أرن %97) كس اصل ي المجمو ات ابي تم أير عالجهال الحرارة المر فعة، بيث أصح يهادد اذور ضعيفا قدر ب %82 زادة لى و و %18 ن الأماك نورا و إلماي أن و اد. و ذلك إن دالة افرة تغيير الجنس الحرارة المر فعة يمكن أن كون بين 11 و 14 و م عد هالة اغذة المنية.

الكلمات المفاية : دد الجنين - الحرارة - افرة - الحلة - رية الأماك - يلايا - *Oreochromis niloticus*

Détermination du début de la période thermosensible pour le déterminisme du sexe chez le tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)

L'objectif de la présente étude a été de préciser davantage le "timing" de la période thermosensible ainsi que l'effet du moment d'application de la température de "masculinisation" sur la sex-ratio chez le tilapia du Nil *Oreochromis niloticus*. L'analyse des résultats a montré que la réduction de la période d'exposition aux hautes températures (21 au lieu de 28 jours) n'a pas d'effet négatif sur la sex-ratio. Dans tous les lots exposés à 37°C entre 0 et 11 jours post-résorption vitelline, les populations sont presque exclusivement monosexes mâles (> 97%), alors que dans les lots qui ont été soumis le plus tard au traitement thermique, la proportion des mâles est plus faible (82%) et une forte proportion d'individus intersexués (18%) a été observée. Ainsi, la limite inférieure de thermosensibilité d'*Oreochromis niloticus* pourrait se situer entre le 11^{ème} et le 14^{ème} jour après la résorption de la vésicule vitelline.

Mots clés: Sex-ratio - Température - Période thermosensible - Aquaculture - Tilapia - *Oreochromis niloticus*

The begining of thermosensitive period for sex determination in tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)

The objective of this study was to specify more the timing of thermosensitive period and the effect of the application moment of the masculinising treatment on the sex-ratio in Nil tilapia (*Oreochromis niloticus*). The results show that the reduction of exposition period under high temperature (21 vs 28 days) have not negative effect on sex-ratio. In all groups, exposed to high temperature (37°C) between 0 and 11 days after yolk sac resorption, populations were exclusively males (> 97%). In the groups exposed later to high temperature, the proportion of males was more low (82%) and high proportion of intersex (18%) was observed. Thus, the start limit of thermosensitive of *Oreochromis niloticus* may take place between the 11th and the 14th day after yolk sac resorption.

Key words: Sex-ratio - Temperature - Thermosensitive period - Aquaculture - Tilapia - *Oreochromis niloticus*

¹ Unité Halieutique, Intitut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Complexe Horticole d'Agadir, B.P. 121 Ait Melloul, Maroc

² Station d'aquaculture (C.E.F.R.A., Tihange), Belgique

* Auteur correspondant

INTRODUCTION

En milieu d'élevage, les espèces du genre *Oreochromis* sont caractérisées par une reproduction très fréquente (plusieurs pontes par année) et une maturation sexuelle précoce (Ruwet *et al.*, 1976; Philippart & Ruwet, 1982). Ceci conduit à une mobilisation de l'énergie destinée à la croissance somatique vers le développement des organes reproducteurs et les comportements de reproduction. Il en résulte ainsi une surpopulation en poissons de petite taille non commercialisables (Baroiller & Jalabert, 1989).

Pour prévenir ce nanisme et permettre un accroissement de la production et de la rentabilité économique de l'élevage, il est nécessaire de contrôler la reproduction (Chevassus *et al.*, 1979). Chez *Oreochromis niloticus*, la présence d'un dimorphisme de la croissance en faveur des mâles à un stade précoce de développement (Ruwet *et al.*, 1976; Bondari, 1982; Hanson *et al.*, 1983; Mélard, 1986; Lester *et al.*, 1989; Baras & Mélard, 1997) a orienté les recherches vers les techniques de production de populations monosexes mâles.

