

**DÉTERMINISME DU SEXE
CHEZ *TILAPIA MACROCHIR* ET *TILAPIA NILOTICA* :
ACTION DE LA MÉTHYLTESTOSTÉRONÉ
DANS L'ALIMENTATION DES ALEVINS
SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE ;
PROPORTION DES SEXES
DANS LA DESCENDANCE DES MÂLES « INVERSÉS »**

B. JALABERT, J. MOREAU*, P. PLANQUETTE** et R. BILLARD

*Laboratoire de Physiologie des Poissons,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas*

** École nationale supérieure agronomique,
B.P. 175, Tananarive (République Malgache)*

*** Centre technique forestier tropical,
Station de Recherches piscicoles de Bouaké,
République de Côte-d'Ivoire*

RÉSUMÉ

L'administration de méthyltestostérone à raison de 40 µg par gramme d'aliment à des alevins de *T. nilotica* et *T. macrochir* pendant deux mois à partir de la fin de l'incubation buccale par la mère, a conduit aux résultats suivants :

— Chez *T. nilotica*, nous avons obtenu l'induction complète et fonctionnelle du sexe mâle chez tous les animaux traités. Certains d'entre eux ont fourni une descendance entièrement femelle, révélant un génotype sexuel femelle, ainsi qu'une homogamétie femelle.

— Chez *T. macrochir*, nous avons observé l'induction de la papille génitale de type mâle, et des modifications anormales dans la morphologie de la tête ; à une exception près, tous les animaux expérimentaux étaient stériles, avec disparition complète de la lignée germinale chez la plupart d'entre eux.

INTRODUCTION

Les hybrides issus du croisement *Tilapia macrochir* mâle × *Tilapia nilotica* femelle sont tous mâles alors que les hybrides issus du croisement réciproque présentent une sex-ratio de 3 mâles/1 femelle (BARD, 1960 ; LESSENT, 1966). L'analyse

de la sex-ratio dans tous les croisements des hybrides F_1 par les espèces parentes laisse subsister un doute quant à la réalité de l'hypothèse d'une simple digamétie sexuelle chez les deux espèces, avec homogamétie mâle chez *Tilapia macrochir* et homogamétie femelle chez *Tilapia nilotica* (JALABERT, KAMMACHER, LESSENT, 1971).

Cette indétermination nous a conduit à essayer une autre voie d'approche ; en effet, les travaux de YAMAMOTO (1953-1958) sur *Oryzias latipes*, de DZWILLO (1962) sur *Lebistes reticulatus* et de YAMAMOTO et KAJISHIMA (1969) sur *Carassius auratus* ont démontré la possibilité d'orienter le sexe des alevins indifférenciés de ces espèces dans le sens mâle ou femelle grâce à un apport alimentaire exogène de stéroïdes sexuels et d'obtenir ainsi des adultes fertiles, dont 50 p. 100 présentent un phénotype sexuel inverse du génotype. L'étude de la descendance de ces animaux « inversés » permet de préciser le système de détermination du sexe en jeu dans l'espèce considérée. Par cette méthode en utilisant l'action de la méthyltestostérone, CLEMENS et INSLEE (1968) ont produit des mâles « inversés » et mis en évidence une homogamétie femelle chez *Tilapia mossambica*.

A partir des données de CLEMENS et INSLEE nous avons essayé d'appliquer le même procédé pour résoudre le problème posé par la détermination du sexe chez *Tilapia nilotica* et *Tilapia macrochir*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'expérimentation a été réalisée à la Station de pisciculture du Centre technique forestier tropical de Bouaké (Côte d'Ivoire) sur *Tilapia macrochir* et sur une souche de *Tilapia nilotica* originaire de la vallée du Nil, comme dans nos essais antérieurs (JALABERT, KAMMACHER, LESSENT, 1971). Un essaim d'alevins de chaque espèce a été isolé simultanément, au moment de la libération par la mère, à la fin de l'incubation buccale (vésicule vitelline résorbée), et réparti dans deux aquariums de 25 litres en deux lots de 100 alevins environ. Les lots expérimentaux ont été nourris *ad libitum* jusqu'à l'âge de 2 mois avec un aliment composé de farine de poisson et d'un mélange de son et de farine de riz, dans lequel a été incorporée de la méthyltestostérone à la dose de 40 µg par gramme. Cette incorporation a été réalisée par humectation de l'aliment avec une solution de méthyltestostérone dans l'éthanol, mélange, puis séchage.

