

## Contrôle de la reproduction et du sexe chez les poissons d'élevage

La reproduction des poissons en élevage pose une grande variété de problèmes, plus ou moins bien résolus selon les espèces et leur niveau de domestication. Le tableau 1 récapitule ces problèmes, leurs causes les plus vraisemblables, ainsi que les solutions qui ont pu être proposées par la recherche. Nous évoquons en introduction chacun de ces problèmes, avant d'aborder plus précisément l'action de l'INRA vis-à-vis de 2 d'entre eux.

Le problème le plus difficile est l'absence de maturation sexuelle, ou une maturation anormale ou incomplète. Des situations de ce genre se rencontrent fréquemment chez diverses espèces qui présentent un intérêt économique, et dont on essaie d'obtenir la reproduction en captivité à partir d'animaux capturés dans le milieu naturel. Les causes possibles sont multiples et peuvent d'ailleurs

se conjuguer : alimentation inadaptée, inadéquation des facteurs du milieu d'élevage, stress de confinement, etc. Dans ce cas, même si une démarche empirique fondée sur des tâtonnements successifs a pu permettre d'aboutir à certains résultats, il est généralement souhaitable de fonder la définition des paramètres d'élevage sur de solides recherches sur l'écologie de l'espèce et le rôle des facteurs externes dans le contrôle des différentes étapes de la gamétogenèse mâle et femelle, afin de déterminer les facteurs essentiels à contrôler en toute connaissance de cause. Au-delà, comme nous le verrons, la connaissance du mécanisme d'action de ces facteurs externes par l'intermédiaire du système neuro-endocrinien peut aussi déboucher sur des méthodes de contrôle susceptibles de

**Tableau 1.** Principaux problèmes rencontrés pour la reproduction des poissons en élevage et solutions apportées par la Recherche (en caractères gras, les exemples développés dans cet article).

Les problèmes	Les causes	Les solutions
Maturation sexuelle anormale ou incomplète	(facteurs d'élevage) : - qualité de l'alimentation - facteurs externes inadéquats - stress	- contrôle des facteurs externes - <b>induction de ponte</b> - sélection de souches mieux adaptées au milieu d'élevage
Absence de fraie en captivité	- défaut des facteurs et stimuli externes indispensables au comportement sexuel	- insémination artificielle
Reproduction saisonnière	- caractéristiques génétiques déterminant la réponse aux facteurs externes synchroniseurs	- contrôle par les facteurs externes - sélection de souches en fonction de leur date de maturité - cryopréservation du sperme
Ovulations non synchrones	- variabilité génétique	- <b>induction de ponte</b>
Décalage de maturité entre mâles et femelles en élevage	- facteurs d'élevage	- cryopréservation du sperme
Maturation sexuelle indésirable ou trop précoce Fraie spontanée indésirable	- caractéristiques génétiques - facteurs d'élevage	- sélection pour une puberté tardive - <b>monosexage exploitant le dimorphisme sexuel</b> - <b>stérilisation</b>

pallier le défaut de certains de ces facteurs en élevage.

Un autre type de problèmes rencontrés chez la plupart des poissons, et en particulier chez les espèces de nos régions septentrionales, tient au caractère saisonnier de la reproduction. Celle-ci se déroule à une époque de l'année qui précède plus ou moins la période la plus favorable à l'alimentation des alevins dans le milieu naturel. Le développement des gonades suit donc un cycle saisonnier lié à l'évolution de certains facteurs externes, notamment la température et la photopériode. Dans le cas des espèces d'élevage, ce phénomène se traduit par des fluctuations saisonnières dans l'occupation des structures d'élevage, dans les besoins en main d'œuvre, et enfin dans la production finale de poissons de taille commerciale, ce qui est peu compatible avec les contraintes du marché. Chez la truite arc-en-ciel, par exemple, la durée requise de l'œuf à la taille « portion » de 250 g est en moyenne de l'ordre de 14 à 18 mois selon les conditions d'élevage. Une reproduction autrefois concentrée à la fin de l'automne aboutissait donc à une surproduction avant l'été, particulièrement dramatique dans les régions à faible débit d'étiage où il est difficile de maintenir de fortes biomasses en été. Certaines solutions ont été mises en œuvre par les producteurs eux-mêmes, mais présentent de nombreux inconvénients : l'importation d'œufs de souches étrangères à saison de ponte décalée, qui comporte beaucoup d'incertitudes sur la fiabilité et la qualité de ces approvisionnements, et la modulation de la vitesse de croissance en jouant notamment sur le rationnement. D'autres solutions sont issues de travaux de recherche menés notamment à l'INRA, comme le contrôle photopériodique de la date de ponte (voir Maisse et Breton 1996), ou la sélection de souches à date de reproduction décalée.

Au caractère saisonnier de la reproduction s'ajoutent les problèmes liés à la variabilité individuelle dans la date d'ovulation ou de spermiation. Ainsi par exemple, pour une souche de truite arc-en-ciel à reproduction automnale, les dates individuelles d'ovulation peuvent se situer approximativement entre le 15 octobre et le 15 décembre selon une courbe de probabilité centrée sur le 15 novembre. Compte tenu des risques de vieillissement des ovules après l'ovulation, cette variabilité impose une manutention régulière des géniteurs pour vérifier leur état de maturité en vue de réaliser l'insémination artificielle, entraînant donc des contraintes de main d'œuvre et de gestion des installations d'écloserie. Comme nous le verrons, les travaux de recherche de l'INRA ont débouché sur des techniques de synchronisation des pontes qui peuvent permettre de lever ces contraintes chez diverses espèces.

