



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Utilisation de sous-produits agro-industriels dans l'alimentation des géniteurs du poisson-chat africain, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), au Rwanda: effets sur le système reproducteur

Defreyne, Pierre-Simon

Award date:
2005

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**UTILISATION DE SOUS-PRODUITS AGRO-INDUSTRIELS DANS L'ALIMENTATION DES
GENITEURS DU POISSON-CHAT AFRICAIN, *CLARIAS GARIEPINUS* (BURCHELL 1822),
AU RWANDA : EFFETS SUR LE SYSTEME REPRODUCTEUR.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Pierre-Simon DEFREYNE
Août 2005

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Utilisation de sous-produits agro-industriels dans l'alimentation des géniteurs du poisson-chat africain, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), au Rwanda : Effets sur les performances de reproduction.

DEFREYNE Pierre-Simon

Résumé

L'objectif de cette étude était de déterminer dans quelle mesure les sous-produits agro-industriels, surtout d'origine végétale, utilisés dans la formulation d'aliments destinés aux géniteurs de *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), pourraient altérer le système reproducteur de ces derniers. De fait, certaines plantes, comme le tournesol, sont connues pour renfermer des perturbateurs endocriniens, les phyto-oestrogènes. Trois sous-produits végétaux, les tourteaux d'arachide et de tournesol, et la farine de haricot, ont été inclus dans 4 régimes expérimentaux de manière à remplacer partiellement, voire totalement, la farine de poissons. Les résultats des analyses morphologique (RGS, diamètre des ovocytes au stade le plus avancé, proportion des ovocytes sains aux différents stades de maturation) furent analysés et comparés : aucune différence notable entre les régimes n'a pu être mise en évidence. Nous avons également analysé les concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels et en vitellogénine de plusieurs mâles et femelles pour chaque régime. Les résultats de ces analyses ne permirent pas démontrer un quelconque effet des aliments sur le déroulement reproductif. La farine de poisson peut donc être partiellement, voire totalement, remplacée par des sous-produits végétaux sans effets significatifs sur la reproduction du poisson-chat africain.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Août 2004

Promoteur : P. Kestemont

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Kestemont de m'avoir permis de travailler sur ce sujet de recherche et de participer ainsi à un voyage en Afrique très constructif, aussi bien sur le plan scientifique que humain.

Je tiens également à remercier ma tutrice de mémoire, Laetitia Nyina-wamwiza, pour m'avoir permis de réaliser mon étude dans le cadre de son doctorat.

Ma reconnaissance va également envers Simon, toujours là pour donner un coup de main ou faire visiter son beau pays qu'est le Rwanda. Il en va de même pour Système, qui s'est toujours préoccupé de mon sort afin pour que je passe le meilleur séjour possible.

Je voudrais remercier particulièrement Dimitri Pauporté pour les petits services qu'il m'a rendu, mais surtout pour les bons moments passé ensemble au Rwanda. Il en va de même pour Murenzi, Système, Léonce, Alain, Victor et surtout la « bande », Chiza, petite Maman, Jimmy. Les soirées passées ensemble me laisseront à jamais un bon souvenir du Rwanda.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Robert pour ses précieux conseils et sa disponibilité. Sans oublier les autres membres de l'URBO qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont permis d'avancer dans mon travail. Je pense en particulier à Martine, Marie-Claire, Gersande, Nicolas et tout les autres.

Je ne voudrais pas oublier les étudiants urboïstes avec lesquels j'ai passé les dures épreuves des études avec succès. Je pense surtout à Céline, Pierre et Thibault, continuellement présents lorsqu'il est question de rire un petit coup mais aussi à Jessica, toujours là pour rendre un service gratuit (avec le sourire en plus !!!).

Je remercie également de tout cœur mes parents pour le soutien, aussi bien moral que financier, qu'ils m'ont prêtés lors de ces quatre années d'étude. Sans eux, je n'en serais sûrement pas là où j'en suis maintenant.

Enfin, je tiens à remercier Céline qui a souvent été là pour moi durant ces deux dernières années et pour qui mon séjour au Rwanda n'a pas été facile tous les jours.

Merci à tous.

Pierre-Simon

Liste des abréviations

°C : degré centigrade
11-KT : 11-kétotestotérone
17 α ,20 β -P : 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogestérone
AA : acide arachidonique
Acétyl-coA : acétyl-coenzyme A
ADN : acide désoxyribo nucléique
AG : acide gras
AGE : acide gras essentiel
AGLPI : acide gras long polyinsaturé
ALP : phosphate alcalin libre
AMPc : adénosine mono phosphate
ANOVA : analyse de la variance
C. : clarias
DHA : acide docosahexaénoïque
E2 : oestradiol
EDC : perturbateur endocrinien
EPA : acide eicosapentaénoïque
ER : efficacité relative
GnRH : gonadotropin release hormon
cpm : coup par minute
GRIF : gonadotrophine
GTH : hormone gonadotrope
hCG : gonadotropine corionique humaine
IGS : indice gonadosomatique
OHA : 11 β -Hydroxyandrosténédione
opt. : optimum
PEG : polyéthylèneglycol
PKT : tyrosine protéine kinase
PIT-tag : Passive Integrative Transponder
PG : prostaglandine
ppm : partie par mille
RE : récepteur oestrogénique
RIA : radioimmunoassay
RGS : rapport gonadosomatique
SPIR : Station Piscicole de Rwasave
spz. : spermatozoïde
T : testostérone
TCA : trichloroacétate
UNR : Université National du Rwanda
UV : ultra violet

Introduction générale.....	1
Première partie : synthèse bibliographique.....	3
1. Présentation générale de <i>Clarias gariepinus</i>	3
1.1. Description.....	3
1.2. Ecologie.....	3
2. Reproduction de <i>Clarias gariepinus</i>	4
2.1. Reproduction naturelle.....	4
2.2. Reproduction artificielle.....	5
2.3. Organes sexuels.....	5
2.3.1. Ovaires.....	6
2.3.2. Testicules.....	6
2.4. Production des gamètes.....	7
2.4.1. Ovogenèse.....	7
2.4.2. Spermatogenèse.....	8
2.5. Vitellogenèse.....	8
2.6. Embryogenèse et développement larvaire.....	9
2.7. Contrôle de la reproduction.....	9
2.7.1. Régulation générale de la reproduction.....	9
2.7.2. Initiation de la puberté.....	10
2.7.3. Influence des principaux stéroïdes sur le système reproducteur.....	10
2.7.3.1. Testostérone.....	10
2.7.3.2. 11-Kétotestostérone.....	11
2.7.3.3. Oestradiol.....	11
2.7.3.4. Progestagènes.....	11
2.8. Expression de l'aromatase P450.....	11
3. Influence de l'alimentation sur la reproduction.....	13
3.1. Phyto-oestrogènes.....	13
3.1.1. Généralités sur les phyto-oestrogènes.....	13
3.1.2. Classification et métabolisme des principaux phyto-oestrogènes.....	14
3.1.3. Sources dans l'alimentation.....	15
3.1.4. Action des phyto-oestrogènes.....	15
3.1.4.1. Différenciation sexuelle.....	15
3.1.4.2. Vitellogenèse.....	16
3.1.4.3. Concentrations en stéroïdes sexuels.....	17
3.1.4.4. Aromatases P450.....	17
3.1.5. Phyto-oestrogènes en tant que facteurs antinutritionnels.....	18
3.2. Nutriments indispensables dans l'alimentation.....	18
3.2.1. Acides gras.....	18
3.2.1.1. Généralité sur les acides gras.....	18
3.2.1.2. Effets des acides gras sur les performances de reproduction.....	19
3.2.1.3. Effets des acides gras sur la qualité des œufs et des larves.....	20
3.2.2. Vitamines.....	21
3.2.3. Caroténoïdes.....	22
3.2.4. Protéines.....	23

Deuxième partie : Matériels et méthodes	25
1. Rappels des objectifs de l'étude de Laetitia Nyina-wamwiza.....	25
2. Matériel et méthode.....	25
2.1. Lieu d'expérimentation.....	25
2.3. Régimes expérimentaux.....	25
2.3.1. Ingrédients expérimentaux.....	25
2.3.2. Formulation des régimes expérimentaux.....	26
2.3. Poissons.....	26
2.4. Conditions de prélèvement.....	27
2.4.1. Sang.....	27
2.4.2. Gonades.....	27
2.5. Dosages des stéroïdes sexuels plasmatiques.....	28
2.6. Dosages de la vitellogénine par ALP.....	29
2.7. Histologie.....	29
2.7.1. Réalisation des coupes histologiques.....	29
2.7.2. Analyses des coupes histologiques.....	30
2.8. Analyses statistiques.....	31
Troisième partie : Résultats	32
1. Paramètres morphologiques.....	32
1.1. Rapport gonadosomatique.....	32
1.2. Analyses des coupes histologiques.....	32
2. Paramètres endocriniens et biochimiques.....	35
2.1. Concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels	35
2.2. Concentrations plasmatiques en ALP.....	41
Quatrième partie : Discussion des résultats	43
1. Présentation des résultats.....	43
2. Mâles.....	43
2.1. Indicateurs morphologiques.....	43
2.2. Concentrations en stéroïdes sexuels.....	44
2.2.1. 11-Kétotestostérone.....	44
2.2.2. Oestradiol.....	45
2.2.3. Testostérone.....	45
3. Femelles.....	45
3.1. Indicateurs morphologiques.....	45
3.2. Concentrations en stéroïdes sexuels.....	46
3.2.1. 11-Kétotestostérone.....	46
3.2.2. Oestradiol.....	47
3.2.3. Testostérone.....	47

4. Concentrations plasmatiques en ALP.....	47
Cinquième partie : Conclusion et perspectives.....	49
Références bibliographiques.....	51

Introduction générale

Au Rwanda, comme un peu partout en Afrique centrale et sub-saharienne, les habitants sont victimes d'un manque de nourriture aussi bien quantitatif que qualitatif, surtout en ce qui concerne les populations rurales. En effet, le Rwanda connaît une croissance démographique galopante (3.7% /an) et une densité sur les terres cultivables de 250 habitants/km². Cet état de fait a entraîné plusieurs conséquences graves dont une pénurie en terres cultivables et en eau, un manque nutritionnel chronique en protéines animales et un sous-emploi de la population. Selon la Banque Mondiale, le chômage atteint 30% environ de la population totale en zone rurale. L'agriculture et l'élevage de subsistance sont pratiqués par un grand nombre de personnes, mais beaucoup de nutriments ne sont disponibles pour aucune forme d'élevage, y compris pour l'aquaculture. La population rwandaise est donc continuellement menacée par la famine (Hishamunda et Curtis, 1998 ; Nathanaël et Moehl, 1989 ; FAO, 2005). Afin de lutter contre ces problèmes de malnutrition, un projet de développement de l'aquaculture à l'échelle nationale a été mis sur les rails. Ce projet a été fortement soutenu par les autorités rwandaises, qui en ont fait une priorité absolue dans le cadre de la politique d'autosuffisance alimentaire (FAO, 2005).

Les poissons ont besoin d'un apport élevé en protéine pour leur croissance. Donc, le nœud d'étranglement pour une aquaculture intensive est essentiellement lié à la disponibilité en protéines et à leur prix, puisque les aliments constituent le coût principal de l'élevage aquacole (Hoffman *et al.*, 1997). Généralement, les aliments pour l'aquaculture sont formés en grande partie de farine de poissons, qui représente 40 à 60% des protéines totales dans les aliments traditionnels pour Siluridés (Van Weerd, 1995). Au vu de son prix d'achat extrêmement élevé, les recherches se sont donc tournées vers des sources alternatives de protéines, en particulier les sous produits agro-industriels, qui ne sont utilisables directement pour la consommation humaine. C'est dans cette optique que des régimes expérimentaux destinés *Clarias gariepinus* furent testés, la farine de poisson y étant remplacée partiellement ou totalement par des sources alternatives de protéines, essentiellement d'origine végétale. Après avoir expérimenté l'influence de cette alimentation à base de végétaux sur la croissance, ce sont les performances de reproduction qui furent analysés. En effet, il a été démontré que des sous-produits végétaux incorporés dans les aliments pour poissons peuvent entraver la capacité de reproduction des géniteurs (Pelissero *et al.*, 1991 *b*). Cela est du notamment à la présence, dans certaines plantes, de molécules que l'on nomme les phyto-oestrogènes. Actuellement, beaucoup de ces phyto-oestrogènes ont été identifiés comme étant des perturbateurs endocriniens. De fait, ces substances sont des ligands pour les récepteurs oestrogéniques, à cause de la forte similitude avec les composés oestrogéniques naturels des poissons (Fox *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2000). Dès lors, le but de notre étude sera de rechercher une éventuelle influence de ces sous produits agro-industriels, et spécialement végétaux, sur la reproduction des géniteurs de *Clarias gariepinus*.

On peut également rappeler que cette étude est effectuée dans le cadre de la recherche doctorale menée par Laetitia Nyina-wamwiza. Dans un premier temps, Laetitia fit un inventaire des différents produits disponibles sur le sol Rwandais (sang d'abattoir; viscères de poulet ; tourteau d'arachide, de tournesol ou de soja; ...) et en a choisi six selon des critères comme une disponibilité continue durant toute l'année, un prix de transport acceptable, un coût d'achat pas trop élevé, Ensuite, dans un deuxième temps, elle a formulé, avec l'aide de Jonathan Richir, six régimes expérimentaux iso protéiques (environ 38 % de protéines brutes) et iso énergétiques (environ 19 KJ g⁻¹ d'aliment) à partir de ces sous-produits agro-alimentaires disponibles au Rwanda, principalement les tourteaux de tournesol et d'arachide et la farine de haricot en connaissant leur composition bromatologique, ainsi que les exigences nutritionnelles globales de *C. gariepinus*. Ces régimes ont été testés en triplicat.

Introduction générale

C'est suite aux résultats obtenus par Laetitia au cours de la première expérience de sélection de sous-produits réalisée de juin à août 2003 que les ingrédients utilisés furent sélectionnés. Ce sont quatre sous-produits végétaux (tourteaux de tournesol, d'arachide, de soja et farine de haricot) qui furent testés dans l'alimentation de juvéniles de *Clarias gariepinus* en grossissement, afin de substituer partiellement les protéines animales dans un aliment contrôlé formulé à base de 50 % de farine de poisson. Le régime contenant du tourteau de tournesol présentait des performances de croissance et nutritionnelles plus que médiocres. Or, ce sous-produit issu de l'extraction de l'huile des graines de tournesol constitue un ingrédient très intéressant à valoriser, au regard de sa disponibilité et son prix d'achat bon marché. Puisqu'il paraissait intéressant de valoriser ce sous-produit, les six régimes formulés contenaient de l'huile de tournesol. Cela permet de démontrer qu'un pré-traitement des graines de tournesol (trempage, décorticage) augmentait considérablement son efficacité alimentaire. Finalement, les performances zootechniques et biochimiques des juvéniles ont offerts des perspectives plus qu'encourageantes. En effet, elles permirent de conclure que la farine de poisson pouvait être fortement diminuée de la formulation d'aliments pour l'élevage du poisson-chat africain, voire totalement exclue. Mais cela ne peut se faire qu'à la seule condition que les sources de protéines végétales alternatives, utilisées dans ces formulations, soient judicieusement combinées entre elles, afin d'assurer un profil en acides aminés qui réponde aux besoins de cette espèce.

Toutefois, l'objectif particulier de ce mémoire est d'évaluer les effets de la substitution de la farine de poisson par des matières premières d'origine végétale dans l'alimentation de *Clarias gariepinus* sur le système reproducteur de cette espèce. A cette fin, des prélèvements de gonades, ainsi que des prises de sang, ont été effectuées dans le but de réaliser, respectivement, des coupes histologiques et des dosages de stéroïdes et de vitellogénine.

Ce travail se décompose en cinq parties. La première partie est la synthèse bibliographique reprenant les connaissances actuelles sur la reproduction de *Clarias gariepinus* et l'influence de l'alimentation sur les performances de reproduction des poissons. La deuxième partie présente le matériel et les méthodes intervenant au cours de cette expérience, depuis le nourrissage en étang jusqu'aux analyses en laboratoire. La troisième partie exposera les résultats obtenus suivis d'une discussion de ceux-ci dans la quatrième partie. Enfin, nous présenterons une conclusion générale et envisagerons les perspectives qu'elle nous inspirera.

Première partie:
synthèse bibliographique



Figure 1 : Photo de *Clarias gariepinus* (FishBase team, 2003).

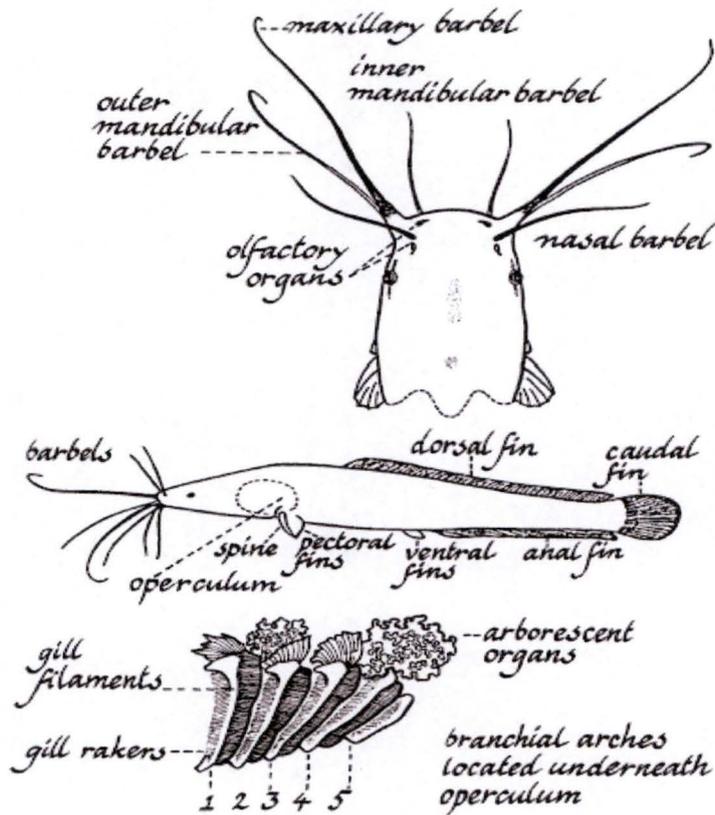


Figure 2 : Caractéristiques morphologiques du poisson-chat africain (de Graaf et Janssen, 1996).

	Oeufs et premières larves	Stade larvaire avancé	Juvéniles et adultes
O ₂	80–100% saturation	3–5 ppm	>3 ppm
Température	opt. 30°C	opt. 30°C	opt. 26–28°C
NH ₃ -N		0.1 ppm (1.0 ppm)	
NO ₂ -N		0.5 ppm	
NO ₃ -N		100 ppm	
pH		6–9	
CO ₂ -C		6 ppm (10–15 ppm)	
Salinité		10 ppt. (15–16 ppt)	

Tableau 1 : Exigences écologiques de l'eau pour *C. gariepinus* (Rhaman *et al.*, 1992).

1. Présentation générale de *Clarias gariepinus*.

1.1. Description.

Clarias gariepinus (figure 1) est un poisson-chat africain de la famille des clariidea, dont l'origine est limitée à la zone intertropicale d'Afrique. En effet, sa distribution initiale s'étend du Nil à l'Afrique de l'ouest et de l'Algérie à l'Afrique du Sud (de Graaf et Janssen, 1996). Teugels a réalisé une révision systématique du genre *Clarias*. Ce dernier, un des douze genres de *Clariidae* présents en Afrique, est subdivisé en six sous-genres dont *Clarias* Gronovius, auquel appartient *C. gariepinus* (Teugels, 1996). Cette famille se caractérise par un corps allongé faisant suite à une tête aplatie dorso-ventralement, terminée à sa partie antérieure par une bouche large et subterminale entourée de quatre paires de barbillons, intervenant dans le sens du goût. Il possède également une forte épine sur sa nageoire pectorale, ainsi qu'un appareil suprabranchial formé par des structures arborescentes, aux parois fortement vascularisées, lui permettant de respirer l'air atmosphérique (Das et Ratha, 1996). L'ensemble des caractéristiques morphologiques du poisson-chat Africain est visible à la figure 2.

1.2. Ecologie.

Clarias gariepinus a été décrit comme un fouilleur omnivore (Jubb, 1967 in Clay, 1979 a), même si son court tube digestif suggérait plutôt un régime carnivore (Angelopulo, 1947 in Clay, 1979 a). Beaucoup d'auteurs s'accordent pour dire que les espèces du genre *Clarias* se nourrissent de manière opportuniste (Groenwald, 1964 in Clay, 1979 a), et donc, en ce qui concerne le poisson-chat africain, il s'agirait d'une espèce opportuniste (Clay, 1979 a). En fait, c'est un poisson qui vit dans une très large gamme d'eaux continentales, généralement calmes (rivières, marais, lacs, ...), mais on peut également le retrouver dans des cours d'eaux plus rapides (FishBase, 2003). De plus, il s'agit d'une espèce tolérante à large spectre de température, à des niveaux de salinités élevés et à de faibles concentrations en oxygène dans l'eau (tableau 1), ce qui explique son intérêt en aquaculture et son aire de répartition relativement grande (figure 3 ; Rhaman *et al.*, 1992 ; Hecht, 1996). De fait, il peut respirer efficacement l'air atmosphérique en utilisant son appareil suprabranchial, et éventuellement sa peau. Ceci le rend capable de se déplacer d'un point à un autre en utilisant ses épines pectorales, et en effectuant des mouvements sinueux avec son corps. Ensuite, il présente une forte résistance à la dessiccation, car il est capable de produire un mucus qui maintient sa peau humide. Il tolère aussi facilement les eaux turbides et la sur densité (jusqu'à 500 kg de poissons par m³) (Hecht, 1996). Ainsi, Hengsawat *et al.* (1997) mirent en évidence que la biomasse finale augmentait directement avec la densité de stockage, sans que le taux de mortalité ne soit affecté, c'est pourquoi cette espèce est également si intéressante en aquaculture.

Ensuite, le phénomène de cannibalisme, très fréquent chez les poissons carnivores, est également présent chez le poisson-chat africain (Hecht et Pienaar, 1993). Son impact est très important, surtout pour les larves et les juvéniles, car ceux-ci ont des exigences énergétique élevées, et montrent une grande hétérogénéité comparés aux adultes (Baras et d'Almeida, 2001). Donc, le cannibalisme pourra être réduit en triant régulièrement les juvéniles par classe de taille, en retirant les cannibales et en faisant en sorte que les individus à croissance trop rapide (cannibales) ne soient pas utilisés comme reproducteurs, puisque cela favoriserait la sélection de ce comportement (Hecht, 1996). Hecht et Piennar (1993) ont également démontré que le cannibalisme était fonction d'une multitude de facteurs environnementaux, tels que la disponibilité, la qualité ou le type de nourriture ; la densité ; la turbidité de l'eau ou la lumière ou encore le génotype.



Figure 3 : Répartition géographique du poisson-chat africain (FishBase, 2003).

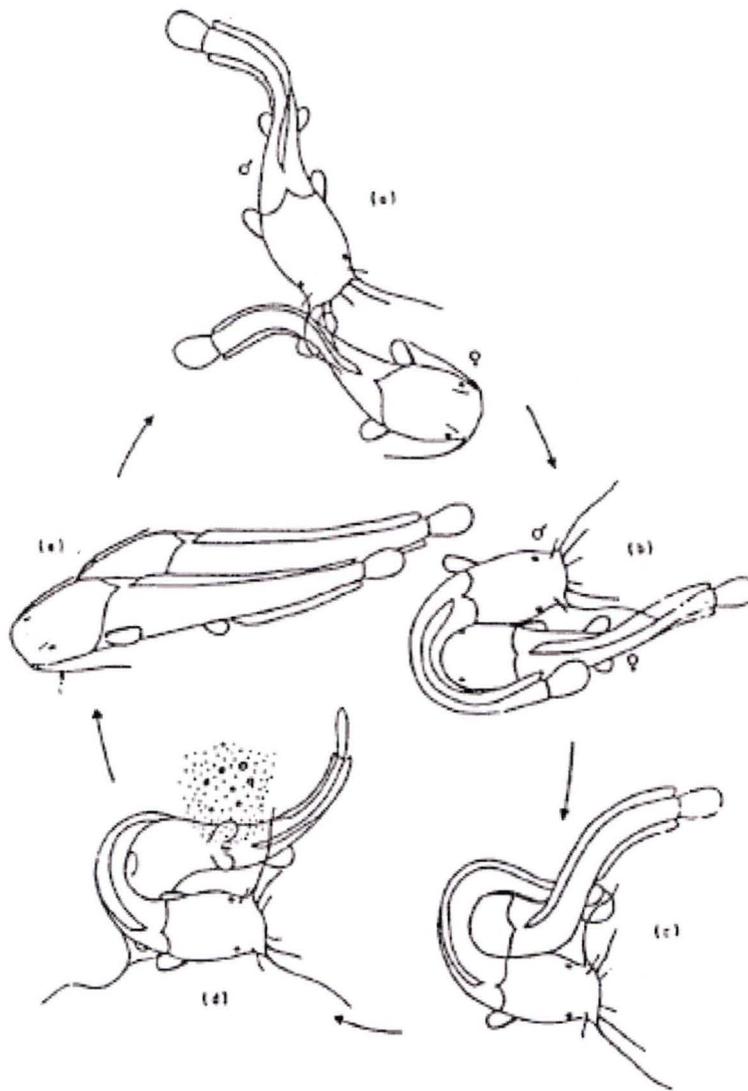


Figure 4 : La courte parade nuptiale de *C. gariepinus* (de Graaf et Janssen, 1996).

2. Reproduction de *Clarias gariepinus*.

2.1. Reproduction naturelle.

Les endroits fraîchement inondés, ou les zones d'eaux calmes et peu profondes, sont des lieux de frayère idéaux pour la ponte, comme pour la croissance des juvéniles (eaux fertiles, libres d'ennemis). Plusieurs auteurs ont observé des migrations et des rassemblements de vastes populations de poissons-chat africains vers les lieux de ponte (migrations latérales). Ainsi, les poissons fraient en groupe, plusieurs fois pendant la saison de reproduction (Janssen, 1985). Les cas de ponte unique sont certainement dus à des conditions environnementales qui restreignent la reproduction à une seule ponte (Clay, 1979 *b*). Après une courte mais agressive parade nuptiale (figure 4), le mâle s'enlace autour de la tête de la femelle. Après quoi, il lâche un peu de sperme, suivi par la femelle qui libère à son tour, une petite quantité d'ovules. Ensuite, la femelle agite vigoureusement sa queue pour mélanger et éparpiller les ovules et le sperme. Les ovules, maintenant fécondés, sont alors distribués sur une zone de frayère assez importante (Van der Waal, 1974; Bruton, 1979 *in* Janssen, 1985).

Dans la phase dormante, ceux-ci ont une couleur jaune-verdâtre, d'une forme légèrement oblongue. Ils sont très petits, de l'ordre de 1,3 à 1,6 mm de diamètre. En moyenne, on compte 600 à 800 ovules par gramme d'ovaire (Janssen, 1985). Les ovules matures représentent à peu près 15-20% du poids corporel de la femelle (de Graaf et Janssen, 1996), ce qui représente environ 75 000 à 100 000 ovules par géniteur, d'un poids corporel de 500 g (Janssen, 1985). Ensuite, le développement des œufs et des larves est rapide, et ces dernières sont généralement capables de nager dans les 48 à 72h après la fertilisation à 23-28 °C (de Graaf et Janssen, 1996). Il n'y a pas de protection parentale des jeunes (Bruton, 1995).

En général, les gonades de *Clarias gariepinus* sont complètement développées en moyenne vers l'âge de deux ans, en fonction des conditions environnementales (température, précipitations, ...) de son milieu, et pour un taille qui varie en moyenne entre 30.5 et 37.5 cm (FishBase, 2003). Sa période de fraie commence avec la saison estivale et s'accomplit généralement la nuit dans des zones inondées en bordure de lacs (Bruton, 1995). De fait, la maturation des gonades est liée à la montée des eaux, et à l'augmentation de la température de l'eau et de la photopériode. Chez *Heterobranchus longifilis*, une espèce jumelle, la ponte nécessite des eaux aux températures assez élevées, celle-ci étant finalement stimulée par la montée des eaux et l'inondation des zones de fraie.

En effet, ce sont les deux événements qui permettent l'accomplissement du cycle ovarien. Le premier, l'accroissement de température, autorise l'agrandissement progressif des ovaires. Quant au deuxième, qui concerne la maturation, l'ovulation et l'oviposition, il s'agit plutôt de l'élévation du niveau de l'eau, mais aussi des changements de la composition chimique de cette eau. (figure 5 ; Nguenga *et al.*, 2004). De la sorte, la maturité sexuelle de *Clarias* s'étale en Centrafrique sur la période de décembre à juin avec un maximum de géniteurs gravides durant les mois de mars et avril. Par contre, durant le mois de juillet, on constate une décrue rapide (figure 6 ; de Graaf et Janssen, 1996). Donc, cela semble indiqué qu'il y a une régression ovarienne durant la saison sèche qui peut être attribuée au choc thermique (Nguenga *et al.*, 2004). En résumé, la période de reproduction optimale se situe, comme pour beaucoup d'autres espèces africaines, pendant la grande saison des pluies correspondant aux grandes inondations (Micha, 1973 *in* Janssen, 1985).

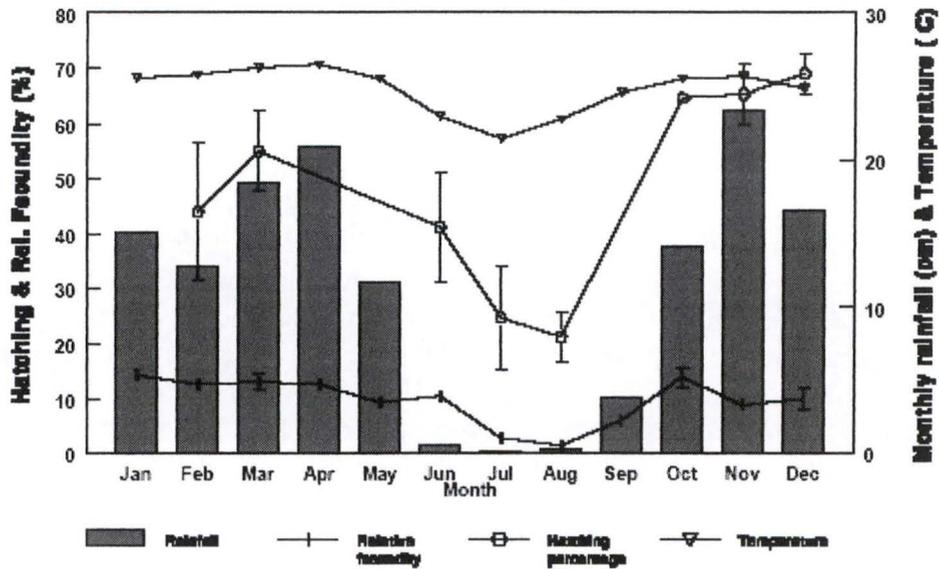


Figure 5 : La fécondité relative (% du poids corporel total) et le pourcentage d'éclosion (% d'œufs totaux) de *C. gariepinus*, les précipitations mensuelles et températures de l'air moyennes ont été mesurées au Congo Brazzaville (de Graaf et Janssen, 1996).

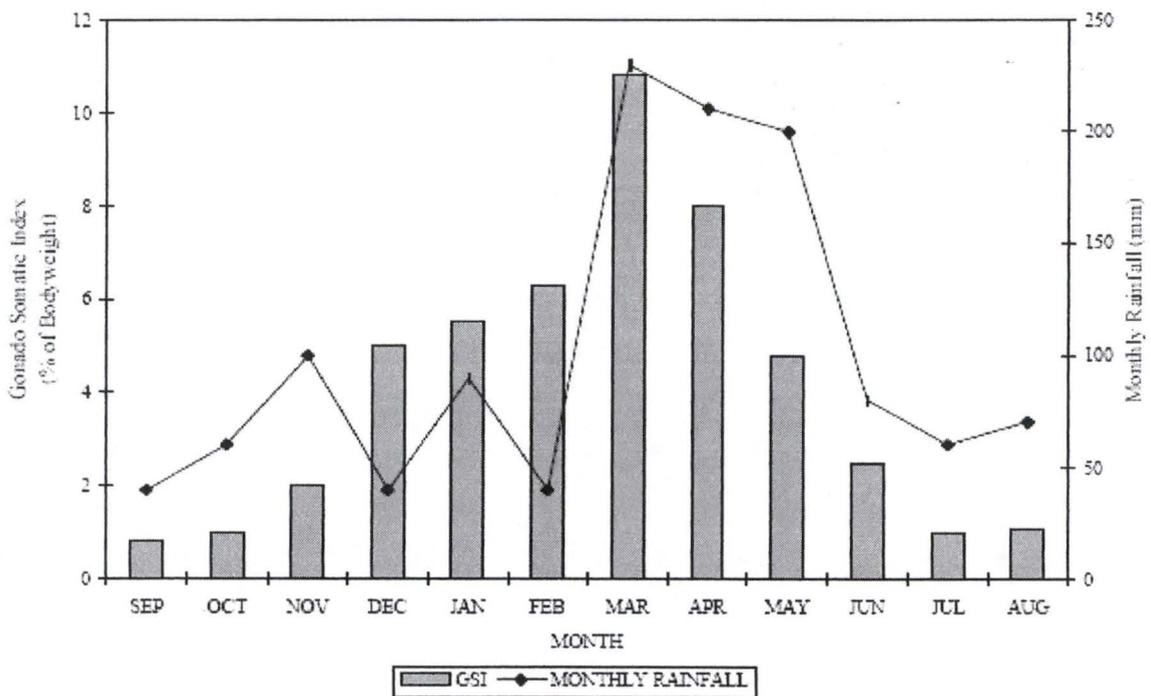


Figure 6 : L'indice gonadosomatique (% du poids corporel) de *C. gariepinus* et la pluviosité mensuelle (mm), golf Nyanza, lac Victoria, Kenya (de Graaf et Janssen, 1996).

2.2. Reproduction artificielle.

En captivité, les poissons-chats africains ne se reproduisent pas spontanément en raison de l'absence, en station piscicole, des facteurs environnementaux déjà cités, tels que l'augmentation du niveau de l'eau ou l'inondation des zones de reproduction (de Graaf et Janssen, 1996). Cependant, maintenus continuellement dans des conditions favorables, ils présentent des gonades matures (testicules avec spermatozoïdes abondants, ovaires au stade postvitellogénique) durant toute l'année, mais sans qu'il y ait spermiation, maturation ovocytaire ou ovulation spontanée, puisque le pic de gonadotrophines, qui précède le frai en milieu naturel, est absent en condition d'élevage. Donc, des ovules et du sperme de bonne qualité pourront être récoltés à tout instant puisque les gonades sont matures continuellement. Ceci permettra d'obtenir des larves viables en toutes saisons (Legendre *et al.*, 1996).

En milieu artificiel, *Clarias gariepinus* est sexuellement mûr après 8 à 12 mois pour un poids d'approximativement 200g (de Graaf et Janssen, 1996). Ce poisson ne frayant pas en étangs, il existe différentes possibilités pour induire le frai, comme une augmentation soudaine du niveau de l'eau dans les étangs ou un renouvellement de l'eau (Legendre *et al.*, 1996). Une autre technique de reproduction semi-artificielle consiste à réaliser un traitement hormonal pour provoquer la ponte. Ainsi, la reproduction des géniteurs induite par des hormones, dans des bassins en plastique avec un substrat en gravier, fut l'une des premières méthodes de ce genre à être utilisées en Afrique (Micha, 1973; Van der Waal, 1974 *in* de Graaf et Janssen, 1996). Mais ces reproductions semi-naturelles se soldent généralement par un très faible taux de survie des jeunes (cannibalisme, prédation ; Legendre *et al.*, 1996) et par la production d'un faible nombre de larves, car l'ovulation n'est souvent que partielle. Voilà pourquoi ces techniques ne peuvent être pratiquées que dans de petites exploitations en vue de produire leur propre larves (de Graaf et Janssen, 1996).

Pour les piscicultures de plus grande envergure, une méthode alternative à celles-ci est utilisée : il s'agit de la reproduction artificielle du *Clarias gariepinus*. En effet, cette dernière autorise une production de masse, ce qui n'est pas le cas des reproductions semi-naturelles. Elle comprend notamment l'induction de l'ovulation par traitement hormonal, la récolte des ovules (figure 7) et du sperme, la fécondation artificielle et l'élevage des larves (de Graaf et Janssen, 1996). Néanmoins, la récolte du sperme par traitement hormonal préalable et pression mécanique n'étant pas possible, cette démarche nécessite automatiquement le sacrifice du mâle (figure 8 ; Ducarme et Micha, 2003). Les avantages de cette technique résident dans le fait que la reproduction se déroule dans des conditions contrôlées, permettant de meilleurs taux de fécondation et d'éclosion, une protection accrue contre les ennemis et les circonstances environnementales défavorables, ainsi que des conditions bien plus propices à la survie et à la croissance (Woyanarowich et Horvath, 1980)

2.3. Organes sexuels.

Les mâles et les femelles de *C. gariepinus* peuvent être facilement être distingués car il existe un dimorphisme sexuel bien marqué. De fait, le mâle possède une papille génitale distinct, localisée derrière l'anus. Cette papille sexuelle est absente chez les femelles (figure 9 ; de Graaf et Janssen, 1996).

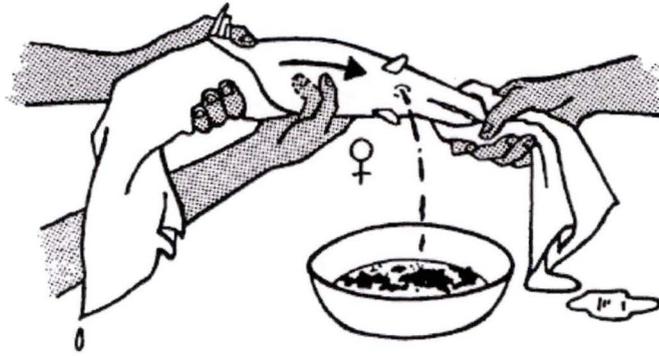


Figure 7 : Récolte des gamètes femelles (stripping) de poisson-chat africain (de Graaf et Janssen, 1996).

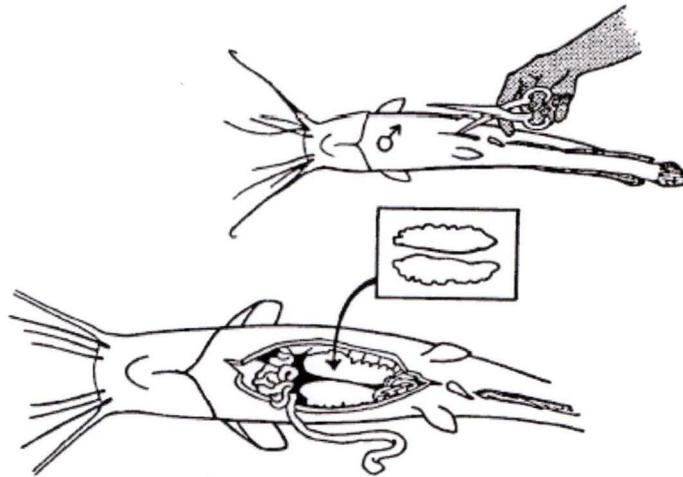


Figure 8 : Collecte du sperme du poisson-chat africain par sacrifice (de Graaf et Janssen, 1996).

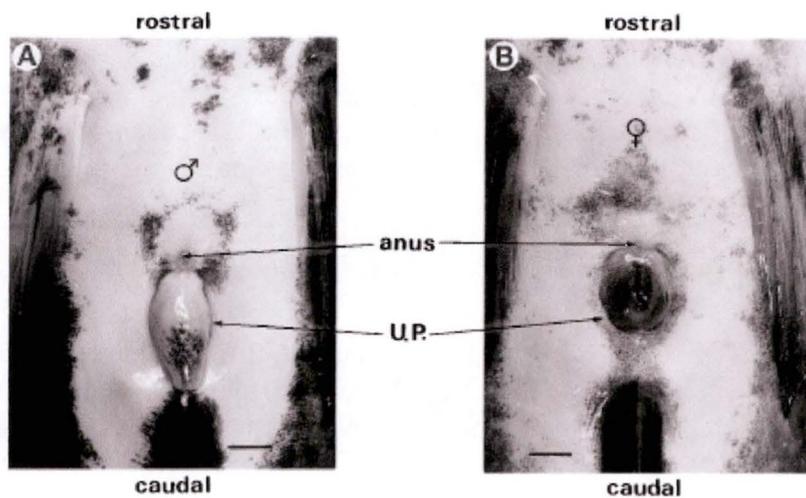


Figure 9 : Vue ventrale des papilles génitales des mâles (A) et des femelles (B) adultes de poisson-chat africain. UP, papille uro-génitale (Cavaco *et al.*, 1998).