Les lots témoins ont été alimentés dans les mêmes conditions avec un aliment traité de la même façon, mais exempt de méthyltestostérone.

La température de l'eau a suivi les variations quotidiennes de la température ambiante du laboratoire, entre 20°C et 30°C. A l'âge de 2 mois environ, les lots témoins ont été sacrifiés pour un sexage de contrôle par examen de la gonade au microscope après écrasement entre lame et lamelle. Les lots expérimentaux ont été placés dans 2 étangs de 0,5 are recevant un apport quotidien de graines de coton broyées.

A l'âge de 6 mois, le contrôle ayant montré que tous les animaux expérimentaux des deux espèces présentaient une papille génitale de type mâle, nous avons entrepris de vérifier s'ils étaient fertiles et d'étudier les caractéristiques de leur descendance éventuelle :

— Pour *T. nilotica*, 8 de ces « mâles expérimentaux » ont été placés individuellement avec une femelle normale dans des étangs de 0,5 are.

— Pour *T. macrochir*, du fait de la difficulté d'obtenir dans cette espèce une reproduction rapide avec un couple choisi *a priori* 10 « mâles expérimentaux » ont été placés individuellement avec 3 femelles normales dans des étangs de 0,5 are.

Après 3 mois les étangs ont été vidés et un échantillon des alevins éventuellement produits a été transféré en étangs de 4 ares pour élevage et sexage à l'âge de 4 à 5 mois. Les « mâles expérimentaux » ont été alors sacrifiés pour observations histologiques des gonades.

Pour les observations histologiques, les gonades ont été fixées au Bouin Hollande, incluses à la paraffine (60°C) coupées à 7 µ et colorées au Rouge Solide, Orangé G, Bleu d'Aniline, ou à l'Azan.

Enfin, une étude séparée a été entreprise afin de vérifier la proportion naturelle des sexes

TABLEAU I
Proportions des sexes observées dans la descendance de 9 couples témoins de Tilapia nilotica des souches Nil et Volta sur plusieurs portées successives âgées de 5 à 8 mois
 L'astérisque (*) signale les valeurs significativement différentes de la répartition théorique 0,5-0,5 par le test χ^2

Couple	Souche	1 ^{re} portée		2 ^e portée		3 ^e portée		Portées cumulées	
		total	proportions ♂ ♀	total	proportions ♂ ♀	total	proportions ♂ ♀	total	proportions ♂ ♀
1	Nil	468	0,632 — 0,368*	409	0,574 — 0,426*	—	—	877	0,605 — 0,395*
2	Nil	102	0,559 — 0,441	378	0,595 — 0,405*	260	0,692 — 0,308*	740	0,624 — 0,376*
3	Nil	1 070	0,662 — 0,338*	549	0,685 — 0,315*	478	0,651 — 0,349*	2 097	0,665 — 0,335*
6	Nil	688	0,529 — 0,471	48	0,447 — 0,583	532	0,541 — 0,459	1 268	0,530 — 0,470*
5	Volta	120	0,542 — 0,458	281	0,456 — 0,544	419	0,453 — 0,547	820	0,467 — 0,533
6	Volta	437	0,545 — 0,455	326	0,515 — 0,485	—	—	763	0,532 — 0,468
7	Volta	489	0,573 — 0,427*	562	0,654 — 0,346*	—	—	1 051	0,617 — 0,383*
8	Volta	792	0,523 — 0,477	570	0,530 — 0,470	—	—	1 362	0,526 — 0,474
9	Volta	650	0,521 — 0,479	39	0,655 — 0,345	443	0,465 — 0,535	1 132	0,498 — 0,502

dans les portées successives de couples témoins de *Tilapia macrochir* et de *Tilapia nilotica*. Pour cette dernière espèce, deux souches ont été comparées, l'une en provenance du Nil, l'autre de la Volta.