Enfin, les phénomènes liés à la reproduction peuvent s'avérer indésirables en élevage lorsqu'il s'agit de produire des animaux de chair et non des œufs. Chez les poissons, le développement des gonades mobilise généra-

lement des ressources métaboliques importantes au détriment de la croissance et de la qualité de la chair. Il peut donc être avantageux d'inhiber ou de retarder ce développement. Diverses espèces présentent en outre un dimorphisme sexuel de la vitesse de croissance et/ou de l'âge de première maturité sexuelle qui peut conduire à privilégier l'élevage de l'un des sexes. C'est le cas chez les salmonidés : les mâles présentent en général une puberté plus précoce d'un an en moyenne par rapport aux femelles, et on cherchera donc à réaliser des élevages monosexes femelles. Chez les tilapias au contraire, espèces tropicales dont la stratégie de reproduction est tellement robuste qu'elle peut aboutir à une prolifération désastreuse de ces poissons en étangs au détriment de la croissance individuelle, on privilégiera la réalisation d'élevages monosexes mâles pour prévenir les reproductions spontanées et valoriser le dimorphisme de croissance favorable au sexe mâle chez ces espèces (Baroiller et Jalabert 1989).

Les recherches menées dans les domaines de la génétique et de la reproduction des poissons, notamment à l'INRA, ont déjà contribué à proposer des solutions à la plupart de ces problèmes et se poursuivent pour en améliorer certaines ou en proposer de nouvelles. Nous développerons particulièrement ici les travaux de l'INRA qui ont débouché sur des apports majeurs dans deux domaines : d'une part les travaux sur la physiologie de la reproduction en vue de la mise au point de traitements d'induction et de synchronisation des pontes applicables à un grand nombre d'espèces, d'autre part le monosexage et la stérilisation par voie génétique chez les salmonidés.

## Traitements d'induction et de synchronisation des pontes

Des travaux anciens avaient montré la possibilité de provoquer la ponte de femelles gardées en captivité, grâce à l'injection d'extraits hypophysaires. Cette technique dite « d'hypophysation » a été appliquée avec plus ou moins de succès à de nombreuses espèces de poissons tout en restant relativement empirique. Sa mise en œuvre posait en effet de nombreux problèmes : approvisionnement en hypophysés de poissons, dont la qualité et la charge gonadotrope pouvaient être extrêmement variables selon les sources ; spécificité zoologique des facteurs gonadotropes hypophysaires (Breton *et al* 1972), qui ne sont pleinement efficaces que pour induire la ponte de la même espèce ou d'une espèce très voisine ; réaction immunitaire des géniteurs, traités plusieurs fois, entraînant une baisse d'efficacité du traitement ; absence de critères fiables pour déterminer la sensibilité des géniteurs en fonction de leur état de maturité. Les travaux réalisés à l'INRA ont

permis de purifier la première gonadotropine de truite (Breton *et al* 1976) grâce à un test de dosage biologique préalablement mis au point, fondé sur la possibilité de provoquer la maturation *in vitro* d'ovocytes de truite incubés dans leur follicule. Ils ont permis également de quantifier cette réponse (Jalabert *et al* 1974). Cette gonadotropine, dénommée ultérieurement gonadotropine « maturante » ou GtH2, étant alors ainsi disponible, les recherches ont pu se développer dans deux directions : d'une part l'étude de son mécanisme d'action sur le follicule ovarien, d'autre part l'étude des facteurs régulant sa sécrétion par l'hypophyse.

### **Application des travaux sur le mécanisme d'action de la GtH2 sur le follicule ovarien**

Ces travaux ont notamment permis de découvrir le rôle médiateur d'une hormone stéroïde, dérivé hydroxylé de la progestérone, la DHP (Fostier *et al* 1973). La DHP est naturellement sécrétée par les enveloppes folliculaires en réponse à l'augmentation de la sécrétion hypophysaire de GtH2, et atteint des concentrations importantes dans le sang des salmonidés en cours de maturation (Fostier *et al* 1981). Ce stéroïde est directement responsable de l'initiation de la maturation ovocytaire chez la truite (Jalabert 1976), ainsi que chez quelques autres espèces de poissons téléostéens, comme cela a été démontré par la suite (revue de Jalabert *et al* 1991). Il permet aussi la préparation du follicule à l'ovulation, ou maturation folliculaire, qui se manifeste par le décollement entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. Enfin, la DHP et son dérivé sulfaté semblent jouer un rôle dans la communication chimique lors du comportement sexuel chez certaines espèces, notamment les cyprinidés (Stacey *et al* 1989).

La connaissance du rôle de la DHP a permis de proposer un traitement d'induction de ponte associant une injection de sensibilisation par une très faible dose d'extrait hypophysaire. Ce traitement est sans effet apparent sur la maturation, il est économe en extraits hypophysaires et s'est révélé efficace chez les salmonidés, le brochet et la carpe commune. Dans cette dernière espèce, il présente l'intérêt d'être actif à température plus basse que l'hypophysation classique. Son efficacité dépend toutefois d'une appréciation rigoureuse du stade de maturité des animaux à traiter.

### **Applications des travaux sur l'étude des facteurs de régulation de la sécrétion hypophysaire**

Dès 1971 nous avons pu disposer d'une hormone gonadotrope purifiée à partir d'hypophyse de carpe, qui a conduit à la mise au point de son dosage par radio-immunologie. Un dosage équivalent a été développé pour la GtH2 de salmonidé après la purification de