2.3.1. Ovaires.

Les ovaires des Siluridés, et donc du poisson-chat africain, sont généralement constitués par une paire d'organes allongés. Ces derniers sont suspendus dans la cavité corporelle dorsale et connectés au pore génital par de courts oviductes. Chez les femelles pré-ovulantes des Clariidés africains (*C. gariepinus* et *Heterobranchus longifilis*), Richter et Van Der Hurk (1982) et Legendre *et al.* (1992) présentèrent l'ovaire comme un objet en forme de sac, donc très allongé, entouré par une membrane externe avec des lamelles qui contiennent des ovogonies et des ovocytes à différents stades de développement (follicules prévitellogéniques, vitellogéniques, postvitellogéniques et atrétiques), puisque c'est dans celles-ci que se déroule l'ovogenèse (Legendre *et al.*, 1996). Ensuite, l'ovaire présente une cavité ovarienne qui est connectée avec l'oviducte. Les oviductes de chaque ovaire se rejoignent pour finir en un seul conduit, qui se termine au pore génital. Un ovaire avec une structure de ce type est dit cystovarien, et après qu'un ovocyte, relâché par follicule sur une lamelle, soit libéré par ovulation dans la lumière, il quittera le corps par le pore génital en passant à travers l'oviducte (Hibiya, 1982). De plus, Clay (1979) démontra que le cycle sexuel des femelles pouvait être divisé en six étapes. Au départ, l'ovaire est blanc, crémeux et translucide durant l'accumulation de la vitellogénine (stade où l'ovaire est immature), pour devenir plus tard de couleur verdâtre et rougâtre-brun lorsque les ovocytes deviennent mûrs. Yalçın *et al.* (2001) firent des observations similaires lors d'une étude sur les paramètres reproducteurs du poisson-chat africain en Turquie. Notons que chez les femelle de Siluridés matures, l'index gonadosomatique (IGS) peut varier entre 10 et 20% (tableau 2 ; Legendre *et al.*, 1996).

2.3.2. Testicules.

Les testicules de *Clarias gariepinus* sont aussi des organes pairs en forme de sac (Hibiya, 1982), comprenant également une vésicule séminale (figure 10). Cette dernière affiche un accroissement et une régression saisonnière, et joue une fonction de glande sexuelle accessoire (Cavaco *et al.*, 1998). De fait, elle produit un fluide dans lequel sont stockés les spermatozoïdes, le rôle de ce fluide séminal étant de les immobiliser. De plus, après l'éjaculation, il prolonge l'activité du sperme (van der Hurk *et al.*, 1987). Les testicules des Téléostéens sont habituellement composés de tubules un peu particuliers, les lobules, qui servent à la fois à produire des spermatozoïdes et à les stocker en attendant l'éjaculation (Mellinger, 2002). La structure lobulaire, qui est donc la plus commune chez les Téléostéens, est constituée de très nombreux lobules, séparés par une fine couche de tissu conjonctif (Hibiya, 1982). Cependant, chez les Siluriformes, comme chez d'autres Téléostéens primitifs (Clupéiformes, Salmoniformes,...), les gonades mâles sont de type lobulaire réticulé, bien différentes de celles des autres poissons. Les tubules spermatogéniques forment un réseau continu et ne se terminent pas en cul-de-sac à la périphérie des testicules (Mellinger, 2002).

Au sein de chaque lobule, il y a des groupes de cellules de Sertoli qui forment des espaces intra-tubulaires, ou cystes, contenant les cellules germinales. Au cours de la maturation, les descendants de ces spermatogonies, suite aux divisions mitotiques produisant plusieurs cellules spermatogoniales, se trouvent tous au même stade de développement au sein d'un cyste (Cavaco *et al.*, 2001 a). Les cellules germinales et leurs cellules de supports sont étroitement liées, ce qui laisse penser que celles-ci communiquent de manière intime, et que les cellules de Sertoli régulent probablement la différenciation des cellules germinales (Buccione *et al.*, 1990; Griswold, 1995 *in* Shiomiya, 2001). En outre, on a remarqué la présence de cellules interstitielles (cellules de Leydig) capables de produire des stéroïdes glycoconjugués, hydrosolubles, qui pourraient jouer le rôle de phéromones (Cinquetti, 1997 *in* Mellinger, 2002).

Espèces	Poids corporel (kg)	Age (année)	IGS (%)	Fécondité (par kg. 10 ³)	Diamètre des ovules (mm)	Références
<i>Ictalurus punctatus</i>	1,5-4	3-6	15	8	3	Grizzle, 1985 ; Tucker et Robinson, 1990.
<i>Chrysichthys nigrodigitatus</i>	1,5-3	3-4	8-10	15-18	2,5-3	Hem, 1986 ; Otémé, 1993
<i>Silurus glanis</i>	4-25	>3	3-15	10-25	25-2,9	Fijan, 1975 ; Horvath et Tamas, 1976 ; Wisniewolski, 1988 ; Kouril <i>et al.</i> , 1993.
<i>Hoplosternum littorale</i>	0,07-0,3	1	6-12	45-75	1,4	Hostache <i>et al.</i> , 1993 ; Pascal <i>et al.</i> , 1994.
<i>Clarias gariepinus</i>	0-3	1-3	15-20	30-150	1,2-1,5	Hogendoorn, 1979 ; Richter <i>et al.</i> , 1987 ; Legendre <i>et al.</i> , 1992 ; (Bruton, 1996).
<i>Clarias macrocephalus</i>	0,1-0,2	-	10-12	20-50	1,3-1,6	Ali, 1993 ; Tan-Fermin et Emata, 1993.
<i>Heterobranchus longifilis</i>	2-6	2-4	15	30-120	1,2-1,6	Legendre, 1986 ; Legendre et Otémé, 1995
<i>Pseudoplatystoma coruscans</i>	5-13	-	-	120-130	0,8	Cardaso (pers. comm.)

Tableau 2 : Poids corporel, âge de première maturité sexuelle et index gonadosomatique (IGS) de femelles, et fécondité relative et diamètre des ovules de quelques espèces de Siluridés (Legendre *et al.*, 1996).

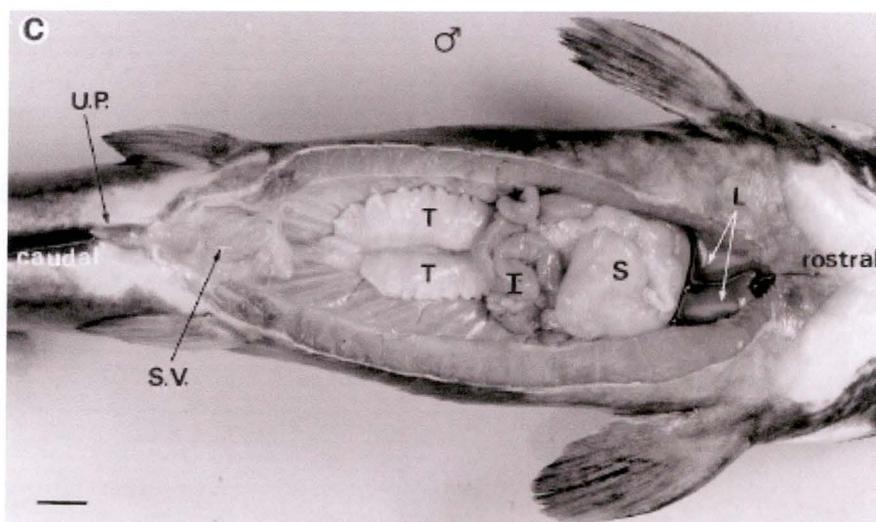


Figure 10 : Conduit reproductif d'un *C. gariepinus* adulte. T, testicules; SV, vésicule séminale; UP, papille uro-génitale; S, estomac; I, intestin; L, lobes du foie (Cavaco *et al.*, 1998).

Toutefois, chez le poisson-chat africain, cette production serait assurée par les tubules spermatiques eux-mêmes (Mellinger, 2002).

2.4. Production des gamètes.

2.4.1. Ovogenèse.

Le développement des produits sexuels de l'ovaire (ovules ou oeufs) est un processus long et complexe pendant lequel plusieurs stades peuvent être différenciés (figure 11). Les différents stades de développement des ovocytes (= cellules femelles destinées à être fécondées, n'ayant pas encore subi la méiose) sont décrits ci-dessous:

Stade 1: Prolifération des cellules primitives de l'ovogenèse (ovogonies) par mitoses normales (Janssen, 1985), celles-ci sont très petites (7 à 10 μm) et ne contiennent pas de vitellus (de Graaf, 1994).

Stade 2: La cellule mère de l'ovocyte grandit jusqu'à 10 ou 15 μm , et une couche de cellules épithéliales commence à entourer chaque ovocyte. L'ovocyte avec sa couche protectrice s'appelle follicule ovarien.

Stade 3: L'ovocyte s'accroît sensiblement de 15 à environ 200 μm . L'enveloppe folliculaire l'entoure à présent complètement. Cette enveloppe a pour fonction de nourrir et de protéger l'ovocyte au cours de son développement, elle joue un rôle majeur dans le processus complexe de la maturation et l'ovulation de l'œuf (Janssen, 1985). L'enveloppe folliculaire est composée de deux assises de cellules, la granulosa et la thèque, séparées de l'ovule par une membrane nommée zona radiata (Bardakci *et al.*, 2000).

Stade 4: L'accumulation des réserves nutritives (vitellogenèse) commence. La première phase, le stade d'alvéoles corticales, est caractérisée par une accumulation de vésicules vitellines, dont l'origine est l'ovocyte lui-même (de Graaf, 1994). Le micropyle, orifice microscopique percé dans la membrane de l'ovocyte, devient visible par une invagination des cellules de l'enveloppe folliculaire (granulosa) (Janssen, 1985).

Stade 5-6-7: C'est la phase de vitellogenèse exogène. L'ovocyte s'agrandit jusqu'à sa taille finale de 1000-1200 μm (de Graaf, 1994), cette croissance étant surtout due à l'accumulation de protéines vitellines d'origine hépatique, la vitellogénine (Bardakci *et al.*, 2000). Lorsque la synthèse protéique du vitellus et son accumulation dans le cytoplasme de l'ovocyte s'achèvent, le noyau de celui-ci (200 μm) se trouve bien au centre (Janssen, 1985). A chaque phase de la vitellogenèse, les ovocytes peuvent être résorbés par la paroi ovarienne (Hibiya, 1982).

Au terme du stade 7, l'ovocyte peut demeurer inchangé pendant quelques temps en attendant les facteurs de l'environnement favorables à la maturation finale et à l'ovulation (la rupture folliculaire et l'expulsion des ovocytes dénudés dans la cavité ovarienne ; figure 12) (Janssen, 1985). En l'absence de ces facteurs, les ovocytes dans cette phase "dormante" sont résorbés (de Graaf, 1994). Les ovaires des femelles en pleine période de reproduction sont essentiellement composés de cellules primitives (stade 1), et des ovocytes dans la phase dormante (stade 7). La maturation finale est caractérisée par la création du disque adhésif, la migration du noyau vers le pôle animal (juste en-dessous du micropyle) et la disparition de la membrane du noyau (Janssen, 1985). C'est à ce moment que l'ovule entreprend sa première méiose, expulsant le premier globule polaire (de Graaf, 1994). L'ovule, jusqu'à présent tenue par le follicule est libéré par des enzymes. Les ovules, mûrs pour la fécondation, tombent alors dans la cavité ovarienne (Janssen, 1985). La seconde méiose se produit après la fécondation (Hibiya, 1982).

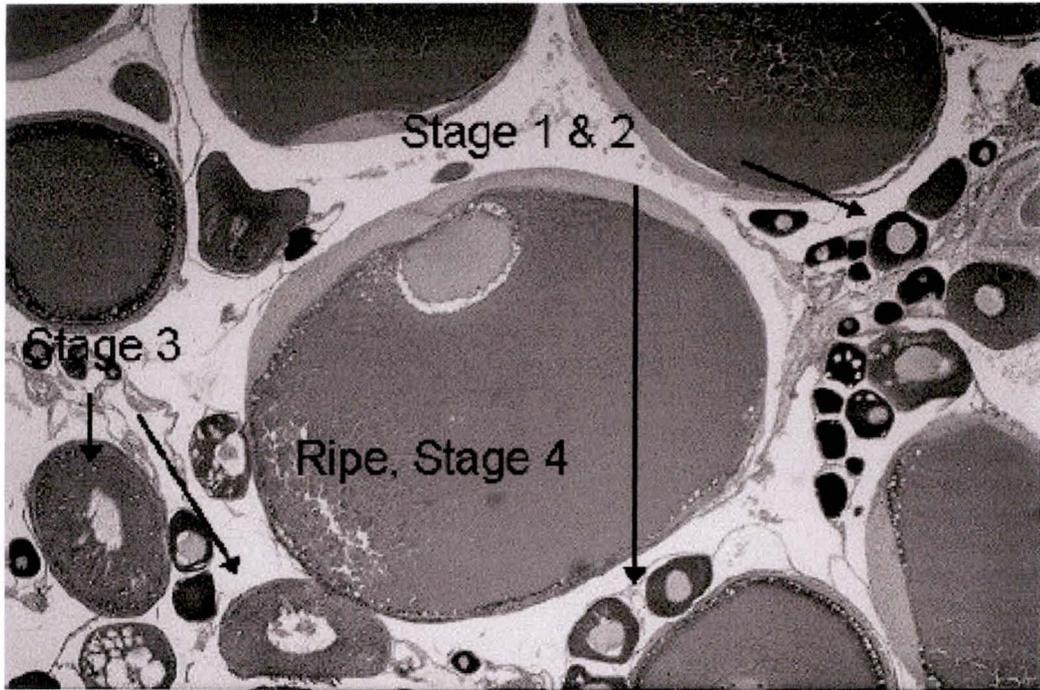


Figure 11 : Section histologique d'un ovaire de poisson-chat africain avec les différents stades du développement de l'ovocyte (de Graaf et Janssen, 1996).

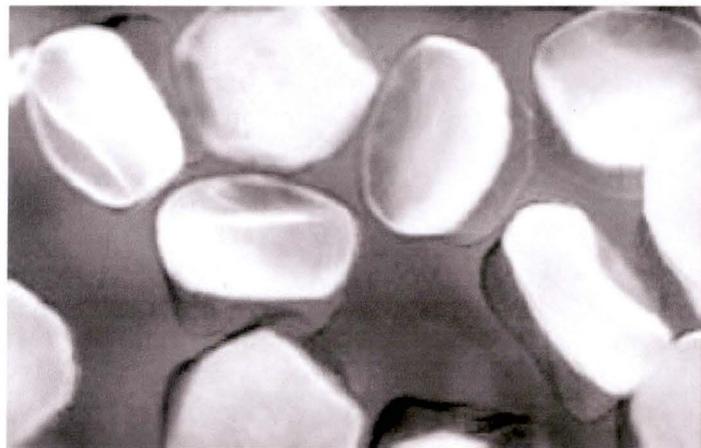


Figure 12 : Œufs ovulés de *C. gariepinus* (de Graaf et Janssen, 1996).

2.4.2. Spermatogenèse.

Comme les gamètes mâles n'apportent aucune substance de réserve à l'œuf, contrairement à l'ovocyte, la spermatogenèse ne comporte pas de phase de grand accroissement (Mellinger, 2002). D'abord, les lobules contiennent de grandes cellules souches spermatogoniales isolées, entourées par des cellules de Sertoli, de petites spermatogonies et des groupes de spermatogonies entourés aussi par des cellules de Sertoli, formant des cystes intralobulaires. De grands amas de cellules de Leydig sont présents dans les interstices (Cavaco *et al.*, 1997). Donc, dans un premier temps, la spermatogonie est une grande cellule ovale avec un nucléole rond. Dans les étapes de prolifération qui suivent, il est plutôt petit et rond (Hibiya, 1982). En fait, les spermatogonies sont les cellules germinales mâles, qui permettent de produire continuellement du sperme pour les générations suivantes. Dans les testicules, ce sont les seuls à avoir la propriété de proliférer par divisions mitotiques et de se différencier (Hong *et al.*, 2004). Les différents stades de la spermatogenèse sont présentés à la figure 13.

Après l'étape de prolifération, les spermatogonies se transforment en spermatocytes primaires. Ceux-ci subissent une division réductionnelle (méiose) pour former des spermatocytes secondaires, mais contenant toujours de l'ADN diploïde. Donc, à ce niveau, il a des spermatocytes à différents stades de développement que l'on retrouve près des spermatogonies. Les cellules de Leydig deviennent dispersées. Ce n'est que lorsque les spermatocytes secondaires se diviseront en quatre cellules égales, les spermatides, que l'on obtiendra des gamètes mâles haploïdes. A partir de ce moment, les lobules sont grands et on trouve non seulement des cystes avec des spermatogonies et des spermatocytes, mais aussi avec spermatides (Hibiya, 1982 ; Hong *et al.*, 2004 ; Cavaco *et al.*, 1997).

La différenciation cellulaire des spermatides en spermatozoïdes parachève la spermatogenèse: c'est la spermiogenèse. Cette dernière comprend l'élimination du cytoplasme résiduel, la condensation de la chromatine, correspondant à une inactivation totale des gènes, et le développement d'un appareil locomoteur flagellaire, ainsi que d'un grain de sécrétion, l'acrosome, qui contient les hydrolases nécessaires à la dissolution transitoire de l'enveloppe primaire de l'œuf au point de pénétration du spermatozoïde (Mellinger, 2002). A ce stade, il y a dès lors des cellules de toutes les étapes de la spermatogenèse. Notons également que le poisson-chat Africain possède un sperme très concentré ($8.2 \cdot 10^9$ cellules par ml) en spermatozoïdes (Mansour *et al.*, 2003).

2.5. Vitellogenèse.

La vitellogenèse, qui se déroule sous le contrôle de l'oestradiol (E₂ ; figure 14), comprend deux grandes étapes chez les Téléostéens: la vitellogenèse endogène et exogène (cfr 2.4.1.). C'est durant cette dernière étape que l'ovocyte subit sa plus grande phase de croissance, puisque la vitellogénine, produite au niveau du foie, est alors incorporée dans l'ovocyte par micropinocytose. De la sorte, les vésicules vitellines, de nature lipoprotéique et possédant une membrane distincte, voient leur nombre et leur taille augmenter pendant cette phase. Dès lors, la plus grande partie du cytoplasme est rapidement envahi par ces vésicules qui, finalement, se déplacent vers la périphérie de l'ovocyte pour former les alvéoles corticales. Leur contenu est expulsé de la cellule (exocytose) au moment de la fécondation: c'est un signe typique de l'activation de l'œuf. Leur contenu contribue notamment à la formation de l'espace périvitellin, rempli de ce gel. Leur fonction est avant tout de participer au système de lutte contre la polyspermie, et de cette façon assurer la fécondation monospermique de l'œuf (Mellinger, 2002).

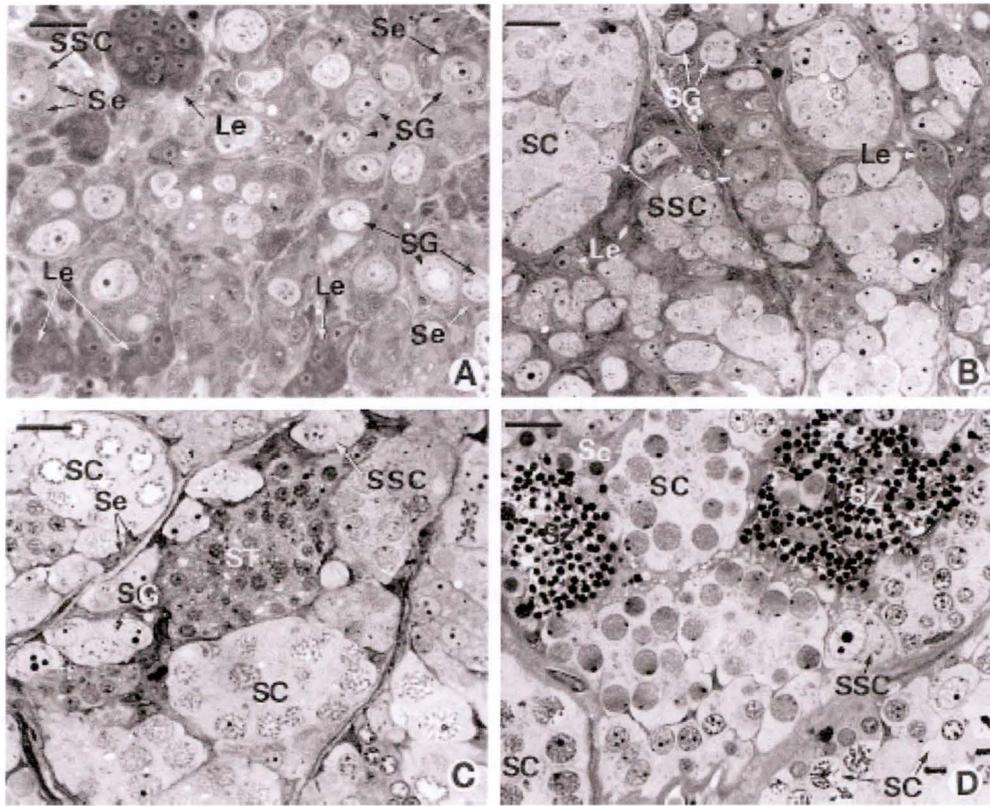


Figure 13 : Section dans un testicule de poisson-chat africain à différents stades de la spermatogenèse. SSC, cellules souches spermatogoniales; Se, cellules de Sertoli; SG, petites spermatogonies; Le, cellules de Leydig; SC, spermatocytes; ST, spermatides; SZ, spermatozoïdes (Cavaco *et al.*, 1998).

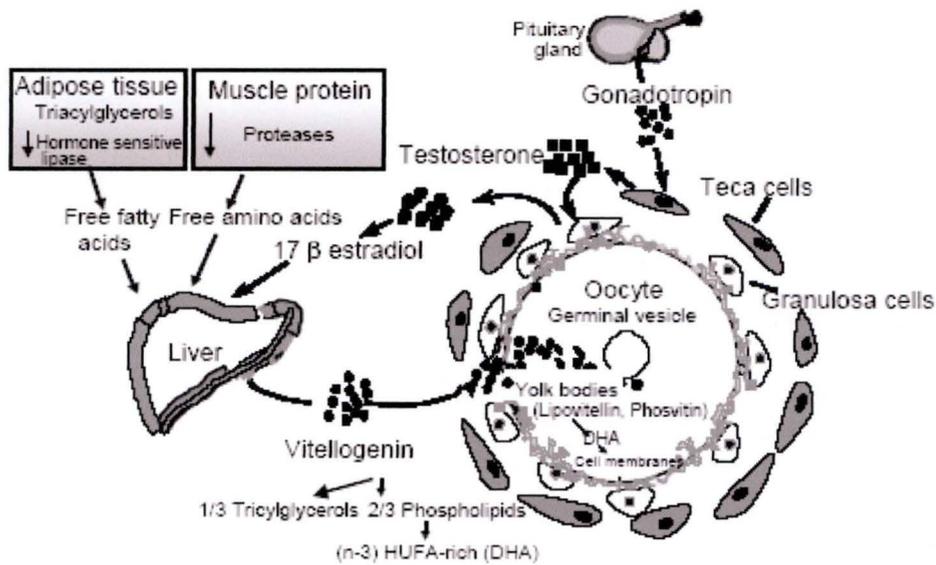


Figure 14 : Régulation hormonale de la vitellogénèse chez les poissons téléostéens (Carrillo *et al.*, 2000).

2.6. Embryogenèse et développement larvaire.

Chez les Siluridés, après la fertilisation, les œufs absorbent plus ou moins d'eau (osmose), le chorion se distend, durci sous l'action d'enzymes et se sépare de la membrane vitelline en formant l'espace périvitellin. Le durcissement du chorion assure la protection de l'embryon pendant les premiers stades de développement (Tucker, 1985). Les œufs fertilisés de *Clarias gariepinus* sont petits et en forme de lentilles, avec un diamètre moyen de 1,5 mm. Leur couleur est rougeâtre-brun ou brunâtre-vert. Ils présentent un disque adhésif de même diamètre que celui de l'œuf (figure 15). Ce dernier contient une substance élastique qui lui permet d'adhérer au substrat. Comme chez d'autres poissons-chat, les œufs sont très sensibles aux chocs mécaniques lors des premières étapes de l'embryogenèse (Peteri *et al.*, 1992). Les différentes étapes du développement de l'œuf fécond sont présentées à la figure 15.

La durée du développement embryonnaire, dans une eau normalement oxygénée, dépend essentiellement de la température de l'eau (tableau 3). Ainsi, Haylor et Mollah (1995) démontrèrent que les œufs de *Clarias gariepinus* peuvent éclore à une température ambiante de l'eau comprise entre 15 et 35°C, toutefois le taux d'éclosion est significativement plus élevé à 30°C (tableau 4). A 15°C, les embryons ne survivent pas. Chez les Siluridés, une heure après la fertilisation, le quatrième clivage est terminé et le pôle animal est formé (blastodisque). Ensuite, pour le poisson-chat africain, neuf heures suffisent à l'embryon pour se développer à une température de 25-27°C. A cette température, l'éclosion commence 23-28 heures après la fertilisation pour ce terminer 2-3 heures plus tard. Les différentes étapes de l'embryogenèse comprennent notamment le mouvement des cellules du blastodisque, qui recouvrent le pôle végétal (épibolie), suivi de la différenciation des tissus et l'apparition des organes (Peteri *et al.*, 1992 ; Cardoso *et al.*, 1995). Quant à la vésicule séminale, il semblerait qu'elle soit formée au début de la spermatogenèse, comme une simple protusion de la paroi du spermiducte et qu'elle se complexifie avec l'âge (Cruz et dos Santos, 2004).

Les larves qui viennent d'éclore ont une taille de 3,5 à 4 mm et nagent activement, directement après l'éclosion. Ceci suppose que le poisson est suffisamment développé pour survivre sans la protection du chorion. Les larves disposent d'une réserve vitelline sur la partie ventrale de leur corps, leur permettant de s'alimenter juste après l'éclosion. A ce moment, leur couleur est rouge. Le sac vitellin sera complètement résorbé après cinq jours, mais les larves se nourrissent déjà d'aliments extérieurs après le deuxième ou troisième jour, car la bouche se développe assez rapidement. La couleur de la larve est alors plutôt noire. Simultanément, les barbillons commencent à se former. Les différentes étapes du développement embryonnaire et larvaire sont visibles sur la figure 16 (Peteri *et al.*, 1992).

2.7. Contrôle de la reproduction.

2.7.1. Régulation générale de la reproduction.

Chez *Clarias gariepinus*, comme chez les autres téléostéens, les fonctions gonadiques sont contrôlées par des hormones gonadotropes (GTH), produites par la glande hypophysaire. En conséquence, les cellules produisant les GTH jouent un rôle central dans la reproduction. Deux formes moléculaires de GTH ont été démontrées chez le saumon: la GTH I, qui est impliquée dans la gamétogenèse, et la GTH II, qui contrôle plutôt la maturation final de l'ovocyte et l'ovulation. Cependant, seule la GTH II a pu être mise en évidence chez le poisson-chat Africain (Goos et Richter, 1996). Sa sécrétion est contrôlée par une neuro-hormone, la GnRH, produite au niveau de l'hypothalamus. Cette dernière est libérée suite à

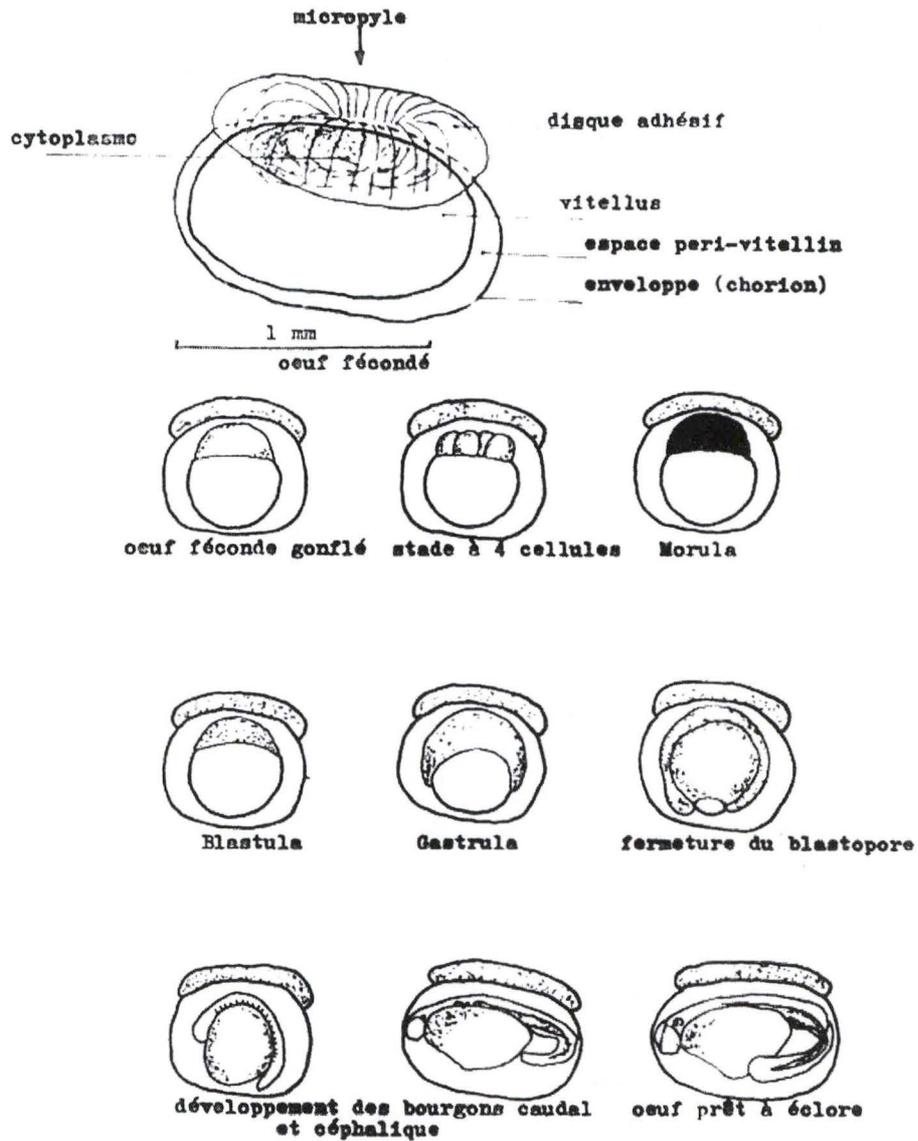


Figure 15 : Développement de l'œuf fécondé (Janssen, 1985).

Périodes d'incubation (h)	Températures de l'eau (°C)
57	20
46	21
38	22
33	23
29	24
27	25
25	26
23	27
22	28
21	29
20	30

Tableau 3 : Longueur de la période d'incubation des œufs de *C. gariepinus* à différentes températures (Peteri *et al.*, 1992)

réception de stimuli externes tels que la température, les précipitations ou encore la présence d'un poisson du sexe opposé (Janssen, 1985). Il existe aussi deux types de GnRH: l'une étant identique à la GnRH de poulet (s-GnRH I) et l'autre (c-GnRH II) étant spécifique uniquement à deux espèces de poissons-chat, l'africain et le thaïlandais (*Pangasius hypophthalmus* ; Goos et Richter, 1996).

Les gonadotropines ont pour effet de stimuler la spermatogenèse, notamment via une augmentation de la production de 11-kétotestotérone (11-KT), de stimuler l'ovogenèse à travers une hausse de la production d'oestrogène et de vitellogénine, et d'induire la maturation finale de l'ovocyte et l'ovulation (Goos et Richter, 1996). De fait, les gonadotropines ont pour effet de stimuler la production des oestrogènes, ou des androgènes de type stéroïde. Celles-ci sont le dernier maillon des événements de la reproduction. Ils sont donc responsables de la maturation et l'ovulation des gamètes (Janssen, 1985). Notons également qu'une activité inhibant la libération de gonadotrophines (GRIF) a été démontrée chez *Clarias gariepinus*. Il s'agit surtout de la dopamine, qui a pour effet de diminuer la sécrétion de GTH (Goos et Richter, 1996).

2.7.2. Initiation de la puberté

La puberté chez le mâle est considérée comme la période qui commence avec la multiplication spermatogoniale, vers l'âge de trois mois, et qui fini quand la première vague de la spermatogenèse est complétée, vers l'âge de six mois (Cavaco *et al.*, 1997). Des expériences menées par Cavaco *et al.* (1998) montrèrent que la 11-KT, le principal stéroïde circulant chez les poissons mâles, était physiologiquement l'androgène le plus important pour l'initiation de la spermatogenèse, et le développement des caractéristiques sexuelles secondaires. A l'inverse, d'autres expériences ont mis en évidence qu'un traitement à la testostérone active la maturation des gonadotrophines et accélère le développement du système GnRH hypothalamique, via l'élévation de la sécrétion de GTH (Cavaco *et al.*, 2001 *b* ; Dubois *et al.*, 1998). Des résultats similaires ont également été obtenus chez la carpe commune (Consten *et al.*, 2002). A l'adolescence, qui dure de six à douze mois, il y a une augmentation des niveaux plasmatiques de 11-KT, ce qui provoque une différenciation morphologique et fonctionnelle des cellules de Leydig, principalement impliquées dans la synthèse des stéroïdes sexuelles. Ainsi, cela prouve encore que la 11-KT est une hormone essentielle dans le développement du système reproducteur des poissons-chat Africain (Schultz *et al.*, 1997).

2.7.3. Influence des principaux stéroïdes sexuels sur le système reproducteur.

2.7.3.1. Testostérone.

Si il s'agit de la principale hormone régulant la spermatogenèse chez les mammifères, cela n'est pas du tout le cas chez les Téléostéens, car ce rôle est rempli par la 11-KT (McLachan *et al.*, 1996). Donc, la testostérone ne joue pas un rôle primordial dans le contrôle de la production du sperme (Cavaco *et al.*, 1998). Chez les Téléostéens, ce stéroïde est présent à la fois chez les deux sexes, puisque celui-ci est l'un des principaux précurseurs de la synthèse de la 11-KT, mais aussi de l'E2. De fait, le taux de testostérone peut atteindre des valeurs plus élevées chez les femelles que chez les mâles, surtout vers la fin de la vitellogenèse, lorsqu'il n'est plus utilisé pour la formation d'E2 (Kime, 1998). Par ailleurs, il semblerait que la testostérone puisse inhiber l'effet stimulant de la 11-KT sur la spermatogenèse (Cavaco *et al.*, 2001 *a*).

Température (°C)	20	22	24	26	28	30	32	34	35
Temps (jours) pour :									
1. Eclosion	2,36	1,73	1,37	1,13	0,96	0,84	0,74	0,67	0,63
2. Première alimentation	4,78	3,51	2,77	2,29	1,95	1,70	1,50	1,35	1,28
3. Résorption du sac vitellin	6,49	4,76	3,76	3,10	2,64	2,30	2,04	1,83	1,74

Tableau 4 : Influence de la température sur les premiers stades de développement de *Clarias gariepinus* (Haylor et Mollah, 1995).

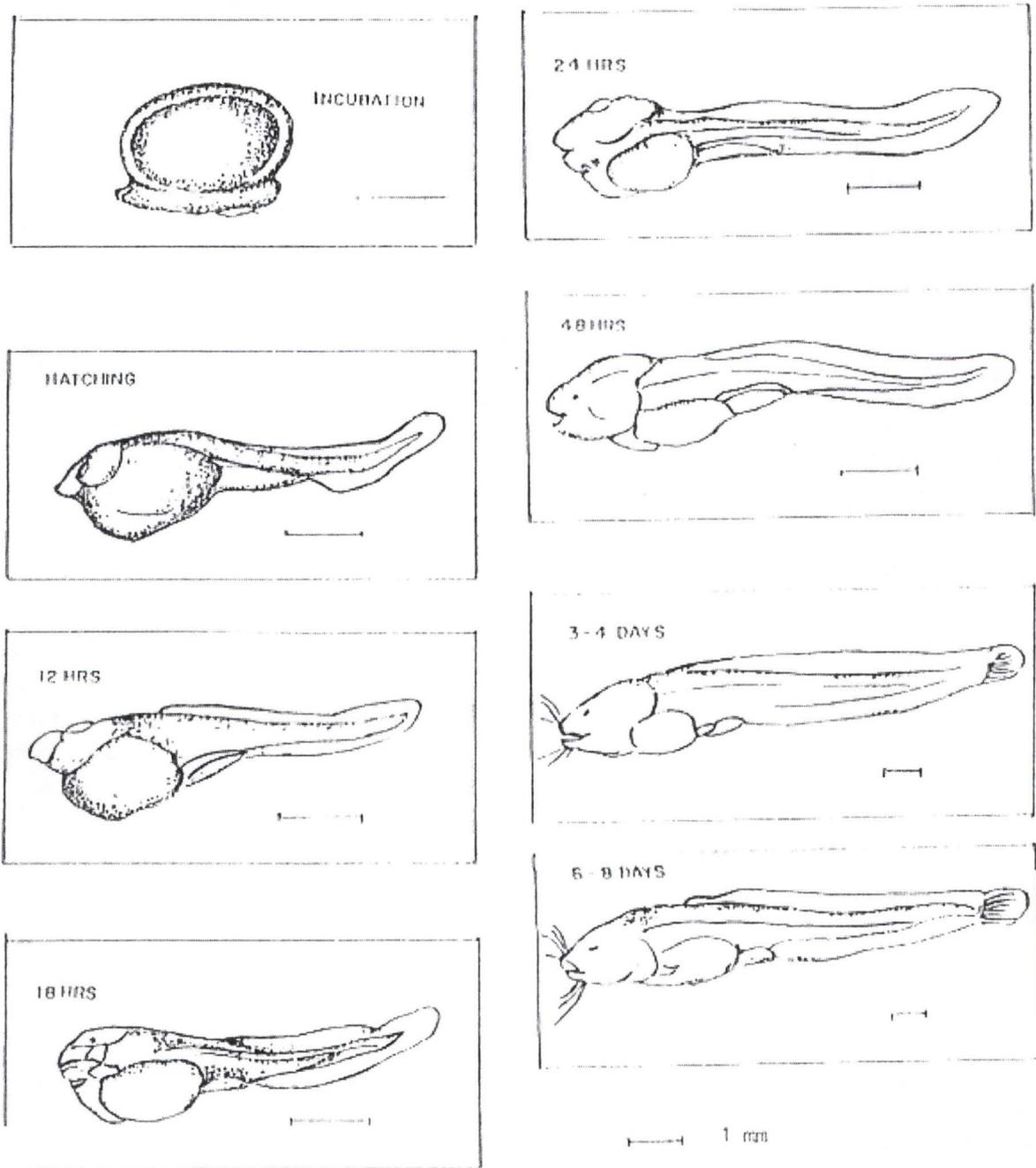


Figure 16 : Différentes étapes du développement larvaire du poisson-chat africain (Peteri et al., 1992)

2.7.3.2. 11-kétotestostérone.

Si la 11 β -Hydroxyandrosténédione (OHA) est le principal stéroïde testiculaire chez le poisson-chat africain, dans le plasma, c'est la 11-KT qui prédomine (figure 17), indiquant une conversion hépatique de OHA en 11-KT (Cavaco *et al.*, 1997). Chez l'anguille japonaise (*Anguilla japonica*), comme chez les carpes, la 11-KT, sécrétée par les cellules de Leydig, active les cellules de Sertoli qui, à leur tour, vont induire toutes les étapes de la spermatogenèse (Miura *et al.*, 1991 ; Yaron, 1995). Quant à la spermiation, chez le poisson-chat américain (*Ictalurus punctatus*), elle semble être déclenchée par une augmentation de la concentration plasmatique en 11-KT (Tucker, 1985). Cela est également le cas chez *Clarias gariepinus*. De plus, ce stéroïde est impliqué dans un feedback négatif sur la sécrétion de GnRH et de GTH, mais cela est également le cas de la testostérone (Goos et Richter, 1996).

2.7.3.3. Oestradiol.

L'oestradiol, l'hormone majeure des Téléostéens femelles, est produite dans les membranes folliculaires des ovocytes en développement. Cette membrane comporte deux parties: la thèque, qui contribue à la synthèse de l'E2 en produisant de la testostérone, et la granulosa, qui convertit la testostérone en E2. Le rôle de celle-ci est de stimuler la production de la protéine de réserve de l'œuf, la vitellogénine, qui sera par la suite incorporée dans l'ovocyte (Kime, 1998), la prolifération des ovogonies ne nécessitant pas l'intervention d'hormones (Tucker, 1985). Donc, l'E2 autorise la croissance des ovocytes, mais n'intervient pas dans la maturation finale de ceux-ci (Yaron, 1995). Tout comme la 11-KT, l'oestradiol a une fonction de feedback négatif envers le système hypothalamo-hypophysaire pour réguler la libération des gonadotrophines (Kime, 1998).