Tous les sexages effectués au-delà d'un âge de 4 mois ont été effectués d'après la conformation de la papille génitale, après avoir vérifié la parfaite corrélation entre ce critère et la nature des gonades.

RÉSULTATS

1. — Sex-ratio de la progéniture des couples témoins des deux espèces (tabl. 1 et 2)

Parmi les 4 couples de *Tilapia nilotica* (souche Nil) témoins, 3 ont donné des portées successives dont la sex-ratio à l'âge de 5 à 8 mois différait significativement de 1 mâle/1 femelle avec un excédent de mâles. Parmi les 5 couples témoins de la souche Volta, un seul a donné 2 portées successives (couple n° 7) avec un excès significatif de mâles.

Chez *Tilapia macrochir*, les 5 couples témoins ont donné des portées de sex-ratio équilibrée.

TABLEAU 2

Proportions des sexes observées dans la descendance de 5 couples témoins de Tilapia macrochir
Aucune valeur ne diffère significativement des proportions théoriques 0,5-0,5

Couple	Total	Proportions	
		♂	♀
1	250	0,507	0,493
2	224	0,53	0,47
3	88	0,477	0,523
4	200	0,51	0,49
5	152	0,54	0,46

2. — Effet du traitement sur le phénotype sexuel externe

Alors que la sex-ratio déterminée à 2 mois chez les témoins par observation microscopique de la gonade était de l'ordre de 1 mâle/1 femelle dans ces échantillons des deux espèces (tabl. 3) le phénotype sexuel externe caractérisé par l'aspect de la papille génitale était nettement de type mâle chez tous les animaux expérimentaux âgés de 6 mois.

En outre, tous les *T. macrochir* mâles traités présentaient une déformation anormale caractéristique de la tête, plus ou moins prononcée suivant les individus, avec hypertrophie de la machoire inférieure (fig. 1 b et c). Une telle malformation n'a jamais été observée naturellement chez les individus normaux mâles et femelles de l'espèce *T. macrochir* (fig. 1 a).

Par contre, les mâles *T. nilotica* expérimentaux ne présentaient aucune différence morphologique par rapport aux animaux normaux de l'espèce.