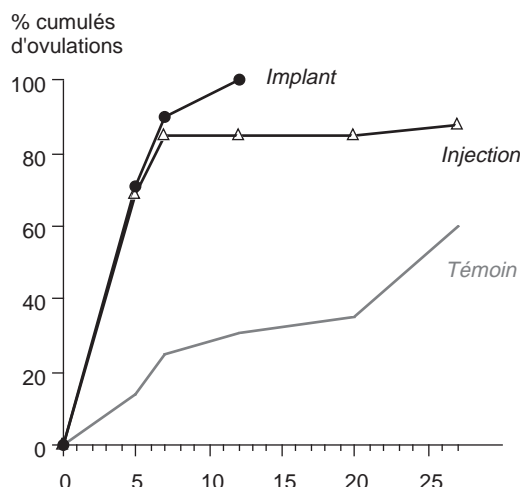
cette hormone chez la truite arc-en-ciel. Ces dosages ont été les seuls disponibles chez les poissons jusqu'en 1980 et ont permis de montrer que, chez les cyprinidés et les salmonidés, la maturation et l'ovulation sont précédées d'une augmentation importante des niveaux plasmatiques de cette hormone, correspondant au pic pré-ovulatoire de LH chez les mammifères. Chez les vertébrés supérieurs, il était clairement démontré que la sécrétion de LH par l'hypophyse était sous le contrôle d'une hormone hypothalamique, la gonadolibérine ou LHRH. Il s'agit d'un décapeptide dont la substitution des acides aminés en position 6 et 10 donne des molécules analogues présentant une superactivité par rapport au LHRH du fait de leur résistance à la dégradation par les endopeptidases. L'existence d'un facteur hypothalamique stimulant la sécrétion de gonadotropine *in vitro* et *in vivo* ainsi que l'action du LHRH de synthèse ont pu être démontrées chez la carpe, de même que l'absence de spécificité biologique entre espèces relativement éloignées. Bien que nos travaux aient montré son appartenance à la famille des gonadolibérines (GnRH), le manque d'équipement analytique ne nous a pas permis d'élucider sa structure qui a été déterminée chez le saumon par Sherwood *et al* (1983). Des travaux du laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA et d'équipes canadiennes ont montré que les analogues du LHRH présentent chez les poissons la même superactivité que chez les mammifères sur la stimulation de la sécrétion gonadotrope, et des analogues plus spécifiques du GnRH de saumon ont été synthétisés (pour revues Peter *et al* 1986, Breton *et al* 1993).

Chez les mammifères, l'utilisation des analogues agonistes du GnRH pour l'induction de l'ovulation s'est révélée décevante. En effet, leur occupation prolongée des récepteurs hypophysaires et leur action de désensibilisation de l'hypophyse résultent en une diminution de la réponse hypophysaire liée à la nature pulsatile de la sécrétion gonadotrope. Par ailleurs, des effets antagonistes secondaires apparaissent parfois à fortes doses. Au contraire, chez les poissons, nous avons pu montrer, *in vitro* comme *in vivo*, que les analogues du GnRH induisent des stimulations prolongées de la sécrétion hypophysaire, sans désensibilisation de l'hypophyse après traitements répétés, ce qui permet son utilisation pour l'induction de l'ovulation. Les traitements par des analogues de GnRH, (GnRHa), se sont effectivement révélés très actifs sur l'induction de la ponte dans de nombreuses espèces de poissons à des doses variant de 5 à 50 µg/kg. Chez certaines d'entre elles, l'efficacité des GnRHa a pu être améliorée en combinant leur action à celle de bloqueurs des récepteurs dopaminergiques. C'est le cas chez les cyprinidés, où la dopamine exerce un effet inhibiteur important sur l'action du GnRH sur l'hypophyse. L'administration conjointe d'un antagoniste dopaminergique permet de

lever cette inhibition (Sokolowska *et al* 1985).

Bien que les traitements d'induction par les GnRHa soient de plus en plus couramment employés, et devraient remplacer à terme les techniques d'hypophysation, plusieurs facteurs limitent encore leur utilisation. L'injection unique entraîne en effet une stimulation aiguë de la sécrétion gonadotrope dont l'efficacité reste limitée à quelques heures. Dans ces conditions, seuls les animaux ayant atteint un stade de maturité suffisant avant le traitement répondent par l'ovulation. Quelle que soit la nature du traitement, la plupart des interventions thérapeutiques chez les poissons nécessitent des captures et des anesthésies souvent répétées, opérations stressantes pouvant entraîner des désordres physiologiques comme le blocage définitif de l'ovulation, ainsi que des conséquences pathologiques. En outre, le nombre d'individus à traiter simultanément est généralement important. Nous avons donc cherché à pallier ces inconvénients par le développement de formes d'administration autorisant, par une action prolongée des GnRHa, l'induction et la synchronisation des ovulations quel que soit le stade de maturité initial (figure 1), et la mise au point de formules d'administration par voie orale sans capture des animaux. Un procédé de microencapsulation et une formulation de microcapsules contenant également des stimulateurs de l'absorption intestinale et des facteurs de protection contre la protéolyse ont été développés. Administrées par voie orale, les microcapsules permettent d'obtenir une stimulation prolongée de la sécrétion gonadotrope et d'induire l'ovulation avec la même efficacité et aux mêmes doses que des traitements aigus par injection ou sous forme retard en implants. Cette formulation (brevet en cours) sera valorisée dans le cadre d'un programme européen de valorisation des résultats de la recherche (VALUE) en relation avec un opérateur industriel. Au-delà de la

**Figure 1.** Pourcentages cumulés d'ovulation après administration d'un analogue de gonadolibérine de saumon à des truites arc-en-ciel : effets de différentes formes d'administration.



stricte application à l'induction hormonale de la ponte, elle devrait permettre l'administration d'autres composés simplifiant les modes d'intervention pour le traitement de cheptels importants de poissons.

## Perspectives

Quelle que soit la technique d'induction utilisée, la cause majeure d'échec reste la méconnaissance ou la mauvaise évaluation du stade de maturité des animaux à traiter. La principale difficulté est l'absence de critère fiable permettant d'évaluer l'état de développement des follicules ovariens. En effet les seuls critères actuellement utilisés, taille du follicule et/ou position de la vésicule germinative dans les ovocytes, présentent une grande variabilité. La recherche de marqueurs de maturité du follicule est donc une priorité.

Sur un plan plus général, la qualité des œufs dépend aussi beaucoup des conditions de déroulement de la vitellogénèse, au cours de laquelle sont accumulées les réserves de l'ovocyte, nécessaires au développement ultérieur de l'embryon. Les travaux sur la nature et le mode d'action des facteurs impliqués dans le contrôle du déroulement de la vitellogénèse constitue une autre priorité parmi les recherches poursuivies sur la reproduction des poissons.