Cette étude a pour objectif de préciser davantage le "timing" de la période thermosensible chez *Oreochromis niloticus*. Cette étape est nécessaire non seulement à la compréhension du mécanisme de thermosensibilité, mais également à la mise au point d'un protocole efficace de production de populations monosexes mâles par traitement thermique. Dans ce contexte, la réduction de la période d'exposition aux hautes températures serait favorable, compte tenu du fait que les températures nécessaires à la masculinisation chez *Oreochromis niloticus* affectent négativement la croissance initiale et la survie (Baras *et al.*, 2000a)

MATÉRIEL & MÉTHODES

L'espèce étudiée est le tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Comme les autres espèces du genre *Oreochromis*, elle appartient à la famille des Cichlidés, à l'ordre des Perciformes et est caractérisée par l'incubation buccale exclusivement par les femelles (Trewavas, 1983).

La présente étude a été réalisée, au Centre de Formation et de Recherche en Aquaculture (Belgique), sur des poissons de la souche Manzala. Les œufs sont extraits de la cavité buccale des

généiteurs femelles et incubés dans une bouteille de Zug (0,75 L) alimentée par une eau maintenue à une température de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ jusqu'à l'éclosion. Les embryons pélagiques sont ensuite placés dans un aquarium de 50 L en circuit fermé dont la température de l'eau est de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, sous une photopériode de 12 heures de lumière artificielle et 12 heures d'obscurité.

À la fin de la résorption de la vésicule vitelline, les juvéniles sont dénombrés et répartis en 10 groupes de 150 individus chacun placés dans des aquariums de 50 L. Un échantillon de 39 juvéniles a été prélevé au hasard et pesé individuellement à l'aide d'une balance à précision (0,1 mg près) afin de déterminer le poids moyen au début de l'expérience et l'hétérogénéité des poissons.

L'expérimentation a été réalisée dans dix aquariums de 50 L chacun, alimentés par une eau d'un circuit fermé équipé d'un filtre biologique:

- Deux aquariums (A_1 et A_2) ont été considérés comme témoins et la température d'élevage a été maintenue entre 27 et 28°C durant toute la durée de l'expérimentation. Les huit autres aquariums étaient équipés d'une résistance électrique chauffante (300 watts) reliée à un thermostat (Biotherm 2000) permettant de maintenir la température constante à 37°C . L'oxygénation de chaque aquarium est assurée par un diffuseur d'air permettant de maintenir un taux d'oxygène supérieur à 5 mg/l.
- Dans les aquariums (B_1 et B_2), la température a été maintenue à 37°C au cours des 28 premiers jours d'alimentation exogène. Comme dans les études précédentes (Tian, 1999; Baras *et al.*, 2000), ces deux lots sont considérés comme "témoins de masculinisation".
- Les aquariums C_1 et C_2 ont subi un traitement thermique constant de 37°C durant une période allant du jour 8 (J8) après la mise en charge au jour 28 inclus (J28). En dehors de cette période, la température a été maintenue entre 27 et 28°C .
- Les aquariums D_1 et D_2 ont subi un traitement thermique constant de 37°C durant une période allant du jour 11 (J11) après la mise en charge au jour 31 inclus (J31). En dehors de cette période, la température a été maintenue entre 27 et 28°C .
- Les aquariums E_1 et E_2 ont subi un traitement thermique constant de 37°C durant une période allant du jour 14 (J14) après la mise en charge au jour 34 inclus (J34). En dehors de cette période, la température a été maintenue entre 27 et 28°C (Figure 1).