2.7.3.4. Progestagènes.

Chez *Clarias gariepinus*, les progestagènes sont surtout impliqués dans la maturation finale des gamètes, essentiellement en ce qui concerne le 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogestérone (17 α ,20 β -P) (Goos et Richter, 1996). De fait, chez les Téléostéens, la motilité du sperme est acquise sous l'effet du 17 α ,20 β -P (mais pas de la testostérone ou de la 11-KT) sur le spermiducte pour élever le pH. Cela est associé à une augmentation de la concentration spermique en AMPc. De plus, la maturation finale de l'ovocyte se fait aussi sous l'influence du 17 α ,20 β -P. Ainsi, la vésicule germinale migre vers le pôle animal et disparaît, cette étape étant appelée 'germinal vesicle breakdown', ce qui indique l'achèvement de la première prophase (Yaron, 1995).

2.8. Expression de l'aromatase P450.

Chez les poissons, mâles comme femelles, les oestrogènes jouent une fonction essentielle dans la coordination des réponses au niveau du déroulement de la différenciation sexuelle et des cycles reproducteurs des adultes chez les vertébrés. Donc, l'aromatase cytochrome P450, produit issu du gène *CYP19*, est l'enzyme stéroïdogénique clef qui catalyse la conversion des androgènes C19 en oestrogènes C18. Cette conversion s'effectue via une aromatisation et un clivage de la chaîne latérale des stéroïdes sexuels C19. Le complexe enzymatique est composé de l'aromatase cytochrome P450 et de la flavoprotéine NADH-cytochrome P450 réductase, ce complexe se situant au niveau du réticulum endoplasmique (Akhtar *et al.*, 1997).

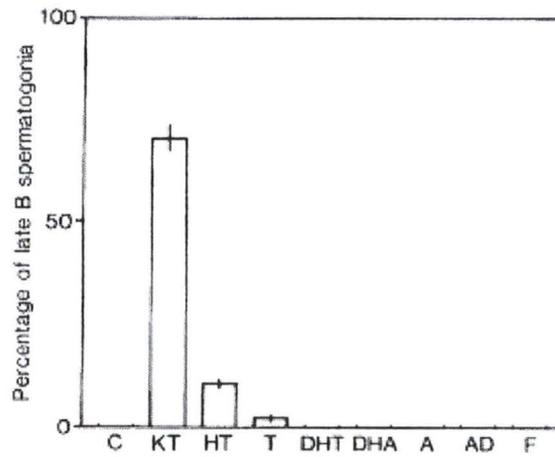


Figure 17 : Effets de différents stéroïdes hormonaux sur l'induction des mitoses *in vitro*. Les fragments testiculaires ont été mis en culture avec les stéroïdes hormonaux pendant 15 jours. C, contrôle; KT, 11-kétotestostérone; HT, 11 β -hydroxytestostérone; T, testostérone; DHT, 5 β -dihydrotestostérone; DHA, déhydroépandrostérone; A, androstérone; AD, androsténédione; F, cortisol (Mirua *et al.*, 1991).

Chez les téléostéens, deux isoformes d'aromatase *CYP19*, structurellement différents, ont été décrites puisqu'ils ne partagent que 60% d'identité, et qu'ils sont le produit de différents loci du gène *CYP19*. De cette manière, *CYP19A1* est surtout exprimé dans les ovaires et est impliqué dans la différenciation sexuelle et la croissance de l'ovocyte, tandis que *CYP19A2* code quant à lui pour l'aromatase au niveau du cerveau et joue un rôle dans le développement du système nerveux central et dans les comportements sexuels (Kashida et Callard, 2001 ; Tchoudakova *et al.*, 2001). En outre, la participation de l' « aromatase du cerveau » dans la physiologie reproductive, à travers l'axe cerveau-hypophyse-gonades, a été suggérée chez les poissons (Cavaco *et al.*, 2001). Kishida *et al.* (2001) ont également constaté, chez des juvéniles de poissons zèbres (*Danio rerio*), que l'oestradiol régula l'expression du gène *CYP19A2*, mais pas la transcription de *CYP19A1*.

Récemment, une étude réalisée par Kazeto *et al.* (2001) sur les éléments régulant la transcription des gènes *CYP19A1* et *CPY19A2* a mis en évidence que ces gènes étaient d'excellentes cibles transcriptionnelles pour mettre en lumière les perturbations endocriniennes. Cependant, il faut être prudent en ce concerne l'utilisation de l'aromatase en tant que biomarqueur, et l'interprétation d'un changement dans la production de cette enzyme. De la sorte, une variation saisonnière de l'activité de l'aromatase P450 située au niveau de l'ovaire fut démontrée chez le poisson-chat américain par une expérience de Trant *et al.* (1997), celle-ci étant corrélée avec des changements plasmatiques en oestradiol. La recrudescence ovarienne et la présence de transcrits d'aromatases durant la saison d'automne correspondent à une élévation de la synthèse en oestradiol, alors qu'en été, ceux-ci sont indétectables, ce qui suppose que l'activité ovarienne est extrêmement faible, voire inexistante à cette période.

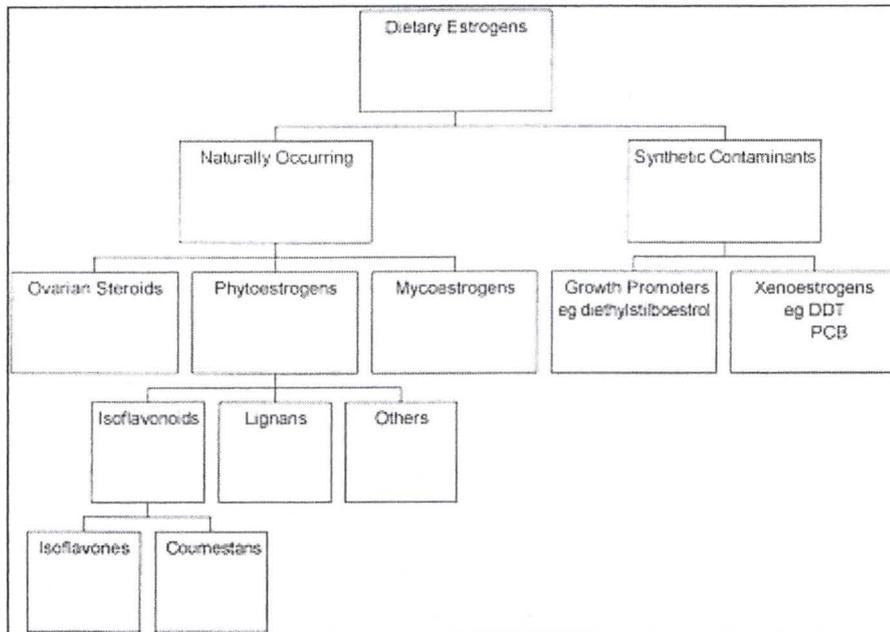


Figure 18 : Source et classification des oestrogènes alimentaires (Murkies *et al.*, 1998).

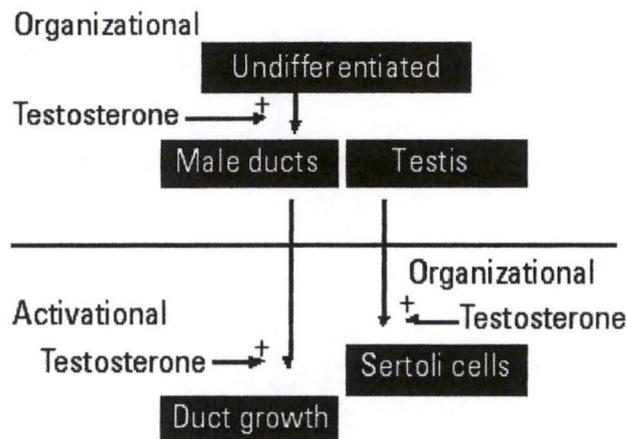


Figure 19 : Une simple représentation du modèle organisationnel par rapport au modèle activationnel. Chez les vertébrés, le développement du conduit reproducteur, induit par la testostérone, serait un effet d'organisation, tandis que la stimulation de la croissance et de la sécrétion par la testostérone du conduit reproducteur, après la puberté, est plutôt activationnel (Guillette *et al.*, 1995).

3. Influence de l'alimentation sur la reproduction.

3.1. Phyto-oestrogènes.

3.1.1. Généralités sur les phyto-oestrogènes.

Récemment, de nombreux produits chimiques déchargés dans l'environnement (pesticides, produits industriels, détergents,...) ont été considérés comme ayant des effets néfastes sur le statut reproducteur de l'homme et des animaux sauvages (figure 18). Il s'agit des xénobiotiques ou perturbateurs endocriniens (EDCs). Un grand nombre de ces EDCs ont une activité oestrogénique, et ils sont donc présumés influencer l'activité reproductrice de l'être humain et des animaux. Depuis que ces substances oestrogéniques entrent dans le milieu aquatique, puisque celui-ci constitue bien souvent le réceptacle terminal des polluants émis, cela augmente la possibilité que ces composés aient des effets aversifs sur la différenciation sexuelle et la reproduction des animaux aquatiques, spécialement les poissons qui occupent une position élevée dans le réseau alimentaire aquatique (Kime, 1998).

De fait, ces xénobiotiques se sont révélés capables d'interférer avec le système endocrinien, particulièrement sensible à de faibles doses d'EDCs, provoquant ainsi un dysfonctionnement dans le bon déroulement de la reproduction. En outre, ces perturbations peuvent altérer directement les organes sexuels par des dégradations de leur structure et/ou de leur fonctionnement (Kime *et al.*, 1999). Une complète compréhension de l'influence des EDCs dans la nature peut seulement se faire après avoir considéré à la fois les altérations organisationnelles et activationnelles (figure 19). Le modèle organisationnel suggère qu'une petite quantité d'un EDC, administré pendant une période spécifique du développement embryonnaire, peut modifier de manière permanente l'organisation des systèmes reproducteurs, immunitaires et nerveux. A l'inverse, le modèle activationnel propose qu'un EDC, chez les individus matures, altère temporairement le fonctionnement d'un tissu normalement organisé (Guillette *et al.*, 1995).

Actuellement, beaucoup de phyto-oestrogènes, substances que l'on retrouve dans les cellules des plantes, ont été identifiés comme étant des perturbateurs endocriniens. De fait, le mécanisme d'action des EDCs et des phyto-oestrogènes est similaire, puisque tous sont des ligands pour les récepteurs oestrogéniques. Ceux-ci sont très importants pour la croissance et le développement normal des plantes. Leurs principales fonctions sont de protéger ces dernières contre les organismes phytopathogènes et les radiations UV, de faire fuir les herbivores, de servir d'attractants pour certains insectes ou encore d'être utilisés comme signal de recrutement pour les bactéries symbiotiques du sol. De cette façon, les isoflavonoïdes jouent un rôle primordial dans l'établissement de la fixation symbiotique de l'azote chez la plante de soja. Ces substances sont présentes dans plus de 300 plantes (Price et Fenwick, 1985 ; Fox *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2000).

Pour les animaux, ces molécules sont des contaminants alimentaires, qui ont un grand intérêt biologique puisqu'ils présentent aussi bien des actions oestrogéniques qu'anti-oestrogéniques, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Price et Fenwick, 1985). Elles proviennent de familles chimiques très variées (isoflavones, isoflavanes, coumestanes, lignans et stylbens), et leur structure chimique présente des similarités avec l'oestradiol (figure 20), leur conférant de la sorte une activité oestrogénique (Latonnelle *et al.*, 2002 a). A l'instar des EDCs, ces composés ont donc des effets néfastes sur le développement sexuel des poissons, ainsi que sur le système endocrine, entravant la reproduction normale de ceux-ci (Latonnelle *et al.*, 2002 b).

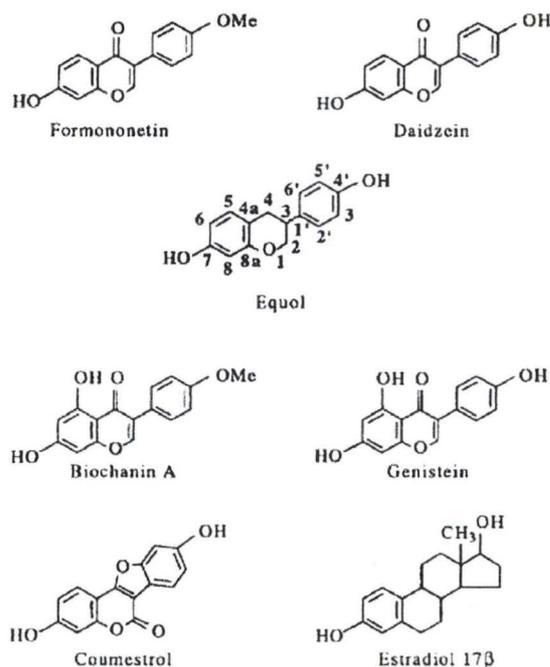


Figure 20 : Structure chimique de différents phyto-oestrogènes comparés à l'oestrogène naturel: 17β-oestradiol (Pelissero *et al.*, 1991 a).

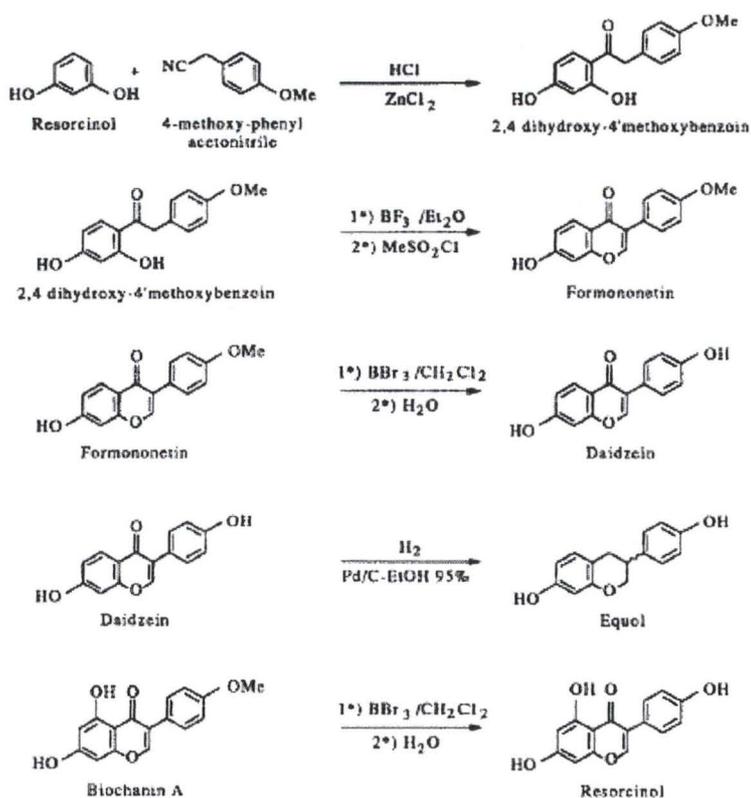


Figure 21 : Réactions chimiques de synthèses de différents phyto-oestrogènes (Pelissero *et al.*, 1991 a).

Toutefois, de nombreux auteurs s'accordent pour supporter l'hypothèse que la consommation humaine de phyto-oestrogènes contribue à diminuer le risque de maladies cardio-vasculaires, et qu'ils servent donc de 'cardioprotecteurs', via des effets directs sur les lipides, tel qu'une diminution du taux de cholestérol (Price et Fenwick, 1985). Chez les poissons, leur ingestion ne semble pourtant pas affecter les niveaux plasmatiques en cholestérol, ni des femelles, ni des mâles (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001). De plus, chez l'homme, ils auraient aussi un rôle bénéfique dans la protection contre différentes sortes de cancers (colon, prostate, ovaire et sein), l'ostéoporose, la dégénérescence des fonctions cognitives (Murkies *et al.*, 1998), cela étant surtout valable pour le génistéine (figure 20), phyto-oestrogènes de la famille des isoflavones (Dixon et Ferreira, 2002). D'autres propriétés, comme l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et les effets anti-oxidants, peuvent également être importantes (Price et Fenwick, 1985). De même, ils ont un potentiel médical bénéfique dans le traitement des symptômes ménopausaux (Murkies *et al.*, 1998).

Il paraît donc évident que les embryons peuvent être soumis à des phyto-oestrogènes, de manière naturelle ou non, mais cette exposition est généralement inoffensive, parce que les embryons sont exposés habituellement à des sources oestrogéniques exogènes (plantes), via l'alimentation quotidienne de la mère. Cette hypothèse est soutenue par l'observation que les herbivores, broutant différentes plantes qui contiennent des phyto-oestrogènes, peuvent transporter ces derniers vers leurs jeunes en développement, sans que cela ne les affectent en aucunes manières (Guillette *et al.*, 1995). Cependant, d'autres études ont démontrés que certains de ces composés peuvent naturellement entraver la reproduction des animaux, dont celle des poissons (Pelissero *et al.*, 1991 b).

Par exemple, les phyto-oestrogènes présents dans les herbes séchées diminuent le rendement reproducteur des populations sauvages de cailles californiennes et de souris communes. De cette manière, la maladie du trèfle dans le bétail, causée par présence de clous de girofle (*Trifolium subterraneum*) dans la nourriture de ces animaux, induit l'infertilité chez les adultes. Cependant, ces exemples sont des cas extrêmes dans l'action des phyto-oestrogènes. La plupart d'entre eux ne représentent pas une menace pour la santé des animaux, puisque ceux-ci y sont soumis quotidiennement à travers leur alimentation naturelle (Guillette *et al.*, 1995). De même, si des repas enrichis en daidzéine ou en génistéine affectent le développement sexuel des rats, l'expérience suggère que les phyto-oestrogènes ont des effets minimaux lorsqu'ils sont en concentrations alimentaires normales (Casanova *et al.*, 1999).

3.1.2. Classification et métabolisme des principaux phyto-oestrogènes.

Il existe trois grandes classes de phyto-oestrogènes: les isoflavones, les coumestans et les lignans, qui sont produits par l'une ou l'autre plante ou leur graine. Une plante contient souvent plus d'une classe de phyto-oestrogènes. Par exemple, le soja est riche en isoflavones, tandis que la pousse de soja est une source efficace de coumestrol, coumestran le plus important (Price et Fenwick, 1985). Les principales isoflavones, le génistéine et le daidzéine, existent généralement en tant que glucosides inactifs. Ils sont dérivés du biochanin A et du formononetin, précurseurs qui seront convertis respectivement en génistéine et daidzéine, après transformation par des glucosidases intestinales. Par la suite, le daidzéine est partiellement métabolisé en équol et en O-desméthylangiolensine (figure 21 ; Murkies *et al.*, 1998).

En fait, les isoflavones sont formés via une branche de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, et sont issus d'une flavone principale intermédiaire, qui est le naringenin dans le cas du génistéine (figure 22), la réaction de transformation étant contrôlée par une isoflavone

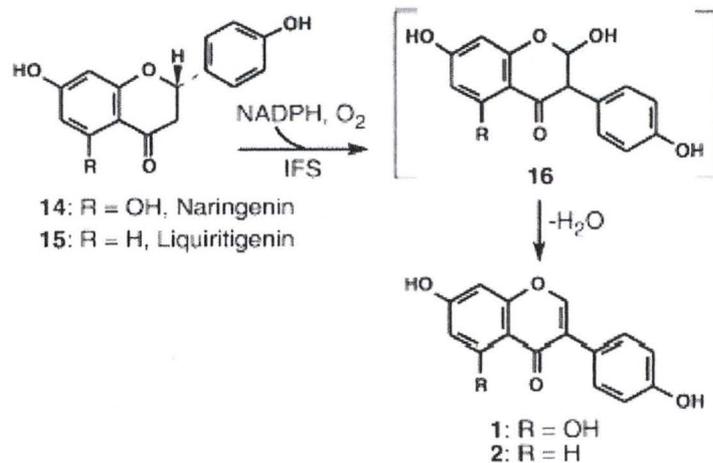


Figure 22 : Formation enzymatique des isoflavones à partir des flavones, via la réaction isoflavone synthase (Dixon et Ferreira, 2002).

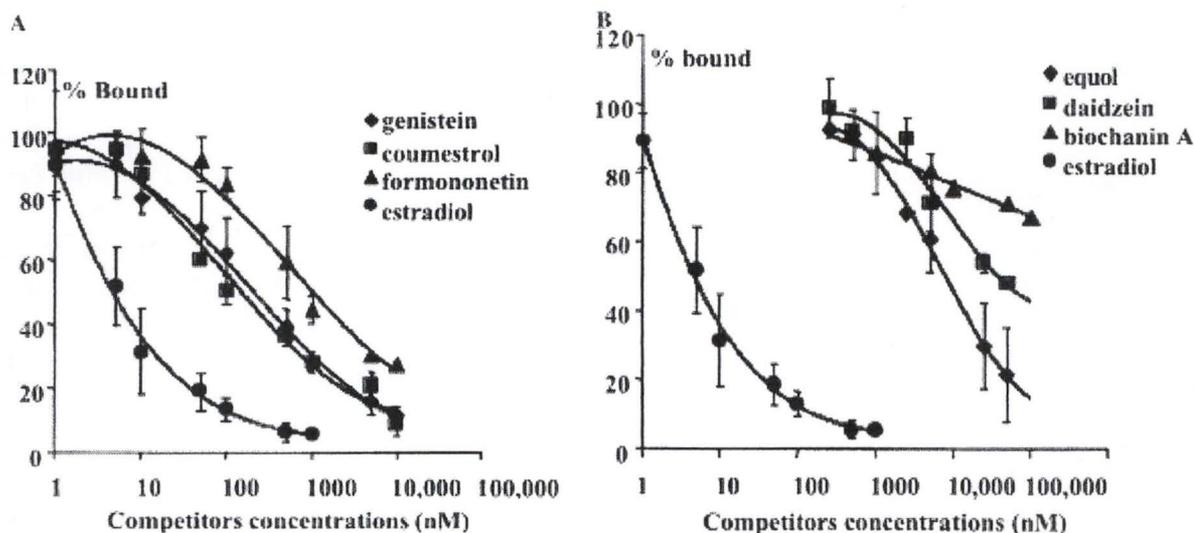


Figure 23 : Affinité des phyto-oestrogènes les plus forts (A) et les plus faibles (B) pour les récepteurs oestrogéniques (RE), comparés au déplacement de l'oestradiol à partir des RE, provenant d'extraits nucléaires hépatiques, par le 17β -oestradiol (régression polynômiale). Présentation logarithmique des concentrations en compétiteurs. Chaque point de repère est indiqué comme la moyenne d'un triplicat. Les barres représentent les écarts types (Latonnelle *et al.*, 2002 b).

synthase (Dixon et Ferreira, 2002). Les lignans oestrogéniquement actifs, entérodiol et entérolactone, sont dérivés du sécoisolaricirésinol et du matairésinol, que l'on retrouve dans les plantes. Ces précurseurs sont produits dans la couche aleuronique du grain, située près de la couche de fibres (Murkies *et al.*, 1998). Le formonétin est obtenu par cyclisation du 2,4-dihydroxy-4' méthoxybenzoïn, ce dernier étant formé par condensation du résorcinol avec le 4-méthoxy-phényl acétonitrile. Quant à l'équol, il a été obtenu par l'hydrogénation catalytique du daidzéine sur palladium/charcoal, utilisé comme catalyseur qui permet de réduire le groupe cétone et la double liaison de l'hétérocyclique. L'ensemble des réactions chimiques sont présentées à la figure 21 (Pelissero *et al.*, 1991 a).

3.1.3. Sources dans l'alimentation.

Les isoflavones faisant preuve d'une activité oestrogénique se situent presque exclusivement dans les légumes et les haricots (Price et Fenwick, 1985), alors que les lignans sont largement répandus dans les céréales, les fruits et les légumes. Ces derniers sont produits en grande quantité notamment dans la semence du lin de textile, et est en plus faible concentration dans les grains de céréales, les légumes, les fruits et les graines (Murkies *et al.*, 1998). Pour ce qui est des coumestrans, ils sont essentiellement synthétisés lors de la germination, comme par exemple dans les germes d'haricots ou les fourrages (Price et Fenwick, 1985).

3.1.4. Action des phyto-oestrogènes.

Latonnelle *et al.* (2002 a) ont constaté que les phyto-oestrogènes avaient *in vitro* une affinité élevée pour les récepteurs oestrogéniques (RE), aussi bien chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), que chez l'esturgeon sibérien (*Acipenser baeri*). Ces résultats dévoilent donc que ces composés peuvent perturber le système endocrinien par compétition pour les RE. Deux sous-ensembles furent identifiés: les compétiteurs plus forts, génistéine, coumestrol et formononétin; et les compétiteurs plus faibles, équol, daidzéine et biochanin A. Cette compétition avec l'oestradiol pour les sites de liaisons oestrogéniques est représentée à la figure 23. Une autre expérience *in vitro* démontra aussi que les phyto-oestrogènes sont capables de se lier aux RE des cellules cibles chez le rat (Casanova *et al.*, 1999).

3.1.4.1. Différenciation sexuelle.

Récemment, il a été reporté que des traitements aux EDCs causaient d'importantes perturbations dans le développement gonadal des poissons zèbres *Danio rerio*, à la fois des mâles et des femelles (Hill et Hanz, 2003). En outre, une exposition à de fortes doses d'isoflavones (1000 µg/L de génistéine) provoque l'apparition de gonades intersexes, caractérisées par la présence d'ovotestis, chez les mâles de medaka japonais (*Oryzias latipes*) au stade juvénile. De la sorte, le génistéine et l'équol altèrent le développement des ovaires et ovogenèse de la femelle, ainsi que la spermatogenèse chez les individus du sexe opposé (Kiparissis *et al.*, 2003). De la même façon, Tzchori *et al.* (2004) mirent en évidence que l'addition de phyto-oestrogènes, en concentration importante (2mg/kg de nourriture), dans l'alimentation pour anguilles européennes (*Anguilla anguilla*) peut affecter la différenciation sexuelle, et augmenter le pourcentage de femelles dans les populations captives d'anguilles. Ils en conclurent que les phyto-oestrogènes pouvaient donc être utilisés comme une alternative aux stéroïdes gonadiques pour les manipulations sexuelles sur les anguilles.

Paramètres analysés	Repas	
	Contrôle	Test
Chez les mâles		
Pourcentages de mâles spermiantes	71,48	76,92
Volume de sperme récolté (ml/kg)	5,84 ± 2,49	13,8 ± 1,73
Motilité (s)	42,2 ± 1,05	38,3 ± 0,99
Chez les femelles		
Fécondité relative	1240 ± 80	1448 ± 105
Pourcentage de femelles ovulantes	100	79
Pourcentage de femelles avec des oeufs viables	100	80
Pourcentage de survie au stade embryonnaire	77,8 ± 5,44	70,40 ± 11,42

Tableau 5 : Performances reproductives des truites arc-en-ciel mâles et femelles alimentées avec différents régimes (adapté de Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001).

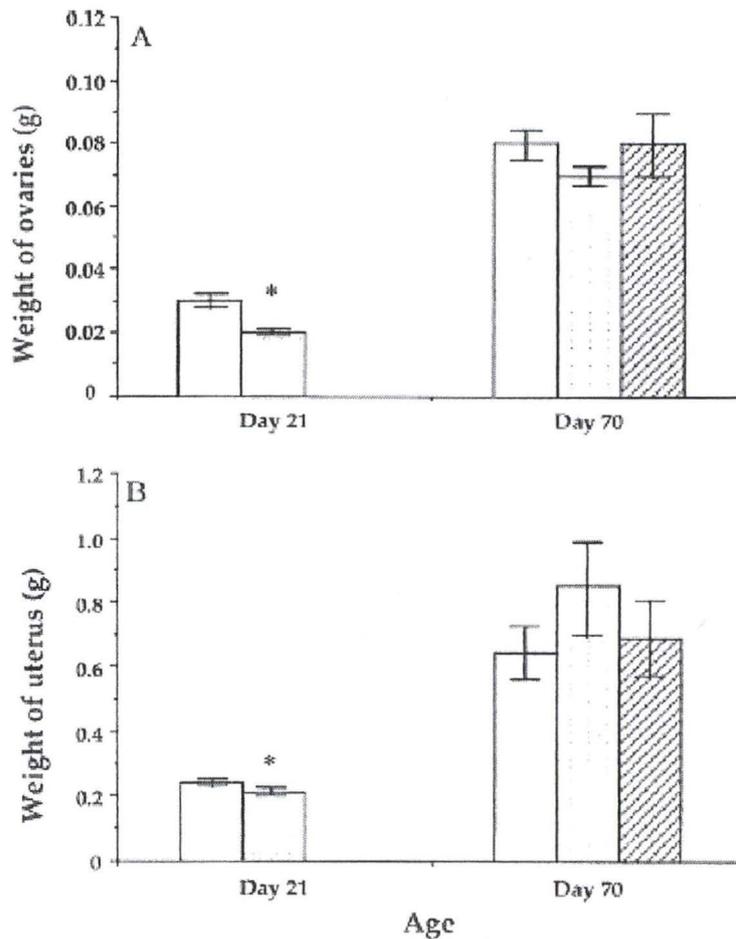


Figure 24 : Effets de l'exposition précoce de la génistéine sur le poids des gonades (A) et de l'utérus (B) chez les rats femelles à 21 et 71 jours de vie. Les *barres ouvertes* représentent les groupes de contrôle, les *barres pointillées* représentent les groupes exposés à la génistéine et les *barres rayées* représentent des groupes ex-génistéine. Pour chaque graphique, les barres avec un astérisque sont significativement différents des contrôles (Awoniyi *et al.*, 1998).

De plus, une alimentation enrichie en génistéine accélère le développement testiculaire des truites arc-en-ciel mâles, et la motilité et la concentration du sperme diminuent de manière dépendante avec la dose de phyto-oestrogènes fournie (tableau 5). Chez les femelles, seule la qualité des gamètes est affectée, caractérisée par un faible pourcentage de poissons ovulants, un faible taux de fécondation et une viabilité réduite des larves (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001). Des effets similaires, dont notamment une accélération de la puberté, ont également été révélés chez d'autres espèces, tel que le rat (Casanova *et al.*, 1999). De fait, une exposition utéro et néonatale à la génistéine, via l'alimentation, peut exercer des modifications structurelles et fonctionnelles chez les rats femelles (figure 24), après que celles-ci aient atteint leur maturité sexuelle (Amoiyi *et al.*, 1998).

3.1.4.2. Vitellogenèse.

Le pouvoir oestrogénique des phyto-oestrogènes fut démontré directement pour la première fois lors d'une expérience réalisée sur des esturgeons sibériens immatures. De fait, tous les phyto-oestrogènes administrés au cours de l'expérience par injections intra péritonéales ont induit la synthèse hépatique de vitellogénine, à l'exception notable du formononetin. Le coumestrol, quant à lui, semblait être le composé le plus efficace pour induire la vitellogenèse (Pelissero *et al.*, 1991 *a*). Cela confirmait des résultats ultérieurs obtenus également chez les esturgeons. Ceux-ci avaient été nourris avec un aliment semi-synthétique contenant du soja, ce qui provoquait un effet très prononcé sur le niveau plasmatique de vitellogénine (Pelissero *et al.*, 1991 *b*).

Donc, chez les poissons, les effets oestrogéniques des phyto-oestrogènes ont été observés *in vivo* à maintes reprises. De cette manière, des expériences *in vivo* sur des esturgeons immatures (Latonnelle *et al.*, 2002 *b*) ont clairement révélé une induction de la synthèse de vitellogénine avec 20 ppm de génistéine administrée oralement (figure 25). Les mêmes expériences réalisées sur des truites arc-en-ciel immatures mirent en évidence qu'au moins 1000 ppm de génistéine dans la nourriture étaient nécessaires pour élever la synthèse vitellogénique (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001). Ces données suggèrent que certaines espèces, comme l'esturgeon, sont plus sensibles à ces molécules que d'autres, telles que la truite arc-en-ciel. Des tests *in vitro* (culture primaire d'hépatocytes) ont également été développés sur ces deux espèces, révélant une augmentation de la vitellogenèse suite à une exposition aux phyto-oestrogènes. Si les effets déterminés ne sont pas représentatifs de la situation *in vivo*, cela permet tout de même de connaître le pouvoir oestrogénique relatif des EDCs, et donc des phyto-estrogènes (Latonnelle *et al.*, 2002 *b* ; Pelissero *et al.*, 1993).

Cependant, il apparaît dans une étude dirigée par Kaushik *et al.* (1995) que les niveaux plasmatiques de vitellogénine, chez les truites arc-en-ciel, n'étaient pas toujours significativement altérés lorsque les poissons étaient nourris avec différents repas à base de soja. Ainsi, de nombreux phyto-oestrogènes ont été analysés dans les ingrédients, alors qu'aucunes traces de ceux-ci n'ont été détectées dans la bile des truites ayant consommé jusqu'à 100% de protéines de soja. De même, l'exposition de medaka japonais à différentes doses de génistéine ne modifie pas de manière significative la vitellogenèse de ces poissons (figure 26). Ces résultats pourraient laisser penser que ces composés n'ont aucuns effets sur la reproduction de cette espèce. Toutefois, l'auteur de l'étude arrive à la conclusion qu'il s'agirait plutôt là d'un indicateur qui ne serait pas assez sensible pour mettre en évidence une exposition aux phyto-oestrogènes. Il faut également tenir compte du fait que le génistéine est connu pour être un inhibiteur des tyrosines protéines kinases (PTK), la PTK étant nécessaire dans la

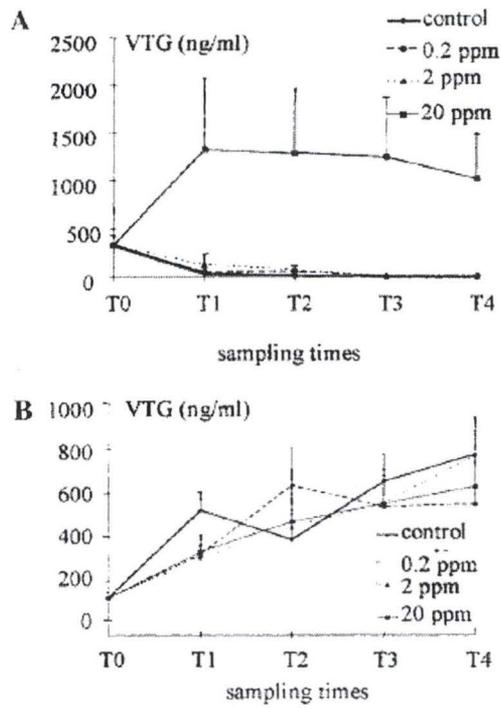


Figure 25 : Induction de la vitellogénine par des repas enrichis avec 0.2, 2 et 20 ppm de génistéine chez l'esturgeon (A) et la truite (B) (Latonnelle *et al.*, 2002 a).

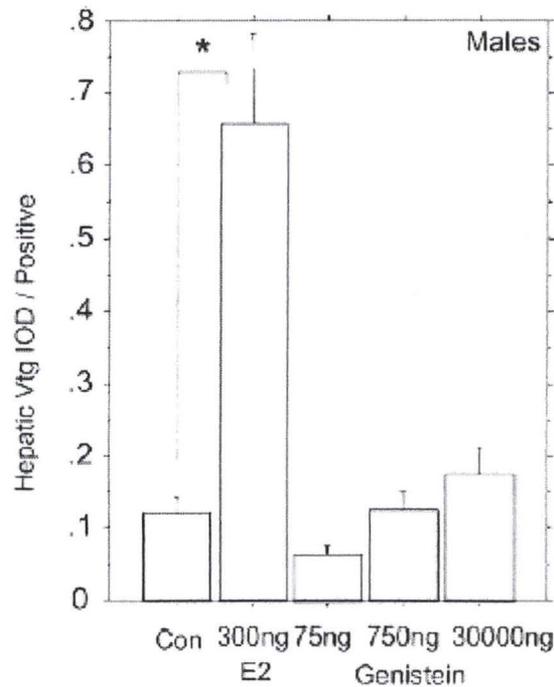


Figure 26 : Concentrations en vitellogénine, mesurées dans le foie des mâles de medaka japonais, suite à un traitement à différentes doses de génistéine (Zhang *et al.*, 2002).

Première partie : synthèse bibliographique

synthèse de vitellogénine. Il est donc possible que cette activité inhibitrice du génistéine masque son effet oestrogénique sur la vitellogenèse (Zhang *et al.*, 2002).

3.1.4.3. Concentrations en stéroïdes sexuels.

Chez les truites arc-en-ciel mâles ayant ingéré du génistéine, une décroissance des niveaux en testostérone fut observée. De cette façon, une légère diminution des niveaux plasmatiques en GTH I et II fut notifiée à la fin de la spermatogenèse de certains mâles. Il y avait également une réduction significative du $17\alpha,20\beta$ -P, alors que la 11-KT n'était pas affecté (figure 27). En ce qui concerne les femelles, seule une chute des concentrations en testostérone fut constatée, les concentrations en oestradiol n'étant pas modifiées par la consommation de génistéine (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001). Néanmoins, il fut démontré que cette dernière n'altérait pas systématiquement les concentrations en stéroïdes circulants chez les poissons, notamment chez les medaka japonais femelles, et que seul le niveau plasmatique en testostérone des mâles subissait une diminution (Zhang *et al.*, 2002). De même, l'exposition de carpes (*Cyprinus carpio*) mâles sexuellement matures au 4-nonylphénol, qui est pourtant un perturbateur endocrinien bien connu, ne provoque pas une augmentation statistiquement significative de leurs concentrations plasmatiques en oestradiol et en testostérone (Villeneuve *et al.*, 2002).

3.1.4.3. Aromatases P450.

L'influence de multiples classes d'EDCs sur l'expression des deux types de gènes *CYP19* chez les juvéniles de poissons zébrés a été clairement établie, ces derniers étant responsables de la production des aromatases P450. La transcription de *CYP19A1*, le *CYP19* prédominant dans les gonades de la plupart de téléostéens, était entravée par éthynyl-oestradiol à forte concentration, tandis que tous les autres EDCs (nonylphénol, clofibrate,...) échouaient dans la modulation de son expression. A l'inverse, l'activité transcriptionnelle de *CYP19A2*, l'isoforme d'aromatase principalement exprimée dans le cerveau, était fortement augmentée à la suite d'un traitement à l'éthynyl-oestradiol ou au nonylphénol. Ces conclusions proposent que cette conception expérimentale est hautement sensible dans son habilité à détecter le pouvoir oestrogénique des xénobiotiques, et que le gène *CYP19A2* est un candidat approprié pour servir de biomarqueur dans la révélation d'une éventuelle exposition à des composés oestrogéniques (Kazeto *et al.*, 2004).

Les effets inhibiteurs des flavonoïdes, incluant les phyto-oestrogènes isoflavoniques, sur le complexe enzymatique aromatase au niveau des ovaires des truites arc-en-ciel ont été évalués *in vitro*. Il a été découvert que la flavone, le 7,4'-dihydroxyflavone, l' α -naphthoflavone, le *dl*-aminoglutéthimide, l'apigenin, le quecertine et surtout l'équol étaient des inhibiteurs efficaces de l'activité aromatase ovarienne chez cette espèce, comparé aux biochanin A et au génistéine qui provoquaient seulement une légère inhibition de cette activité aromatase. Finalement, le 7-hydroxyflavone, le formononetin, le daidzéine, le coumestrol, le chrysin, la flavanone et le 17β -oestradiol n'avaient eux aucune influence sur le fonctionnement du complexe aromatase (tableau 6). Néanmoins, les grandes différences dans les valeurs de RE, révélées en changeant un paramètre du titrage de l'enzyme, suggèrent qu'il pourrait être très imprudent d'extrapoler les résultats obtenus *in vitro* dans une situation *in vivo*.