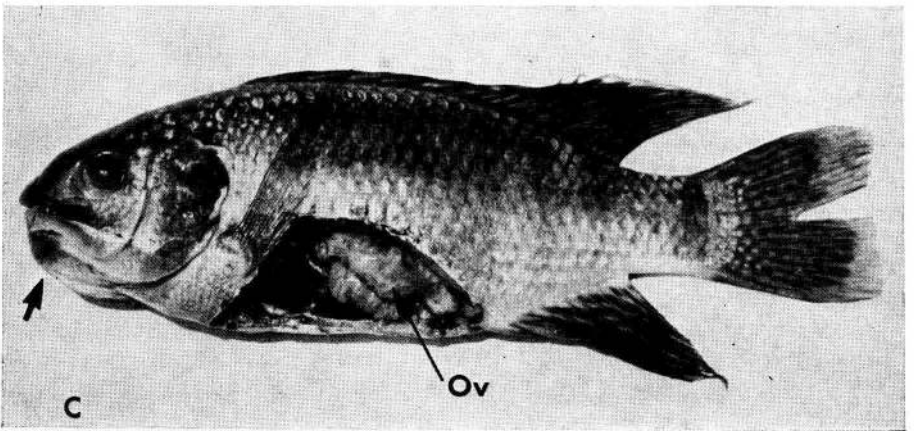
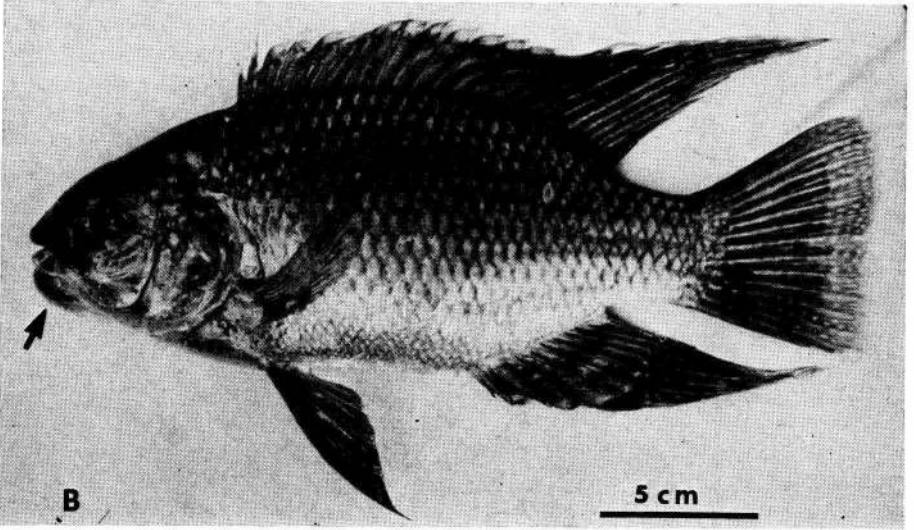
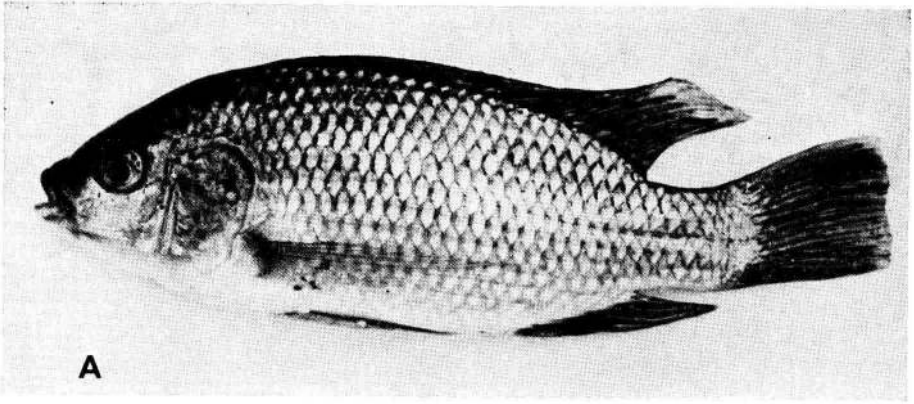


FIG. 1

A : Individu mâle normal *Tilapia macrochir* ;

B et C : Deux « mâles expérimentaux » de *T. macrochir* ayant subi le traitement par la méthyltestostérone, présentant de multiples déformations de la tête, et particulièrement de la mâchoire inférieure (flèche).

L'animal de la figure 1 C pourvu d'une papille génitale de type mâle, présente en fait des ovaires hypertrophiés (OV).

TABLEAU 3
Schéma expérimental

Lot : espèce/traitement	Nombre d'alevins au début du traitement	Alevins survivants à 2 mois			Alevins survivants à 6 mois		
		total	♂	♀	total	Phénotype sexuel externe (papille génitale)	
						♂	♀
<i>T. nilotica</i> méthyltestos- térone.....	100	57	→		53	53	0
<i>T. nilotica</i> témoin	100	68	38	30	—	—	—
<i>T. macrochir</i> méthyltes- tostérone	100	71	→		19	19	0
<i>T. macrochir</i> témoin ...	100	76	40	36	—	—	—

3. — Caractéristiques de la descendance

— *T. nilotica*.

Tous les mâles *nilotica* expérimentaux testés sur descendance se sont montrés fertiles (tabl. 4). Dans 4 cas sur 8, la descendance s'est avérée entièrement femelle. Dans 2 cas elle comportait environ 80 p. 100 de femelles. Dans un seul cas (n° 1) la proportion des sexes n'était pas significativement différente de 1/1.