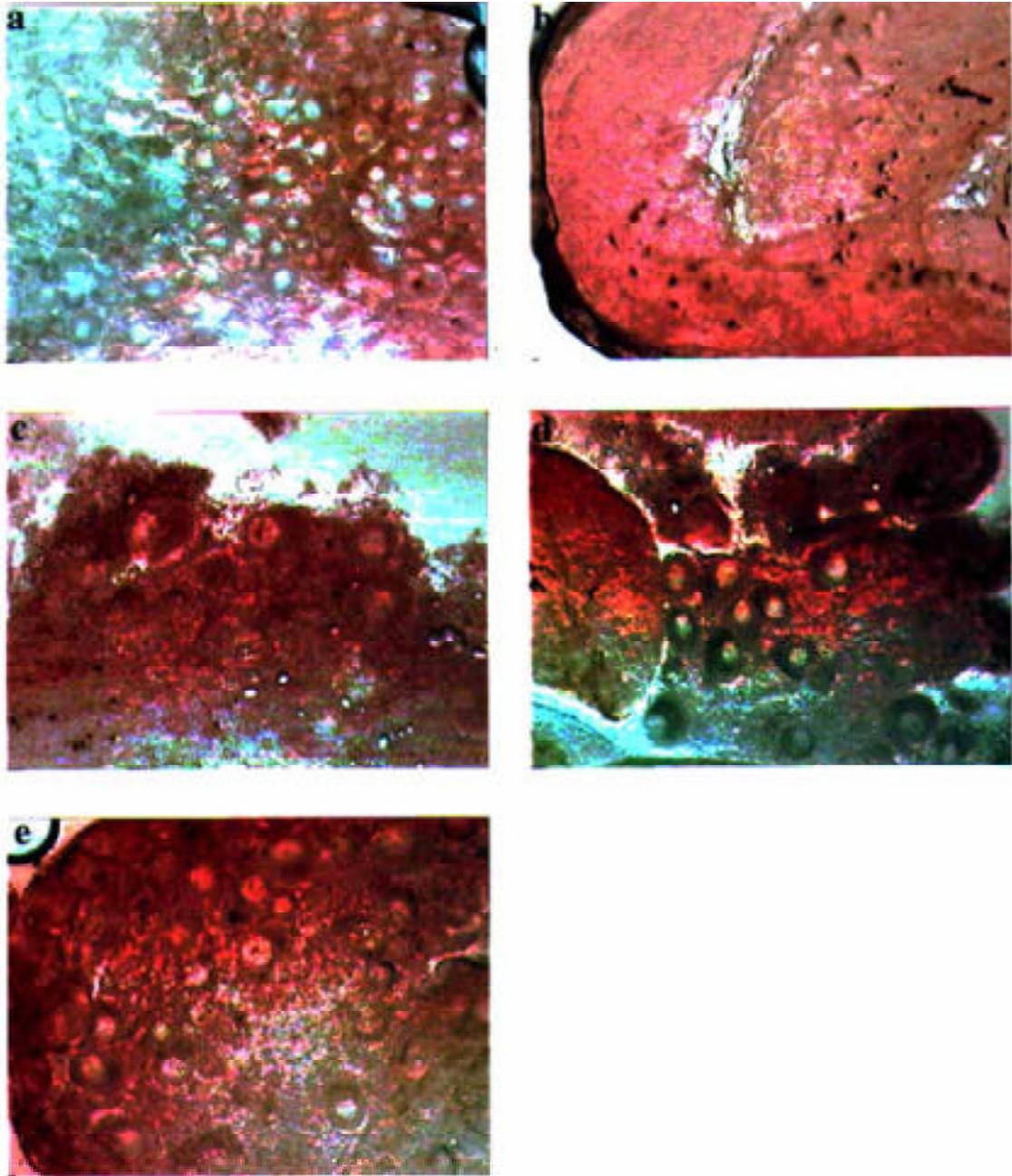


Figure 1. Illustration des gonades de *Oreochromis niloticus* (âge: 42 jours post-résorption vitelline) après préparation par la méthode acéto-carmin squash
a: gonade femelle (oogonies et ovocytes exclusivement); b: gonade mâle (tissu lobulaire exclusivement); c, d et e: gonades d'individus intersexués présentant différentes proportions de tissus mâle et femelle; c: intersexué I (prédominance du tissu mâle); d: intersexué II (tissus mâle et femelle en proportions équivalentes); e: intersexué III (prédominance du tissu femelle)