Plusieurs de ces substances utilisées sur les poissons ont aussi été testées sur l'activité aromatase du placenta humain, afin de comparer les deux sources différentes d'enzymes. De cette manière, il a été constaté que le *dl*-aminoglutéthimide, la flavone, la flavanone et l'équol

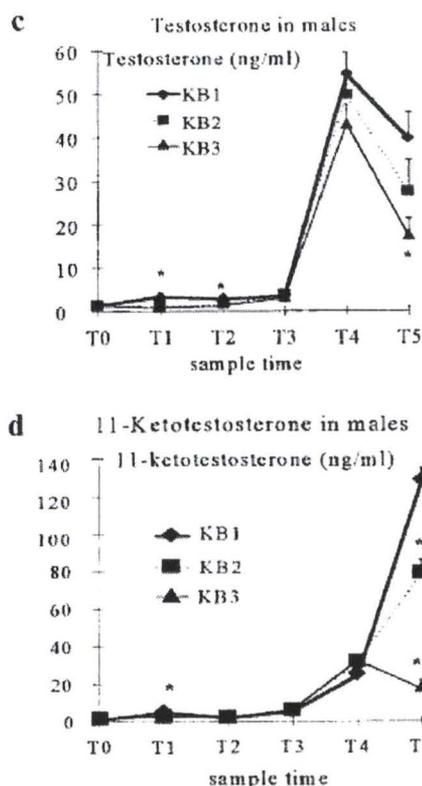


Figure 27 : Profils en stéroïdes de mâles de truite arc-en-ciel soumis à KB1, régime contrôle à base de farine de poissons ; KB2, régime contenant 500 ppm de génistéine ; KB3, régime contenant 1000 ppm de génistéine. Les valeurs sont les moyennes de 20 mesures. Les barres représentent les écarts-types. * indiquent des différences significatives (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001)

Flavonoïdes	ER de l'aromatase ovarienne de truite
flavone	1
<i>dl</i> -aminoglutéthimide	19,0
7-hydroxyflavone	PI
apigenin	8,7
quercetin	5,3
formononetin	PI
chrysin	PI
7,4'-dihydroxyflavone	3,7
α -naphthoflavone	3,2
coumestrol	PI
flavanone	PI
équol	0,9
daidzéine	PI
17 β -oestradiol	PI

PI: ne provoque pas une inhibition de l'activité aromatase, même à une dose supérieur à 1000 μ M.

Tableau 6 : Efficacité relative (ER) de différents flavonoïdes sur l'aromatase des ovaires de la truite arc-en-ciel (adapté de Pelissero *et al.*, 1996).

Première partie : synthèse bibliographique

possédaient des effets inhibiteurs sur l'aromatase du placenta humain. Cependant, les efficacités relatives de certains composés (tableau 7), obtenus à fois sur l'aromatase placentaire humaine et sur l'aromatase ovarienne de la truite arc-en-ciel, présentaient des différences prononcées. Ces dernières sont essentiellement dues à des différences structurales du complexe aromatase cytochrome P450 entre la truite arc-en-ciel et l'être humain, puisqu'il a uniquement 52% d'homologie dans la séquence polypeptidique de l'aromatase de ces deux espèces (Pelissero *et al.*, 1996).

3.1.5. Phyto-oestrogènes en tant que facteurs antinutritionnels.

Les facteurs antinutritionnels présents dans les plantes sont souvent définis comme étant des substances interférant avec l'utilisation de la nourriture, la santé et la production des animaux (Makkar, 1993 *in* Francis *et al.*, 2001). C'est pourquoi l'emploi de matériaux dérivés de plantes comme ingrédients pour la nourriture de poissons est limité, à cause de la présence d'une grande variété de ces facteurs antinutritionnels (tableau 8). Les plus importants parmi eux sont les phytates, saponines, tannins, lectines, composés antigéniques, alcaloïdes, gossypol, mimosine, antivitamines et enfin les phyto-oestrogènes.

Généralement, leur effet se résume à entraver la croissance des poissons. Cependant, il est peu probable que cette dernière soit affectée par les inhibiteurs de protéases, les acides phytiques et les composés antigéniques. A l'inverse, le rôle joué par les glucosinolates, les saponines, les tannins, les esters phorbiques, les polysaccharides solubles autres que l'amidon et le gossypol semblent beaucoup plus importants. Quant aux substances telles que les lectines, les phyto-oestrogènes ou les alcaloïdes, les informations dont on dispose ne semblent pas suffisantes pour en arriver à quelque conclusion que ce soit (Francis *et al.*, 2001). Toutefois, Bennetau-Pelissero *et al.* (2001) obtinrent des résultats qui suggéraient que les phyto-oestrogènes, et particulièrement le génistéine, même présents à des concentrations élevées dans les aliments, n'étaient pas les composés responsables d'une altération de la croissance.

3.2. Nutriments indispensables dans l'alimentation.

A de nombreuses reprises, il a été démontré que des modifications dans la ration de nourriture peuvent fortement influencer la fécondité des reproducteurs et leur capacité à produire des œufs de bonne taille. De la sorte, la disponibilité en nutriments a toute son importance dans l'influence de différents aspects physiologiques de la reproduction. (Bromage et Roberts, 1995). De plus, il existe des preuves démontrant que ces changements peuvent affecter la qualité des œufs et des larves (Hardy, 1985 ; Watanabe, 1985 *in* Bromage et Roberts, 1995). Actuellement, on met de plus en plus l'accent sur le rôle que jouent les composants individuels de l'alimentation (tableau 9), tels que les acides gras long polyinsaturés (AGLPI), les vitamines et les caroténoïdes (Bromage et Roberts, 1995).

3.2.1. Acides gras.

3.2.1.1. Généralité sur les acides gras.

Les acides gras (AG) sont des acides carboxyliques (-COOH) à longue chaîne aliphatique. Il existe une distinction entre les acides gras saturés et insaturés, en fonction de la présence, ou non, d'une ou plusieurs doubles liaisons dans la chaîne de carbones. La voie de biosynthèse des AG chez les poissons est connue pour être basiquement similaire dans son fonctionnement à celui des mammifères. Elle comprend le catabolisme (ou β -oxydation) en

ER de différents flavonoïdes dont les phyto-oestrogènes isoflavonoïques		
Flavonoïdes	Aromatase placentaire humaine	Aromatase ovarienne de truite
flavone	1	1
<i>dl</i> -aminoglutéthimide	2,8	19
flavanone	1,5	NT
équol	0,4	0,9

NT: non testé.

Tableau 7 : Comparaison des efficacités relatives (ER) entre l'aromatase placentaire humaine et l'aromatase ovarienne de truite (adapté de Pelissero *et al.*, 1996).

Source de matériaux dérivés de plantes	Antinutriments présents
Soja	Inhibiteurs de protéases, lectines, acides phytiques, saponines, phyto-oestrogènes, antivitamines, allergènes.
Graine de colza	Inhibiteurs de protéases, tannins, acides phytiques, glucosinolates.
Graine de pois	Inhibiteurs de protéases, tannins, acides phytiques, saponines, lectines, cyanogènes, antivitamines.
Graine de coton	Acides phytiques, phyto-oestrogènes, gossypol, antivitamines, acide cyclopropénoïque.
Graine de lupin	Inhibiteurs de protéases, saponines, phyto-oestrogènes, alcaloïdes.
Feuilles de <i>Leucaena</i>	Mimosine.
Tourteau d'huile de moutarde	Tannins, glucosinolates.
Sésame	Acide phytique, inhibiteurs de protéases.

Tableau 8 : Antinutriments importants présents dans différentes plantes communément utilisées comme alternatives à la nourriture de poissons (Francis *et al.*, 2001).

Nutriments	Espèces	Références
Acides gras	<i>Pagrus major</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 1984 <i>a, b</i>
	<i>Sparus aurata</i>	Fernández-Palacios <i>et al.</i> , 1985
Vitamine E	<i>P. major</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 1991 <i>a</i>
	<i>S. aurata</i>	Fernández-Palacios <i>et al.</i> , in press
Caroténoïdes	<i>P. major</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 1991 <i>b</i>
Phospholipides	<i>P. major</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 1991 <i>b</i>
Vitamine C	<i>Salmo salar</i>	Eskelinen, 1989
	<i>Gadus morhua</i>	Mangor-Jensen <i>et al.</i> , 1993
Protéines	<i>P. major</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 1984 <i>d</i>
	<i>D. labrax</i>	Cerdá <i>et al.</i> , 1994

Tableau 9 : Nutriments essentiels dans les repas pour les stocks de poissons marins (Izquierdo et Fernández-Palacios, 2000).

acétyl-coenzyme A, leur synthèse à partir de l'acétyl-CoA et les réactions d'élongation et /ou désaturation. Les principaux AG sont visibles dans le tableau 10 (Henderson et Sargent, 1985).

Les AG non biosynthétisés efficacement par les animaux sont dits des AG essentiels (AGE). Ainsi, deux séries d'acide gras sont essentielles tant aux poissons qu'aux mammifères. Il s'agit des AGLPI des séries n-3 et n-6. A l'exception du tilapia (*Oreochromis niloticus*), les poissons requièrent généralement plus d'AG de type n-3 que d'AG de type n-6, au contraire des mammifères, pour qui les AG de la série n-6 sont considérés comme plus essentiels. De fait, comme les poissons sont incapables de synthétiser *de novo* à la fois l'acide linoléique, l'acide linoléique, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), l'apport alimentaire de ces AG est donc très important, puisque ceux-ci sont indispensables pour une croissance et une survie normale des poissons (Kanazawa, 1985). Toutefois, les animaux, et donc les poissons, sont capables de convertir une forme d'AGLPI en une autre par élongation ou désaturation (Henderson et Sargent, 1985).

Les fonctions principales des AGE sont probablement en relation avec leurs rôles comme composants phospholipidiques, et comme précurseurs des prostaglandines. De fait, les AGE sont présents en très forte concentration dans les phospholipides, et sont donc très importants dans le maintien de la flexibilité et de la perméabilité des membranes biologiques, le transport lipidique et l'activation de certaines enzymes. En tant que composants des prostaglandines, ils sont impliqués dans diverses fonctions métaboliques et physiologiques, telles que la stéroïdogenèse et la maturation ovocytaire chez les vertébrés, ce qui a notamment été démontré chez le bar de mer européens (*Dicentrarchus labrax*) par Sorbera *et al.* (2001). En effet, le AA est connu pour être le précurseur des prostaglandines des séries II, et EPA est le précurseur de la série III (Bell *et al.*, 1997).

3.2.1.2. Effets des AG sur les performances de reproduction.

Actuellement, l'impact des AGLPI sur la reproduction des poissons paraît bien établie. C'est ainsi que l'expérience dirigée par Asturiano *et al.* (2001) montra que des bars de mer européens, nourris avec des repas enrichis en AGLPI, présentaient une augmentation de leurs capacités reproductives, comparés à des individus qui étaient alimentés avec des repas non enrichis. Les mâles recevant un supplément d'AGLPI, après une longue période de spermiation, produisaient des volumes de laitance plus élevés, qui étaient également plus dense en spermatozoïdes. Dès lors, cela reflète les effets bénéfiques d'un enrichissement aux AGLPI. Aucune différence dans la qualité ou la motilité du sperme ne fut observée entre les deux types de régime.

De même, une autre étude *in vivo* sur les bars de mer européens a permis de mettre en évidence une influence des AGE, parmi lesquels l'acide arachidonique (AA), l'EPA et le DHA, sur la maturation des ovocytes. Ces derniers ont été obtenus à partir de femelles maintenues avec une alimentation enrichie en AGLPI (RE) et le développement de la maturation a été comparé avec les ovocytes de femelles recevant un repas naturel. Bien qu'aucunes différences ne furent observées dans le taux de maturation spontané des ovocytes, un pourcentage plus élevé dans la maturation induit par la GTH et un faible pourcentage de l'atrésie des ovocytes furent démontrés chez les individus alimentés avec RE. Par ailleurs, alors que la sécrétion basique de PG produite par les ovocytes des deux groupes était identique, les ovocytes des individus RE ont produits des niveaux sensiblement plus élevés de PG, en présence de gonadotrophines chorioniques humaines (figure 29 ; Sorbera *et al.*, 2001).

	16:0	acide palmitique
	18:0	acide stéarique
	18:1 (n-9)	acide oléique
	18:2 (n-6)	acide linoléique
	20:4 (n-6)	acide arachidonique
	18:3 (n-3)	acide linoléique
	20:5 (n-3)	acide eicosapentaénoïque (EPA)
	22:6 (n-3)	acide docosahexaénoïque (DHA)

Tableau 10 : Principaux acides gras présents dans les lipides des poissons (adapté de Henderson et Sargent, 1985).

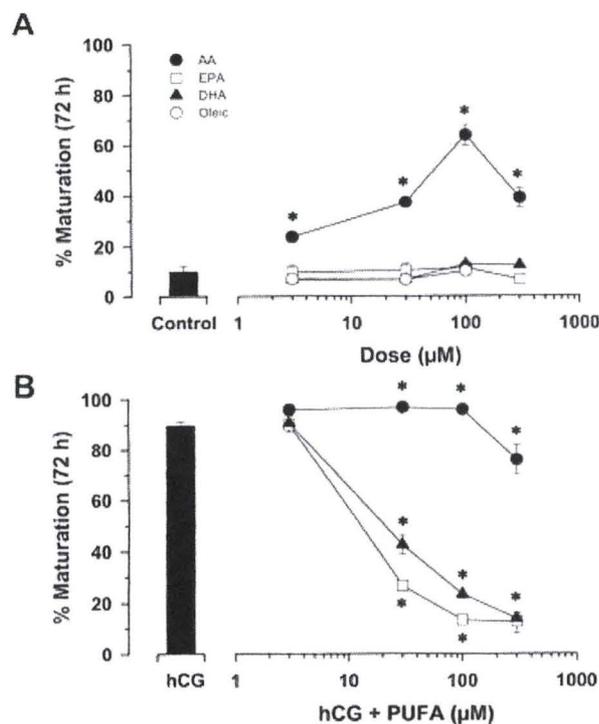


Figure 29 : A) Effets des doses graduelles de AA, EPA, DHA et acide oléique sur la maturation ovocytaire après 72h d'incubation. La barre indique la maturation spontanée (contrôle). *Différence significatives par rapport au contrôle, $P < 0.0001$. B) Effets des doses graduelles de AA, EPA, DHA et acide oléique sur la maturation ovocytaire après 72h d'incubation en présence de 100 IU/ml hCG. La barre indique la maturation spontanée en présence de 100 IU/ml hCG. *Différences significatives par rapport à la maturation induite par hCG, $P < 0.05$ (Sorbera *et al.*, 2001).

Plusieurs études ont démontrés que l'utilisation de sous-produits végétaux dans la formulation d'un régime pour poisson avait une influence aussi bien sur la composition en AG de leur carcasse que sur celle de leur chaire. Ainsi, les carcasses de surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*), nourris avec un régime à base d'huile de soja, d'huile de lin ou d'huile de maïs, présentaient une quantité totale d'AG saturés moins élevée que ceux nourris avec un régime formulé à partir de graisse de porc (Martino *et al.*, 2002). En outre, des bars de mers européens auxquels on avait donné des repas contenant de l'huile de graine de colza, d'olive ou de lin à hauteur de 600g/kg de nourriture avaient une chaire pauvre en EPA et en DHA (Mourente *et al.*, 2005). Ainsi, parmi nos aliments, il y a les graines de tournesol, utilisées sous la forme d'huile et de tourteau. L'huile de tournesol est très efficace pour augmenter la croissance de la carpe, mais elle affecte fortement sa composition en AG. Cette huile est riche en AGLPI, mais elle devient très faible si on enlève l'acide linoléique. De plus, l'huile de tournesol ne contient ni EPA, ni DHA et très peu AA (0,6 % des AG), les trois AGE les impliqués dans la reproduction (Hertrampf et Piedad-Pascual, 2000).

Chez les poissons marins, les AGE, et surtout les EPA, font également partie des composants majeurs des prostaglandines. Or, beaucoup de ces stéroïdes, produits notamment par les femelles de poissons rouges, jouent un rôle important comme phéromones, qui stimulent le comportement sexuel mâle et qui synchronisent l'éjaculation et la ponte. Ceux-ci agissent donc directement sur le succès de la fertilisation. La distribution de l'EPA dans le sperme peut aussi être affecté par la consommation d'AG, mais également être responsable de l'activité spermatozoïque et du taux de fertilisation (Izquierdo et Fernández-Palacios, 2000). Toutefois, lorsque Mourente *et al.* (2005) étudièrent les concentrations plasmatiques en prostaglandines E2 et F2 α chez des bars de mer européens nourris principalement avec de l'huile de graine de colza, d'olive ou de lin, ils ne trouvèrent aucune différence significative par rapport au contrôle (huile de poisson). De plus, chez les bars de mer européens mâles, le taux de fertilisation du sperme était similaire jusqu'à 24 heures après la fertilisation, que les poissons aient été nourris avec des régimes enrichis en AGLPI ou non (Asturiano *et al.*, 2001).

3.2.1.3. Effets des AG sur la qualité des œufs et des larves.

A maintes reprises, l'effet des AGE sur la qualité des œufs et le bon déroulement du développement larvaire ont été mis en exergue. De cette façon, Furuita *et al.* (2000) ont démontrés que, chez les plies japonaises (*Paralichthys olivaceus*), une alimentation enrichie en AGLPI de la série n-3 permettait d'améliorer les pourcentages de larves normales et de survie des larves trois jours après l'éclosion, ceux-ci étant corrélés avec le niveau d'AGLPI n-3. A l'inverse, la production totale d'œufs était plus élevée dans les groupes nourris avec une alimentation pauvre en AGLPI n-3, et diminuait avec une augmentation de ces AG. Le niveau des d'AGLPI dans les œufs augmentait avec l'élévation du niveau alimentaire, et une forte concentration en AA avait aussi été découverte dans les œufs de grande qualité. De plus, le pourcentage d'œufs flottants, qui est un paramètre important pour évaluer la qualité des œufs chez la plie, était plus bas dans le groupe déficient en AGLPI n-3 que dans le groupe nourri avec un niveau élevé de cette série d'AG, sans être significatif. De même, une expérience sur le bar de mer européen montra que les régimes alimentaires pour poissons, qui présentaient une croissance des ratios de DHA/EPA et de AA/EPA, pouvaient être bénéfiques pour l'amélioration de la qualité et de la viabilité des larves (Bell *et al.*, 1997). En outre, chez cette même espèce, des taux significativement plus importants de survie embryonnaire et larvaire furent enregistrés de 48 à 72h après la fertilisation par du sperme de mâles recevant une nourriture concentrée en AGLPI, comparé à ceux nourris avec un régime naturel (Asturiano *et al.*, 2001).

	Vitamine C	Vitamine E	Interaction
Eclosion	0.001	NS	NS
Survie	0.002	0.027	NS
IGS	NS	NS	0.036

NS : non significatif.

Tableau 11 : Résultats de l'ANOVA bi-directionnelle sur les effets des vitamines C et E, et leur interaction sur l'éclosion, la survie et l'index gonadosomatique mâle (IGS; Lee et Dabrowski, 2004).

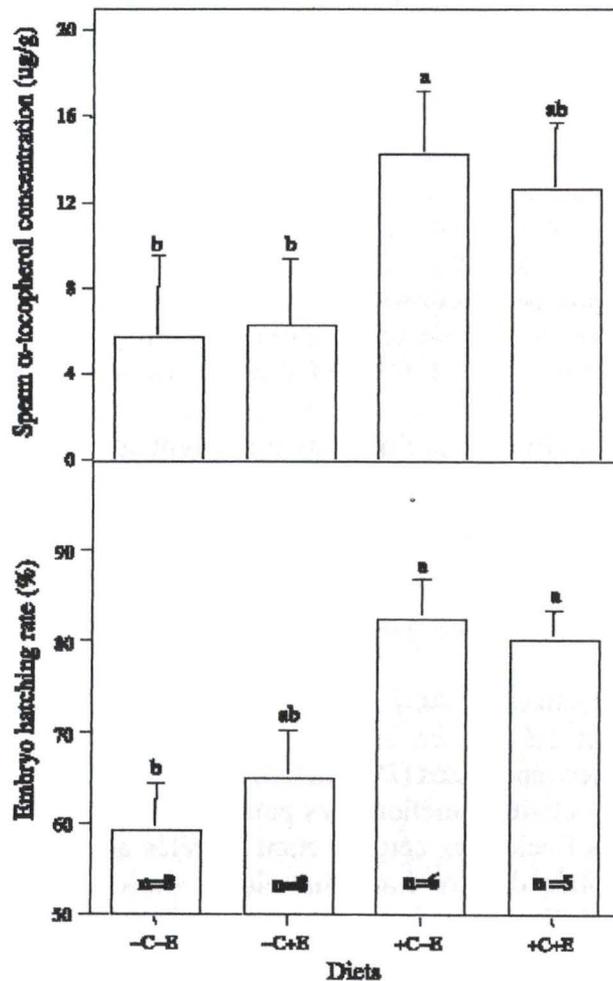


Figure 30 : Concentration dans le sperme de l' α -tocophérole et des effets des repas sur le taux d'éclosion des embryons chez des perches jaunes nourries avec quatre repas expérimentaux semi purifiés pendant 32 semaines. Les régimes ont été formulés pour contenir des niveaux bas ou élevés de vitamine E de 5 et 160 mg/kg avec ou sans supplémentarité de vitamine C (250 mg/kg) désignés comme repas -C - E, -C +E, +C -E, +C +E, respectivement. Les données sont les moyennes de triplicats accompagnées par les écarts-types. Les barres indiquées par une lettre différente sont significativement différentes (Lee et Dabrowski, 2004).

A l'instar de l'expérience de Martino *et al.* (2000), lorsqu'on distribue un repas composé d'huile de soja à des rohu (*Labeo rohita*), le contenu en AG de leur carcasse s'en voit également modifié puisque ce dernier diminue de manière significative. Dès lors, si l'ingestion de régimes à base de sous-produits végétaux altère la composition de la carcasse, elle pourrait aussi bien avoir une influence sur la composition des œufs et des larves, et donc sur leurs qualités (Khan *et al.*, 2003). Toutefois, l'utilisation d'arachide, un de nos aliments, ne change en rien les proportions en AG de la carcasse chez cette espèce. Comme pour le tournesol, l'arachide, un autre de nos aliments, contient essentiellement de l'acide linoléique (30 %) et oléique (56 %), respectivement de la série n-6 et n-9. Donc, l'arachide ne renferme pratiquement pas d'AGLPI n-3. De plus, cet aliment ne contient pas de DHA, d'EPA et de AA (Hertrampf et Piedad-Pascual, 2000).

Par ailleurs, d'autres recherches ont insistés sur le rôle essentiel que joue l'équilibre entre les différents AGLPI pour autoriser des développements embryonnaires et larvaires optimaux. Dans ce sens, des niveaux élevés en AGLPI n-3 dans l'alimentation auraient un effet négatif sur la production d'œufs flottants et le taux d'éclosion chez les plies japonaises (Furuita *et al.*, 2002), comme c'était le cas avec une déficience en AGLPI (Furuita *et al.*, 2000). De fait, chez des géniteurs qui étaient nourris avec des régimes contenant différents niveaux d'AA (0.1%, 0.6% et 1.2%), il était possible d'observer une qualité et une quantité totale d'œufs produits plus importante chez les poissons recevant 0.6% d'AA que chez ceux auxquels on donnait 1.2%. Ces résultats indiquent qu'une petite quantité d'AA dans la nourriture est nécessaire pour une croissance et un développement normal, mais qu'une surconsommation à des effets négatifs sur les poissons (Furuita *et al.*, 2003 b).

3.2.2. Vitamines.

Les vitamines sont des substances qu'un organisme est incapable d'élaborer lui-même et qui sont indispensables à son développement et à son fonctionnement, et dont l'absence détermine des troubles ou des lésions caractéristiques. Les vitamines sont donc des métabolites essentiels pour certains organismes (hommes, animaux, bactéries) qui doivent les trouver dans leur alimentation (Hertrampf et Piedad-Pascual, 2000). Leur impact sur la reproduction est bien établi. De cette manière, l'acide ascorbique (ou vitamine C) joue une fonction indispensable dans le fonctionnement des tissus reproducteurs: (1) son effet antioxydant sur les gamètes pour prévenir les dommages de l'ADN ; (2) son indispensabilité alimentaire pour optimiser la survie et le fonctionnement physiologique au cours des multiples pontes ; (3) le possible rôle de la vitamine C dans la régulation de la maturation et/ou l'infertilité des poissons en présence de radiations ultra-violettes ou en conditions d'aquaculture intensive (hypoxie, supersaturation d'oxygène,...). Toutefois, il existe peu de renseignement sur les mécanismes d'action des vitamines le long de la cascade des événements reproductifs (Drabrowski et Ciereszko, 2001).

Ainsi, l'addition de vitamine C et de vitamine E (tocophérol), dans l'alimentation du poisson-lait (*Chanos chanos*), permet de mettre en lumière l'essentialité de la vitamine C dans la production d'un plus grand nombre de frais, accompagnée par une meilleure qualité des œufs et des larves. Mais elle ne démontra pas un effet bénéfique de la vitamine E seule sur le succès reproducteur de cette espèce. (Emata *et al.*, 2000). De la sorte, l'expérience menée par Lee et Dabrowski (2004) mis en évidence que l'ajout d'acide ascorbique dans l'alimentation de la perche jaune (*Perca flavescens*) provoquait une croissance des capacités de fertilisation du sperme chez les mâles, ainsi qu'une production de laitance plus importante. De nouveau, cette étude ne dévoila pas une influence de la vitamine E sur la viabilité des gamètes. La raison pourrait être attribuée au niveau alimentaire du tocophérole (160 mg/kg) qui serait insuffisant

Niveaux de protéines	Intervalles de pontes (jours)			
	1	2	3	4
10%	23.6 ± 1.0 a	29.6 ± 2.5 b	57.1 ± 6.1 b	49.3 ± 5.7 b
20%	20.3 ± 1.0 a	21.7 ± 1.4 a	21.7 ± 1.4 a	22.4 ± 1.1 a
30%	21.9 ± 1.3 a	20.7 ± 1.1 a	20.9 ± 0.9 a	21.7 ± 0.8 a

Niveaux de protéines	Première ponte	Deuxième ponte	Troisième ponte	Quatrième ponte
Diamètre des œufs (mm)				
10%	2.35 ± 0.07	2.28 ± 0.09	2.36 ± 0.04	2.39 ± 0.02
20%	2.31 ± 0.04	2.34 ± 0.03	2.35 ± 0.02	2.39 ± 0.03
35%	2.38 ± 0.03	2.41 ± 0.03	2.43 ± 0.03	2.34 ± 0.03
Fécondité absolue (nombres d'œufs par ponte)				
10%	332 ± 43 a	324 ± 52 a	321 ± 38 a	318 ± 31 a
20%	393 ± 48 a	448 ± 35 ab	479 ± 42 b	482 ± 60 b
35%	449 ± 43 a	521 ± 63 b	517 ± 59 b	626 ± 54 b
Fécondité relative (nombre d'œufs par g de poids corporel)				
10%	4.64 ± 0.31	4.27 ± 0.55	4.74 ± 0.67	3.91 ± 0.43
20%	4.77 ± 0.34	4.91 ± 0.36	4.48 ± 0.20	4.23 ± 0.23
35%	4.90 ± 0.63	5.10 ± 0.63	4.10 ± 0.36	4.64 ± 0.49

a,b: les valeurs annotées par une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P>0.05$).
Les valeurs de tailles des œufs et de fécondités relatives ne diffèrent pas significativement ($P>0.05$) entre elles et entre les traitements.

Tableau 12 : Intervalles de pontes moyens, diamètres des œufs, fécondité absolue et fécondité relative pour quatre pontes successives d'*Oreochromis niloticus* femelles, nourries avec des régimes comprenant différents niveaux de protéines (Gunasekera *et al.*, 1996 a).

Critères	Niveau en protéines dans l'alimentation			
	20%	30%	10%	
			Essai I	Essai II
Nombres de femelles ovulantes	8/8	8/8	3/8 ¹	6/6
Pontes fertilisées	7/8	7/8	0/8	0/6
Nombre moyen d'œufs par ponte	397.5 ± 38.8b	359.2 ± 30.9b	/	261.2 ± 15.4a
Diamètre moyen des œufs (mm)	2.31 ± 0.05	2.29 ± 0.05	/	2.28 ± 0.04a
Fertilisation (%)	83.83 ± 3.95	79.75 ± 4.19	/	/
Éclosion (%) ²	68.69 ± 3.64b	41.73 ± 5.05a	/	/
Larves normales (%)	59.77 ± 2.84b	41.75 ± 4.44a	/	/

a,b: les valeurs annotées par une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P>0.05$).

¹ : cinq femelles sont mortes après la ponte.

² : au stade où la vésicule vitelline est complètement résorbée.

Tableau 13 : Détails des performances de pontes d'*Oreochromis niloticus* femelles maintenues à trois niveaux de protéines dans l'alimentation. L'erreur type (±) de chaque moyen est mentionnée (Gunasekera *et al.*, 1996 b).

pour améliorer les performances reproductives de la perche jaune, un poisson d'eau froide. En outre, l'index gonadosomatique des mâles et le taux d'éclosion des embryons étaient plus faibles chez les individus nourris avec un repas sans suppléments vitaminiques que chez ceux alimentés avec des vitamines C et/ou E (tableau 11 et figure 30). De tout façon, si la vitamine E avait eu un impact sur la reproduction, cela n'aurait pas posé de problème dans notre expérience car les végétaux sont très riches en tocophérol, surtout l'huile de tournesol (650 mg/kg). Néanmoins, nos ingrédients sont dépourvus de vitamine C. Donc, cela pourrait être délétère pour le bon déroulement reproductif du poisson-chat africain (Sauvant *et al.*, 2002).

En tout cas, l'ajout de vitamine A (palmitate de rétinol) dans l'alimentation pour poissons semble jouer un rôle dans la reproduction. Ainsi, un contenu faible en vitamine A dans la nourriture des plies japonaises a pour effet de diminuer le taux d'œufs flottants, mais aussi de réduire le taux d'éclosion. De plus, si les plies nourries avec un repas enrichi en vitamine A ne montraient pas de différences notables dans la qualité des œufs au début de la période de ponte, leur production d'œufs durait beaucoup plus longtemps (Furuita *et al.*, 2003 a). Des résultats similaires furent obtenus chez d'autres espèces, comme la crevette chinoise (*Penaeus chinensis*), ce qui démontre donc que la vitamine A a bien un effet bénéfique sur la fécondité et la qualité des larves chez les animaux (Mengquing *et al.*, 2004). De la sorte, comme nos régimes ne renferment pas d'aliments contenant des vitamines A, cette carence pourrait constituer une entrave au processus reproductif des *C. gariepinus* (Sauvant *et al.*, 2002).

3.2.3. Caroténoïdes.

L'étude réalisée par Craik (1985) fut l'une des premières qui dévoila un effet positif des caroténoïdes, en particulier l'astaxanthine, sur la reproduction des poissons, le saumon Atlantique (*Salmo salar*) dans le cas présent. Il a suggéré que la couleur des œufs fournissait une excellente indication de leur qualité. Cette expérience a également proposé que les caroténoïdes pouvaient avoir une fonction respiratoire, parce que les œufs qui subissent un développement dans une eau pauvre en oxygène comportent plus de pigment que ceux qui se développent dans une eau bien oxygénée. En outre, le contenu en caroténoïdes serait lié à l'habilité des œufs à tolérer des conditions environnementales difficiles, telles qu'une élévation de la température de l'eau ou de la concentration en ammoniacque, ou encore l'exposition aux effets nocifs des rayons UV.

Plus récemment, plusieurs études ont reporté que les caroténoïdes n'avaient aucun impact sur le déroulement de la reproduction. Dans cette optique, Choubert *et al.* (1998) montraient que la supplémentation chez la truite arc-en-ciel d'astaxanthine et de canthaxanthine, deux sortes de caroténoïdes, n'avait pas d'influence sur la fréquence de maturation des femelles ou encore sur la date de maturation, ni sur le nombre d'ovaires par kilo de femelle. De plus, il n'y avait aucune différence significative en ce qui concerne la survie des œufs et des larves entre les poissons nourris avec des repas supplémentés en caroténoïdes et ceux alimentés avec les repas contrôles. A l'instar de cette expérience, Christiansen et Torrissen (1997), qui travaillaient sur le saumon Atlantique, ne trouvèrent pas de relation entre les concentrations en astaxanthine dans les œufs et les taux de fertilisation. De fait, les embryons qui avaient éclos d'œufs présentant un niveau élevé en astaxanthine n'étaient pas plus performants que ceux issus d'œufs moins riches en ce caroténoïde.

Toutefois, une corrélation positive entre la survie pendant le développement embryonnaire et la concentration en caroténoïde a été mise en évidence chez le saumon Atlantique. De même, l'existence d'un niveau critique en caroténoïdes ($1-3 \mu\text{g/g}$ d'œufs) a été démontré. En effet, au-dessus de ce dernier, des pourcentages d'éclosion supérieurs à 80% sont observés, tandis qu'au-dessous, il n'y a que des pourcentages inférieurs à 50% (Craik, 1985). Dans tout les cas, cela n'a pas beaucoup d'importance pour notre expérience. En effet, comme les caroténoïdes sont produits par pratiquement la totalité des plantes photosynthétiques, il est fort peu probable que l'on observe des carences de ces composés, puisque nos régimes sont formulés à partir de sous produits végétaux (Khan *et al.*, 2003).

3.2.4. Protéines.

De nos jours, l'influence du niveau en protéines dans l'alimentation sur les capacités reproductrices des poissons semble bien établie, notamment dans la puberté et la maturation ovocytaire, dans les performances de pontes et dans la qualité et la performance des larves. De fait, des tilapias du Nil (*Oreochromis niloticus*) femelles maintenues avec trois régimes comprenant différents niveaux de protéines (10, 20 et 35%) montrèrent des divergences dans les intervalles de pontes et dans la fécondité (nombres d'œufs par ponte), qui étaient plus importants chez les femelles recevant 35% que chez celles ayant droit à 10%. Mais en ce qui concerne la fécondité relative (nombre d'œufs par g de poids corporel) et la taille des œufs, il n'y avait pas de modification significative entre les trois traitements (tableau 12 ; Gunasekera *et al.*, 1996 a). Dans une expérience similaire, Gunasekera *et al.* (1996 b) ont découvert que le pourcentage d'éclosion des œufs et le pourcentage de larves normales était beaucoup plus élevé chez les poissons nourris avec le repas contenant 35% de protéines. Par contre, les autres paramètres ne différaient pas entre les repas (tableau 13). Cette étude paraît donc soutenir l'hypothèse que le pool d'acides aminés a un rôle à jouer dans l'ontogenèse et l'éclosion.

Ensuite, une influence de la concentration en protéine dans la nourriture sur la puberté d'*Oreochromis niloticus* a également été mise en exergue. Dans un premier temps, on constata que les individus maintenus avec des repas pourvus de faibles pourcentages de protéines (10% et 17%) présentaient des taux de croissance inférieurs comparés à ceux qui recevaient des pourcentages plus conséquents (25%, 32% et 40%), et aucun n'a atteint la puberté. Dans un second temps, on a découvert que les poissons alimentés avec les régimes présentant des taux de protéines à hauteur de 32% et 40% atteignaient la puberté à un âge plus avancé, avec des ovocytes mûrissant plus rapidement (Gunasekera *et al.*, 1995). Par contre, chez la même espèce, il semblerait que la recrudescence ovarienne soit plus lente chez les femelles nourries avec une alimentation contenant 10% de protéines que chez celles recevant 25% ou 35%. Cela paraît être le résultat d'un sacrifice de la croissance somatique en faveur de la croissance des ovocytes, la femelle favorisant la production d'une bonne progéniture au détriment de son propre bien-être (Gunasekera *et al.*, 1997).

Toutefois, différentes études s'accordent sur le fait qu'il y a moyen de substituer jusqu'à 100% des protéines animales dans un régime par des protéines végétales, sans que cela n'affecte significativement la croissance et la digestibilité des poissons. Cela a été démontré notamment chez la brème de mer européenne (*Dicentrarchus labrax* ; Kaushik *et al.*, 2004) et la truite arc-en-ciel (Kaushik *et al.*, 1995). Cependant, chez le turbo (*Psetta maxima*), Fournier *et al.* (2004) révélèrent une modification de la composition corporelle totale mais également une diminution de la croissance, lorsque la proportion de protéines animales était inférieure ou égale à 20 %. Néanmoins, les ingrédients utilisés étaient limités au lupin, au maïs et blé. Ceci n'est pas du tout le cas de nos régimes qui ont été formulés à partir de nombreux ingrédients et pas seulement d'origine végétale (farine de sang et viscères de poulet). De cette manière, il est possible d'établir un profil en acides aminés qui répond parfaitement aux exigences de *Clarias gariepinus*.

Deuxième partie: matériel et méthodes

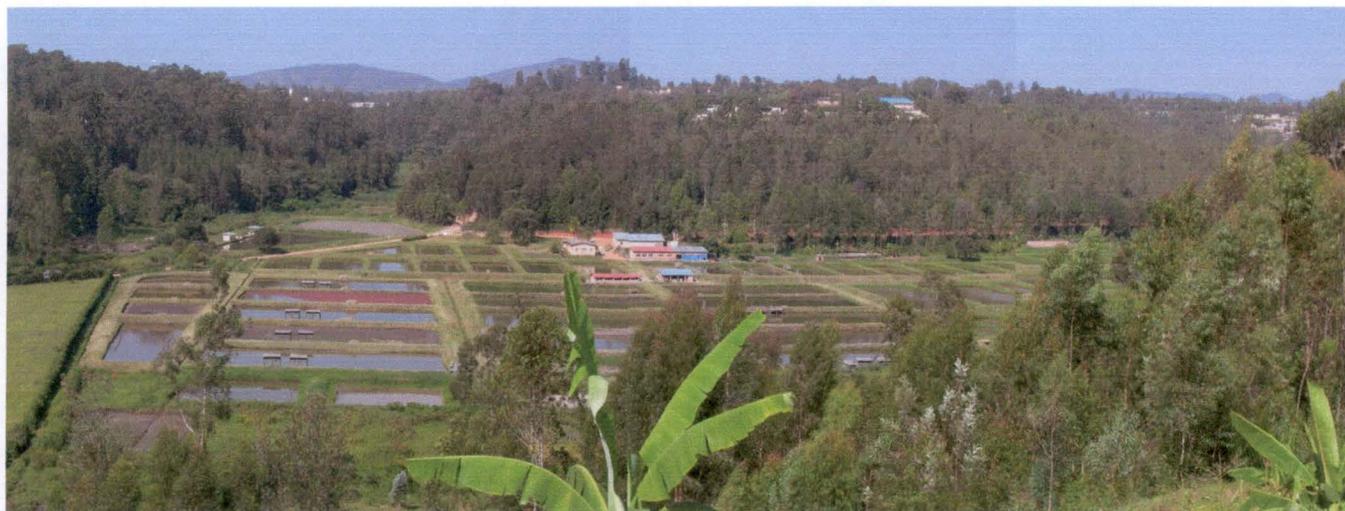
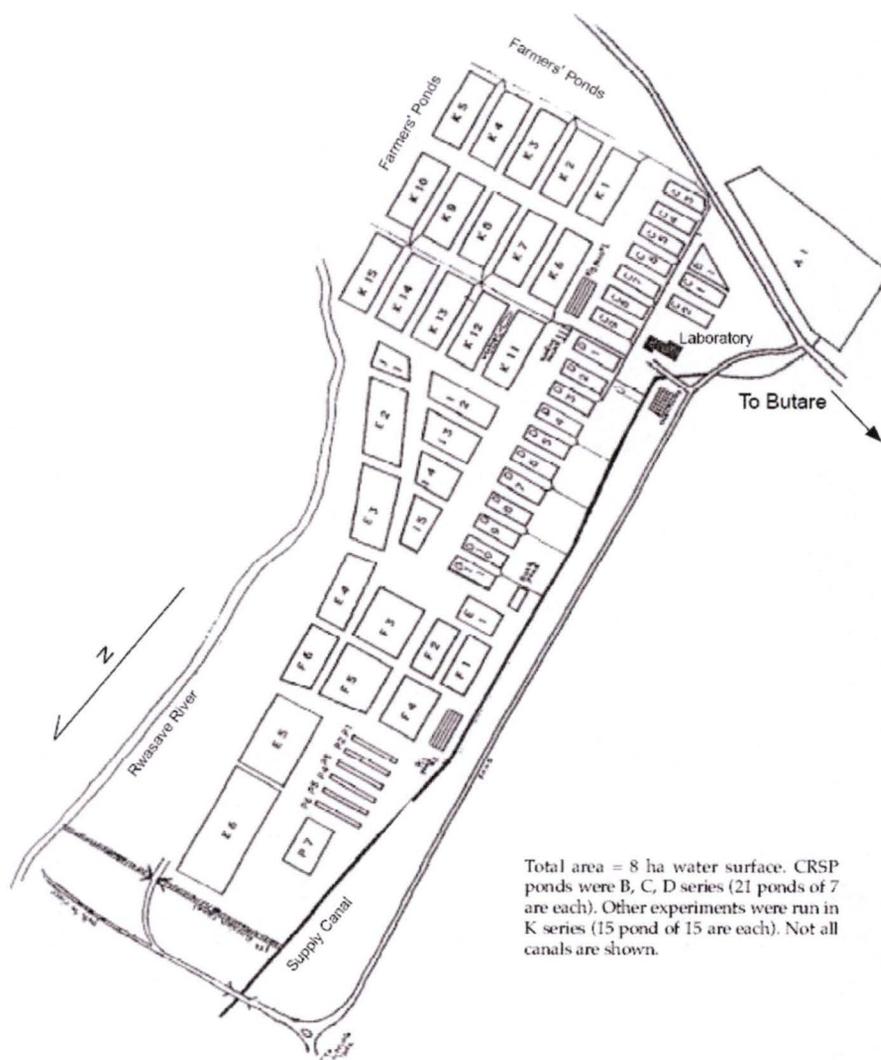


Figure 31 : Vue d'ensemble de la station piscicole de Rwasave.