## Monosexage et stérilisation par voie génétique

Des travaux anciens sur les Amphibiens (comme ceux de J. Rostand) avaient montré qu'il était possible de modifier le stock chromosomique des embryons à l'aide d'interventions simples sur les gamètes ou les œufs fécondés. Ils sont à l'origine des méthodes mises au point pour le contrôle du sexe et de la reproduction chez les poissons d'élevage. La figure 2 présente les diverses interventions possibles et les principaux groupes qu'elles permettent d'obtenir.

### La stérilisation par triploïdisation

La triploïdisation a très vite été tentée chez les poissons en vue de leur stérilisation, la présence d'un jeu chromosomique surnuméraire étant de nature à perturber le déroulement normal de la méiose chez les animaux triploïdes. Il en est ainsi non seulement chez les Amphibiens, mais aussi chez les plantes, où de nombreuses variétés sans pépin ont été obtenues selon ce principe. De plus, contrairement à ce qui est observé chez les Vertébrés supérieurs, la triploïdie semblait viable chez les Vertébrés inférieurs, en particulier les poissons : certaines espèces comprennent des populations naturellement triploïdes, et des individus adultes spontanément triploïdes ont été décrits à plusieurs reprises dans des populations normalement diploïdes.



**Figure 2.** Les étapes de la fécondation et du début du développement embryonnaire chez les poissons. Principales interventions possibles et leurs résultats.

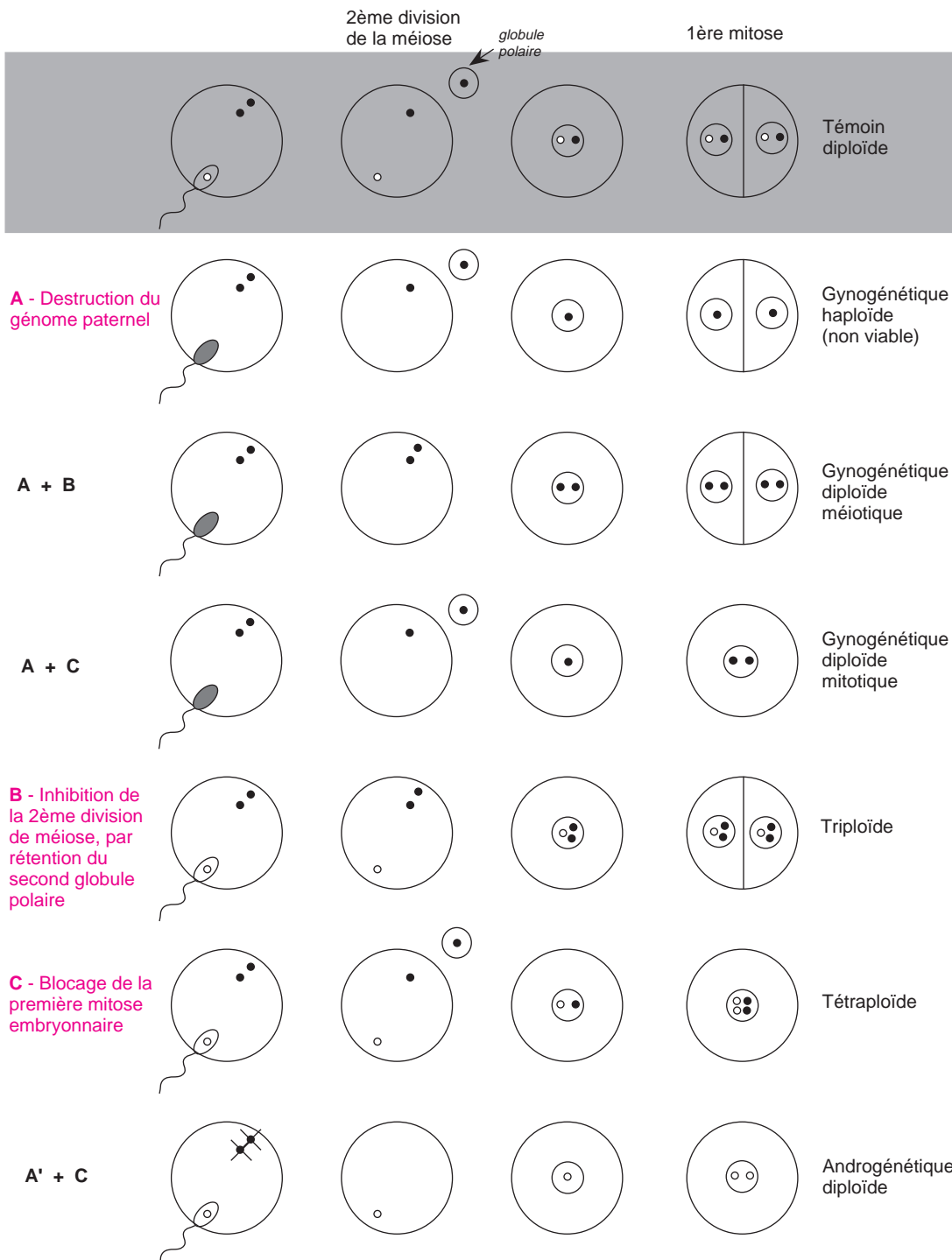
La plupart des espèces animales sont diploïdes : le stock génétique de chaque individu est constitué de  $n$  paires de chromosomes ( $n$  dépendant de l'espèce), l'un des exemplaires de chaque paire provenant de la mère et l'autre du père de l'individu. La méiose est une division cellulaire particulière qui permet la formation de gamètes, ovules ou spermatozoïdes, haploïdes (ne contenant plus qu'un seul exemplaire de chaque chromosome), de telle sorte que l'état diploïde se trouve restitué à la génération suivante.

Chez les poissons, comme chez beaucoup d'espèces, l'ovule pondu n'a pas achevé sa méiose : il contient encore deux stocks chromosomiques d'origine maternelle, et ce n'est qu'après la fécondation qu'un des deux stocks est éliminé sous la forme d'un petit corpuscule, le second globule polaire. L'œuf entame alors son développement par divisions cellulaires mitotiques permettant la constitution d'un organisme diploïde.