Les juvéniles ont été nourris *ad libitum* par deux types d'aliments (50% de protéines et 18% de lipides). La température journalière de l'eau a été contrôlée au moins deux fois par jour à l'aide d'un thermomètre à mercure (précision 0,1°C). 41 jours après le début de l'expérimentation, le sexe phénotypique de chaque poisson survivant était déterminé par la méthode du squash gonadique (Guerrero & Shelton, 1974). L'observation sous le microscope photonique permet de distinguer les gonades mâles (configuration lobulaire) des gonades femelles (présence des ovocytes) et de celles d'individus intersexués qui présentent à la fois des ovocytes et des parties lobulaires.

L'analyse par tables de contingence à deux dimensions a été utilisée pour les sex-ratios obtenues dans les différents lots.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Au jour 42 après la résorption de la vésicule vitelline, le sexe phénotypique de tous les poissons examinés (n = 618) a été facilement identifié lors de l'examen microscopique. L'indice normalisé

moyen Mâle-Intersexué-Femelle (M: I: F) est de 1: 0: 0,79 ± 0,01 dans les lots (A₁-A₂) élevés à une température constante de 27°C, et ne diffère pas significativement au seuil de 5% de 1: 0: 1. Dans tous les lots exposés à 37°C, la sex-ratio est significativement déviée en faveur des mâles (Tableau 1).

Dans les lots B₁-B₂, C₁-C₂ et D₁-D₂, les populations sont presque exclusivement monosexes mâles, alors que dans les lots E₁-E₂, qui ont été exposés le plus tard au traitement thermique, la proportion de mâles est plus faible (82%), et on observe une forte proportion d'individus intersexués. Lors de l'opération du sexage, on a pu distinguer trois catégories d'intersexués au niveau des lots soumis au traitement thermique. Il s'agit des individus de type "intersexué I" possédant des gonades contenant quelques ovocytes (Planche 1 c). Le type "intersexué II" concerne les individus possédant des gonades dans lesquelles les ovocytes sont fréquents (Planche 1 d). Les individus de type "intersexué III" sont caractérisés par la prédominance des ovocytes dans leurs gonades (Planche 1 e).

Tableau 1. Effets de différents traitements thermiques sur la sex-ratio chez *Oreochromis niloticus*

Lots	Régime thermique	Nombre (n) Sexé	Sex-ratio (n) et %			Indice normalisé M: I: F	Tests de comparaison (*)		
			M	I	F		M	I	F
A ₁	27°C	100	(56)	(0)	(44)	1: 0: 0,78	a	a	a
A ₂	27°C	99	56,0 (55)	0,0 (0)	44,0 (44)	1: 0: 0,80	a	a	a
B ₁	37°C (J1-J28)	48	55,6 (48)	0,0 (0)	44,4 (0)	1: 0: 0	b	a	b
B ₂	37°C (J1-J28)	48	100 (63)	0,0 (1)	0,0 (0)	1: 0: 0	b	a	b
C ₁	37°C (J8-J28)	64	98,4 (48)	1,6 (1)	0,0 (0)	1: 0,02: 0	b	a	b
C ₂	37°C (J8-J28)	49	98,4 (53)	1,6 (2)	0,0 (0)	1: 0,02: 0	b	a	b
D ₁	37°C (J11-J31)	55	96,4 (38)	3,6 (1)	0,0 (0)	1: 0,04: 0	b	a	b
D ₂	37°C (J11-J31)	39	97,4	2,6	0,0	1: 0,03: 0	b	a	b

(*) Pour une même colonne, deux lots partageant au moins une lettre commune ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (Tests exacts de Fisher, deux à deux)

Le nombre (n) et le type d'intersexués enregistré varie d'un lot à l'autre. En effet, Les intersexués obtenus dans les lots C₁ et C₂ sont tous de type I (n = 1 pour chaque lot). Au niveau des lots D₁ et D₂, on a obtenu en plus des intersexués de type I, un individu intersexué de type II (n = 1 pour D₁). Pour les lots soumis au traitement thermique au jour 14 après la résorption de la vésicule vitelline (E₁-E₂), les intersexués obtenus sont de type I, II et III (n = 3 de type I et n = 6 de type II dans le lot E₁; n = 6 de type I, n = 5 de type II et n = 1 de type III dans le lot E₂).