TABLEAU 4

Proportions des sexes dans les portées
de 8 couples ♂ *T. nilotica* méthyltestostérone × ♀ *T. nilotica* normale
L'astérisque désigne les proportions significativement différentes de 0,5-0,5

Couple n°	Nombre d'alevins sexés après élevage (4 à 5 mois)	Proportions des sexes	
		♂	♀
1	547	0,542	— 0,458
2	316	0,348	— 0,652*
3	242	0	— 1*
4	485	0	— 1*
5	390	0,182	— 0,818*
6	424	0,219	— 0,782*
7	440	0	— 1*
8	465	0	— 1*

— *T. macrochir*.

Sur les 10 mâles *macrochir* expérimentaux mis à l'essai, 1 seul s'est reproduit, et a eu une descendance de 350 alevins dont 50,7 p. 100 de mâles et 49,3 p. 100

de femelles. Cette sex-ratio ne diffère pas significativement de la distribution théorique 1/1.

4. — Observation des gonades

— *T. nilotica*.

L'étude de la gonade d'un *T. nilotica* expérimental tué accidentellement à l'âge de 4 mois a permis d'observer (fig. 2) un testicule normal avec présence de spermatozoïdes dans le canal déférent, tout comme des mâles normaux, et en outre, la subsistance de quelques ovocytes en cours de prévitellogenèse, ce qui n'a été observé chez aucun mâle *nilotica* normal du même âge.

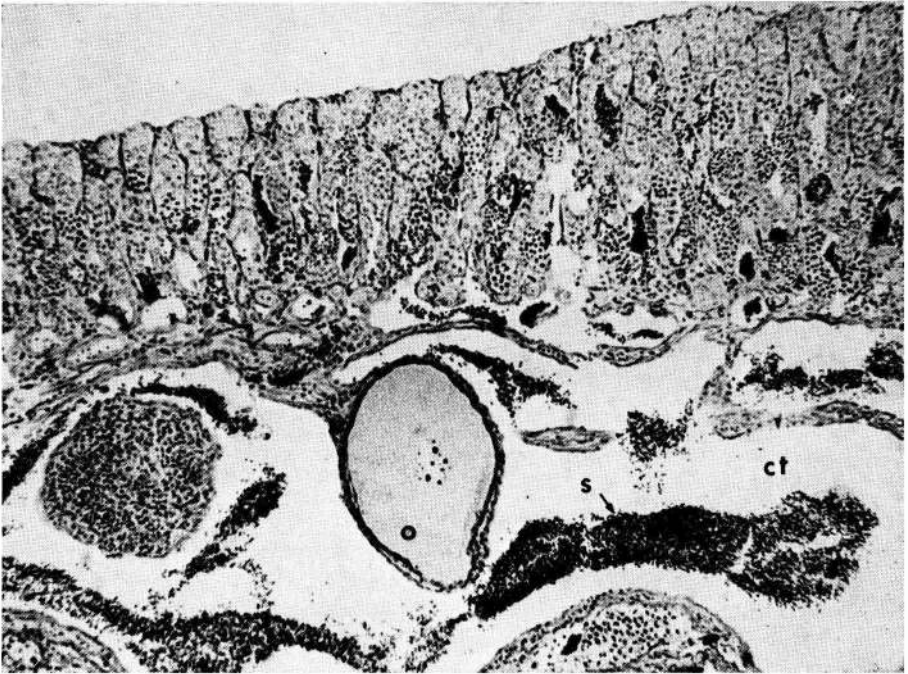


FIG. 2. — Coupe longitudinale du testicule d'un « mâle expérimental » juvénile *T. nilotica* montrant une structure histologique normale à l'exception de quelques ovocytes résiduels en prévitellogenèse (O), dans la région du canal testiculatire (c.t.) s : spermatozoïdes ($\times 100$).

Par contre, le testicule des mâles expérimentaux adultes (âgés de 1 an) n'a montré aucune différence histologique par rapport aux mâles normaux de l'espèce.

— *T. macrochir*.