Les possibilités théoriques d'intervention sur cette séquence d'événements sont multiples :

- destruction du génome paternel (A) ou maternel (A')
- inhibition de la 2<sup>e</sup> division de méiose, par rétention du second globule polaire (B)
- blocage de la première mitose embryonnaire (C).

Une combinaison choisie de ces interventions permet l'obtention de groupes génétiquement originaux (animaux sans père - gynogénétiques - ou sans mère - androgénétiques -, animaux polyploïdes possédant plus de 2 stocks chromosomiques - triploïdes, tétraploïdes provenant d'une ou deux espèces parentales). Bien que tous les groupes présentés dans cette figure ne soient pas repris dans cet article, tous ont pu être obtenus et élevés jusqu'à l'âge adulte chez la truite. Presque tous ont un intérêt pour la recherche et l'expérimentation, et certains ont apporté de réels progrès dans les filières de production.



### **Les techniques d'induction de la triploïdie**

Les premiers essais d'induction systématique de la triploïdie chez les poissons ont été réalisés chez l'épinoche (Swarup 1959), par inhibition de l'expulsion du second globule polaire (voir figure 2) à l'aide de chocs froids ou chauds appliqués aux œufs fraîchement fécondés. Ont alors suivi des travaux sur la carpe et les poissons plats notamment, qui ont généralisé l'efficacité des traitements thermiques froids. Par contre, chez les salmonidés et en particulier la truite arc-en-ciel, les essais restaient infructueux, ni les chocs froids, ni les agents antiméiotiques chimiques testés ne donnant de bons résultats. Les premiers résultats positifs ont été obtenus à l'INRA, par Chourrout (1980) qui a montré que des chocs chauds (24 à 30 °C) induisaient de forts taux de triploïdie (jusqu'à 100 %), les survivants des lots traités restant très satisfaisantes.

L'intérêt des chocs chauds a depuis été validé chez tous les salmonidés et dans de nombreuses autres espèces (voir revues de Chourrout 1987 et Ihssen *et al* 1990). Cette technique, très peu coûteuse et facile à mettre en œuvre à grande échelle, a pu être diffusée très rapidement dans les élevages qui le souhaitaient. Dans un premier temps, le personnel du laboratoire de Génétique des Poissons et les ingénieurs du Groupe d'Etudes et de Diffusion des Innovations Technologiques en Hydrobiologie (GEDITH), structure dépendant du Département d'Hydrobiologie et Faune Sauvage, ont assuré le transfert de la technique à la profession, en accompagnant les premiers essais à grande échelle et en ajustant les paramètres des traitements thermiques (moment d'application, durée, niveau) en fonction des résultats observés et des contraintes rencontrées. Depuis, la profession s'est structurée et le relais a été pris par le SYSAAF (Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français) qui joue maintenant le rôle d'institut technique dans ce domaine.

Le laboratoire de Génétique des Poissons de l'INRA a également montré que les chocs de pression (à 500 ou 600 atmosphères pendant quelques minutes) permettent d'induire très efficacement la triploïdie chez la truite arc-en-ciel. Il est possible que ces traitements finissent par supplanter les chocs thermiques dans la pratique, car ils sembleraient fournir des rendements plus réguliers. A court terme néanmoins, l'achat de l'appareil à pression reste un investissement dissuasif pour beaucoup d'entreprises.

Il existe une autre voie pour produire des individus triploïdes, qui permettrait de s'affranchir des traitements d'induction : c'est le croisement direct entre un parent tétraploïde (voir figure 2) et un parent diploïde normal. Notre laboratoire est le premier à avoir démontré la faisabilité de cette voie, mais aussi à en avoir souligné les limites, parmi lesquelles une triploïdisation élevée mais non

totale des descendants (95 % seulement, ce qui est équivalent aux rendements obtenus par induction directe) et la difficulté d'entretien « en routine » d'un stock de géniteurs tétraploïdes. Cette voie n'apparaît donc pas compétitive dans des espèces comme les salmonidés, chez qui les techniques de reproduction artificielle (recueil et manipulation des gamètes, fécondation et incubation *in vitro*) sont suffisamment maîtrisées pour permettre une application facile des traitements d'induction directe de la triploïdie, mais pourrait être avantageuse dans d'autres cas.

### **Les performances des triploïdes en élevage**

Le laboratoire de Génétique des Poissons a réalisé d'importants travaux sur l'intérêt zootechnique des triploïdes avant d'en proposer l'usage dans les élevages salmonicoles (Quillet 1986, Quillet *et al* 1988).

Passés les stades précoces, au cours desquels la triploïdie se traduit par une mortalité plus élevée (en partie à cause des effets négatifs des traitements d'induction), on observe assez généralement, chez les triploïdes, une survie équivalente et une croissance égale ou légèrement inférieure (10 à 20 % pour le poids immature) à celles des animaux témoins diploïdes. Des conditions de milieu plus sévères (oxygène, température, salinité...) sont cependant susceptibles de creuser ces écarts, pour la survie notamment : ce point est important à souligner, car il signifie que les triploïdes n'ont d'intérêt potentiel réel que dans une filière où les conditions d'élevage sont bien maîtrisées.

Pendant la période de maturation sexuelle, les triploïdes sont effectivement stériles, conformément aux attentes, dans le sens où ils sont inaptes à produire des gamètes viables. Mais cette stérilité se traduit différemment chez les mâles et les femelles. Bien que génétiquement stériles, les mâles triploïdes présentent en effet un développement plus ou moins important du testicule. Les caractères sexuels secondaires se développent également avec une intensité variable, mais suffisante pour conférer à ces mâles triploïdes un comportement et une physiologie de mâles matures avec le cortège des problèmes décrits plus haut (mortalité, chute de croissance, baisse de la qualité de la chair). Par contre, la stérilité des femelles est complète et définitive. La croissance ovarienne est totalement inhibée : on voit ainsi des ovaires de moins de 1 g sur des animaux de plus d'un kilo (figure 3). Ces femelles triploïdes se comportent donc comme des poissons « éternellement » immatures : elles poursuivent leur croissance, sans la baisse de qualité organoleptique liée à la maturation sexuelle.