Ce résultat montre bien que l'inversion du sexe dans les lots E₁-E₂ est relativement incomplète puisqu'on a obtenu un nombre élevé d'intersexués et que les individus intersexués de type III n'ont été observés que dans le lot E₂.

Dans ces différentes études, la durée d'exposition aux hautes températures était de 28 jours. Par contre, lors de la présente étude, la diminution de cette durée de 7 jours n'a pas d'effet négatif sur la sex-ratio puisque les populations sont presque monosexes mâles dans tous les lots exposés à 37°C à l'exception des lots E₁-E₂ qui ont été soumis au traitement thermique le plus tard (J14). C'est au niveau de ces lots qu'on a observé une forte proportion d'intersexués et des individus intersexués de type III.

Au plan de l'inversion du sexe, les résultats de cette étude confirment ceux qui sont obtenus par Baroiller *et al.* (1996 a,b), Desprez & Mélard (1998), Tian (1999) et Baras *et al.* (2000 a), selon lesquels, l'exposition des juvéniles du genre *Oreochromis* aux hautes températures durant les premières semaines d'alimentation exogène déplace fortement la sex-ratio en faveur des mâles.

La sensibilité au traitement hormonal chez *Oreochromis niloticus* apparaît durant une période critique précise. Selon Baroiller & Toguyeni (1991), le traitement hormonal exogène, pour être efficace, doit débiter entre 9 et 14 jours post-fécondation.

Au delà de cette période, la différenciation semble définitivement engagée conformément au génotype et elle ne serait plus influencée efficacement par des facteurs stéroïdiens exogènes. Selon les mêmes auteurs, le moment d'apparition de la thermosensibilité est identique à celui de la période hormonosensible. Cependant, la limite inférieure de masculinisation révélée par

les résultats de cette étude diffère sensiblement du début de la période hormonosensible (11 au lieu de 7 jours post-résorption de la vésicule vitelline, soit plus de 23-24 jours post-fécondation à 27-28°C).

Sur le plan de l'aquaculture et au vu des résultats obtenus dans la présente étude, il paraît intéressant de produire des mâles phénotypiques par l'inversion du sexe en exposant les juvéniles de tilapia *Oreochromis niloticus* (souche Manzala) à une température de 37°C à partir du 8^{ème} jour après la résorption de la vésicule vitelline durant une période de 21 jours.

La souche Bouaké semble être plus thermosensible (production de populations monosexes mâles à 36°C avec un faible taux de mortalité et une croissance plus élevée) (Baroiller *et al.*, 1995, 1996 b) que la souche Manzala. Elle serait donc potentiellement plus intéressante dans l'optique de production de populations monosexes mâles par traitement thermique.

Cependant, aucune des deux souches, n'apparaît aussi performante que *Oreochromis aureus*, qui a montré une croissance rapide et une survie élevée aux températures de masculinisation (Desprez & Mélard, 1998; Baras *et al.*, 2000 b).

La proportion d'intersexués dans les lots E₁-E₂ est de 18% (21 sur 116). Ces individus intersexués peuvent être interprétés comme des individus à génotype femelle incomplètement inversés en mâles, en raison du fait qu'ils auraient atteint, avant l'application du traitement thermique, une taille supérieure à celle du début de la période thermosensible. En d'autres termes, leurs gonades auraient déjà commencé à se différencier en gonades femelles, contrairement à celles des poissons de même âge mais plus petits.