Le seul *T. macrochir* mâle expérimental ayant fourni une descendance présentait une structure testiculaire analogue à celle des mâles normaux.

L'examen histologique des gonades des 9 « *T. macrochir* expérimentaux » qui n'ont pas fourni de descendance a révélé :

— dans 2 cas, l'existence d'ovaires hypertrophiés par la non-émission des ovocytes mûrs, du fait de la conformation mâle de la papille génitale.

— dans les 7 autres cas, une vacuolisation des gonades (fig. 3) avec disparition complète de la lignée germinale sans qu'il soit possible d'en préciser l'origine mâle ou femelle.

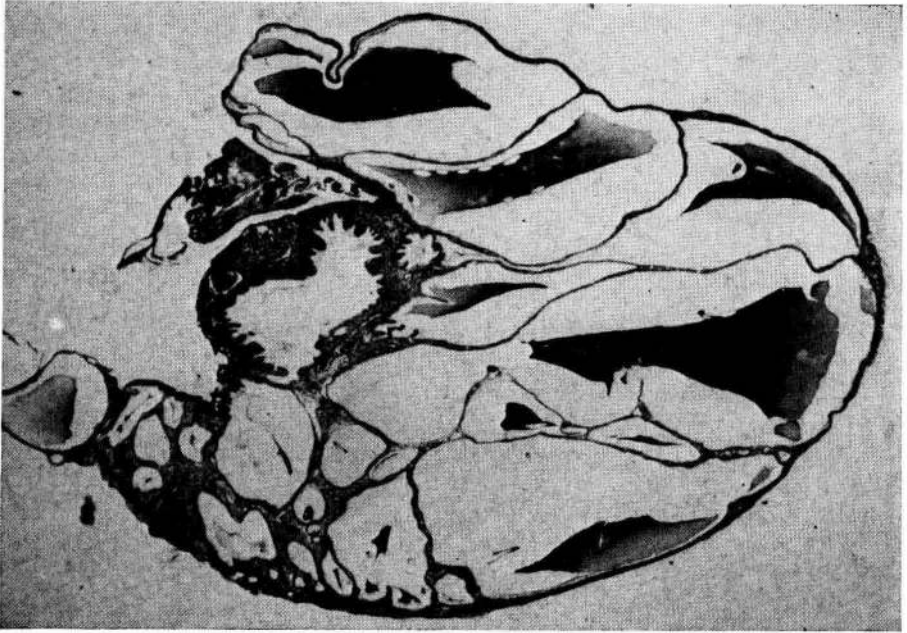


FIG. 3. — Coupe transversale d'une gonade d'un « mâle expérimental » *T. macrochir* dont la structure ne rappelle que de très loin celle du testicule ou de l'ovaire des animaux normaux et ne permettant pas d'identifier de lignée germinale ($\times 30$).

Dans tous les cas, en présence de ces animaux, les femelles normales incubaient des œufs non fécondés ce qui laisse supposer un comportement sexuel mâle de ces mâles expérimentaux de *T. macrochir*, particulièrement intéressant à souligner dans le cas particulier des 2 animaux pourvus d'ovaires.

DISCUSSION

Il est remarquable que pour une même dose de méthyltestostérone appliquée simultanément dans les mêmes conditions et au même âge sur les deux espèces de *Tilapia*, la tentative d'inversion sexuelle ait pleinement réussi chez *T. nilotica* donnant des mâles fertiles, alors qu'elle a échoué chez *T. macrochir*, ne conduisant qu'à des animaux avec une papille génitale mâle, mais stériles (à une exception près qui correspond certainement d'après sa descendance à un mâle génétique). De plus, les malformations de la tête observées, totalement anormales, tendent à prouver que la dose utilisée était extra-physiologique chez cette espèce. CLEMENS et INSLEE (1968) qui ont essayé chez *T. mossambica* un large éventail de doses de méthyltestostérone