On voit donc clairement que l'avantage essentiel de la triploïdisation, qui est de fournir des produits de caractéristiques zootechniques et organoleptiques stables sur de longues périodes d'élevage, n'est complet que

dans le cas où l'on peut disposer de cheptels monosexes femelle. L'obtention de tels cheptels a donc motivé un important effort de recherche décrit plus loin.

### Le cas des hybrides triploïdes

Un autre intérêt de la triploïdie réside dans le fait qu'elle permet d'obtenir des hybrides interspécifiques viables, alors que l'hybride diploïde correspondant ne l'est pas : ce résultat a été démontré simultanément par notre laboratoire et une équipe américaine travaillant aussi sur les salmonidés. On peut ainsi produire avec des rendements acceptables des hybrides triploïdes entre la truite arc-en-ciel et des espèces résistantes à plusieurs viroses très redoutées. Ces hybrides héritent de leur père la résistance à la maladie, ont le plus souvent une stérilité équivalente à celle des triploïdes en espèce pure, et des performances zootechniques comprises entre celles des deux espèces parentales. Leur intérêt appliqué dépend donc beaucoup des conditions locales, notamment de l'occurrence des pathogènes en question.

### La production de populations monosexes femelles

Dans le contexte du contrôle de la reproduction, les femelles présentent deux avantages particuliers sur les mâles :

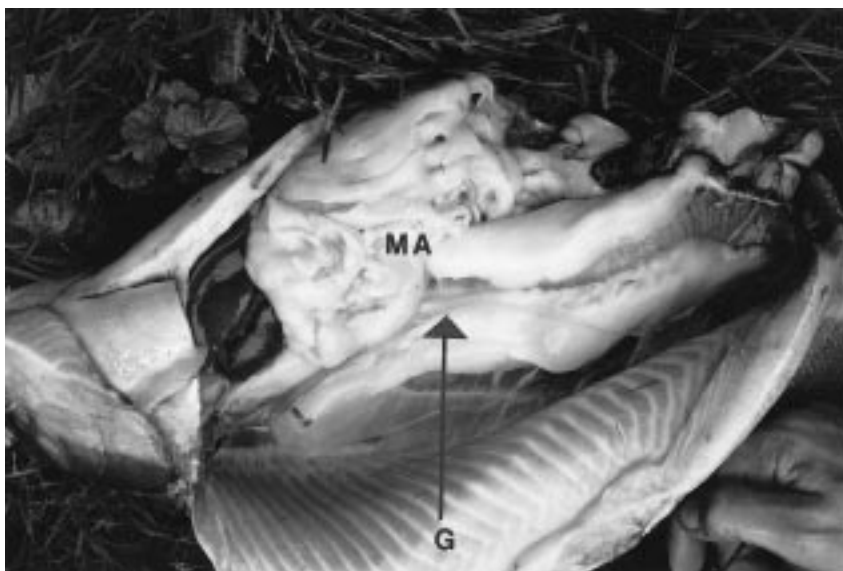
- *leur puberté est plus tardive*. Elles se reproduisent pour la première fois à deux ans voire trois, alors qu'il n'est pas rare d'observer des mâles matures dès la première année, surtout lorsque la croissance est rapide. De ce fait, même lorsque le produit recherché est un animal « portion », la maturation des mâles est préjudiciable à la gestion des élevages ;

- *leur stérilité est complète lorsqu'elles sont triploïdisées* : les cheptels monosexes triploïdes sont le seul moyen de s'affranchir définitivement des problèmes liés à la reproduction. C'est pourquoi les cheptels monosexes femelles ont été recherchés en salmoniculture.

### Le principe d'obtention des populations monosexes

La figure 4 présente le principe d'obtention de populations monosexes femelle dans une espèce comme la truite arc-en-ciel, où le déterminisme génétique du sexe est de type mammifère (femelle XX, mâle XY). Dans ce cas, c'est le spermatozoïde (porteur du chromosome X ou Y) qui détermine le sexe futur de l'embryon. L'objectif est donc d'éliminer tout apport génétique paternel et de produire des embryons uniquement à partir du matériel génétique de la mère : il faut donc faire une gynogénèse (opération A + B de la figure 2). La destruction du génome paternel est obtenue par divers traitements du sperme : mutagènes chimiques, rayons gamma ou ultraviolets, la meilleure efficacité de ces derniers ayant été démontrée au laboratoire

**Figure 3.** Inhibition de la croissance ovarienne chez les femelles triploïdes. Alors que la masse ovarienne se développe dans des proportions très importantes chez les femelles diploïdes (O, photo supérieure), la gonade reste limitée à un simple filament chez les femelles triploïdes (G, photo inférieure). Par contre, on notera le développement abondant des masses adipeuses périviscérales (MA). Clichés E. Quillet.