CONCLUSION

Actuellement, il est bien établi que l'apparition du sexe phénotypique chez *Oreochromis niloticus* dépend de la température. L'élevage à haute température (37°C) dans les premières semaines de vie chez cette espèce permet d'obtenir une déviation significative de la sex-ratio en faveur des mâles.

Le début de la période thermosensible se situe entre 11 et 14 jours post-résorption de la vésicule vitelline.

Dans l'optique de l'aquaculture comme dans celle de la compréhension des mécanismes fondamentaux inhérents à la thermosensibilité, des études complémentaires sont nécessaires afin d'apporter des précisions aux points ci-dessous.

- Détermination de la fin de la période thermosensible
- Quel est le devenir des intersexués, notamment au plan de la maturité de leurs gonades?

RÉFÉRENCES CITÉES

- Baras E & Mélard C (1997) Individual growth patterns of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.): Emergence and dynamics of sexual growth dimorphism. In: Fitzsimmons K. (Ed.), Tilapia aquaculture. *Northeast Regional Agricultural Engineering Service* 106: 169-177
- Baras E, Jacobs B & Mélard C (2000 a) Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX-XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 13 p.
- Baras E, Prignon C, Gohoungou G & Mélard C (2000 b) Phenotypic sex differentiation of blue tilapia under constant and fluctuating thermal regimes and its adaptive and evolutionary implications. *Journal of Fish Biology* 57 (1): 210-223
- Baroiller JF & Jalabert B (1989) Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapias. *Aquatic Living Resources* 2: 105-116
- Baroiller J-F & Toguyeni A (1991) Comparative effects of a naturel steroid, 11 β -hydroxy-androstenedione (11 β -OH-A4) and a synthetic androgen, 17 alpha-Methyltestosterone (17a-MT) on sex-ratio in *Oreochromis niloticus*. In "Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture". 11-16 Nov.
- Baroiller J-F, Chourrout D, Fostier A & Jalabert B (1995) Temperature and sex chromosomes govern sex-ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology* 273: 216-223
- Baroiller JF, Fostier A, Cauty C, Rognon X & Jalabert B (1996a) Significant effects of high temperatures on sex-ratio of progenies from *Oreochromis niloticus* with sibling sex-reversed males broodstock. In Pullin R.S.V., Lazard J., Legendre M., Amon Kothias J.B. & Pauly D. (Eds.), Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture, ICLARM Conf. Proc. 41, Abidjan, Côte d'Ivoire, 11-16 November 1991, pp. 333-343
- Baroiller JF, Nakayama I, Foresti F & Chourrout D (1996b) Sex determination studies in tow species of teleost fish, *Oreochromis niloticus* and *Leporinus elongatus*. *Zoological Studies* 35: 279-285
- Chevassus B, Chourrout D & Jalabert B (1979) Le contrôle de la reproduction chez les poissons. I. Les populations "monosexes". *Bulletin Français de Pisciculture* 274: 18-31
- Desprez D & Mélard C (1998) Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 162: 79-84
- Hanson TR, Smitherman RD, Shelton WL & Dunham RA (1983) Growth comparisons of monosex Tilapia produced by separation of sexes, hybridization and sex-reversal. In Fishelson L. & Yaron Z., (Eds) Proceedings of the International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Tel Aviv University, Tel Aviv, pp. 570-579
- Lester LJ, Lawson KS, Abella TA & Palada MS (1989) Estimated heritability of sex-ratio and sexual dimorphism in tilapia. *Aquaculture and Fisheries Management* 20: 369-380
- Ruwet JC, Voss J, Hanon L & Micha JC (1976) Biologie et élevage du tilapia. In: Symposium on Aquaculture in Africa. *CIFA Technical paper* 4 (1): 332-364
- Tian X (1999) Effect of high temperature on sex-ratio and growth in *Oreochromis niloticus*. Mémoire, Université de Liège, 30 p.
- Trewavas E (1983) Tilapiine Fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. London: British Museum (Natural History)