Total area = 8 ha water surface. CRSP ponds were B, C, D series (21 ponds of 7 are each). Other experiments were run in K series (15 pond of 15 are each). Not all canals are shown.

Figure 32 : Plan de la station piscicole de Rwasave.

1. Rappel des objectifs de l'étude de Laetitia.

Cette étude a pour objectif de déterminer la capacité de substitution de la farine de poisson par des sous-produits agro-alimentaires, essentiellement d'origine végétale, dans l'alimentation des géniteurs de *Clarias gariepinus*, et d'évaluer les effets de cette substitution sur les performances de reproduction de cette espèce. Au cours de cette expérience, quatre régimes alimentaires ont été comparés trois prélèvements de gonades (31 janvier, 31 mars et 9 juin 2005) ont été réalisés sur les géniteurs de *Clarias gariepinus*, afin de confectionner des lames histologiques et de doser l'activité aromatasase dans les ovaires. Les cerveaux ont également été extraits pour accomplir sur ceux-ci le même dosage que sur les ovaires. De plus, des prises de sang mensuelles ont été effectuées dans l'optique d'exécuter par la suite des dosages de la vitellogénine et des stéroïdes sexuels.

2. Matériel et méthodes.

2.1. Lieu d'expérimentation.

L'expérience se déroule dans les infrastructures de la Station Piscicole de Rwasave (SPIR ; figure 31) de l'Université Nationale du Rwanda (UNR). La station, située à approximativement trois kilomètres de l'UNR, possède une superficie totale de 18 hectares, parmi lesquels plus de 7 sont occupés par des étangs (figure 32). Ainsi, il y a 21 étangs de 700 m², 15 de 1500 m² et au moins 25 de tailles diverses. La SPIR comprend un laboratoire équipé, une aire de stockage, un secteur contenant des tanks et des aquariums, une salle de formation et des bureaux. La monoculture de tilapia, ainsi que la polyculture tilapia/poissons-chats africain, sont les principales activités piscicoles de Rwasave. La station est alimentée en eau par la rivière de Rwabuye, qui ne tarie pas durant la saison sèche. Dès lors, l'eau des étangs peut être renouvelée sur toute l'année. La température de l'eau se situe entre 19 et 23 °C, ce qui n'est pas très élevé pour autoriser une reproduction optimale de *C. gariepinus*.

2.3. Régimes expérimentaux.

2.3.1. Ingrédients expérimentaux.

Une enquête a été menée par Laetitia Nyina-wamwiza au cours de l'année académique 2002-2003 auprès de petites unités locales de production agro-alimentaire. Cette étude fut réalisée dans l'optique de connaître le prix et la disponibilité tout au long de l'année de différents produits ou sous-produits végétaux. Suite à cette enquête, les ingrédients les plus intéressants ont été analysés (protéines et énergie) au laboratoire de la SPIR. Une sélection a donc été opérée à la suite de cette expérience. La composition des ingrédients utilisés est reprise dans le tableau 14.

Ingrédients	Matière sèche	Protéines	Lipides	Cendres
Farine de poisson	92,1	65,2	15,2	11,6
Sang d'abattoir	90,9	71,9	1,71	6,37
Viscères de poulet	90,9	35,0	13,0	6,32
Farine de haricot	99,5	23,1	7,09	3,54
T. d'arachide	89,4	47,6	30,9	2,67

Tableau 14 : Composition des ingrédients utilisés dans la formulation des différents régimes testés chez *Clarias gariepinus* (% du poids frais initial).

Ingrédients	Pourcentages			
	Régime I	Régime II	Régime III	Régime IV
Farine de poisson	50	25,74	12,5	0
Farine de sang	7	8,91	9,9	9,9
Viscères de poulet	0	9,9	9,9	9,9
Huile (poisson+tournesol)	12	4,95	3,96	3,96
Prémix	6	5,94	3,96	3,96
Tourteau de tournesol	0	43,56	30	29,7
Cellulose	3	0	0	0
Farine de haricot	0	0	12,5	9,9
Tourteau d'arachide	0	0	16,29	31,68
Carboxyméthylcellulose	2	0,99	0,99	0,99
Farine de maïs	20	0	0	0
Total	100	100	100	100
Composition biochimique				
Protéines brutes (%)	39,7	38,89	37,76	37,88
Energie (MJ/kg)	18,8	18,98	18,89	20,47
Régime I : contrôle				
Régime II: Tourteau de tournesol non décortiqué et non trempé.				
Régime III: Tourteau de tournesol non décortiqué + haricot.				
Régime IV: Tourteau de tournesol décortiqué + haricot + tourteau d'arachide.				

Tableau 15 : Ingrédients et formulation des quatre régimes expérimentaux.



Figure 33 : Photo des cages dans lesquelles étaient maintenus les *C. gariepinus*.

Tous les ingrédients ont été récoltés directement au Rwanda, mis à part la farine de poisson qui a été achetée auprès de la société néerlandaise Coppens International. Ainsi, l'unité d'extraction d'huile de l'association Profemme-Benurugwiro situé à Kibungo a fourni les tourteaux d'arachide et de tournesol, ainsi que l'huile de tournesol. Le sang a été collecté à l'abattoir de Nyabugogo à Kigali. Les tourteaux d'extraction sont obtenus après une simple pression (sans solvant) des graines, celles-ci étant préalablement décortiquées ou pas. Les haricots ont été achetés au marché de Butare. Les viscères de poulet ont été collectés à l'hôtel Credo et dans un élevage de poulets de Butare, mais également au centre des jeunes sourds-muets de Butare. En ce qui concerne les compléments alimentaires que sont le carboxyméthyl cellulose employé comme liant, les prémix minéraux et vitaminés, l'huile de foie de morue et l'éthoxyquine utilisé comme antioxydant, ils ont été obtenus via la société SIGMA-ALDRICH.

2.3.2. Formulation des régimes expérimentaux.

Parmi les six régimes formulés dans le cadre de l'expérience d'alimentation de Jonathan et Laetitia chez les juvéniles de poisson-chat africain, quatre furent sélectionnés pour la suite de l'étude (tableau 15). En fait, ce sont ces régimes qui ont été retenus car les jeunes de *C. gariepinus*, nourris avec ces aliments, présentaient de meilleures performances de croissances. Cependant, les régimes furent en partie modifiés afin de contenir un pourcentage de farine de poissons de 50, 25, 12.5 et 0.0 %, respectivement dans les régimes I, II, III, IV.

Pour la préparation, les ingrédients bruts étaient pesés et mélangés à l'aide d'un mixeur de la marque Kenwood jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène, à laquelle étaient ajoutées les proportions adéquates d'huile de poisson et de tournesol, d'éthoxyquine et de carboxyméthyl-cellulose. Ensuite, il était ajouté une certaine quantité d'eau, de manière à obtenir une pâte destinée à être pressée dans un petit hachoir à viande qui permettait de produire des spaghettis de 4 mm de diamètre. Ces derniers étaient alors séchés au soleil, puis transformés en granulés avant d'être pesés et distribués aux poissons.

2.2. Poissons.

Les poissons-chat africains adultes de notre étude proviennent des juvéniles utilisés dans l'expérience conduite par Jonathan Richir et Laetitia Nyina-wamwiza au cours de l'année 2003-2004. Ces juvéniles avaient été obtenus par reproduction artificielle de géniteurs de *Clarias gariepinus* élevés depuis le stade d'œufs à la SPIR. L'éclosion s'était déroulée dans des bassins en plastiques (Fastank), qui ont été utilisés par la suite comme bacs de premier élevage, les jeunes frais étant nourris avec du zooplancton prélevés dans les étangs. Après environ deux semaines, les alevins maintenus dans les fastank ont été transférés dans les étangs d'alevinage fertilisés organiquement, où ils recevaient du son de riz comme supplément alimentaire. C'est seulement à la taille de 3-4g que les alevins ont été pêchés et stockés afin d'être habitués à l'alimentation artificielle. Ceux-ci ont donc été nourris avec les différents régimes expérimentaux dès leur plus jeune âge.

Actuellement, les poissons, maintenus dans un étang, sont répartis dans quatre cages selon le régime qu'ils reçoivent (± 90 individus par cage au début de l'expérience). Ces cages sont constituées de filets en nylon, soutenus par quatre poteaux en bois (figure 33). Les poissons sont nourris deux fois par jour, à 9h et à 16h. La quantité de nourriture distribuée pour chaque régime est fonction du poids des poissons et de la température de l'eau, mais aussi grâce à l'emploi de tables appropriées. Donc, il est nécessaire de mesurer la température de l'eau, opération qui était effectuée trois fois par jour (7h, 12h et 17h), à raison de deux à trois

fois par semaine selon les disponibilités de chacun. Le pH et l'oxygène dissous étaient aussi déterminés. Ceci permettait de suivre la variation des facteurs abiotiques du milieu dans lequel se trouvent nos poissons, puisque ceux-ci doivent tout de même être maintenus dans une certaine gamme de valeurs physico-chimiques. De fait, cette dernière est essentielle au bon déroulement de la croissance et de la reproduction de *C. gariepinus*. Quant aux poids, ils sont établis par des pesées individuelles mensuelles. Tous les poissons sont marqués à l'aide d'une micropuce électronique (Passive Integrative Transponder ou PIT-tag), ce qui permet de suivre chaque individu de manière individuelle. Ces PIT-tags sont lu à l'aide d'un détecteur approprié.

2.4. Conditions de prélèvement.

2.4.1. Sang.

Dix individus ont été sélectionnés au mois de février afin de subir une prise de sang. Par la suite, ce sont les mêmes individus qui ont été repris lors des prises de sang mensuelles réalisées jusqu'au mois de juin. Donc, ceci correspond à cinq prises de sang par poisson et à un total de 200 échantillons sur l'ensemble de l'expérience. Ces dernières étaient pratiquées au niveau de la région ventro-caudale, juste en arrière de la nageoire anale. Pour cette opération, les poissons ont été anesthésiés par ajout de MS222 à raison d'1 g pour 10 L. Pour empêcher la coagulation du sang, du citrate de sodium était utilisé à une concentration de 1 g pour 10 ml d'eau distillée, en remplacement de l'héparine non efficace chez cette espèce.

Chaque prise de sang a été réalisée à l'aide d'une seringue, dont le volume maximal est de deux millilitres et sur laquelle était fixée une aiguille de 0,5 mm de diamètre. Un volume de sang de 1ml était alors prélevé avant d'être vidé dans des eppendorfs, dans lesquels il avait été préalablement déposé quelques gouttes de citrate de sodium. Après homogénéisation, les échantillons de sang ont été centrifugés sur place à 3500 RPM pendant 30 min afin d'en récupérer le plasma ($\pm 0,5$ ml). Celui-ci a été transféré de nouveau dans des eppendorfs et maintenus dans un frigo box en attendant le retour à Butare. Ainsi, en fin de journée, les échantillons de plasma étaient stockés dans un frigo à -20 °C jusqu'au retour au FUNDP pour les analyses en laboratoire.

Notons également que lors de ces prélèvements sanguins, le poids et la taille de chaque poisson étaient également vérifiés. Cela servait notamment à déterminer la quantité de nourriture à distribuer dans chaque cage, mais aussi de suivre les performances de croissance des clarias alimentés avec les différents régimes expérimentaux.

2.4.2. Gonades.

Trois fois au cours de l'étude (31 janvier, 31 mars et 9 juin 2005), dix individus ont été sacrifiés par régime. Cette opération n'a pas été effectuée tous les mois en vue de préserver assez de géniteurs pour les reproductions artificielles. Les poissons étaient tués par incision de la colonne vertébrale au niveau de la nuque et rupture de la moelle épinière. Ensuite, ils ont été soigneusement ouverts par une entaille au niveau du ventre en évitant de percer un quelconque organe. Cette manipulation est surtout délicate chez les femelles car les ovaires sont très volumineux et fragiles. Après, les gonades de chaque individu ont été prélevées et pesées au centième de gramme près. Ces prélèvements étant réalisés dans le but d'examen ultérieurs en laboratoire, une partie des gonades a été placée dans du bouin pour l'analyse histologique, alors qu'uniquement une partie des ovaires était stocké dans des pots à -20 °C pour le dosage de l'activité aromatasase.

Pour prélever le cerveau, il était nécessaire d'écarteler la mâchoire et le crâne après avoir pratiqué une incision entre ceux-ci et de briser l'os qui se situe autour de l'organe central. Les cerveaux étaient placés dans des eppendorfs, qui étaient maintenus dans un frigo box en attendant le retour en laboratoire où ils étaient stockés à -80 °C. Toutefois, pour ce mémoire, ceux-ci n'ont pas été utilisés puisque le dosage de l'activité aromatasase sera réalisé uniquement dans le cadre du doctorat L. Nyina-wamwiza.

2.5. Dosages des stéroïdes sexuels plasmatiques.

Le protocole employé a été décrit par Fostier et Jalabert (1986). En fait, il s'agit d'une dosage qui est réalisée grâce à une méthode radioimmunologique (Radioimmunoassay : RIA). Son principe est basé sur la compétition entre une hormone marquée (chaude), à l'aide d'un isotope radioactif (H^3), et une hormone froide vis-à-vis d'un anticorps spécifique à chaque hormone. L'hormone froide se trouve soit en concentration connue (standard), soit en concentration inconnue (échantillons). Au départ, les stéroïdes sexuels doivent subir une double extraction grâce à du diéthyléther-cyclohexane, ce qui permet de produire une rupture des liaisons hormone-protéine. Ensuite, on effectuera la compétition entre l'hormone froide (standards et échantillon) et l'hormone marquée par rapport à l'anticorps. Dans cette optique, l'hormone froide est mise en contact avec l'anticorps spécifique dans un premier temps. Elle se trouve alors sous deux formes : libre ou complexé.

Après, on additionne l'hormone marquée ou marqueur. La quantité d'anticorps et d'hormone marquée reste constante. La moindre élévation de la concentration en hormone froide entraîne inévitablement une diminution du taux de fixation de l'hormone marquée. Par la suite, on sépare l'hormone marquée complexée à l'anticorps de l'hormone marquée qui reste libre. Dès lors, il est possible de mesurer la radioactivité de l'une de ces deux fractions et d'en déduire la concentration en hormone froide présente dans l'échantillon. L'établissement d'une courbe standard permet de caractériser la décroissance du pourcentage d'hormone marquée qui se fixe à l'anticorps en présence d'une quantité connue et progressivement croissante d'hormone froide. Remarquons que les meures sont réalisées en duplicata pour chaque échantillon, ainsi que pour la droite standard. De plus, on effectue également une mesure de la radioactivité naturelle (background) et une mesure de la fixation totale.

A la suite de deux incubations (à 37 et 4 °C), on rajoute du polyéthylèneglycol (PEG), et on laisse incuber pendant 12 heures à 4 °C. La séparation entre l'hormone marquée libre et celle complexée à l'anticorps se fait par centrifugation, décantation et rinçage. Finalement, la dernière étape consistera à mesurer la radioactivité émise par chaque échantillon (cpm). Cette mesure est effectuée à l'aide d'un compteur à scintillations β (BECKMAN LS 6000 IC). Fostier et Jalabert (1986) ont proposé un système de calcul qui permet de transformer les valeurs, exprimées en cpm, en valeurs exprimées en $\mu\text{g}/\text{échantillon}$. La quantité réelle d'hormone présente dans l'échantillon est calculée via la formule :

$$C_c = C_t \times \frac{Q_t \times 1000}{Q_{pi} \times Q_{pe}}$$

C_c = concentration en $\mu\text{g}/\text{ml}$
 C_t = concentration en $\mu\text{g}/\text{échantillon}$
 Q_t = quantité de tampon reprise dans les stéroïdes extraits (μl)
 Q_{pi} = quantité de plasma initiale pour le dosage (μl)
 Q_{pe} = quantité de plasma extrait (μl)

2.6. Dosages de vitellogénine par ALP.

La vitellogénine et la vitelline sont des complexes lipo-phosphoprotéiques. Les phosphates dans ces composés sont sous formes libre en milieu alcalin et peuvent être mesurés par spectrophotométrie (méthode phosphomolybdate). La quantité de phosphate alcalin libre (ALP) est un indicateur indirect de la quantité de vitellogénine ou de vitelline. Chez la plupart des vertébrés, la vitellogénine contient à peu près 1,4% de phosphate. De fait, la corrélation avec la vitellogénine dosée grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique est très élevée (>95%).

La méthode comprend les différentes étapes suivantes :

- Précipitation des protéines plasmatiques à l'aide de trichloroacétate 20% (TCA).
- Obtention d'un culot après centrifugation et élimination du surnageant.
- Lavage du culot avec différents solvants organiques : l'éthanol absolu, le chloroforme, l'acétone et le diéthyléther. Entre chaque solvant, les échantillons sont centrifugés.
- Séchage du culot contenant essentiellement des protéines
- Ajout d'une solution alcaline (NaOH 2N) afin de libérer les phosphates des lipophosphoprotéines.
- Addition des réactifs nécessaires à la mesure spectrométrique : le phosphomolybdate et le réducteur.

La mesure de l'absorbance de chacun des échantillons se fait à une longueur d'onde de 600 nm. La détermination du contenu en phosphate dans chaque tube est possible à partir de l'absorbance des dilutions standard préalablement réalisées. Finalement, la concentration en phosphate pour chaque échantillon (en μg ALP/ml plasma) peut être calculée par la relation suivante :

$$C_c = C_t \times \frac{V_t \times 1000 \mu\text{l}}{V_m \times V_p}$$

C_c = concentration en μg ALP/ml plasma

C_t = concentration en μg ALP/tube

V_t = volume total présent dans les tubes (μl)

V_m = volume de phosphomolybdate ajouté (μl)

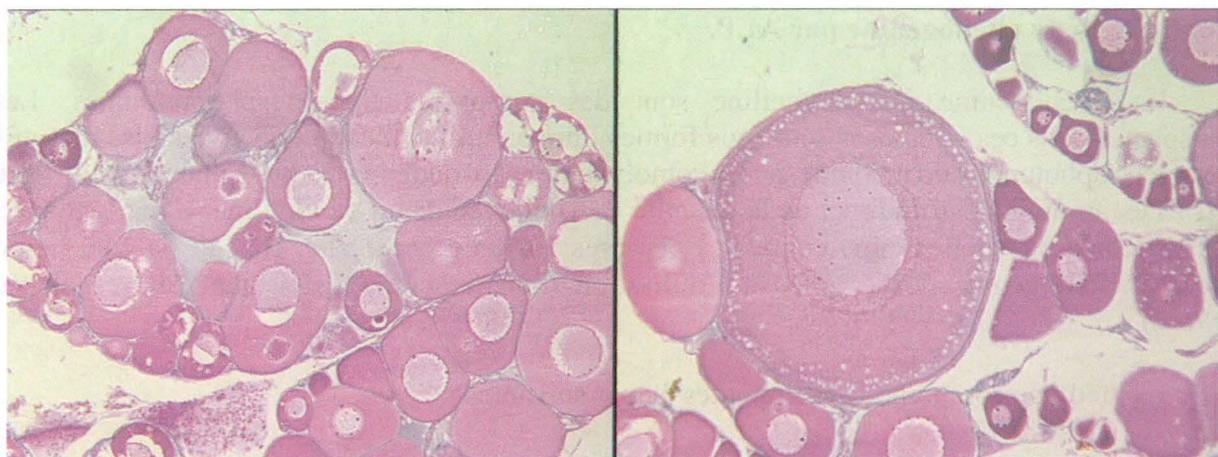
V_p = volume de plasma utilisé pour le dosage (μl)

2.7. Histologie.

2.7.1. Réalisation des coupes histologiques.

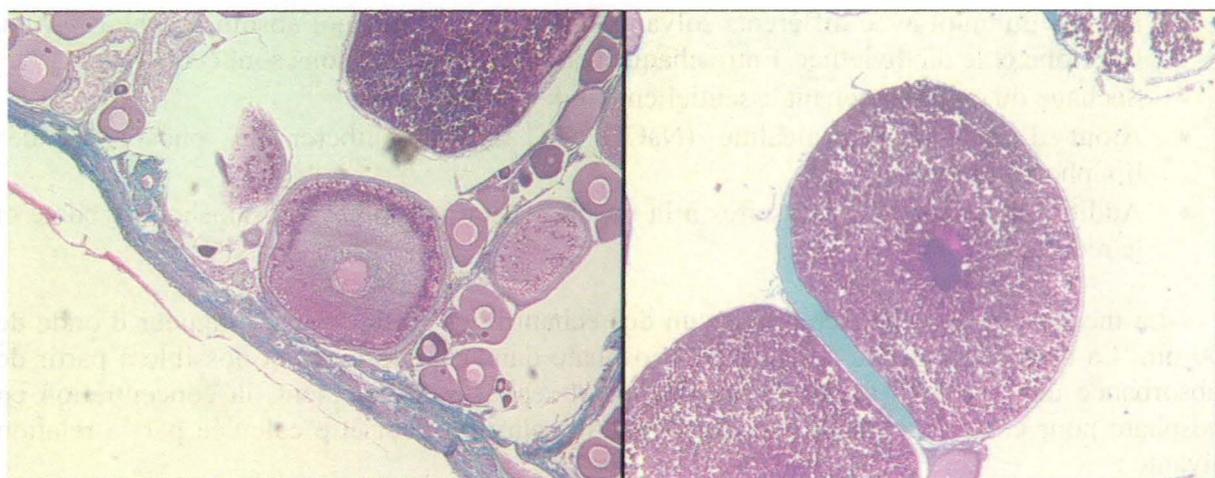
A la suite du prélèvement, les gonades sont pesés et placés dans du bouin composé de 75% d'acide picrique, 20% de formol et 5% d'acide acétique glacial. Quelques grandes étapes sont nécessaires pour la réalisation de lames histologiques :

- La coupe d'une portion de gonade qui est placée ensuite dans une cassette en plastique appropriée.
- La déshydratation : ce processus consiste à plonger les cassettes, contenant les gonades, successivement dans différents bains pendant 12 heures. Ces derniers comprennent 4 bains de méthanol absolu, 4 bains de toluol et 4 bains de paraffine. Les huit premiers servent à déshydrater le tissu pour permettre à la paraffine de pénétrer. Le processus de déshydratation se réalise automatiquement.



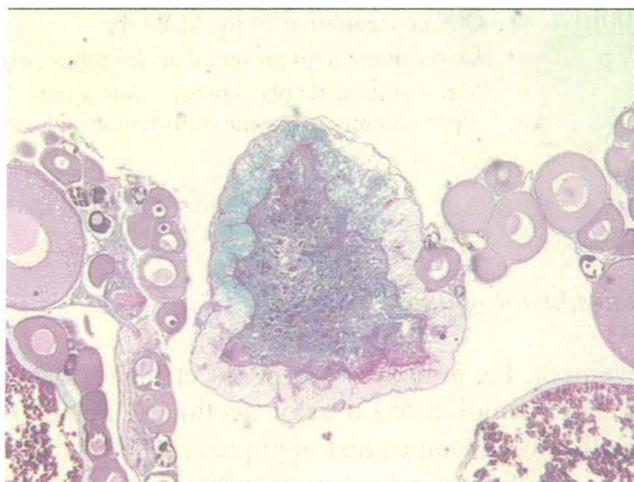
(A)

(B)



(C)

(D)



(E)

Figure 33 bis : Photos des différents stades ovariens chez les femelles de *Clarias gariepinus*.
 (A) stade 1 : ovocyte protoplasmique ; (B) stade 2 : ovocytes en prévitellogenèse précoce ; (C) stade 3 : ovocyte en prévitellogenèse avancée ;
 (D) stade 4 : ovocyte en vitellogenèse endogène ; (E) stade 5 : follicule atrétique pré ovulatoire.

- L'enrobage des gonades dans un bloc de paraffine.
- La coupe des blocs au microtome après un dégrossissement et un ramollissement du tissu dans du moliflex pendant 12 heures. Les ovaires sont coupés à 4 μm et les testicules à 3 μm .
- L'étalement du coupon avec le tissu sur des lames « superfrost ».
- La coloration des lames : les ovaires sont colorés avec un trichrome à froid comprenant du Bleu de Célestin, de l'hémalun, de la phloxine et du vert lumière. L'association du Bleu de Célestin et de l'hémalun colore le noyau des ovocytes en bleu foncé, alors que la phloxine colore les protéines en rouge, dont la vitelline. Quant au vert lumière, il est utilisé pour colorer les tissus conjonctifs en vert, ce qui aussi le cas chez les mâles. Pour être coloré, les testicules subissent quant à eux un trichrome à chaud avec de l'hématoxiline de Regaud à 57 °C, de la solution de rouge et du vert lumière. Le premier sert à colorer le noyau des cellules germinales mâles en noir, alors que le second colore le cytoplasme des cellules mâles en rouge.
- Le montage : ce processus, qui est la dernière étape de la réalisation des lames, consiste à enduire la préparation de DPX. Enfin, le tout est recouvert par une lame couvre-objet.

2.7.2. Analyses de coupes histologiques.

L'analyse des coupes histologiques des mâles et des femelles a été réalisée selon deux approches distinctes pour des raisons pratiques. De fait, les coupes de testicules ont été analysées de manière qualitative. Pour chaque individu, le stade le plus mûre atteint a été identifié. L'évaluation de la présence d'intersexe a également été effectuée. Cela fait suite à la définition de différents stades de maturité, malgré que la spermatogenèse soit un processus continu.

Par contre, les coupes des ovaires ont été analysées de manière quantitative. Chez les poissons téléostéens, l'ovogenèse, bien que ce soit aussi un processus continu, peut être divisée en quatre grandes étapes : la croissance primaire, la vitellogenèse endogène (appelée également prévitellogenèse ou stade des alvéoles corticales), la vitellogenèse exogène et la maturation finale. Pour chaque femelle, on a déterminé le stade ovocytaire le plus avancé, ce qui servira d'élément de classification entre les ovaires. Les différents stades ovariens sont visibles à la figure 33 bis. En outre, la proportion des différents stades ovocytaires a été effectuée, excepté pour les ovules et follicules atreétiques.

Cependant, l'extrapolation des résultats obtenus sur une surface à la réalité morphologique tridimensionnelle nécessite un certain nombre de corrections tenant compte des caractéristiques des échantillons à analyser. Dans le cas des ovaires, où l'on retrouve des ovocytes sphériques, une correction pour l'extrapolation en trois dimensions divise la fréquence des tailles des particules par le diamètre moyen de la particule, puisqu'il est évident qu'une particule de grand diamètre, à nombre égal avec une particule de petit diamètre a plus de chance d'être représentée dans une section aléatoire. Remarquons que seuls les ovocytes dont la coupe passait par le noyau en position centrale ont été mesurés, de sorte à éviter des problèmes de stéréologie.

2.8. Analyses statistiques.

L'analyse statistique des résultats obtenus pour les concentrations en stéroïdes sexuels, les niveaux en vitellogénine consistaient en des analyses de la variance (ANOVA) visant à mettre en évidence d'éventuelles différences significatives entre les régimes. Par contre, sur le RGS et les paramètres morphologiques, c'est une ANOVA II qui a été opérée. L'ANOVA (I ou II) a toujours été précédée d'une vérification de la normalité de la distribution, ainsi que d'un test d'homogénéité des variances, propriétés indispensables pour poursuivre l'analyse. Les tests de Hartley ou de Levene ont été employés dans la majorité des cas. Lorsque ces tests révélaient des variances hétérogènes, celui de Brown-Forsythe a été utilisé. Une fois l'homogénéité des variances établie, l'ANOVA nous a permis de déceler ou non l'existence de différences significatives ($p < 0,05$). Enfin un test post hoc LSD a été employé pour mettre en évidence les régimes (ou les dates) qui différaient significativement entre eux. Ces analyses ont été menées sur le logiciel STATISTICA.

Troisième partie: résultats

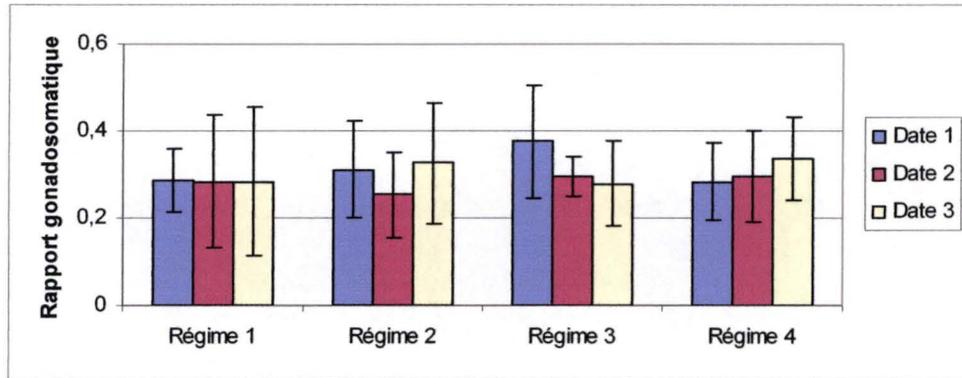


Figure 34 : Comparaison des rapports gonadosomatiques chez les mâles.

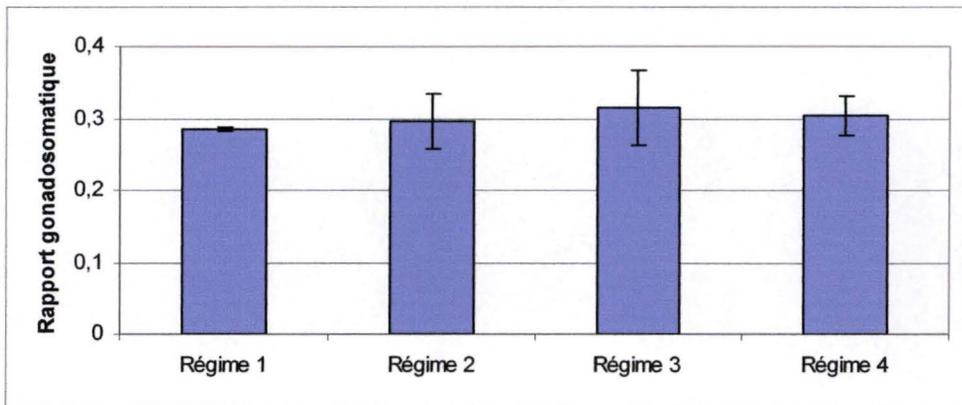


Figure 35 : Comparaison globale des rapports gonadosomatiques chez les mâles.

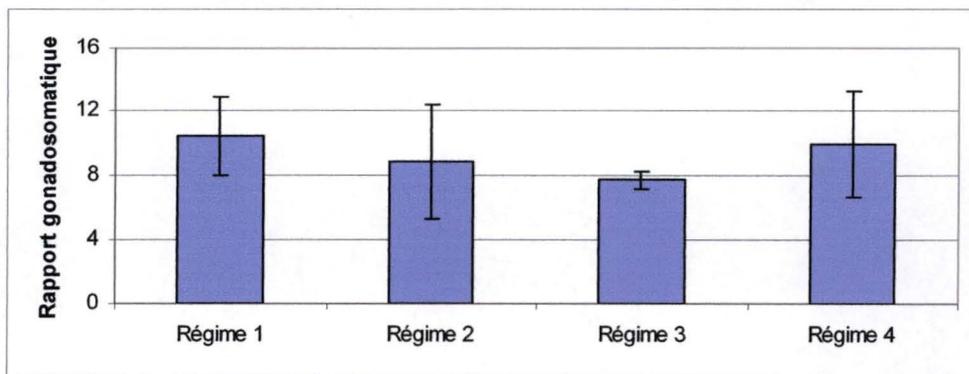


Figure 36 : Comparaison globale des rapports gonadosomatiques entre les régimes chez les femelles.

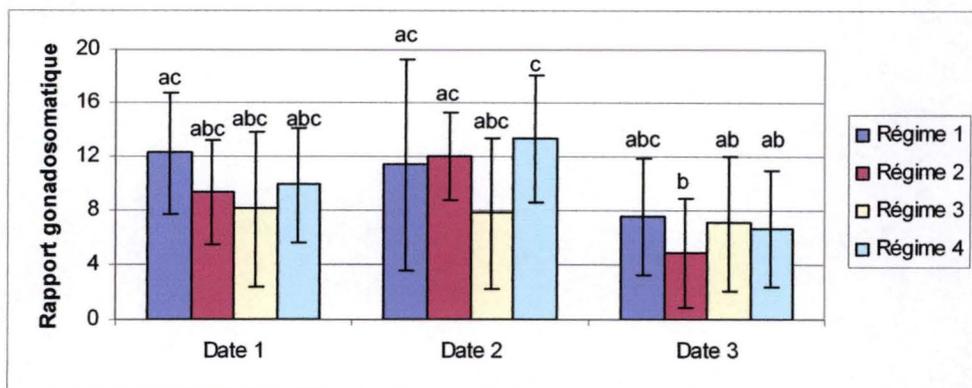


Figure 37: Comparaison des rapports gonadosomatiques entre les dates chez les femelles.

1. Paramètres morphologiques.

1.1. Rapport gonadosomatique (RGS).

1.1.1. Les mâles.

L'évolution des différents RGS pour les mâles entre les dates est représentée à la figure 1. Les mâles présentent des RGS nettement plus faibles que les femelles. Dans le cadre de notre étude, elles varient entre 0,37 % pour les mâles provenant du régime 3 (date 1) et 0,25 % pour ceux issus du régime 2 (date 2). La moyenne est de 0,3 %. Les résultats du modèle linéaire généralisé n'ont révélés aucuns effets significatifs pour les paramètres de la date, du régime et de l'interaction date - régime ($p > 0,05$) sur le rapport gonadosomatique des mâles.

De plus, il n'est pas possible de sortir une tendance générale de l'évolution des histogrammes. De fait, les résultats sont relativement similaires d'une date à l'autre au sein d'un même régime, à l'exception du régime 3 où les barres diminuent avec le temps (figure 34). En outre, si on s'intéresse à l'effet global des régimes sur le RGS des mâles (figure 35), on voit bien que les histogrammes sont presque identiques d'un régime à l'autre.

1.1.2. Les femelles.

L'évolution des différents RGS pour les femelles entre les régimes est représentée à la figure 36. Globalement, les valeurs de RGS varient beaucoup plus que pour les mâles puisque, pour l'ensemble des régimes, elles se situent entre 4,9 et 13,4 %. La moyenne est de 9,2 %. Les résultats de l'ANOVA 2 ont démontrés un effet significatif pour les paramètres de date et d'interaction date - régime, mais pas pour celui du régime seul, sur le rapport gonadosomatique des femelles. De plus, l'application d'un test post hoc a aussi révélé que la différence globale entre la troisième date de prélèvement et la première était significative ($p = 0,035$), alors qu'avec la deuxième, elle était hautement significative ($p = 0,004$). De fait, si on regarde de plus près la figure 37, on constate que le régime 2 (date 3) est significativement différent du régime 1 à la date 1 ($p = 0,021$) et à la date 2 ($p = 0,042$), mais aussi du régime 2 ($p = 0,026$) et du régime 4 ($p = 0,008$) à la date 2. Par contre au sein de chaque date, on ne retrouve pas de différences ente les RGS des quatre régimes.

La figure 38 montre les profils de RGS des différents régimes pour les femelles. De manière générale, on constate une brusque diminution du RGS au début du mois de juin (date 3) dans le régime 2 ($p = 0,01$) et le régime 4 ($p = 0,032$) alors que les valeurs de RGS des deux autres régimes diminuent plus progressivement et ne sont donc pas significatives ($p < 0,05$). Notons que la diminution du RGS pour le régime 3 est beaucoup moins prononcée que pour les trois autres.

1.2. Analyses des coupes histologiques.

1.2.1. Les mâles.

L'analyse histologique des testicules a été effectuée de manière qualitative et non quantitative. Le but de cette description étant de réaliser une évaluation de la maturité des individus, on a donc déterminé les cellules germinales les plus avancées dans le processus de spermatogenèse. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

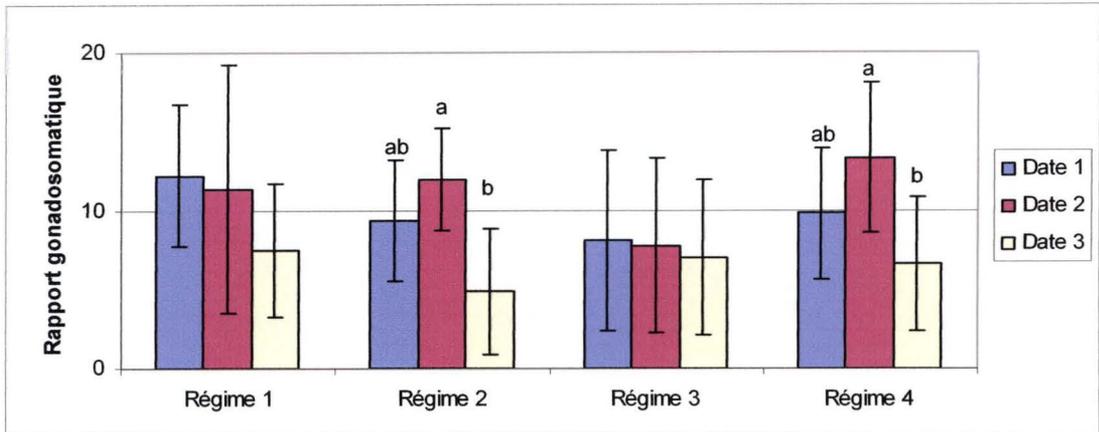


Figure 38 : Comparaison des rapports gonadosomatiques entre régimes chez les femelles.

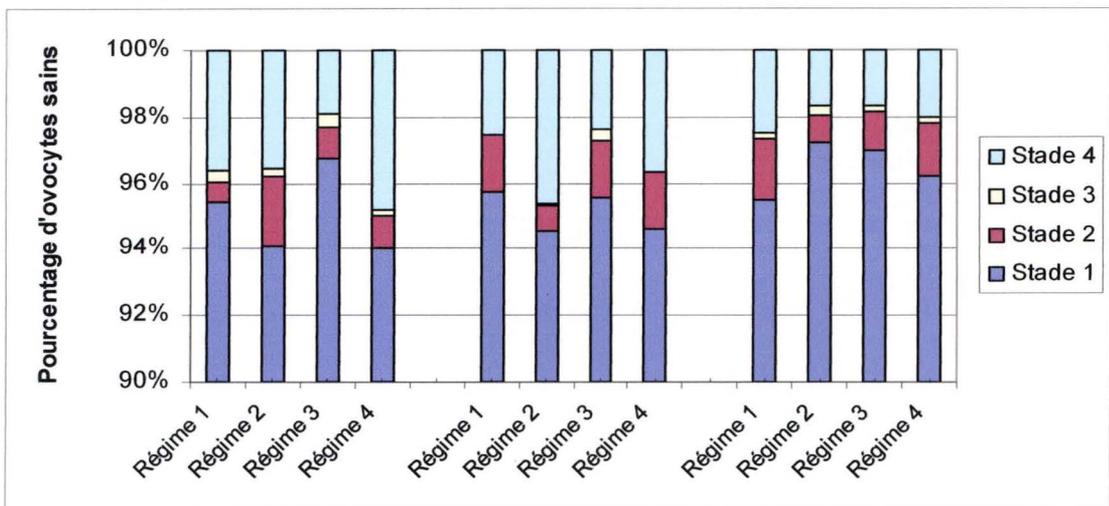


Figure 39 : Comparaison de la proportion des ovocytes sains aux différents stades de maturités pour chaque date de prélèvement. .

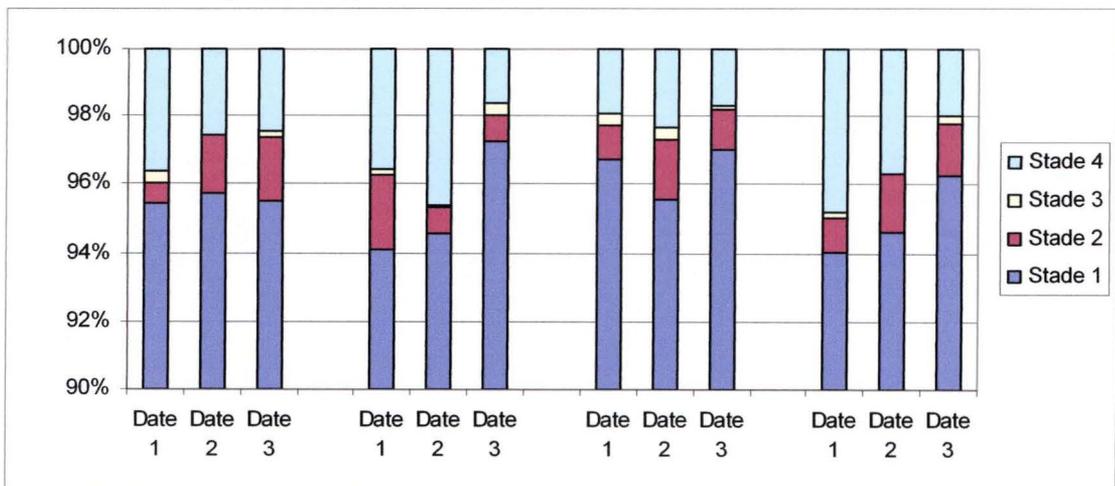


Figure 40 : Comparaison de la proportion d'ovocytes sains aux différents stades de maturités pour chaque régime étudié.