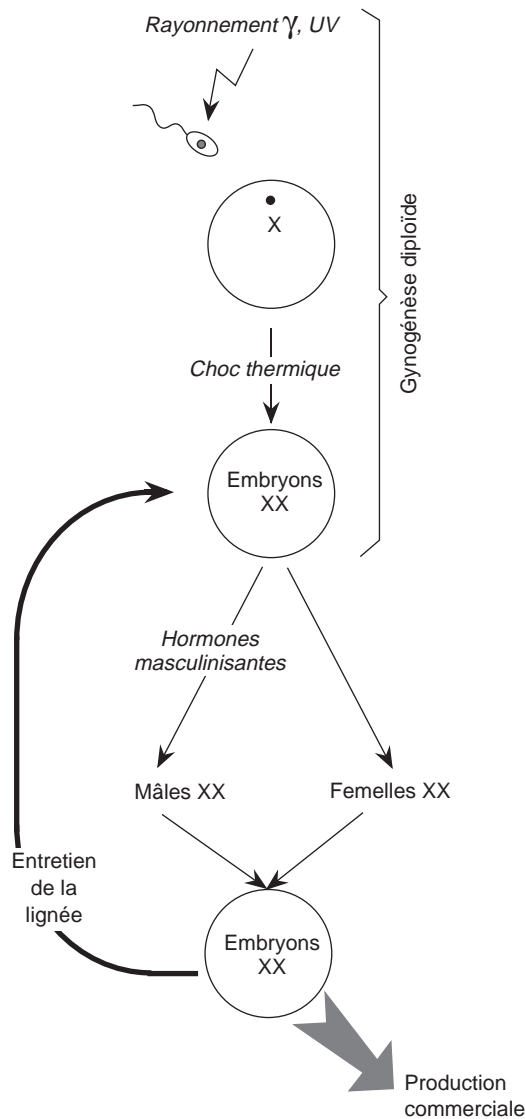


(Chourrou 1987). Le doublement du génome maternel est ensuite obtenu par inhibition de l'expulsion du second globule polaire, avec les mêmes traitements que ceux qui sont utilisés pour induire la triploïdie. Les alevins gynogénétiques qui se développent sont donc tous femelles (XX). Cependant, à la fois parce qu'ils sont relativement délicats à produire (l'efficacité de l'irradiation doit notamment être rigoureusement contrôlée) et partiellement consanguins, donc peu performants en élevage, ces alevins monosexes ne sont pas proposés directement pour l'élevage.

Ils reçoivent, au cours des premières semaines d'alimentation, un traitement hormonal qui oriente la différenciation sexuelle vers le développement de testicules malgré



**Figure 4.** Principe du sexage génétique utilisant la gynogénèse. Le système repose sur la création par gynogénèse d'un petit nombre de « néomâles » (femelles génétiques inversées) qui, croisés avec des femelles normales, fournissent une descendance exclusivement femelle. Les embryons XX destinés à la production commerciale peuvent être triploïdisés par application d'un traitement complémentaire juste après la fécondation.



un sexe génétique femelle. Les « néomâles » ainsi produits, croisés avec des femelles ordinaires, fournissent une descendance exclusivement femelle, qui est triploïdisée par traitement thermique.

Ce schéma est généralisable à la plupart des salmonidés et à d'autres espèces de poissons comme la carpe. Dans d'autres cas, c'est le mâle qui est homogamétique (ZZ) et la femelle hétérogamétique (ZW). Mais ces modèles simples sont insuffisants pour expliquer les sex-ratio très variables observés chez d'autres espèces. Il faut dans ce cas faire appel à des mécanismes complexes, faisant intervenir des gènes portés par d'autres chro-

mosomes que les chromosomes sexuels ou un déterminisme environnemental du sexe.

### Les modalités de mise en pratique

Le schéma décrit ci-dessus présente plusieurs avantages :

- l'opération de gynogénèse n'est nécessaire que dans la phase initiale. La deuxième génération de néomâles est en effet facilement entretenue par traitement hormonal d'une petite fraction des animaux monosexes destinés à l'élevage. Le système est donc facilement « décentralisable » dans les entreprises. En outre, les élevages qui ne veulent (ou ne peuvent) pas entretenir un stock de néomâles peuvent recevoir directement de la laitance de néomâles ;

- il suffit d'un petit nombre de néomâles pour produire un grand nombre d'œufs. L'inversion sexuelle est en effet obtenue par incorporation d'hormones stéroïdes dans l'aliment. L'hormone d'usage courant est la méthyltestostérone, une hormone de synthèse dont l'usage en pisciculture fait l'objet en France d'une mesure dérogatoire depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1993. Les animaux qui l'ont reçue doivent être détruits après avoir été utilisés comme reproducteurs. D'où l'intérêt d'en limiter le nombre.

Chez la truite arc-en-ciel, le système a fait ses preuves et de nombreuses entreprises sont maintenant autonomes pour la production de cheptels monosexes. Les laboratoires de l'INRA de Génétique des Poissons (Jouy-en-Josas) et de Physiologie des Poissons (Rennes) ont contribué à la définition de traitements hormonaux (dose, durée) qui permettent d'obtenir des taux très élevés de mâles, dont la plupart émettent spontanément de la laitance par pression abdominale.

Les espèces (salmonidés ou autres) candidates à la mise en place d'un tel schéma ne manquent pas. Le système est déjà transposé chez la truite commune, mais les néomâles obtenus présentent des anomalies du canal déférent qui bloquent l'émission de laitance. Le sacrifice des animaux est alors indispensable pour pratiquer la fécondation. D'autres voies d'inversion (utilisation de stéroïdes naturels, agents anti-œstrogènes) sont maintenant explorées par le laboratoire de Physiologie de Poissons et pourraient permettre de lever les difficultés pratiques sur cette espèce particulière, puis faciliter l'optimisation des traitements sur d'autres espèces.

### Les perspectives

Nous avons maintenant un recul suffisant pour assurer que les techniques génétiques de contrôle du sexe et de la reproduction sont profitables aux filières aquacoles à la fois comme outil de gestion et de diversification. Le monosexage femelle est de plus en plus répandu dans les trutticultures françaises ; la production de « grosses » truites (quelques milliers de tonnes) repose principalement sur des stocks triploïdes, et c'est aussi grâce à la



combinaison entre un programme de sélection efficace pour la croissance mis au point au laboratoire de Génétique des Poissons et l'application de ces techniques de monosexage/triploïdisation que l'élevage en mer de la truite commune émerge progressivement. Essentiellement limitées à la salmoniculture jusqu'à présent, ces techniques y ont apporté un bénéfice qui légitime les demandes de transposition aux autres filières (poissons marins notamment), même si leur apport effectif devra être réévalué dans chaque cas particulier.

On peut identifier deux grands volets justifiant des investigations complémentaires.