ont constaté des malformations similaires ; pour des doses très faibles ils ont en outre observé des animaux présentant des ovaires bien différenciés et une papille génitale de type mâle. HACKMANN et REINBOTH (1974) ont trouvé un effet paradoxal du propionate de testostérone et de la méthyltestostérone chez un autre Cichlidé *Hemihaplochromis multicolor*, avec féminisation des gonades mâles. Certains poissons ainsi traités ont donné une progéniture dont la sex-ratio suggère bien la réalité d'une inversion paradoxale de mâles génétiques en femelles sous l'effet du traitement par la méthyltestostérone, ainsi que l'existence d'une hétérogamétie mâle dans cette espèce. Les auteurs ont par ailleurs mis en évidence l'existence d'une période critique très courte (entre 14 et 16 jours d'âge, à 26,5°C) ; un traitement trop long (30 jours) tendrait à réduire notablement la fertilité ultérieure des poissons traités. YAMAMOTO (1969) a passé en revue les différentes tentatives d'inversion sexuelle réalisées chez de nombreux Téléostéens : il semblerait que l'échec éventuel puisse tenir soit au choix impropre du stéroïde inducteur (les corticostéroïdes sont sans action sur la différenciation du sexe chez *Oryzias latipes*) soit à une action trop tardive après une différenciation précoce des gonades, soit enfin à l'utilisation de doses de stéroïdes inadéquates. Ces trois éventualités peuvent être envisagées dans notre cas, ce qui impliquerait donc l'existence de différences importantes dans la morphogénèse des gonades de ces deux espèces *Tilapia nilotica* et *Tilapia macrochir* pourtant voisines, qu'il s'agisse d'un décalage dans la période de différenciation sensible à l'action du stéroïde inducteur exogène, ou seulement d'une différence de sensibilité au traitement. Il n'est cependant pas possible d'établir un lien entre cette différence de nature génétique et l'hypothèse antérieurement formulée (JALABERT *et al.*, 1971) sur l'existence de deux systèmes différents de chromosomes sexuels dans les deux espèces, et selon laquelle une homogamétie mâle de type *yy* chez *T. macrochir*, s'opposant à l'homogamétie femelle de type *xx* démontrée ici chez *T. nilotica* conduirait aux sex-ratios observées lors de l'hybridation.

S'il n'est donc pas possible de tirer de conclusions quant au système de détermination du sexe existant chez *T. macrochir*, chez *T. nilotica* au contraire l'hypothèse de l'existence d'un homogamétie femelle paraît vérifiée par l'observation des portées entièrement femelles fournies par le croisement de certains mâles « expérimentaux » obtenus par le traitement à la méthyltestostérone. Il est cependant nécessaire de tenir compte de certaines autres observations dont l'explication paraît moins simple ;

— Dans les portées successives issues des couples témoins de *T. nilotica* (Nil), la sex-ratio est significativement différente de 1/1, avec un excédent de mâles. Compte tenu du fait que ces valeurs de sex-ratio ont été obtenues à un âge de 5 à 8 mois, l'écart observé par rapport à une sex-ratio équilibrée pourrait s'expliquer par une mortalité préférentielle des femelles avant l'âge adulte.

Par ailleurs, surtout si l'on conserve la précédente hypothèse, il devient très difficile d'expliquer de manière simple la présence de portées avec une sex-ratio de l'ordre de 1 mâle pour 3 femelles observées dans certains croisements entre mâles expérimentaux traités par la méthyltestostérone et des femelles normales (tabl. 4 : couples 5 et 6).

Or, depuis les remarquables travaux de WINGE (1934) chez *Lebistes*, il est certain que la notion de chromosome sexuel ne doit pas revêtir chez certains Téléostéens une conception formelle trop rigoureuse ; les travaux réalisés ultérieurement et revus par YAMAMOTO (1969) ont contribué à renforcer cette idée.