	Régime 1	Régime 2	Régime 3	Régime 4
31 janvier 2005	Spz	Spz	Spz	Spz
31 mars 2005	Spz	Spz	Spz	Spz
9 juin 2005	Spz	Spz	Spz	Spz

Spz : spermatozoïdes

On peut constater que la spermiogenèse se trouve au stade le plus avancé quel que soit le régime que reçoivent les mâles. De fait, ces derniers sont tous spermiantes et cela sur l'entièreté de l'expérience. Donc, la spermiogenèse ne débute pas à des moments différents selon les régimes ou la date.

De plus, aucune structure ovocytaire n'a été observée au sein des testicules. Par contre, au niveau macroscopique, plusieurs anomalies furent mises en évidence. Ainsi, au cours de la première campagne de prélèvement, un individu avec des gonades mâle et femelles, qui plus est en régression, fut découvert dans la cage 1 (régime 1), de même qu'un individu avec l'un des deux testicules en régression dans la cage 3 et la cage 4. A la deuxième date, on constata dans la cage 1 qu'un mâle ne disposait pas de testicules. Un autre individu, présentant une papille génitale mâle, renfermait en fait des ovaires non mûres qui étaient accolés à la paroi dorsale. Dans la cage 2, les testicules d'un des mâles étaient en régression. Finalement, lors du dernier prélèvement, on n'a observé qu'un seul mâle anormal (cage 2) n'ayant qu'un seul testicule.

1.2.2. Les femelles.

1.2.2.1. Proportion des ovocytes à différents stades de maturation.

La figure 39 permet de se rendre compte de la différence entre la maturité des femelles recevant les différents régimes. On peut remarquer que pour les trois dates, tous les individus de l'ensemble des cages possèdent les mêmes types d'ovocytes les plus avancés. Ces derniers sont du type 4 qui correspond à l'état de vitellogenèse exogène, c'est-à-dire à l'apparition des globules de vitellus (lipoprotéine) dans le cytoplasme qui finiront par repousser les vésicules de glycoprotéines en périphérie. Aucun ovocyte en maturation finale ne fut observé (apparition du micropyle et migration du noyau en périphérie). L'étude statistique ne permit pas de mettre en évidence des différences significatives entre les régimes au sein de chaque date. De fait, les ovocytes de type 1, ou protoplasmiques, constituent à chaque fois entre 94 et 98% de la totalité des ovocytes. Remarquons qu'il y avait tout de même trois individus non matures, respectivement à la date 1, 2 et 3. Pour la date 1 - cage 1, les ovocytes les plus avancés sont de type 3 (prévitellogenèse avancée). Par contre, pour la date 2 - cage 1 et la date 3 -cage 2, on retrouve des ovocytes au stade 2 (prévitellogenèse précoce).

L'évolution de l'état de maturation des femelles prélevées au sein d'une cage, correspondant à un régime, est représentée à la figure 40. De manière générale, pour chaque régime, on peut voir une diminution du nombre d'ovocytes en vitellogenèse exogène avec le temps. Donc, à l'inverse, on constate une augmentation du nombre d'ovocyte de type 1. La proportion des ovocytes de type 2 et 3 ne semble pas être modifiée au cours du temps. Cependant, ce ne sont que des tendances parce que, de nouveau, il n'y a aucune différence significative entre les dates pour chaque régime.

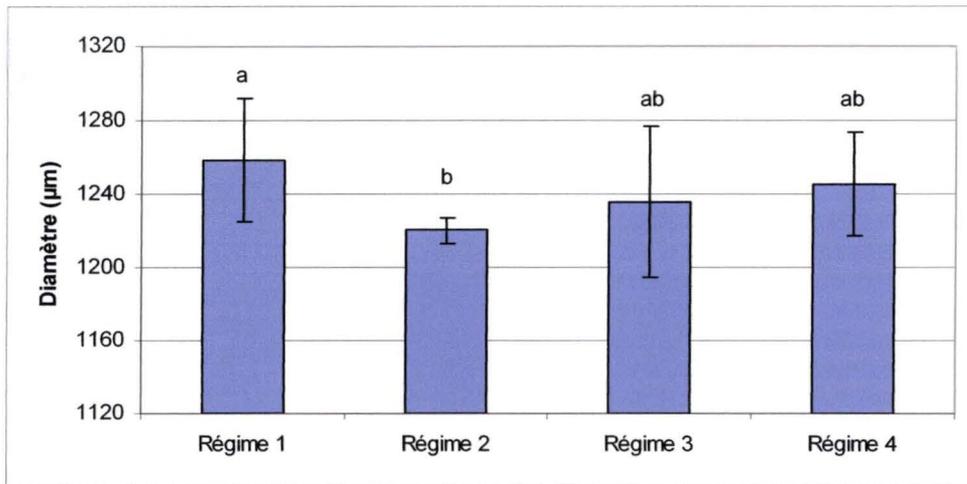


Figure 41 : Comparaison globale des diamètres des ovocytes les plus avancés entre les régimes.

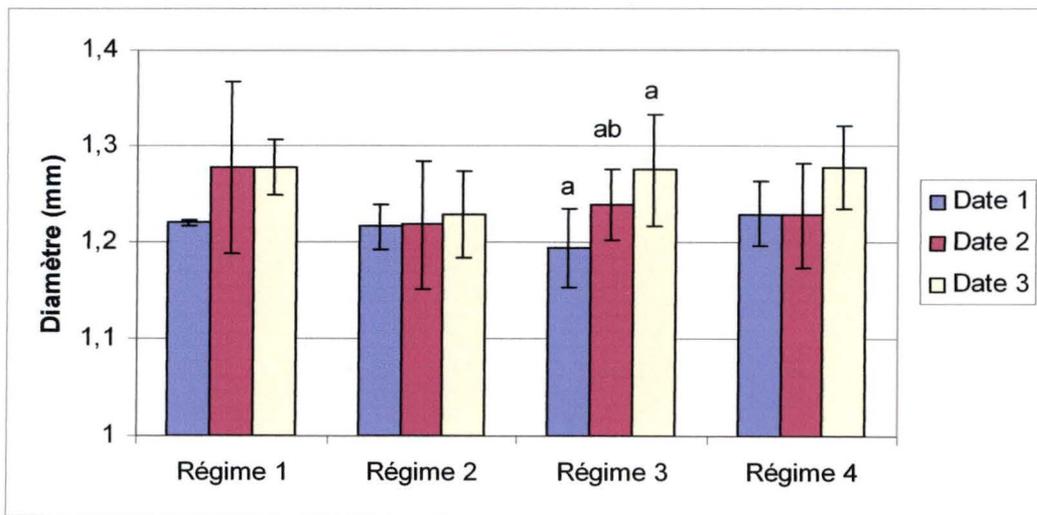


Figure 42 : Comparaison des diamètres des ovocytes les plus avancés entre les régimes.

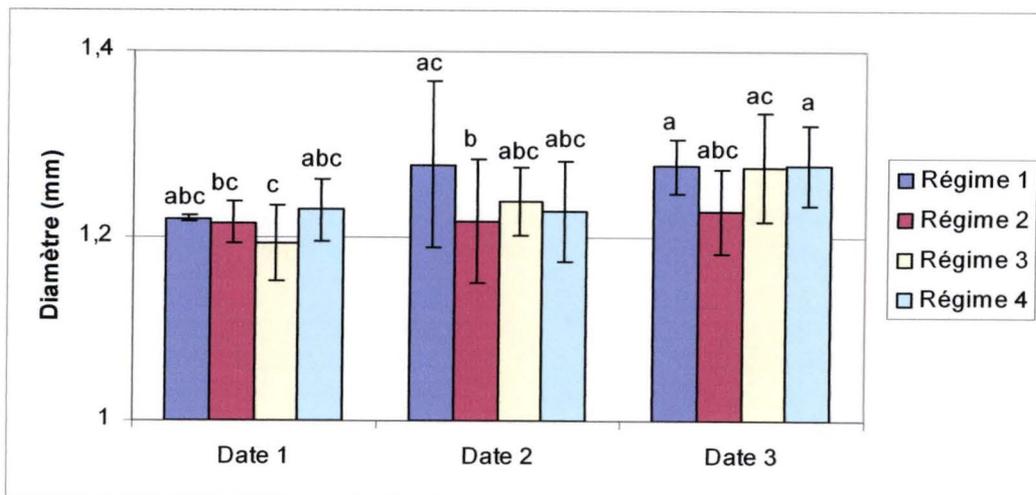


Figure 43 : Comparaison des diamètres des ovocytes les plus avancés entre les dates.

1.2.2.2. Diamètre des ovocytes les plus avancés.

La taille des ovocytes, pour l'ensemble des femelles prélevées, peut varier de 1368,46 μm à 395,42 μm sur toute la période de l'expérience. Quant à la taille moyenne, elle est de 1239,84 μm . Remarquons que les plus petites tailles des ovocytes les plus avancés correspondent à celles des ovocytes en prévitellogenèse précoce (stade 2). Toutefois, cela ne concerne qu'un seul individu non mature. Deux autres individus non matures ont également été observés, mais les ovocytes les plus avancés sont au stade de prévitellogenèse avancée. Les résultats du modèle linéaire généralisé ont révélés un effet significatif de la date d'échantillonnage, du régime mais aussi de l'interaction du régime et de la date sur le diamètre des ovocytes les plus avancés ($p < 0,05$).

La différence globale entre les diamètres des ovocytes les plus avancés des différents régimes est présentée à la figure 41. L'application d'un test post hoc a laissé entrevoir une différence significative entre le régime 1 et le régime 2 ($p = 0,029$), mais aucune autre différence n'a pu être observée. En outre, au sein de chaque régime (figure 42), l'ANOVA permet seulement de montrer que la date 1 différait significativement de la date 3 pour le régime 3. Globalement, un autre test post hoc démontra quant à lui que la date 1 était hautement significativement plus petite que la date 3 ($p = 0,0024$). Toutefois, la comparaison des régimes pour chaque date ne dévoila qu'une seule différence entre le régime 1 et 2 à la date 2 ($p = 0,039$).

Enfin, un dernier test post hoc a permis de mettre en évidence les interactions date – régime, visibles à la figure 43. On se rend compte que trois histogrammes sont significativement différents d'autres valeurs de diamètres, respectivement le régime 2 à la date 1 et à la date 2, ainsi le régime 3 à la date 1.

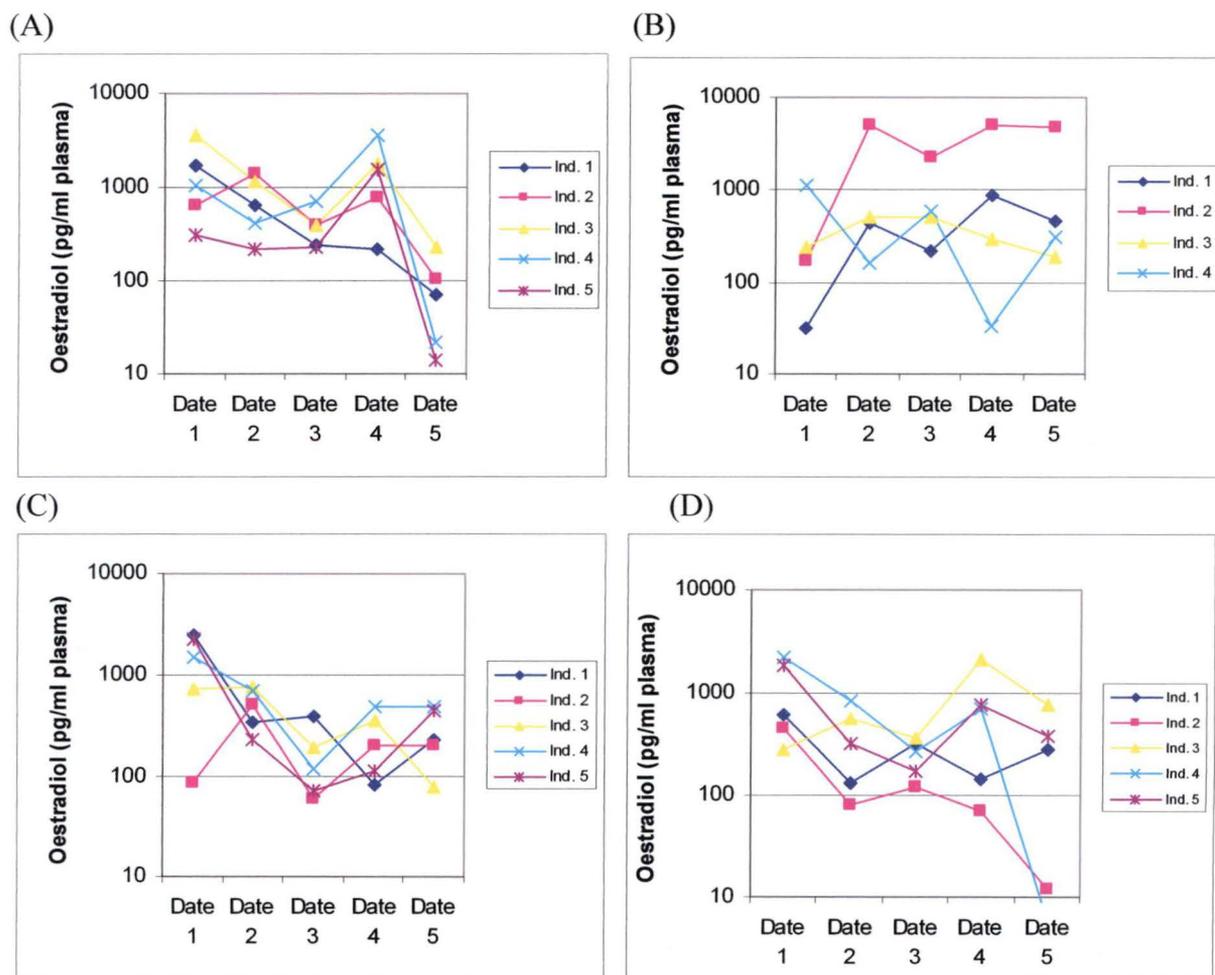


Figure 45 : Profils individuels en E2 des mâles au cours du temps pour le régime 1 (A), le régime 2 (B), le régime 3 (C) et le régime 4 (D).

2. Paramètres endocriniens et biochimiques.

2.1. Concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels.

2.1.1. Mâles.

2.1.1.1. Oestradiol.

Les valeurs d'oestradiol (E2) observées pour les mâles sont relativement faibles puisqu'elles ne présentent pas de valeurs supérieures à 1,5 ng/ml plasma, la moyenne étant de 0,78 ng/ml plasma. Ces dernières varient de 1,16 ng/ml plasma (régime 2) à 0,53 ng/ml plasma (régime 3). Toutefois, l'ANOVA ne montre pas de différences significatives des concentrations plasmatiques en E2 entre les régimes (figure 44). Globalement, les régimes 3 et 4 présentent des valeurs plus faibles que celles des régimes 1 et 2.

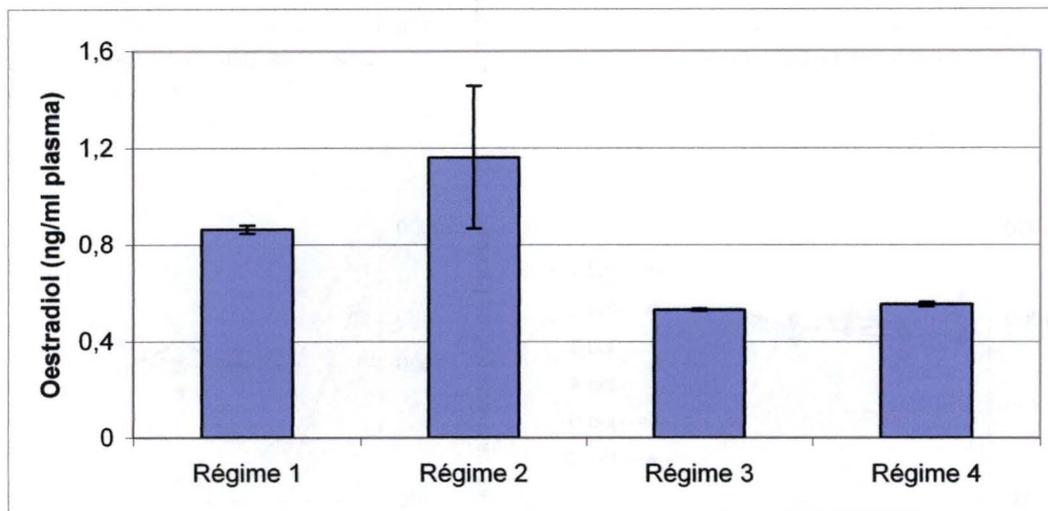
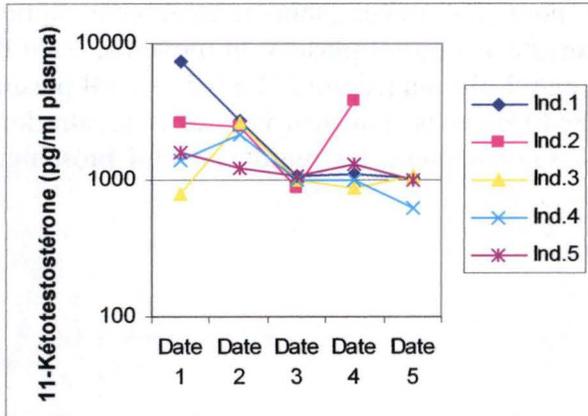


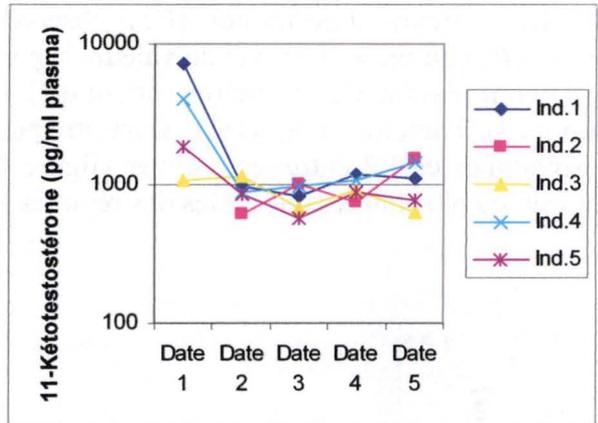
Figure 44 : Comparaison des concentrations plasmatiques en E2 chez les mâles.

Pour ce qui est des profils individuels en E2, tous les individus du régime 1 (figure 45 ; A) présentent le même schéma d'évolution. En effet, on voit une diminution de la concentration d'E2 jusqu'à la date 3, suivie par un pic et ensuite une diminution, mais plus prononcée cette fois. Pour le régime 2 (B), il y a trois individus se situant dans un rang de valeurs identiques, le quatrième présentant des concentrations étrangement élevées. De fait, elles sont de l'ordre de 5 ng/ml plasma, ce qui correspond à ce qui est observé chez les femelles. Dans le régime 3 (C), la décroissance constitue la tendance générale. Le régime 4 (D) dévoile des courbes qui évoluent de la même manière, c'est-à-dire en W. A la date 5, deux poissons présentent des concentrations très faibles (6 et 12 ng/ml plasma).

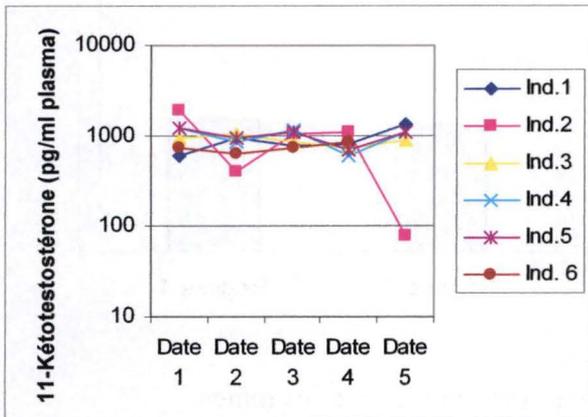
(A)



(B)



(C)



(D)

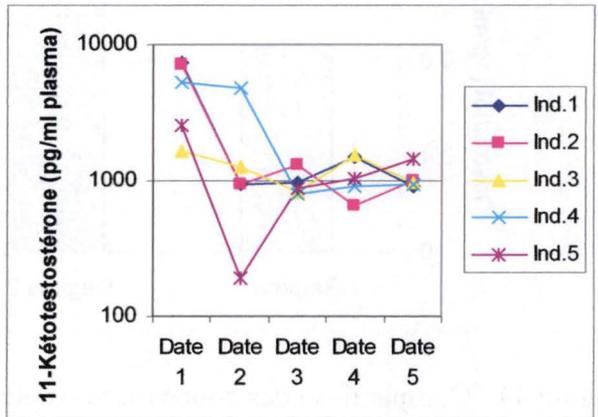


Figure 47 : Profils individuels en 11-KT des mâles au cours du temps pour le régime 1 (A), le régime 2 (B), le régime 3 (C) et le régime 4 (D).

2.1.1.2. 11-Kétotestostérone (11-KT).

Remarquons que les niveaux de concentrations pour cette hormone peuvent aller jusqu'à 4,8 ng/ml plasma, le niveau minimum étant 2,1 ng/ml plasma. Pour l'ensemble des individus et des dates, la moyenne est de 3,9 ng/ml plasma. Les résultats du modèle linéaire généralisé (figure 46) signalent l'existence de différences significatives entre les *C. gariepinus* provenant des différentes cages. De fait, les valeurs obtenues pour le régime 2 (~2,1 ng/ml plasma) sont significativement inférieures à celles du régime 4 (~4,6 ng/ml plasma ; $p = 0,0437$). Par contre, entre les autres régimes, l'ANOVA ne montre aucun effet du régime sur les concentrations en 11-KT chez les mâles. De manière générale, on peut enregistrer une tendance plus basse pour les mesures du régime 2 que pour celles des régimes 3 et 4.

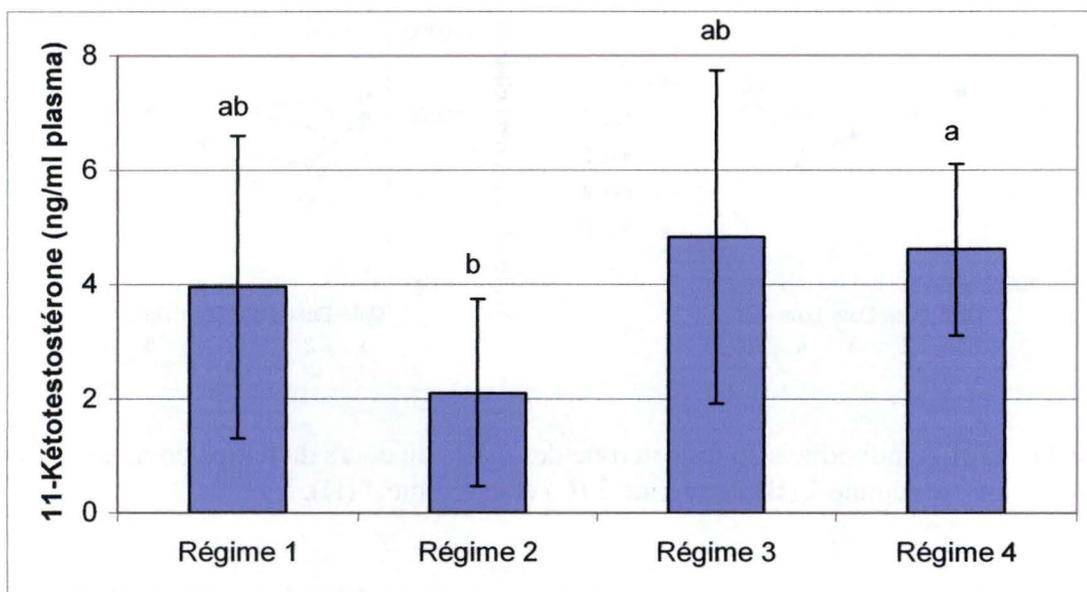


Figure 46 : Comparaison des concentrations plasmatiques en 11-KT chez les mâles. Les histogrammes partageant une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

Lorsqu'on s'intéresse aux profils individuels de chaque mâle, on peut remarquer une très grande variation au cours du temps (figure 47). Pour le régime 1 (A), trois individus sont relativement stables alors que les deux autres présentent des valeurs beaucoup plus élevées aux dates 1 et 2. Les poissons du régime 2 (B) ont des concentrations en 11-KT relativement similaires, à l'exception d'un pic pour un individu à la date 5. Dans le régime 3 (C), on remarque une grande variabilité au départ pour obtenir finalement (date 5) des valeurs assez semblables. Cela semble également être le cas pour le régime 4 (D), même si la variabilité est plus importante entre les extrémités.

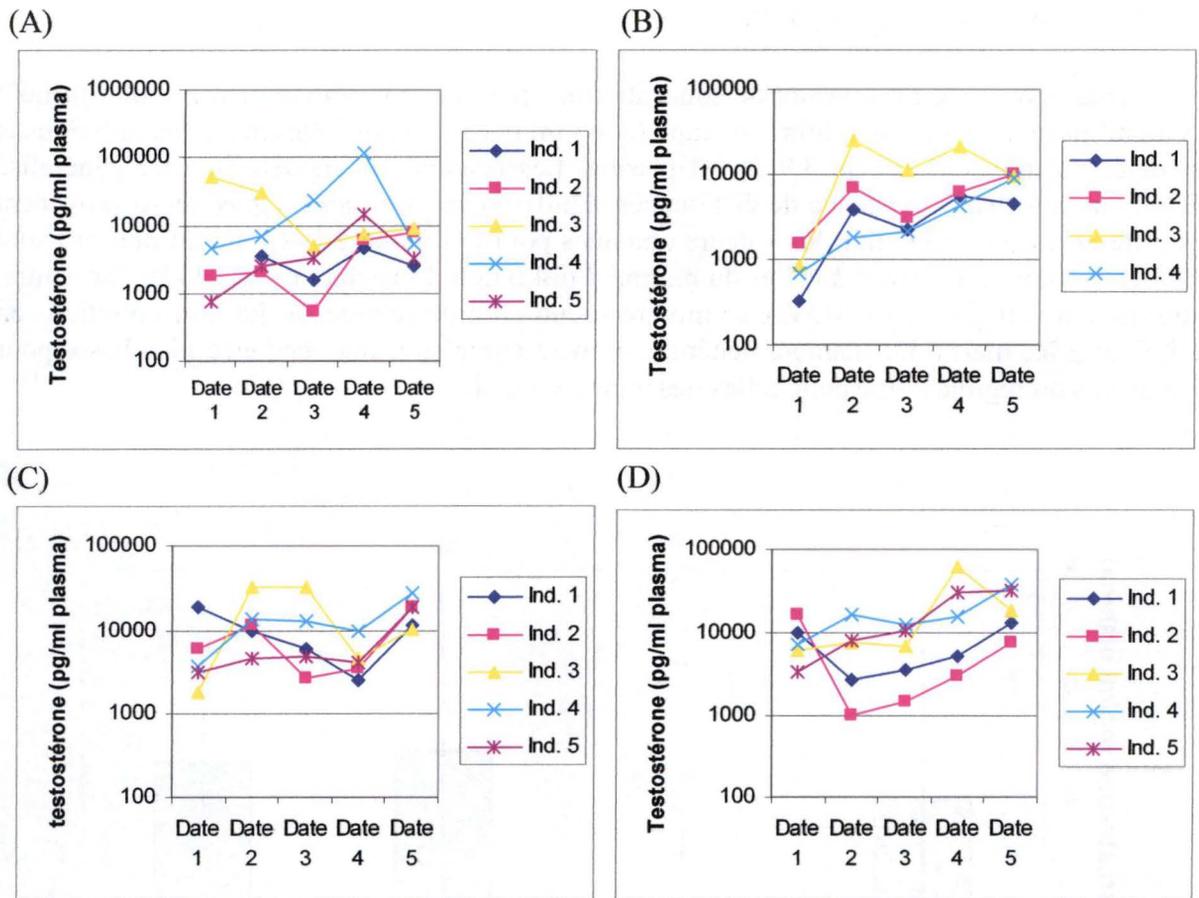


Figure 49 : Profils individuels en testostérone des mâles au cours du temps pour le régime 1 (A), le régime 2 (B), le régime 3 (C) et le régime 4 (D).

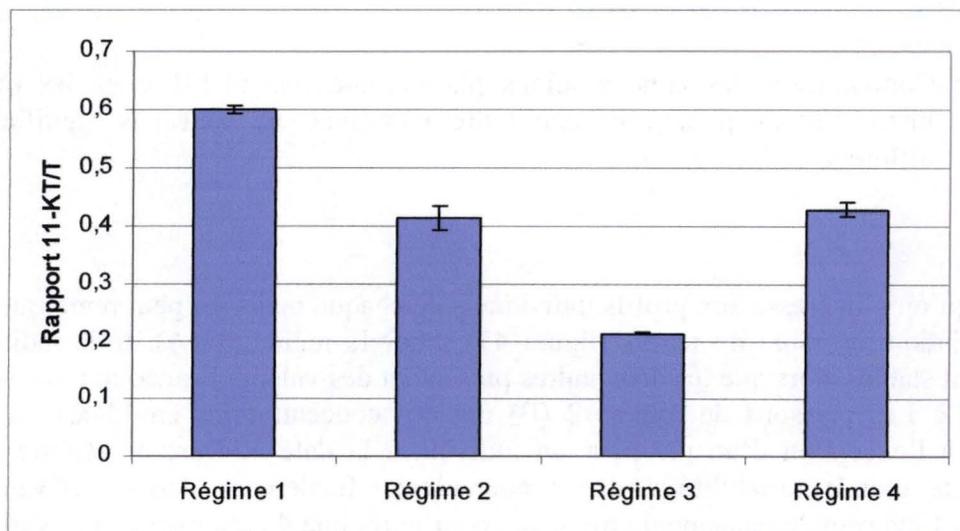


Figure 50 : Comparaison du rapport 11-KT/T chez les mâles.

2.1.1.3. Testostérone (T).

La testostérone est le stéroïde qui présente la plus grande variation de ses concentrations plasmatiques puisqu'elles se situent entre 3 ng/ml plasma et 17,5 ng/ml plasma pour l'ensemble des individus. La moyenne est de 8,69 ng/ml plasma. Néanmoins, l'ANOVA ne montra aucune différence significative sur base des concentrations en testostérone chez les mâles ($p > 0,05$). On peut tout de même noter que ces dernières ont tendance à être plus élevées dans le régime 3 et 4 que dans le régime 1 et 2, comme on peut le voir dans la figure ci-dessous :

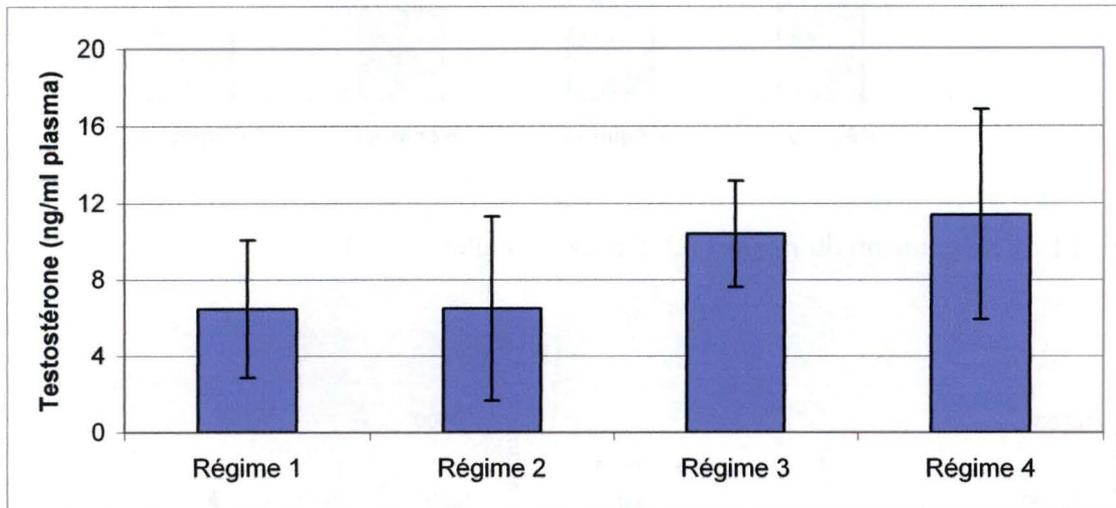


Figure 48 : Comparaison des concentrations en testostérone chez les mâles.

La figure 49 représente l'évolution au cours du temps des concentrations plasmatiques en testostérone pour chacun des poissons. Parmi les individus du régime 1 (A), trois ont des profils similaires, alors qu'un quatrième possède une valeur élevée au départ et finit dans le même rang que les autres. Le dernier commence et finit avec des concentrations identiques aux trois autres, mais subit un pic très important à la fin avril (date 4). Le régime 2 (B) présente des individus avec des courbes en M, l'un d'eux possédant des concentrations plus importantes (ind. 3). Quatre poissons montrent en profil en S dans le régime 3 (C), dont un avec une augmentation et une diminution très prononcée (ind. 3), respectivement à la date 2 et 4. Le cinquième (ind. 1) commence à une concentration plus élevée qui ensuite diminue progressivement pour finir par augmenter à la date 5. Finalement, les *C. gariepinus* du régime 4 (D) ont un profil qui commence dans un rang de valeurs très proche et qui se termine avec des valeurs assez différentes. L'individu 3 subit un pulse de testostérone fortement prononcé à la fin avril.

2.1.1.4. Rapport 11-KT/T.

La figure 50 illustre la comparaison des rapports globaux en 11KT/T des mâles entre les quatre régimes. Les valeurs se situent de 0,24 à 1,18 pour l'ensemble des poissons tandis que la moyenne est de 0,61. Les résultats du modèle linéaire généralisé n'ont pas révélés d'effet significatif du régime sur le rapport 11-KT/T. Toutefois, on peut enregistrer que les valeurs du régime 3 sont trois fois moins importantes que celles du régime 1 et deux fois moins élevées que celles du régime 2 et 4. Quant à ces deux derniers, ils ont des valeurs 30 % plus basses que celles du régime 1.

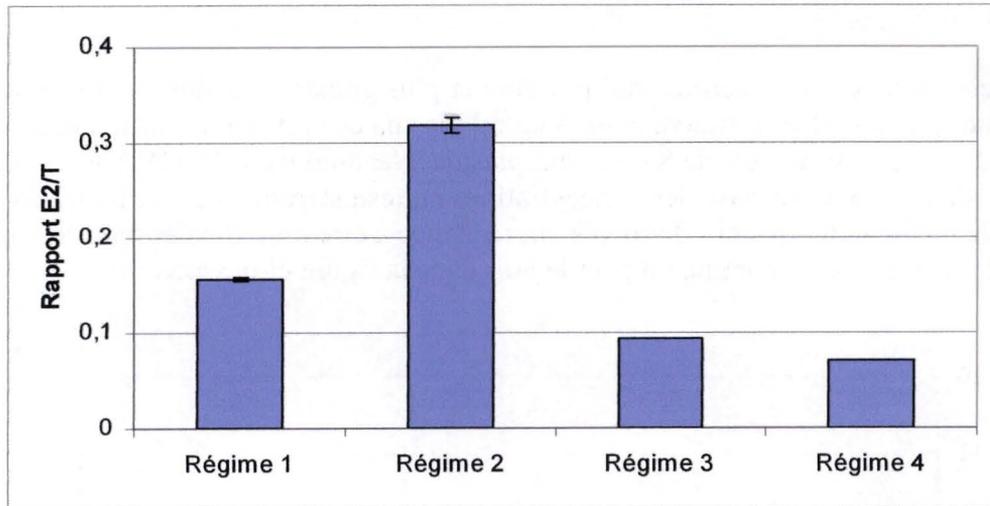


Figure 51 : Comparaison du rapport E2/T chez les mâles.

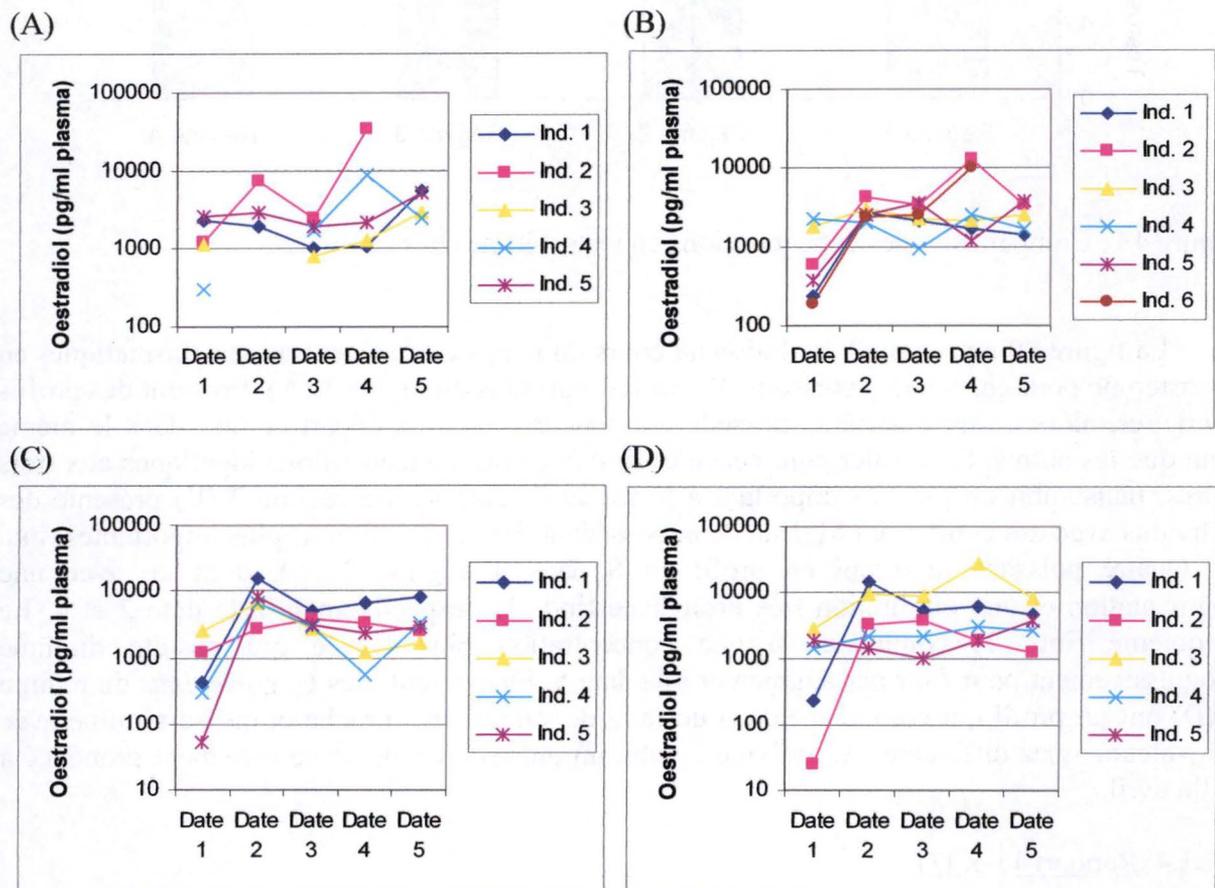


Figure 53: Profils individuels en E2 des femelles au cours du temps pour le régime 1 (A), le régime 2(B), le régime 3 (C) et le régime 4 (D).

2.1.1.5. Rapport E2/T.

La figure 51 montre la comparaison du rapport E2/T des mâles entre les régimes. Les valeurs extrêmes pour l'ensemble des individus sont 0,03 et 0,579. La moyenne est de 0,16. Il n'a pas été possible de pratiquer une ANOVA sur ces données car la normalité de la distribution n'a pu être prouvée. Donc, un test non-paramétrique a été réalisé afin de mettre en lumière d'éventuelles différences entre les régimes. Malheureusement, les résultats de ce test furent négatifs et aucune différence entre les valeurs de ces rapports E2/T ne furent découvertes. Malgré cela, certaines tendances peuvent être mis en évidence. De ce fait, on peut observer que le régime 2 a des valeurs jusqu'à trois fois plus élevées que celles des régimes 3 et 4. Par contre, les rapports de E2/T du régime 1 sont deux fois plus faibles que ceux du régime 2 et sont 50 % plus élevés que les rapports des régimes 3 et 4.