**Dans le domaine des techniques d'induction**, nous avons vu que des travaux d'ajustement complémentaires sont en cours de réalisation à la fois pour l'induction de la triploïdie (amélioration et régularisation des rendements) et pour l'inversion sexuelle (obtention de néomâles fonctionnels aisément utilisables), qu'il s'agisse de la mise au point pour des espèces nouvelles ou de l'optimisation de techniques déjà fonctionnelles chez les salmonidés.

Un deuxième axe de recherches concerne **la poursuite de la caractérisation des produits triploïdes** pour d'autres critères que la croissance ou la maturation sexuelle, notamment, les critères de qualité des carcasses et d'aptitude à la transformation, qui sont appelés à prendre une importance croissante compte tenu des modes de consommation.

Enfin, il est aussi primordial d'analyser les modalités d'introduction de la triploïdie dans les schémas de sélection qui sont nécessairement pratiqués en phase diploïde. L'application d'une opération de triploïdisation « terminale » permet-elle de conserver le progrès génétique obtenu en phase diploïde ? Les premiers résultats obtenus par les équipes de l'INRA sont de ce point de vue encourageants.

## Conclusion

Chez les poissons, espèces sur lesquelles nous ne possédions que peu de données par rapport à d'autres espèces d'intérêt agronomique, dans ces domaines, ainsi que pour l'étude d'autres fonctions physiologiques ou la mise en place de schémas de sélection génétique, l'une des difficultés majeure pour les chercheurs a été le développement de méthodologies et outils spécifiquement adaptés à ces espèces, le recours à ceux utilisés dans d'autres classes de vertébrés s'étant révélés la plupart du temps inutilisables.

Les résultats présentés dans cet article fournissent deux exemples de la démarche à long terme mise en place et poursuivie actuellement sur ces thèmes. Ils montrent la spécificité du modèle poisson et ont permis de proposer des solutions souvent originales qui, au-delà de leur application directe en élevage, font des poissons des modèles biologiques originaux par rapport aux vertébrés supérieurs.

## Références bibliographiques

- Baroiller J.F., Jalabert B., 1989. Contribution of research on reproductive physiology of the culture of Tilapias. *Aquat. Living Resources*, 2, 105-116.
- Breton B., Billard R., Jalabert B., 1972. Spécificité d'action et relations immunologiques des hormones gonadotropes de quelques poissons téléostéens. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 13, 347-362.
- Breton B., Jalabert B., Reinaud P., 1976. Purification of gonadotropin from rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) pituitary glands. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 16, 25-31.
- Breton B., Mikolajczyk T., Popek W., 1993. The neuroendocrine control of the gonadotropin (GTH2) secretion in teleost fish. *American Geophysical Union*. In : B. Lalhou et P. Vitello (eds), *Aquaculture : fundamental and applied research*, 199-215.
- Chourrou D., 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) *Reprod. Nutr. Develop.*, 20, 727-733.
- Chourrou D., 1987. Genetic manipulations in fish : review of methods. *Proc. World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture*. Bordeaux 27-30 May, 1986. Berlin, Vol. II, 111-126.
- Fostier A., Breton B., Jalabert B., Marcuzzi O., 1981. Evolution des niveaux plasmatiques de la gonadotropine glycoprotéique et de la 17 $\alpha$ -hydroxy,20 $\beta$ -dihydroprogesterone au cours de la maturation et de l'ovulation chez la truite arc-en-ciel, *Salmo gairdneri*. *C.R. Acad. Sci.*, 293, 817-820.
- Fostier A., Jalabert B., Terqui M., 1973. Action prédominante d'un dérivé hydroxylé de la progestérone sur la maturation *in vitro* des ovocytes de la Truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri*. *C.R. Acad. Sci.*, 292, 777-780.
- Ihssen P. E., McKay L. R., McMillan I., Phillips R. B., 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes : cytogenetic and fisheries applications. *Transactions of the American Fisheries Society*, 119, 698-717.
- Jalabert B., 1976. *In vitro* oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox lucius*), and goldfish (*Carassius auratus*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 33, 974-988.
- Jalabert B., Breton B., Billard R., 1974. Dosage biologique des hormones gonadotropes de poissons par le test de maturation *in vitro* des ovocytes de truite. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 14, 217-228.

- Jalabert B., Fostier A., Breton B., Weil C., 1991. Oocyte maturation in vertebrates. In : P.K.T. Pang et M.P. Schreibman (eds), Vertebrate endocrinology : fundamental and biomedical implication, 23-90. Academic Press, New York.
- Maisse G., Breton B., 1996. Contrôle photopériodique de la saison de reproduction chez les salmonidés. INRA Prod. Anim., 9, 71-77.
- Peter R.E., Chang J.P., Nahorniak K., Omeljaniuk R.J., Sokolowska M., Shih S.H., Billard R., 1986. Interactions of catecholamines and GnRH regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. Recent Progress in Hormone Research, 42, 513-546.
- Quillet E., 1986. Contribution à l'étude de la triploïdie induite chez les salmonidés : conséquences sur les caractéristiques zootechniques. Thèse de Docteur-Ingénieur, INA PG, 126 pp.
- Quillet E., Chevassus B., Blanc J.M., Krieg F., Chourrout D., 1988. Performances of auto and allo triploids in salmonids. 1 - Survival and growth in freshwater farming. Aquat. Liv. Resources, 1, 29-43.
- Sherwood N., Eiden L., Brownstein M., Spiess J., Rivier J., Wale W., 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing-hormone. Neuropeptides, 6, 205-214.
- Sokolowska M., Peter R.E., Nahorniak C.S., 1985. The effects of different doses of pimozone and [D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-N ethylamide]-LHRH (LHRH-A) on gonadotropin release and ovulation in female goldfish. Can. J. Zool., 63, 1252-1256.
- Stacey N. E., Sorensen P. W., Van Der Kraak G.J., Dulka, 1989. Direct evidence that 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a goldfish primer pheromone : preovulatory release is closely associated with male endocrine responses. Gen. Comp. Endocrinol., 75, 62-70.
- Swarup M., 1959. Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus*. J. Genet., 56, 129-142.