Nous avons nous-même discuté la valeur toute relative de cette notion de chromosome sexuel dans le genre *Tilapia* (JALABERT, KAMMACHER, LESSENT, 1971), et les mêmes arguments restent valables. Nous devons donc admettre que l'homogamétie femelle indubitablement mise en évidence chez *T. nilotica* ne permet pas d'exclure pour autant l'existence de génotypes où le rôle de « chromosomes sexuels » peu différenciés pourrait être éventuellement compensé par des gènes sexuels portés par des « autosomes », ce qui pourrait donner lieu aux fluctuations observées dans la sex-ratio attendue. Dans une telle situation, il n'est pas impensable qu'un tel équilibre puisse donner prise à l'action de certains facteurs externes pendant la morphogénèse des gonades. Chez *T. macrochir* au contraire, on peut penser qu'un système de chromosomes sexuels mieux différenciés interdirait de telles fluctuations de sex-ratio.

Reçu pour publication en avril 1974.

SUMMARY

SEX DETERMINATION IN *TILAPIA MACROCHIR* AND *TILAPIA NILOTICA* : EFFECT OF METHYLTESTOSTERONE ADMINISTERED IN FRY FOOD ON SEX DIFFERENTIATION ; SEX-RATIO OF THE OFFSPRING PRODUCED BY SEX-REVERSED MALES

Methyltestosterone was mixed in food (40 µg/g of food) of the fry of *T. nilotica* and *T. macrochir* during 2 months, beginning when mouth-breeding by the mother has ended. The following effects were observed :

— in *T. nilotica*, complete and functional sex-reversal towards male side was obtained in all the treated animals. Some of these « experimental males », when crossed with normal females, produced all-female offspring, disclosing a female sex genotype and demonstrating the existence of a female homogamety in this species.

— in *T. macrochir*, external male sexual characters (as judged by the conformation of the genital papilla) were induced, but were accompanied by deformations of the morphology of the head. Except in one case, all the treated animals were sterile; in most, all germ cells disappeared.

The difference of response to the same steroid treatment between the two close-related species *T. nilotica* and *T. macrochir* probably reflects important differences in the morphogenesis of gonads. The significance of this fact and the possible implications regarding sex-determination mechanism in the two species are discussed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARD J., 1960. Hybridation des *Tilapia*. *C. R. Symp. Lusaka, publ. C. S. A.*, n° 63, 179-182.
- CLEMENS H. P., INSLIEE T., 1968. The production of unisexual broods by *Tilapia mossambica* sex-reversed with methyltestosterone. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **97**, 18-21.
- DZWILLO M., 1962. Über künstliche Erzeugung funktionelle Männchen weiblichen Genotypus by *Lebistes reticulatus*. *Biol. Zentr.*, **81**, 575-584.
- HACKMANN E., REINBOTH R., 1974. Delimitation of the critical stage of hormonon-influenced sex differentiation in *Hemihaplochromis multicolor*, (Hilgendorf) (Cichlidae). *Gen. Comp. Endocr.*, **22**, 42-53.
- JALABERT B., KAMMACHER P., LESSENT P., 1971. Déterminisme du sexe chez les hybrides entre *Tilapia macrochir* et *Tilapia nilotica*. Étude de la sex-ratio dans les croisements des hybrides de première génération par les espèces parentes. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **11**, 155-165.
- LESSENT P., 1966. Essais d'hybridation dans le genre *Tilapia* à la station de recherches piscicoles de Bouaké, Côte d'Ivoire. *F. A. O. Fish. Rep.*, **44**, 148-159.

- WINGE O., 1934. The experimental alteration of sex chromosomes into autosomes (and vice versa) as illustrated by *Lebistes*. *C. R. Lab. Carlsberg, (Ser. Physiol.)*, **21**, 1-49.
- YAMAMOTO T., 1953. Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.*, **123**, 571-594.
- YAMAMOTO T., 1958. Artificial induction of functional sex reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.*, **137**, 227-262.
- YAMAMOTO T., KAJISHIMA T., 1968. Sex hormone induction of sex reversal in the goldfish and evidence for male heterogamety. *J. Exp. Zool.*, **168**, 215-222.
- YAMAMOTO T., 1969. Sex differentiation, in *Fish Physiology*. Ed. HOAR et RANDALL. Academic Press, New York and London, **3**, chap. 3, 117-175.
-