2.1.2. *Les femelles*

2.1.2.1. Oestradiol.

L'analyse de la concentration plasmatique en oestradiol chez les femelles a prouvé que les mesures atteintes (entre 1,5 et 7,3 ng/ml plasma) étaient nettement supérieures à celles des mâles qui dépassent rarement 0,8 ng/ml plasma. La moyenne est de 3,33 ng/ml plasma. C'est le test de Hartley qui a prouvé l'homogénéité des variances. Le modèle linéaire généralisé n'a pas permis de mettre en évidence un effet significatif du régime sur les concentrations en E2 (figure 52). Cependant, on observe que les valeurs en E2 des régimes 1 et 2 sont plus faibles que celles des régimes 3 et 4. Il s'agit donc de la situation inverse par rapport à celle des mâles (figure 44).

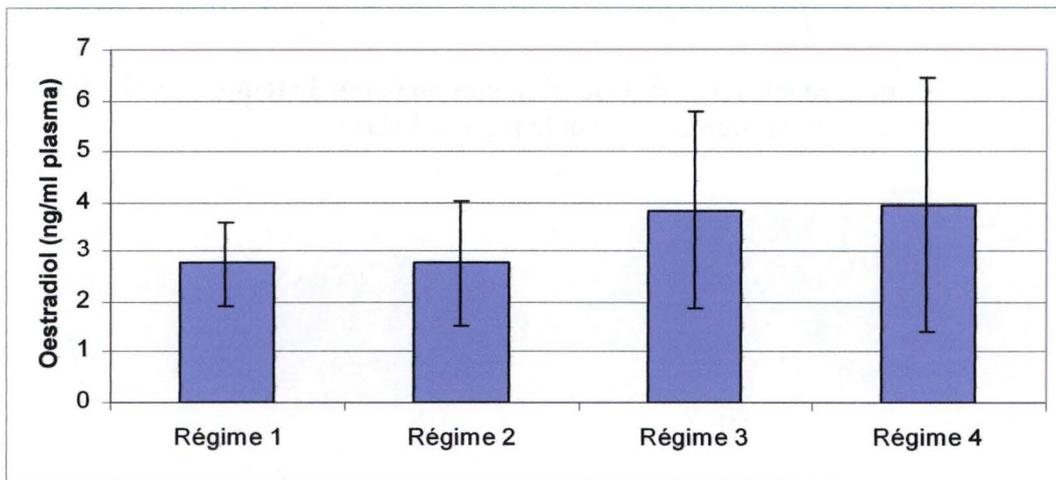
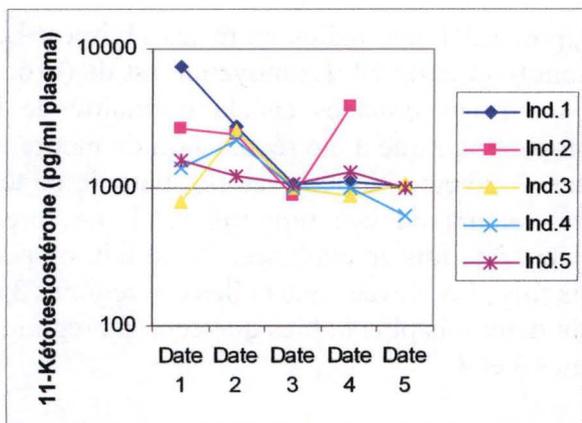


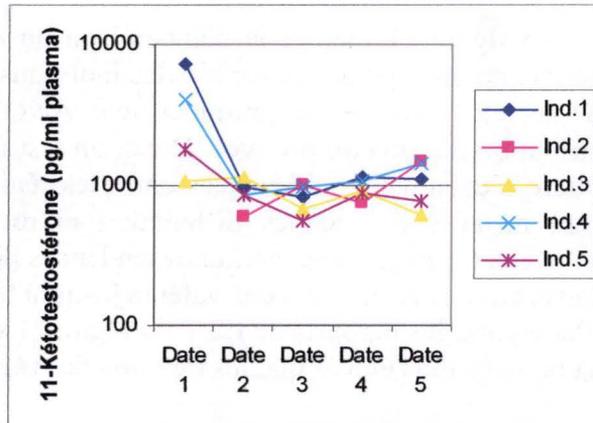
Figure 52 : Comparaison des concentrations en E2 chez les femelles.

Les profils individuels des concentrations plasmatiques en oestradiol pour les différents régimes sont visibles dans la figure 53. Le régime 1 (A) renferme quatre courbes qui débutent et finissent dans un même rang de valeurs, hormis un poisson (ind. 4) dont la courbe commence plus bas et présente un pic à la date 4. Le cinquième profil (ind. 5) a deux pics, respectivement à la date 2 et à la date 4. Il faut tout de même être prudent avec le pulse du mois d'avril (date 4) car il semble hors norme (30ng/ml plasma). Pour le régime 2 (B), deux individus ont des valeurs assez stables dans le temps (ind. 3 et 4) alors que les autres subissent une forte augmentation de leur concentration en E2 à la date 2 pour ensuite se stabiliser dans une gamme

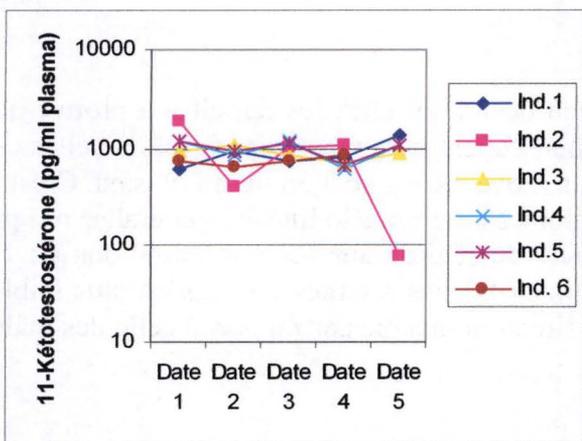
(A)



(B)



(C)



(D)

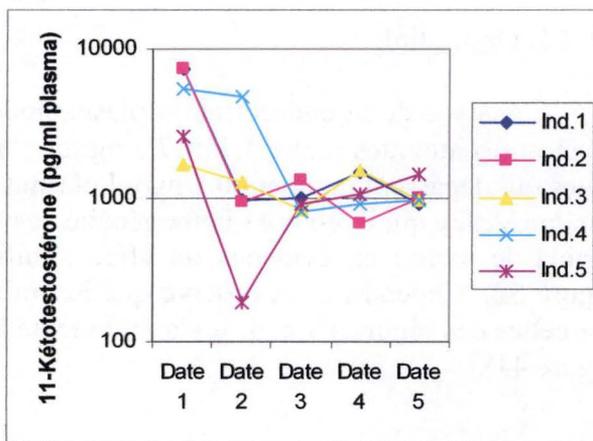


Figure 55 : Profils individuels en 11-KT des femelles au cours du temps pour le régime 1 (A), le régime 2(B), le régime 3 (C) et le régime 4 (D).

de valeurs identiques au deux premiers. L'individu 2 a un pic à la date 4. Quant aux poissons du régime 3 (C), il y en a deux qui ne varient pas beaucoup avec le temps (ind. 2 et 3) alors que les autres subissent une élévation importante de leur taux en E2 au départ. Pour finir, le régime 4 (D) contient deux profils (ind. 1 et 3) qui augmentent sur le début, pour se stabiliser par la suite dans un rang de valeurs dans lequel se maintiennent les individus 4 et 5. La dernière courbe se situe dans une gamme de mesures relativement supérieures avec un pic à la date 4. De nouveau, ce pulse de 26 ng/ml plasma semble hors norme.

2.1.2.2. 11-Kétotestostérone.

A l'inverse des fortes concentrations en E2, les femelles se distinguent des mâles par des concentrations en 11-KT beaucoup plus faibles (dépassant rarement 2 ng/ml plasma), alors que certains mâles peuvent avoir des pics pouvant atteindre jusqu'à 35 ng/ml plasma. La concentration moyenne pour l'ensemble des régimes est de 1,49 ng/ml plasma. Le test de Brown-Forsythe parvient à prouver l'homogénéité des variances. Les résultats de l'ANOVA ont montré un effet significatif du régime ($p < 0,05$) sur les concentrations plasmatiques en E2 chez les femelles (figure 54).

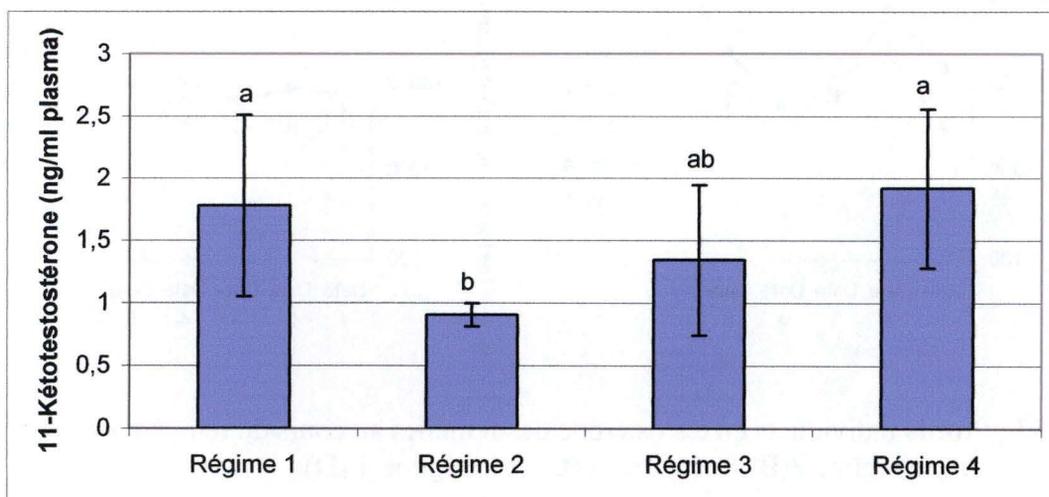


Figure 54 : Comparaison des concentrations en 11-KT chez les femelles. Les histogrammes qui partagent une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

Un test post hoc a donc permis de distinguer les différences entre régimes. Ainsi, on se rend compte que le régime 2 est significativement différent du régime 1 ($p = 0,018$) alors que la différence entre les régimes 2 et 4 est hautement significative ($p = 0,0077$). A l'instar de ce qui a été observé chez les mâles, on remarque que le taux de 11-KT pour le régime 2 est nettement inférieur à ceux des trois autres repas. Mais cette fois, le régime 1 se situe dans un même rang de valeurs que les régimes 3 et 4.

L'évolution des concentrations individuelles en 11-KT pour chacun des régimes est représentée à la figure 55. Pour les régimes 1 (A), 2 (B) et 4 (D), on peut voir qu'un schéma relativement similaire a tendance à se reproduire. En effet, dans ces trois régimes, les profils débutent avec des valeurs assez différentes pour se terminer dans une gamme de concentrations

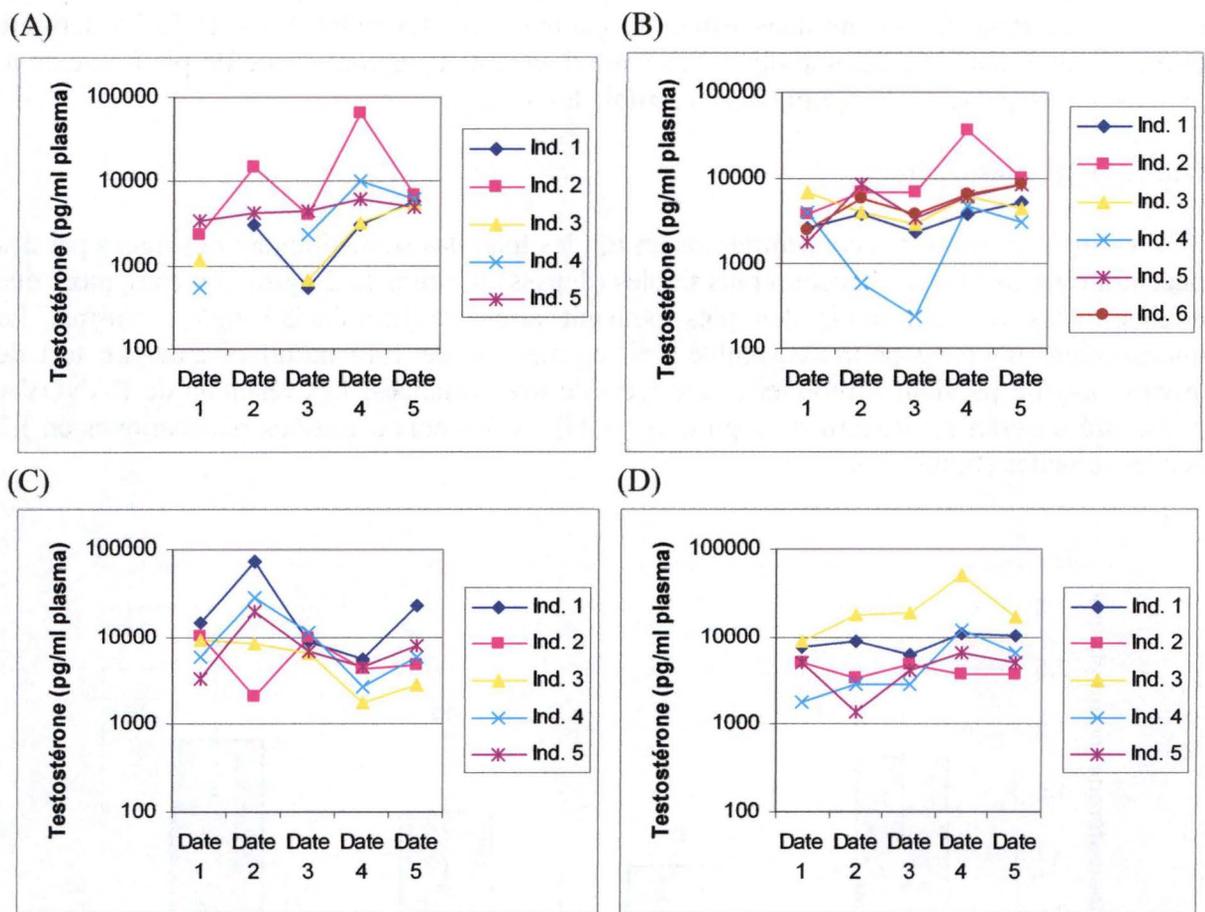


Figure 57 : Profils individuels en testostérone des femelles au cours du temps pour le régime 1 (A), le régime 2(B), le régime 3 (C) et le régime 4 (D).

beaucoup plus proches. Notons quand même que l'individu 2 du régime 1 subit un pic en mai (date 4) tandis que l'individu 5 du régime 4 montre une forte diminution en mars (date 2). Les poissons du régime 3 (C) ont des courbes qui restent très stables avec le temps, hormis l'individu 2 qui subit une chute importante de sa concentration en 11-KT en juin (date 5).

2.1.2.3. Testostérone.

Au contraire des autres hormones, les femelles ne se distinguent pas des mâles par des concentrations en testostérone beaucoup plus élevées ou plus faibles, les valeurs étant assez proches d'un régime à l'autre entre les deux sexes. De fait, celles-ci varient entre 4,48 ng/ml plasma et 8,98 ng/ml plasma, la moyenne étant de 6,73 ng/ml plasma. Les résultats du modèle linéaire généralisé n'ont pas révélé d'effets significatifs du régime sur les concentrations plasmatiques en testostérone ($p < 0,05$). Cependant, comme chez les mâles, les histogrammes des régimes 1 et 2 ont tendance à être plus faibles que ceux des régimes 3 et 4, effet surtout marqué entre le premier et le troisième.

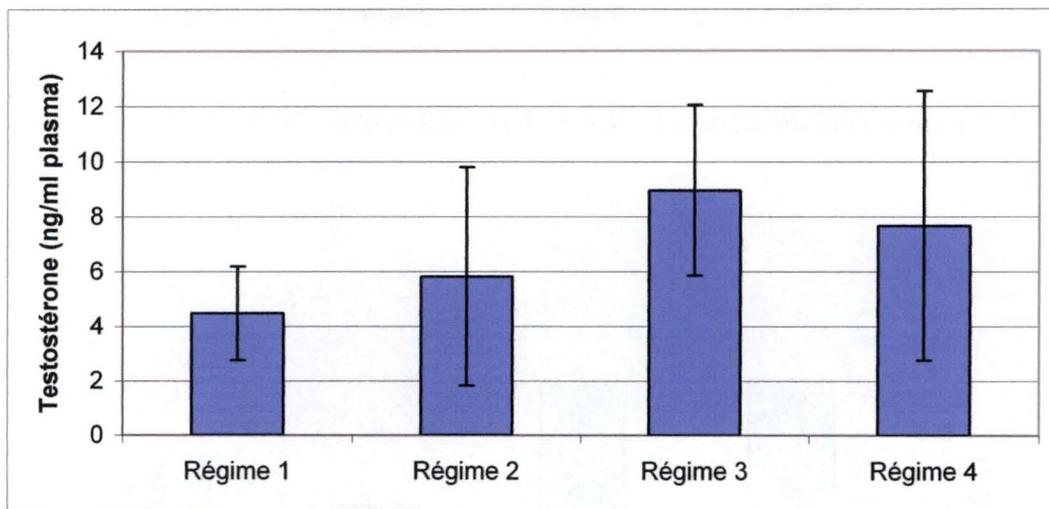


Figure 56 : Comparaison des concentrations plasmatiques en testostérone.

Les profils individuels en testostérone des femelles sont présentés à la figure 57. Ainsi, le régime 1 (A) nous dévoile des profils individuels très différents les uns des autres. Un des *C. gariiepinus* (ind. 2) possède une courbe en M, avec un pic prononcé en mai (date 4). Deux autres (ind. 1 et 3) présentent une diminution importante à la date 3 alors que les deux derniers ont des valeurs plus stables au cours du temps. Pour le régime 2 (B), on remarque que quatre courbes sont identiques tandis que la concentration en T de l'individu 2 augmente fortement à la date 4 et que celle du poisson 4 est très faible jusqu'en avril (date 3) avant de croître subitement. Pour le régime 3 (C), les courbes ont une forme de S (pic à la date 2), à l'exception de l'individu 2 dont le profil diminue en mars au lieu d'augmenter. Quant au régime 4 (D), ces mesures sont relativement constantes dans le temps pour quatre individus, mais sont nettement plus élevées pour le cinquième (ind. 3) avec un pulse en mai.

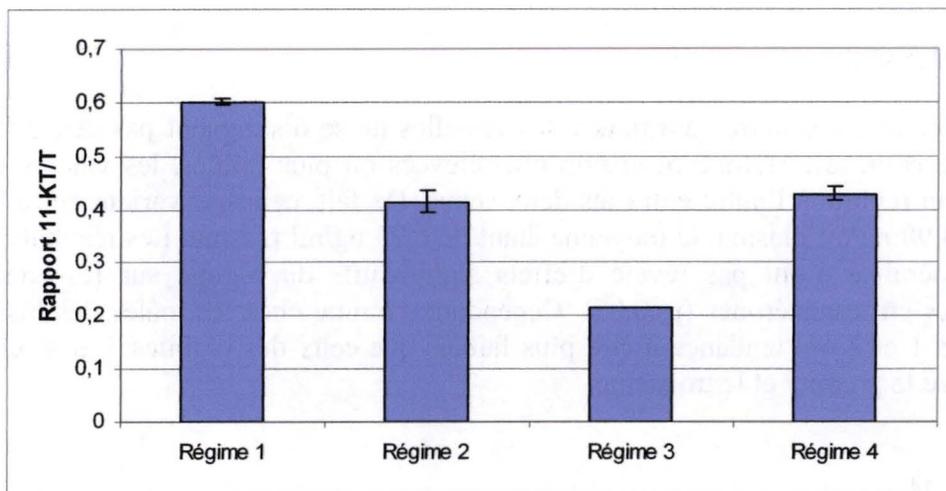


Figure 58 : Comparaison du rapport 11-KT/T chez les femelles.

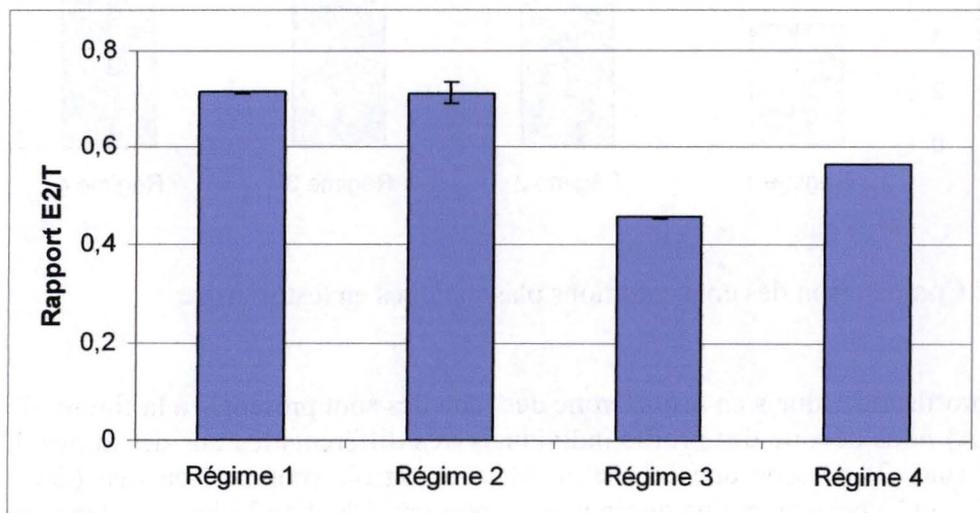


Figure 59 : Comparaison du rapport E2/T chez les femelles.

2.1.2.4. Rapport 11-KT/T.

Les rapports globaux en 11-KT/T chez les femelles pour chaque régime sont illustrés sur la figure 58. Le rang de valeurs dans lequel se trouvent les histogrammes des femelles n'est pas très éloigné de celui des mâles. De fait, la moyenne est de 0,41 tandis que celle des mâles est de 0,61. Les mesures varient entre 0,07 et 1,43. Ceci pourrait refléter une forte variabilité, mais la grande majorité des individus se trouve plutôt entre 0,2 et 0,5. Les résultats de l'ANOVA n'ont pas révélé un effet significatif du régime sur les rapport en 11-KT/T chez les femelles ($p < 0,05$). Globalement, on peut enregistrer certaines tendances : les valeurs du régime 3 sont deux fois plus basses que celles des régimes 2 et 4, assez similaires entre elles, et jusqu'à trois plus faibles que celles du régime 1.

2.1.1.5. Rapport E2/T.

La figure 59 représente les profils de différences au niveau du rapport E2/T chez les femelles pour chaque régime. Les histogrammes obtenus sont bien plus importants ici que chez les mâles. Ainsi, pour l'ensemble des poissons, les valeurs extrêmes obtenues sont 0,26 et 1,78, avec une moyenne de 0,61 pour 0,16 chez les mâles. Néanmoins, l'ANOVA n'a pas su mettre en évidence un quelconque effet significatif du régime sur les rapports en E2/T chez les femelles ($p < 0,05$). Malgré ceci, on peut voir que les valeurs des régimes 1 et 2 sont plus élevées par rapport à celles des régimes 3 et 4. De plus, ce profil est très ressemblant à celui qui a été observé pour les rapports en 11-KT/T chez les mâles.

2.2. Concentrations plasmatiques en ALP.

2.2.1. Les mâles.

Les valeurs de phosphate alcalin libre (ALP) observées chez les mâles sont représentées à la figure 60. Ces dernières varient de 15,8 $\mu\text{g/ml}$ plasma à 68,8 $\mu\text{g/ml}$ plasma. Cependant, elles restent plus faibles que chez les femelles dont les concentrations atteignent des pics avoisinant 130 à 160 $\mu\text{g/ml}$ plasma. La moyenne est de 28 $\mu\text{g/ml}$ plasma. Les résultats de l'ANOVA n'ont pas révélé d'effets significatifs du régime sur les concentrations plasmatiques en vitellogénine des mâles ($p < 0,05$). Même si ce n'est pas significatif, on peut enregistrer que les moyennes des régimes 1 et 2 sont plus élevées que celles des régimes 3 et 4.

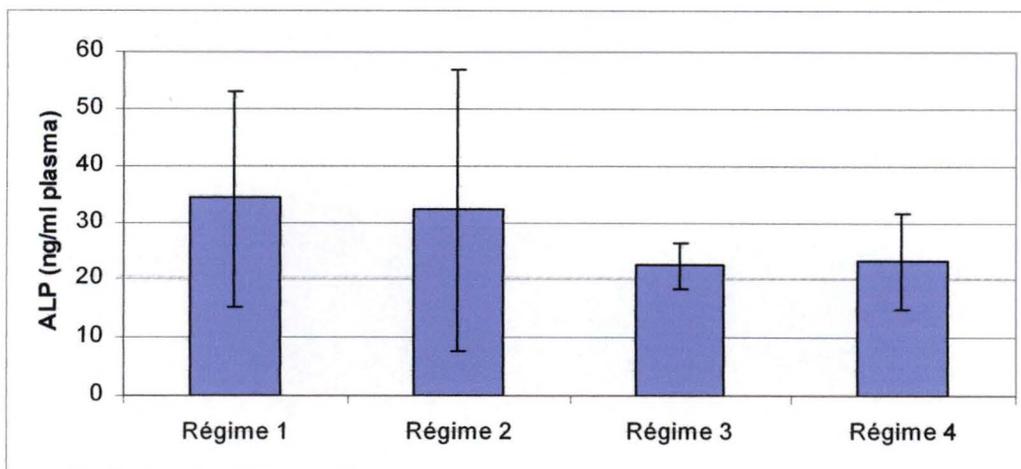


Figure 60 : Comparaison des concentrations plasmatiques en ALP chez les mâles.

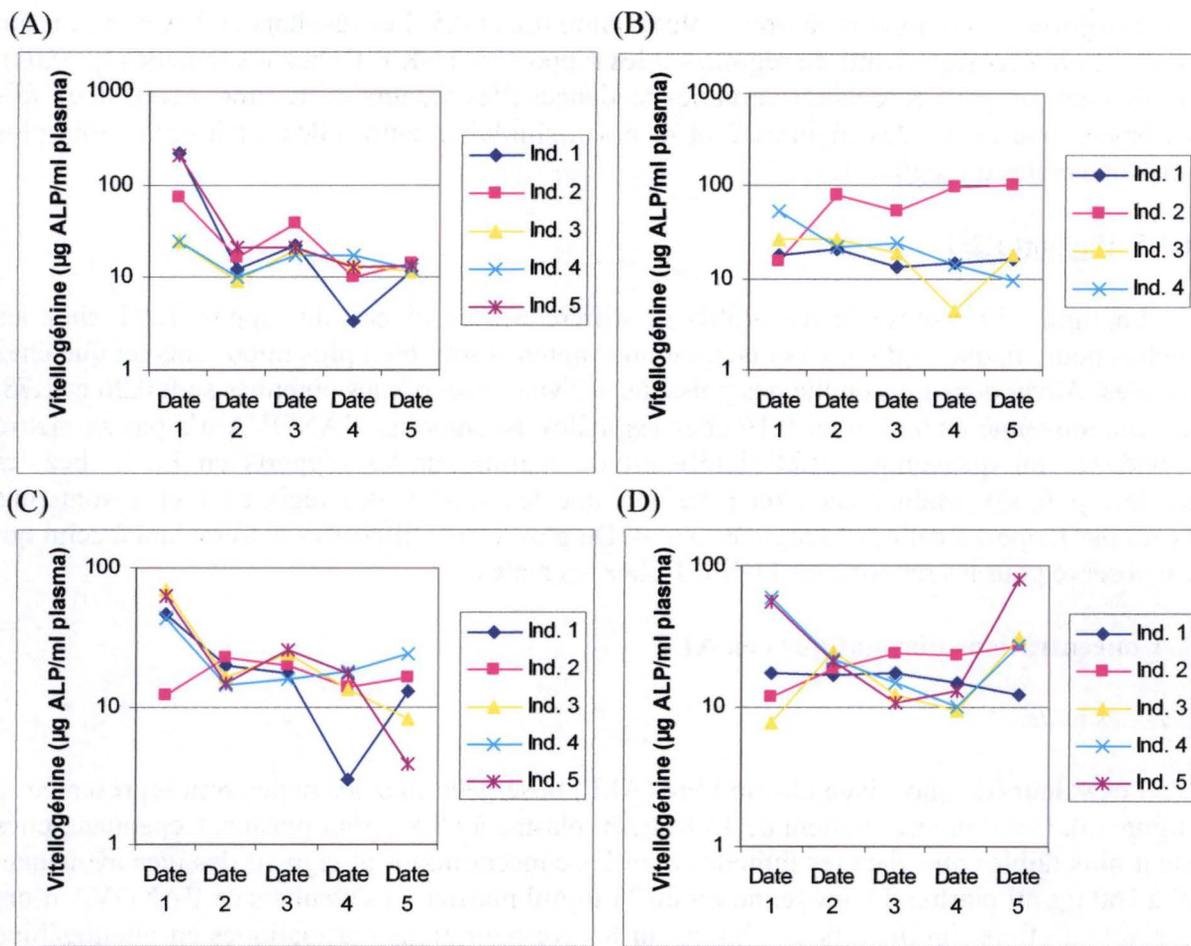


Figure 61: Profils individuels en vitellogénine des mâles au cours du temps pour le régime 1 (A), le régime 2(B), le régime 3 (C) et le régime 4 (D).

Les profils individuels en vitellogénine pour chacun des régimes sont visibles à la figure 61. Les courbes du régime 1 (A) ont toutes une forme de W. Notons que ces courbes commencent avec des valeurs très différentes pour se finir près d'un point commun, et que les individu 1 et 5 présentent une concentration en janvier (date 1) très importante (plus de 200 $\mu\text{g/ml}$ plasma), surtout pour des mâles. Trois des poissons du régime 2 (B) sont assez stables et similaires tandis que le dernier (ind. 2) voit sa concentration augmenter en mars (date 2) avant de se stabiliser. Pour le régime 3 (C), les profils, relativement différents, débutent avec des valeurs proches et se terminent avec des valeurs éloignées. Quant au régime 4 (D), les courbes commencent et finissent avec des concentrations très disparates.

2.2.2. Les femelles.

Parallèlement aux fortes valeurs d'E2, les femelles présentent des concentrations importantes en ALP, pouvant atteindre des pics compris entre 130 et 170 $\mu\text{g/ml}$ plasma, les concentrations minimales obtenues se situant aux alentours de 40 $\mu\text{g/ml}$ plasma. Toutefois, la moyenne est de 65,2 $\mu\text{g/ml}$ plasma pour l'ensemble des poissons. Aucun effet significatif du régime sur les concentrations en ALP ne fut enregistré suite à l'application d'une ANOVA. Comme c'était le cas chez les mâles, les histogrammes des régimes 1 et 2 sont supérieurs à ceux des régimes 3 et 4 (figure 62).

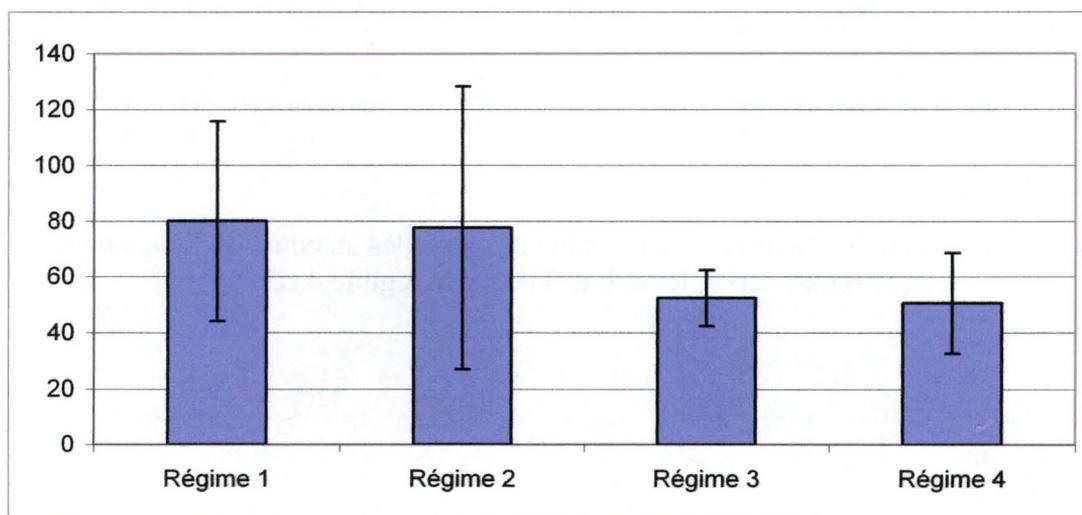


Figure 62 : Comparaison des concentrations plasmatiques en ALP chez les femelles.

En ce qui concerne les profils individuels en ALP (figure 63), on constate que les *C. gariepinus* du régime 1 contiennent trois individus (ind. 2, 3 et 5) avec des concentrations élevées en janvier (date 1). Ils subissent ensuite une forte décroissance de leur taux de vitellogénine pour finir dans la même gamme de mesures que les deux autres, plus stables. Pour le régime 2, tous les poissons montrent une augmentation à la date 2, sauf un qui diminue (ind. 3), et quatre se stabilisent par la suite. Le cinquième subit une chute de sa concentration alors que pour le sixième, ce sera un pic très fortement prononcé à la date 5. Les courbes du régime 4 sont quant à elles toutes identiques. On remarque ainsi une importante élévation suivie par une chute plus au moins prononcée selon les individus. C'est un peu similaire pour les courbes du régime 4 puisqu'il y a également une décroissance précédée par une augmentation. De nouveau, celles-ci sont plus ou moins importantes en fonction des poissons.

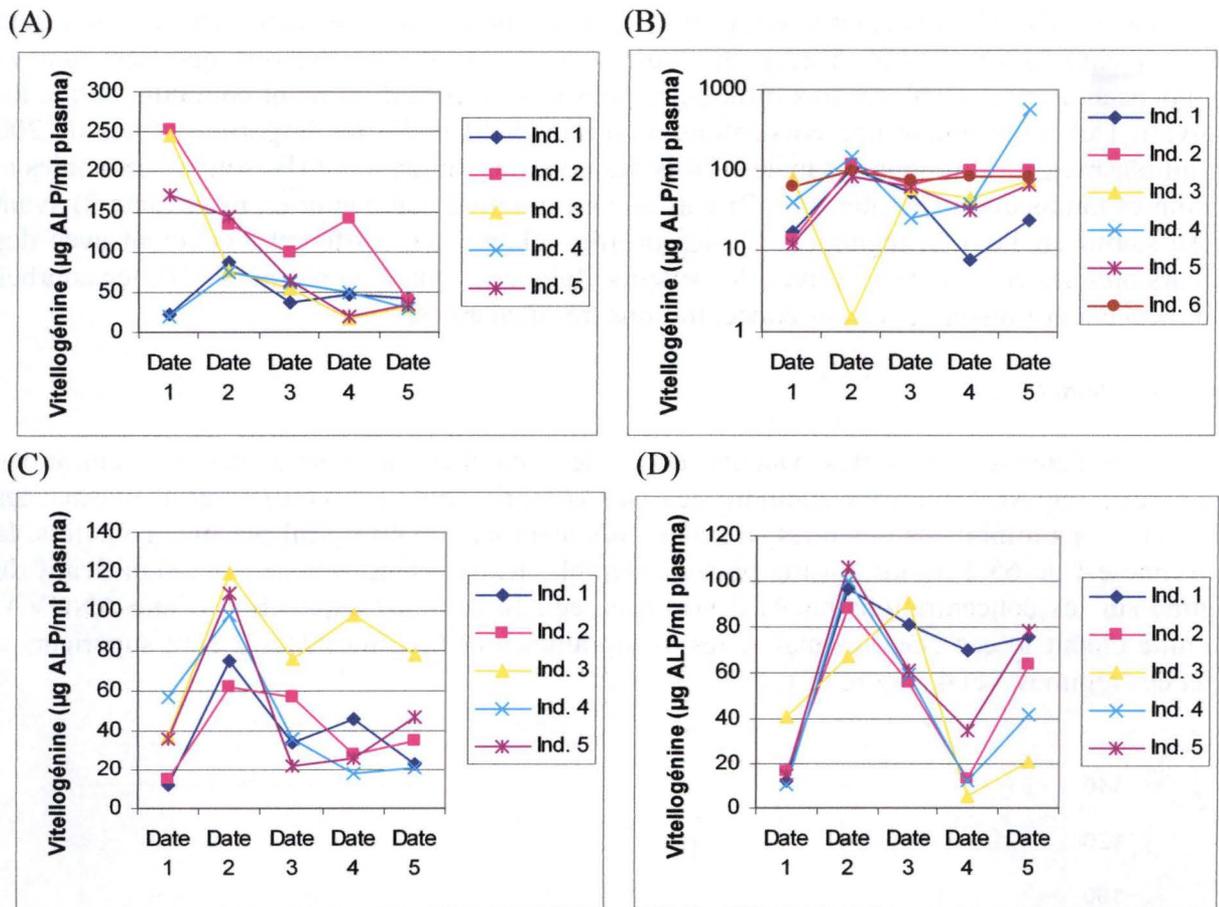


Figure 63 : Profils individuels en vitellogénine des femelles au cours du temps pour le régime 1 (A), le régime 2(B), le régime 3 (C) et le régime 4 (D).

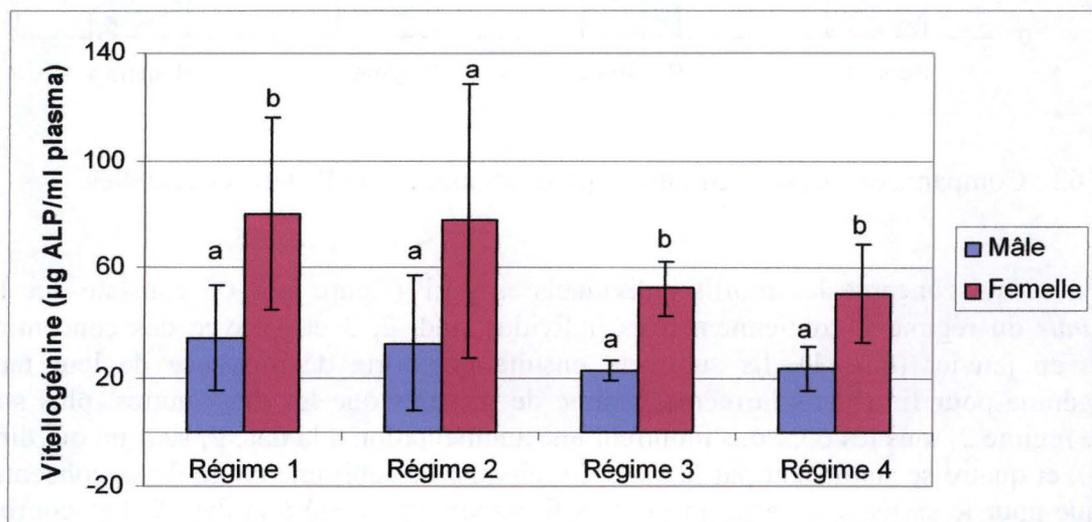


Figure 64 : Comparaison des concentrations plasmatiques en ALP entre les femelles et les mâles. Au sein de chaque régime, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

2.2.3. *Comparaison mâles/femelles.*

La figure 64 illustre les concentrations en ALP à la fois chez les mâles et chez les femelles. Les résultats de l'ANOVA, effectuée pour chacun des régimes, ont révélé une différence significative des concentrations en ALP entre les deux sexes ($p < 0,05$). De fait, il y a une différence significative entre les mâles et les femelles pour le régime 1 ($p = 0,035$) et pour le régime 4 ($p = 0,014$), mais elle est très hautement significative pour le régime 3 ($p = 0,0002$). Par contre, aucun effet du sexe n'a été enregistré pour le régime 2.

Quatrième partie: discussion

1. Présentation des résultats.

Il paraît évident que l'échantillonnage réalisé au cours de ce type d'expérience va fortement conditionner les résultats et la fiabilité des discussions autour de ceux-ci. Il faut rester conscient que les éventuelles relations mentionnées entre les différentes variables et les conclusions que nous pourrions tirer devront être considérées avec précautions. De fait, les prélèvements ont été réalisés sur un petit nombre d'individus et qui plus est, nous ne disposons de données que pour un nombre restreint de paramètres. En outre, la présence de phytoestrogènes, des perturbateurs endocriniens, dans nos aliments reste une hypothèse puisque aucun dosage ne fut directement réalisé sur ceux-ci. De plus, certains ingrédients sont pré-traités avant leur incorporation dans un régime, ce qui pourrait encore réduire leur impact sur le déroulement la reproduction. C'est le cas pour les antinutriments dont l'influence sur la croissance est réduite lorsqu'ils sont pré-traités (Francis *et al.*, 2001).

Dans notre expérience, des problèmes d'ordre logistique (manque de place), humain (manque de main d'œuvre) et financier nous ont empêché de prendre plusieurs répliqués par régime et de considérer les individus de chaque régimes comme tels, ce qui n'est bien sur pas l'idéal. De plus, il n'a pas été possible de tenir compte de l'effet temps dans notre étude pour la majorité des variables (stéroïdes et vitellogénine). Ceci est du au fait qu'en milieu tropical le cycle hormonal d'un poisson n'est pas bien synchronisé à celui des autres. De plus, en milieu semi-artificiel, *Clarias gariepinus* subit beaucoup moins l'influence des facteurs environnementaux, comme la montée des eaux durant la saison des pluies, ce qui le rend capable de se reproduire tout le long de l'année. Donc, aux moments des prélèvements, certains poissons se trouvaient au début de leur cycle, d'autres en plein milieu avec le pic de stéroïdes ou d'autres encore à la fin. Dès lors, il devenait très compliqué d'obtenir l'homogénéité des variances et d'effectuer une ANOVA 2 sur les résultats. En effet, pour que les données soient valables sur le plan statistique, il aurait fallu que tous les poissons se situent au même endroit dans le cycle reproductif. Une autre solution aurait peut être été de réaliser l'échantillonnage sur un plus grand nombre d'individus. Afin de contourner le problème, nous avons décidé de faire une moyenne des valeurs individuelles sur toute la durée de l'expérience, puisque nous prélevions le sang, pour une cage, sur les cinq mêmes individus d'un mois à l'autre. Donc, cela permettait d'obtenir une valeur de concentration pour chaque individu. Ces dernières ont ensuite été moyennées par régime et comparées une à une à l'aide d'un test ANOVA.

2. Mâles.

2.1. Indicateurs morphologiques.

Il est connu que le poids des testicules est largement inférieur à celui des ovaires puisque l'allocation énergétique attribuée aux gonades mâles est plus faible que chez les femelles. Comme d'autres espèces de Siluroïdes, le poisson-chat africain est oligospermique ($RGS \leq 1\%$), ce qui correspond aux mesures faites dans notre étude ($RGS = 0,3\%$). Si on a pas trouvé de différences entre les RGS des mâles aux différentes dates de prélèvements, c'est certainement du au fait qu'en étang les poissons-chats africains disposent de gonades matures durant toute l'année (Legendre *et al.*, 1996). De plus, aucun effet du régime sur ce paramètre ne fut enregistré. Donc, cela tend à démontrer que les sous-produits agro-industriels, servant à formuler nos régimes, n'ont pas d'impacts sur le RGS des mâles. De la sorte, Bennetau-Pelissero *et al.* (2001) démontrèrent que la consommation de génistéine n'influençait pas le RGS des truites arc-en-ciel mâles.

L'analyse des coupes histologiques chez les mâles s'est révélée essentielle d'une part dans la détermination du stade exact de maturité et d'autre part dans l'évaluation des effets des phyto-oestrogènes éventuellement présents dans l'alimentation. Cette analyse des coupes histologiques vient confirmer les résultats du calcul du RGS. Elles ne révèlent aucunes différences dans la maturation sexuelle des individus entre les régimes. En effet, la maturation finale, caractérisée par l'apparition de spermatozoïdes, est observée chez l'ensemble des individus et à toutes les dates de prélèvements. Cela signifie donc que tous les mâles sont spermiantes, confirmant les conclusions de Legendre *et al.* (1996). Et si les aliments végétaux utilisés n'ont pas d'influence sur le développement testiculaire, ils n'affectent pas non plus l'apparition de structures ovocytaires au sein des testicules. De cette façon, on n'a pas découvert de trace d'ovocytes lors de l'étude des coupes des gonades mâles. Toutefois, Tzchori *et al.* (2004) mirent en évidence que la présence de phyto-oestrogènes dans l'alimentation pour anguilles européennes (*Anguilla anguilla*) peut modifier la différenciation sexuelle et augmenter le pourcentage de femelles dans les populations captives d'anguilles. Mais dans le cadre de cette expérience, ils ont du rajouter de fortes doses de phyto-oestrogènes (2mg/kg de nourriture) pour enregistrer de tels résultats, tandis que nos régimes renfermaient des concentrations naturelles en perturbateurs endocriniens. Quant aux mâles avec des testicules en régression, il est difficile de dire que cela est dû à un quelconque effet du régime car le phénomène est sporadique (3 individus) et généralisé aux quatre cages. En outre, ces gonades semblent parfaitement normales puisque l'analyse histologique ne dévoila pas d'anomalies au niveau microscopique. Le plus déroutant fut la découverte d'un individu avec un testicule et un ovaire, parfaitement normaux au niveau histologique, et d'un autre sans testicules. Tout deux furent prélevés dans la cage 1, c'est-à-dire celle recevant le régime le plus riche en farine de poisson, ce qui nous empêche d'attribuer ce phénomène aux phyto-oestrogènes.

2.2. Concentrations en stéroïdes sexuels.

2.2.1. 11-Kétotestostérone.

Comme chez de nombreux poissons téléostéens, la 11-kétotestostérone est responsable de l'apparition des caractères sexuels secondaires, du comportement reproducteur et du développement gonadique chez les *C. gariépinus* mâles (Schultz *et al.*, 1997). Les concentrations en 11-KT obtenues sont relativement proches de celles observées par Goos et Richter (1996). Il est peu probable que la différence entre les régimes 2 et 4 soit attribuable à un impact de l'alimentation car le régime 1, contenant le moins de sous produits végétaux et donc de phyto-oestrogènes, présente une valeur proche de celles de ces deux régimes. De plus, ce qui différencie le régime 2 des autres, c'est l'absence notamment dans sa formulation de farine de haricot, aliment connu pour contenir assez bien d'isoflavones (Murkies *et al.*, 1998). Ensuite, chez des truites arc-en-ciel mâles ayant ingéré du génistéine, une légère diminution des niveaux plasmatiques en GTH I et II fut notifiée à la fin de la spermatogenèse, ainsi qu'une réduction significative du $17\alpha,20\beta$ -P. Par contre, le taux de 11-KT n'était pas du tout affecté (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001). Donc, on pourrait plutôt attribuer cette différence à l'échantillonnage d'un plus grand nombre d'individus de la cage 2 présentant justement à ce moment là de faibles concentrations en 11-KT. Quant à l'analyse des profils individuels de chaque régime, elle ne permet pas d'imputer aux aliments un quelconque effet sur la concentration plasmatique en 11-KT. Aucune tendance à l'augmentation ou à la diminution ne sont ainsi observées au fil du temps, alors que les poissons sont censés absorber de plus en plus de sous-produits végétaux.

2.2.2. Oestradiol.

Globalement, les concentrations en oestradiol mesurées chez les mâles (ne dépassant pas les 1,5 ng/ml plasma) sont beaucoup plus faibles que chez les femelles. Si aucuns effets significatifs ne furent mis en évidence, ceci était peut être du à la grande variabilité qui donne lieu à des écarts types conséquents. De fait, les histogrammes des régimes 1 et 2 sont bien plus importants que ceux des régimes 3 et 4, ce qui pourrait refléter une influence des aliments sur la reproduction, puisque ces régimes contiennent d'avantages de sous-produits végétaux, donc de phyto-oestrogènes. Cependant, ces différences n'étant pas significatives, il ne nous est pas possible de tirer de telles conclusions. De la sorte, Villeneuve *et al.* (2002) constatèrent que les concentrations plasmatiques en oestradiol de carpes (*Cyprinus carpio*) mâles sexuellement matures ne subissaient pas une augmentation statistiquement significative suite à une exposition au 4-nonylphénol, un perturbateur endocrinien pourtant bien connu. Ces observations viennent plutôt confirmer la conclusion selon laquelle nos régimes n'auraient pas d'impact sur la concentration en oestradiol des poissons-chats africains. Si les courbes individuelles de cette hormone pour les régimes 1 et 3 montrent une tendance générale à la baisse, ce n'est pas du tout le cas pour les deux autres régimes. On ne peut donc pas affirmer que les aliments provoquent une diminution du taux d'E2.

2.2.3. Testostérone.

Les concentrations en testostérone mesurées dans notre étude (en moyenne 8,69 ng/ml plasma) sont largement inférieures à la référence de 16,4 ng/ml plasma proposée par Legendre *et al.* (1996). Or, plusieurs études ont démontrés les effets des phyto-oestrogènes sur la concentration plasmatique en testostérone chez les mâles. De cette manière, une décroissance des niveaux en testostérone fut observée chez des truites arc-en-ciel ayant ingérés du génistéine (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001). Cette observation pourrait donc soutenir l'hypothèse d'une influence de notre alimentation sur le développement reproductif des *C. gariepinus* mâles. Mais pour s'en assurer, il aurait fallu avoir un régime contrôle avec 100% de farine de poisson, car ces niveaux de testostérone sont peut-être simplement le résultat de processus physiologiques naturels. D'autant plus qu'aucune différence significative n'existe entre les régimes, alors que le régime 4 contient nettement plus d'ingrédients à base de plantes que le régime 1. Ensuite, une étude démontra que l'exposition de carpes mâles au 4-nonylphénol ne provoque pas une élévation de leur concentration en testostérone (Villeneuve *et al.*, 2002). Cette observation nous ferait plus à pencher pour l'hypothèse d'un aspect inoffensif des aliments sur le taux de testostérone. Quant aux rapports de 11-KT/T et de E2/T, ils ne dévoilent pas de différence significative entre les quatre régimes, ce qui confirme encore cette conclusion. Si le profil individuel varie différemment d'un poisson à l'autre entre le mois de janvier et le mois de juin, les valeurs à ces extrémités pour un individu sont assez semblables, rendant difficile toutes interprétation.

3. Femelles.

3.1. Indicateurs morphologiques.

Chez les poissons, l'investissement énergétique réservé aux ovaires est largement supérieur à celui affecté aux testicules. Voilà pourquoi chez les mâles, on observe un RGS maximum de 0,37 tandis que chez les femelles, les valeurs peuvent atteindre jusqu'à 13,4. Toutefois, ces mesures ne correspondent pas aux résultats donnés par Legendre *et al.* (1996) qui mesuraient des valeurs de RGS entre 15 et 20 % du poids corporel. De la sorte, Amoyi *et al.* (1998) découvrirent que des rats femelles exposés à de la génistéine, via l'alimentation, subissaient une baisse significative du poids de leurs ovaires. Mais de nouveau, il est difficile d'attribuer cette constatation à une influence des sous-produits végétaux. En effet, le régime contrôle est formulé en partie avec ces ingrédients, ce qui nous empêche de savoir si ces faibles valeurs de RGS sont le résultat d'une perturbation endocrinienne ou d'autres paramètres tels que la température de l'eau, la disponibilité en AGLPI, D'autant plus que les mesures de RGS entre les régimes sont forts semblables. De fait, si les aliments étaient capables d'entraver le développement ovarien, les femelles du régime 4 auraient certainement des RGS plus faibles que celles du régime 1.

Par contre, la diminution du RGS au cours du temps, quel que soit le régime, est quant à elle bien réelle, puisque les différences sont significatives ($p < 0,05$). Mais cette évolution du RGS mesurée chez les femelles est plus attribuable à une différence de maturation ovarienne qu'à une perturbation endocrinienne des phyto-oestrogènes. En effet, si *C. gariepinus* est une espèce qui, en station piscicole, ne se reproduit pas naturellement, les étangs ne sont pas totalement hermétiques aux facteurs environnementaux régulant leur cycle reproductif. Donc, cela laisserait plutôt penser que c'est l'approche de la saison sèche qui est responsable de cette diminution. De fait, l'augmentation de la température et la diminution du niveau de l'eau provoquent une décroissance du RGS. Si il existe une différence significative entre les diamètres des ovocytes les plus avancés des régimes 1 et 2, celle-ci n'est probablement pas le résultat d'un effet du repas, mais plutôt du hasard. Dans un tel cas, les valeurs du régime 1, moins riche en sous-produits végétaux, seraient évidemment plus élevées que celles des régimes 3 et 4. On remarque aussi que les diamètres des ovocytes les plus avancés ont tendance à augmenter légèrement avec le temps, alors que les valeurs de RGS diminuent. Cela pourrait être dû au fait que l'étape la plus avancée, généralement le stade de vitellogenèse exogène, serait moins sensible à l'approche de la saison sèche que le stade protoplasmique par exemple.

Si quelques femelles non matures ont été retrouvées, l'aspect aléatoire (on en retrouve dans les quatre régimes) et sporadique (quatre individus seulement) du phénomène nous empêche de relier ces observations à une quelconque perturbation de l'alimentation sur la reproduction du poisson-chat africain. Qui plus est, les proportions d'ovocytes sains n'ont révélés aucune différence significative entre les régimes ou les dates de prélèvement, ce qui conforte encore cette hypothèse. Dans cette optique, il faut également noter que le taux de follicules atrétiques pré-ovulatoires (4,6 % en moyenne), pas particulièrement élevé, est assez semblable d'un régime à l'autre.

3.2. Concentrations en stéroïdes sexuels.

3.2.1. 11-Kétotestostérone.

Si les concentrations en 11-KT obtenues chez les femelles sont très faibles, cela est parfaitement normal puisqu'il s'agit de l'hormone mâle par excellence chez les poissons (McLachan *et al.*, 1996). A l'instar du sexe opposé, on observe une différence significative entre les régimes 2 et 4. Comme c'était déjà le cas pour les mâles, il n'est pas possible d'attribuer cet effet aux aliments. Dans cette perspective, le régime 4 devrait également être significativement différent du régime 1, parce que ce dernier renferme une quantité moindre de sous-produits végétaux. En plus de cette constatation, Zhang *et al.* (2002) démontrèrent que la consommation de génistéine n'altérait pas systématiquement les concentrations en stéroïdes circulants chez les poissons, notamment chez les medaka japonais femelles. En conséquence, tout concorde vers un aspect inoffensif du repas sur la reproduction du *C. gariepinus*. Ceci semble être confirmé par les profils individuels en 11-KT des femelles qui ne dévoilent aucune tendance générale à la baisse.

3.2.2. Oestradiol.

A l'inverse des mâles, ce sont les régimes 1 et 2 qui montrent des concentrations en E2 plus faibles par rapport à celles des régimes 3 et 4. Mais comme les effets ne sont pas significatifs, il doit certainement s'agir de dissemblances dues au hasard et au petit nombre d'individus échantillonnés, plutôt qu'à un impact du repas. En outre, dans une étude réalisée sur des truites arc-en-ciel femelles, seule une chute des concentrations en testostérone fut constatée suite à la consommation de génistéine, les concentrations en oestradiol n'étant pas modifiées (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001). Dans le cas présent, on remarque que presque toutes les courbes individuelles en oestradiol présentent une augmentation en mars (date 2). Si les concentrations sont faibles durant la prévitellogenèse, son niveau augmente ensuite durant l'accumulation des globules de vitellus et reste à des valeurs élevées pendant la vitellogenèse. Or, début mars correspond au début de la saison des pluies qui est la période de reproduction. Cette concentration élevée en E2 durant cette période joue donc le rôle de soutien hormonal nécessaire pour le recrutement des ovocytes. De fait, on observe également une forte élévation des concentrations en vitellogénine à la même date.

3.2.3. Testostérone.

Chez les Téléostéens, la testostérone est présente à la fois chez les deux sexes, puisque celle-ci est l'un des précurseurs principaux de la synthèse de la 11-KT, mais aussi de l'E2. Voilà pourquoi les femelles présentent des niveaux de testostérone presque aussi élevés que ceux des mâles. Malgré cela, on remarque uniquement une tendance des valeurs des régimes 1 et 2 à être légèrement plus faibles que celles des régimes 3 et 4. Or, c'est une chute des concentrations en testostérone qui fut constatée chez les femelles de truites arc-en-ciel ayant ingérés de la génistéine (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001). Encore une fois, le repas fourni aux *C. gariepinus* ne paraît pas avoir une influence sur l'aspect reproductif de cette espèce. De plus, les profils individuels sont assez stables au cours du temps, ne montrant aucunes anomalies, hormis des pics de concentration très importants (200 ng/ml plasma) observés chez certains individus en mai (date 4). Mais il est tout à fait possible que le taux de testostérone atteigne des valeurs plus élevées chez les femelles que chez les mâles, surtout vers la fin de la vitellogenèse, lorsqu'elle n'est plus utilisée pour la formation d'E2 (Kime, 1998). Cette conclusion semble

confirmée par le fait que l'on ne trouve aucune différence significative entre les rapports en 11-KT /T et en E2/T des différents régimes.

4. Concentrations plasmatiques en ALP.

Que ce soit chez les mâles ou chez les femelles, on remarque que les valeurs des régimes 3 et 4 sont plus faibles que celles des régimes 1 et 2. Or, la capacité des phyto-oestrogènes à induire la vitellogenèse fut démontrée à maintes reprises, conduisant les auteurs à affirmer que cette molécule était le meilleur marqueur pour mettre en évidence un éventuel effet des phyto-oestrogènes. De la sorte, Pelissero *et al.* (1991 *a*) prouvèrent que l'injection intra péritonéale de phyto-oestrogènes provoquait une augmentation de la synthèse hépatique de vitellogénine chez des esturgeons sibériens (*Acipenser baeri*) immatures. D'autres expériences sur cette même espèce ont clairement révélé une induction de la synthèse de vitellogénine lorsque de la génistéine était administrée oralement (Latonnelle *et al.*, 2002 *a*) ou encore lorsque les individus étaient nourris avec un aliment semi-synthétique contenant du soja, riche en perturbateurs endocriniens (Pelissero *et al.*, 1991 *b*). En conséquence, ces observations nous conduisent à penser que nos aliments ont une conséquence sur la production de vitellogénine des *C. gariepinus* mâles et femelles.

Néanmoins, cela semble précipité car si différences il y a, elles ne sont en aucun cas significatives. Dès lors, il paraît hasardeux de conclure à un quelconque impact du régime sur la vitellogenèse de nos poissons. De plus, Kaushik *et al.* (1995) constatèrent que les niveaux plasmatiques de vitellogénine, chez les truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), n'étaient pas significativement altérés lorsque les poissons étaient nourris avec différents repas à base de soja. Qui plus est, dans cette expérience, les phyto-oestrogènes sont en concentration naturelle dans l'aliment, comme c'est aussi le cas pour notre étude. Il semble en conséquence plus prudent de pencher pour l'hypothèse que nos ingrédients ne perturbent pas les concentrations en vitellogénine du poisson-chat africain.

Cinquième partie:
conclusions et perspectives

La malnutrition, voir la sous nutrition, est un problème majeur dans de nombreux pays en voie de développement, notamment en Afrique. Il est donc nécessaire, dans ces régions du monde, de trouver une alternative aux sources traditionnelles de protéines animales. Le développement de l'aquaculture, et en particulier de la pisciculture, est une des solutions qui permettrait de résoudre partiellement cette difficulté, encore faut-il qu'il s'agisse d'une pisciculture durable et intégrée. Or, une pisciculture durable ne peut se faire que si on utilise d'autres sources de protéines que la farine de poisson. Ainsi, il existe un grand nombre de sous-produits agro-industriels, sous formes de déchets végétaux ou animaux, non valorisés dans l'alimentation humaine qui pourraient remplacer en partie, ou totalement, la farine de poisson dans la formulation des régimes destinés à l'élevage piscicole. Pour ce qui est de l'aspect intégré, il sera indispensable de valoriser des sous-produits disponibles directement sur place, afin de ne pas perdre dans l'importation de sous-produits spécifiques, ce qui avait été gagné sur le coût du prix d'achat des farines de poissons.

Dans un premier temps, il a été démontré qu'il était possible d'utiliser les sous-produits agro-industriels disponibles au Rwanda dans l'alimentation du poisson-chat africain, *Clarias gariepinus*, sans que cela n'affecte significativement sa croissance et sa digestibilité. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à savoir si ces aliments, surtout les sous-produits végétaux, n'entravent pas la reproduction des géniteurs. En effet, certains de ces végétaux, tels que le tournesol ou le haricot, sont susceptibles de renfermer des substances appelées phyto-oestrogènes, connues pour être des perturbateurs endocriniens.

Toutefois, les résultats de nos analyses n'ont pas révélé une perturbation de la fonction reproductive chez les poissons-chats africains nourris avec les différents régimes. De fait, du point de vue morphologique, il ressort de notre expérience que la farine de poisson peut être complètement remplacée par des sous-produits agro-industriels (régime 4) sans que cela n'affecte le RGS de nos poissons. Il en est de même pour la proportion des ovocytes sains et le diamètre des ovocytes au stade le plus avancé. Les concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels et en vitellogénine ne dévoilent également aucuns effets des aliments sur le déroulement de la reproduction des *Clarias gariepinus* adultes.

Quant aux différences significatives observées, elles pouvaient à chaque fois être expliquées par d'autres phénomènes. Ainsi, chez les femelles, les différences de RGS relevées entre les dates sont essentiellement dues à l'approche de la saison sèche, période de repos sexuel en milieu naturel. Ces observations semblent cohérentes, car elles vont dans le même sens de ce qui ressort de la littérature. De la sorte, si de nombreuses études ont mis en évidence un effet aversif des phyto-oestrogènes sur la reproduction des poissons, c'est suite à une injection intra péritonéale, une forte dilution dans l'eau, une administration orale ou encore un enrichissement des repas en ces substances. En concentration naturelle, l'action des phyto-oestrogènes sur le processus reproductif des poissons n'a pas encore été démontrée. Cette hypothèse est soutenue par l'observation que les herbivores, broutant différentes plantes qui contiennent de ces perturbateurs endocriniens, ne subissent pas d'altération de leur système reproducteur. En outre, il est fort probable que les prétraitements, auxquels sont soumis les ingrédients avant leur incorporation dans le régime, diminuent nettement leur concentration en phyto-oestrogènes. Ces observations sont d'un grand intérêt puisqu'elles nous permettent de conclure que les régimes formulés dans notre étude peuvent aussi être utilisés pour nourrir les géniteurs, et pas seulement servir au grossissement.

Néanmoins, ces conclusions doivent être tout de même nuancées. En effet, si les différents paramètres reproductifs n'ont pas montré de perturbations, il n'a pas encore été non plus possible de produire des alevins en quantité à partir de ces géniteurs. Qui plus est, la fiabilité et l'exactitude de l'interprétation des résultats, présentés dans le cadre de ce mémoire, seraient certainement augmentées si on connaissait des données telles que le nombre de femelles ovulantes, le taux de fertilisation, le taux d'éclosion,... Il sera donc nécessaire de disposer des résultats de plusieurs reproductions avant de pouvoir conclure définitivement que nos régimes n'entravent pas le processus reproductif de *Clarias gariepinus*.

Les perspectives consécutives à cette étude sont multiples. Tout d'abord, il faudra vérifier si le passage des conditions expérimentales aux conditions réelles d'élevage du poisson-chat africain se déroule sans heurts. Actuellement, nous ne disposons que de quelques individus répartis dans quatre cages et donc maintenus dans des conditions bien contrôlées. Il n'est pas dit que le passage en étang avec un grand nombre de poissons donnera de si bons résultats. Ensuite, il sera également indispensable de vérifier la viabilité économique du projet. Ainsi, pour l'instant, on doit faire décortiquer les graines de tournesol à la main, ce qui coûte très cher. Si cela est possible dans un cadre expérimental, la production d'une grande quantité d'aliment nécessitera obligatoirement d'optimiser un tel procédé, en employant par exemple des décortiqueuses automatiques. Toutefois, les résultats restent très encourageant et laissent entrevoir de belles perspectives d'avenir. On pourrait imaginer obtenir à terme une alimentation bon marché, permettant d'accroître significativement la production piscicole au Rwanda et de réduire en partie le problème de mal nutrition dans cette partie du monde.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Akhtar, M. ; Lee-Robichaud, P. ; Akhtar, M. E. et Wright, J. N. (1997). The impact of aromatase mechanism on other P450. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **61** (3-6): 127-132.
- Asturiano, J. F. ; Sorbera, L. A. ; Carrillo, M. ; Zanuy, S. ; Ramos, J. ; Navarro, J. C. et Bromage, N. (2001). Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture*, **194**: 173-190.
- Awoniyi, C. A. ; Roberts, D. ; Veeramachaneni, D. N. ; Hurst, B. S. ; Tucker, K. E. et Schlaff, W. D. (1998). Reproductive sequelae in female rats after in utero and neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Fertil. and Steril.*, **70**: 440-447.
- Baras, E. et d'Almeida, A. F. (2001). Size heterogeneity prevails over kinship in shaping cannibalism among larvae of sharpooth catfish *Clarias gariepinus*. *Aquatic Living Resources*, **14**: 251-256.
- Bardakci, F. ; Ozansoy, Ü. et Koptagel, E. (2000). *A comparison of oogenesis under constant and fluctuating temperatures in Doctor fish, Garra rufa Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae)*. Publication internet: Epress Inc., 7p.
- Bell, J. G. ; Farndale, B. M. ; Bruce, M. P. ; Navas, J. M. et Carrillo, M. (1997). Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, **149**: 107-119.
- Bennetau-Pelissero, C. ; Breton, B. ; Bennetau, B. ; Corraze, G. ; Le Menn, F. ; Davail-Cuisset, B. ; Helou, C. et Kaushik, S. J. (2001). Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, **121**: 173-187.
- Bromage, N. R. et Roberts, R. J. (1995). *Broodstock management and egg and larval quality*. Editions Blackwell Science: London, 478p.
- Bruton, M. N. (1996). Alternative life-history strategies of catfishes. *Aquatic Living Resources*, **9**: 35-41.
- Cardoso, E. L. ; Alves, M. S. D. ; Ferreira, R. M. A. et Godinho, H. P. (1995). Embryogenesis of the neotropical freshwater Siluriforme *Pseudoplatystoma coruscans*. *Aquatic Living Resources*, **8**: 343-346.
- Carrillo, M. ; Zanuy, S. ; Oyen, F. ; Cerdá, J. ; Navas, J. M. et Ramos, J. (2000). Some criteria of the quality of the progeny as indicators of physiological broodstock fitness. In: *Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification* . pp: 61-73. Editions CIHEAM-IAMZ: Zaragoza.
- Casanova, M. ; You, L. ; Gaido, K. W. ; Archibeque-Engle, S. ; Janszen, D. B. et Heck, H. A. (1999). Developmental effects of dietary phytoestrogen in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors α and β *in vitro*. *Toxicological Sciences*, **51**: 236-244.
- Cavaco, J. E. B. ; Lambert, J. G. D. ; Sculz, R. W. et Goos, H. J. T. (1997). Pubertale development of male African catfish, *Clarias gariepinus*. In vitro steroidogenesis by testis and interrenal tissue and plasma levels of sexual steroids. *Fish Physio. Biochem.*, **17**: 155-162.
- Cavaco, J. E. B. ; Vilroix, C. ; Trudeau, V. L. ; Sculz, R. W. et Goos, H. J. T. (1998). Sex steroids and the initiation puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). *The American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **275**: 1793-1802.
- Cavaco, J. E. B. ; Bogerd, J. ; Goss, H. et Sculz, R. W. (2001 a). Testosterone inhibits 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biology of Reproduction*, **65**: 1807-1812.

Références bibliographiques

- Cavaco, J. E. B. ; van Baal, J. ; van Dijk, W. ; Hassing, G. A. M. ; Goos, H. J. T. et Schulz, R. W. (2001 *b*). Steroid hormones stimulate gonadotrophs in juvenile male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biology of Reproduction*, **64**: 1358-1365.
- Choubert, G. ; Blanc, J. M. et Poisson, H. (1998). Effects of dietary keto-carotenoids (canthaxanthin and asthaxanthin) on the reproductive performance of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, **4**: 249-254.
- Christiansen, R. et Torrissen, O. J. (1997). Effects of dietary asthaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **153**: 51-62.
- Consten, D. ; Keuning, E. D. ; Bogerd, J. ; Zandbergen, M. A. ; Lambert, J. G. D. ; Komen, J. et Goos, H. J. T. (2002). Sex steroids and their involvement in the cortisol-induced inhibition of pubertal development in male common carp, *Cyprinus carpio* L. *Biology of Reproduction*, **67**: 465-472.
- Clay, D. (1979 *a*). Population biology, growth and feeding of African catfish (*Clarias gariepinus*) with special reference to juveniles and their importance in fish culture. *Arch. Hydrobiol.*, **87**(4): 453-482.
- Clay, D. (1979 *b*). Sexual maturity and fecundity of the African catfish (*Clarias gariepinus*) with an observation on the spawning behaviour of the Nile catfish (*Clarias lazera*). *Zool. J. Linn. Soc.*, **65**: 351-365.
- Craik, J. C. A. (1985). Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture*, **47**: 61-88.
- Cruz, R. J. G. et dos Santos, J. E. (2004). Testicular structure of three species of neotropical freshwater pimelodids (Pisces, Pimelodidea). *Revista Brasileira de Zoologia*, **21**(2): 267-271.
- Dabrowski, K. et Ciereszko, A. (2001). Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. *Aquaculture Research*, **32**: 623-638.
- Das, A. B. et Ratha, B. K. (1996). Physiological adaptative mechanisms of catfish (*Siluroidei*) to environmental changes. *Aquatic Living Resources*, **9**: 135-143.
- de Graaf (1994). *The artificial reproduction and pond rearing of the African catfish, Clarias gariepinus*. FAO: Rome, 19p.
- de Graaf, G.J. et Janssen, H. (1996). Artificial reproduction and pond rearing of the African catfish *Clarias gariepinus* in sub-Saharan Africa, A handbook. *FAO Fisheries Technical Paper*, **362**:109p.
- Dixon, R. A. et Ferreira, D. (2002). Genistein. *Phytochemistry*, **60**: 205-211.
- Ducarme, C. et Micha, J. C. (2003). Technique de production intensive du poisson-chat Africain, *Clarias gariepinus*. *Tropicultura*, **21**(4): 189-198.
- Dubois, E. A. ; Florijn, M. A. ; Zanbergen, M. A. ; Peute, J. et Goos, H. J. T. (1998). Testosterone accelerates the development of the catfish GnRH system in the brain of immature African catfish (*Clarias gariepinus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **112**: 383-393.
- Emata, A. C. ; Borlongan, I. G. et Damaso, J. P. (2000). Dietary vitamin C and E supplementation and reproduction of milkfish *Chanos chanos* Forsskal. *Aquaculture Research*, **31**: 557-564.
- FishBase team (2003). FishBase profile: *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) North African catfish. *NAGA, Worldfish Center Quarterly*, **26**(3): 27.
- Fournier, V. ; Huelvan, C. et Desbruyeres, E. (2004). Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, **236**: 451-465.

Références bibliographiques

- Fox, J. E. ; Starcevic, M. ; Jones, P. E. ; Burow, M. E. et McLachlan, J. A. (2004). Phytoestrogens signaling and symbiotic gene activation are disrupted by endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, **112**(6): 672-677.
- Francis, G. ; Makkar, H. P. S. et Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, **199**: 197-227.
- Furuita, H. ; Tanaka, H. ; Yamamoto, T. ; Shiraiishi, M. et Takeuchi, T. (2000). Effects of *n*-3 HUFA levels in broodstock diet on the reproductive performance and egg and larval quality of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **187**: 387-398.
- Furuita, H. ; Tanaka, H. ; Yamamoto, T. ; Suzuki, N. et Takeuchi, T. (2002). Effects of high levels of *n*-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **210**: 323-333.
- Furuita, H. ; Tanaka, H. ; Yamamoto, T. ; Suzuki, N. et Takeuchi, T. (2003 *a*). Supplemental effect of vitamin A in diet on the reproductive performance and egg quality of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T & S). *Aquaculture Research*, **34**: 461-467.
- Furuita, H. ; Yamamoto, T. ; Shima, T. ; Suzuki, N. et Takeuchi, T. (2003 *b*). Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **220**: 725-735.
- Goos, H. J. T. et Richter, C. J. J. (1996). Internal and external factors controlling reproduction in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquatic Living Resources*, **9**: 45-58.
- Guillette, L. J. ; Crain, D. A. ; Rooney, A. A. et Pickford, D. B. (1995). Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ. Health Perspect.*, **103** (7): 157-164.
- Gunasekera, R. M. ; Shim, K. F. et Lam, T. J. (1995). Effect of dietary protein level on puberty, oocyte growth and egg chemical composition in the tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, **134**: 169-183.
- Gunasekera, R. M. ; Shim, K. F. et Lam, T. J. (1996 *a*). Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, **146**: 121-134.
- Gunasekera, R. M. ; Shim, K. F. et Lam, T. J. (1996 *b*). Influence of protein content of broodstock diets on larval quality and performance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, **146**: 245-259.
- Gunasekera, R. M. et Shim, K. F. (1997). Influence of dietary protein level on ovarian recrudescence in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, **149**: 57-69.
- Hansen, P.-D. ; Dizer, H. ; Hock, B. ; Marx, A. ; Sherry, J. ; McMaster, M. et Blaise, C. (1998). Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors. *Trends In Analytical Chemistry*, **17** (7): 448-451.
- Haylor, G. S. et Mollah, M. F. A. (1995). Controlled hatchery production of African catfish, *Clarias gariepinus* : the influence of temperature on early development. *Aquatic Living Resources*, **8**: 431-438.
- Hecht, T. et Piennar, A.G. (1993). A review of cannibalisme and its implications in fish larviculture. *World Aquaculture Society*, **24**: 246-254.
- Hecht, T. ; Oellermann, L. et Verheust, L. (1996). Perspectives on clariid catfish culture in Africa. *Aquatic Living Resources*, **9**: 197-206.
- Henderson, R. J. et Sargent, J. R. (1985). *Fatty acid metabolism in fish*. In: *Nutrition and feeding in fish*. pp: 349-365. Editions Academic Press: London.
- Hengsawat, K. ; Ward, F.J. et Jaruratjamorn, P. (1996). The effects of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* burchell 1822) cultured in cages. *Aquaculture*, **152**: 67-76.

- Hertrampf, J. W. et Piedad-Pascual, F. (2000). *Handbook on ingredients for aquaculture feeds*. Editions Kluwer Academic Publishers : London Boston, 573p.
- Hibiya, T. (1982). *A atlas of fish histology: normal and pathological features*. Editions Kodonsha: Tokyo et Editions Gustave Fisher Verlag: Stuttgart New-york, 143p.
- Hill, R. L. et Janz, D. M. (2003). Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effets on sex ratio and breeding success. *Aquatic Toxicology*, **63**: 417-429.
- Hishamunda, N. et Moehl, J. F. (1989). *Rwanda national fish culture project*. International Center for Aquaculture Research and Development N°34, 19p.
- Hishamunda, N. et Curtis, M. J. (1998). Evaluation of small-scale aquaculture with intra-rural household trade as an alternative enterprise for limited resource farmers: the case of Rwanda. *Food Policy*, **23** (2): 143-154.
- Hoffman, L. C., Prinsloo, J. F. et Rukan, G. (1997). Partial replacement of fish meal with either soybean meal, brewers yeast or tomato meal in the diets of African sharptooth catfish *Clarias gariepinus*. *Water SA*, **23**: 181-186.
- Hong, Y. ; Liu, T. ; Zhao, H. ; Xu, H. ; Wang, W. ; Liu, R. ; Chen, T. ; Deng, J. et Gui, J. (2004). Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production in vitro. *PNAS*, **101**(21): 8011-8016.
- Izquierdo et Fernández-Palacios (2000). Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. In: *Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification*. pp: 243-264. Editions CIHEAM-IAMZ: Zaragoza.
- Janssen, J. (1985). *Elevage du poisson-chat Africain Clarias lazera (Cuv. et al., 1840) en République Centrafricaine*. FAO: Rome, document technique n°20.
- Jensen, K. M. ; Korte, J. J. ; Kahl, M. D. ; Pasha, M. S. et Ankley, G. T. (2001). Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **128**: 127-141.
- Kanazawa, A. (1985). Essential fatty acid and lipid requirement of fish. In *Nutrition and feeding in fish*. pp: 281-298. Editions Academic Press: London.
- Kaushik, S. J. ; Cravedi, J. P. ; Lalles, J. P. ; Sumpter, J. ; Fauconneau, B. et Laroche, M. (1995). Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effets, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, **133**: 257-274.
- Kaushik, S. J. ; Covès, D. ; Dutto, G. et Blanc, D. (2004). Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **230**: 391-404.
- Kazeto, Y. ; Ijiri, S. ; Place, A. R. ; Zohar, Y. et Trant, J. M. (2001). The 59-flanking regions of *CYP19A1* and *CYP19A2* in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **288**: 503-508.
- Kazeto, Y. ; Place, A. R. et Trant J. M. (2004). Effets of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology*, **69**: 25-34.
- Khan, M. A. ; Jafri, A. K. ; Chadha, N. K. et Usmani, N. (2003). Growth and body composition of rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing oilseed meals : partial or total replacement of fish meal with soybean meal. *Aquaculture Nutrition*, **9**: 391-396.
- Kime, D. E. (1998). *Endocrine disruption in fish*. Kluwer Academic Publishers: Boston, 396p.
- Kime, D. E. ; Nash, J. P. et Scott, A. P. (1999). Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture*, **177**: 345-352.
- Kiparissis, Y. ; Balch, G. C. ; Metcalfe, T. L. et Metcalfe, C. D. (2003). Effects of the isoflavones genistein and equol on the gonadal development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives*, **111**(9): 10p.

Références bibliographiques

- Kishida, M. et Callard, G. V. (2001). Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology*, **142**(2): 740-750.
- Kishida, M. ; McLellan, M. ; Miranda, J. A. et Callard, G. V. (2001). Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, **129**: 261-268.
- Latonnelle, K. ; Fostier, A. ; Le Menn, F. et Bennetau-Pelissero, C. (2002 a). Binding affinities of hepatic nuclear estrogen receptors for phytoestrogens in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *General and Comparative Endocrinology*, **129**: 69-79.
- Latonnelle, K. ; Le Menn, F. ; Kaushik, S. J. ; et Bennetau-Pelissero, C. (2002 b). Effects of dietary phytoestrogens *in vivo* and *in vitro* in rainbow trout and Siberian sturgeon: interests and limits of the *in vitro* studies of interspecies differences. *General and Comparative Endocrinology*, **126**: 39-51.
- Lee, K. J. et Dabrowski, K. (2004). Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, **230**: 377-389.
- Legendre, M. ; Linhart, O. et Billard, R. (1996). Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in *Siluroidei*. *Aquatic Living Resources*, **9**: 59-80.
- Mansour, N. ; Lahnsteiner, F. et Berger, B. (2003). Metabolism of intratesticular spermatozoa of a tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*). *Elsevier Science Inc.*, **135**, 285-296.
- Martino, R. C. ; Cyrino, J. E. P. ; Portz, L. et Trugo, L. C. (2002). Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. *Aquaculture*, **209**: 233-246.
- McLachlan, R. I. ; Wreford, N. G. ; O'Donnell, L. ; de Kretser, D. M. et Robertson, D. M. (1996). The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *Journal of Endocrinology*, **148**: 1-9.
- Mellinger, J. (2002). *Sexualité et reproduction des poissons*. Editions CNRS: Paris, 322p.
- Mengquing, L. ; Wenjuan, J. ; Quing, C. et Jialin, W. (2004). The effect of vitamin A supplementation in broodstock feed on reproductive performance and larval quality in *Penaeus chinensis*. *Aquaculture Nutrition*, **10**: 295-300.
- Miura, T. ; Yamauchi, K. ; Takahashi, H. et Nagahama, Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*anguilla japonica*). *Proc. Nalt. Acad. Sci.*, **88**: 5774-5778.
- Mourente, G. ; Good, J. E. et Bell, J. G. (2005). Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2 α , immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture nutrition*, **11**: 25-40.
- Murkies, A. L. ; Wilcox, G. et Davis, S. R. (1998). Phytoestrogens. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**(2): 297-303.
- Nguenga, D. ; Teugels, G. G. ; Legendre, M. et Ollevier, F. (2004). Influence of tropical seasonal changes on oocyte diameter, responses to hormonal induction and hatching quality in two strains of the catfish, *Heterobranchus longifilis* Val. (Clariidea). *Aquaculture Research*, **35**(14): 1349-1357.
- Pelissero, C. ; Bennetau, B. ; Babin, P. ; Le Menn, F. et Dunoguès, J. (1991 a). The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **38**: 292-299.

Références bibliographiques

- Pelissero, C. ; Le Menn, F. et Kaushik, S. (1991 *b*). Estrogenic effect of dietary soya bean meal on vitellogenesis in cultured siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *General and Comparative Endocrinology*, **83**: 447-457.
- Pelissero, C. ; Flouriot, G. ; Foucher, J. L. ; Bennetau, B. ; Dunoguès, J. ; Le Gac, F. et Sumpter, J. P. (1993). Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes: an in vitro test for the estrogenic potency of chemicals. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **44**(3): 263-272.
- Peteri, A. ; Nandi, S. et Chowdhury, S. N. (1992). *Manuel on seed production of African catfish (Clarias gariepinus)*. FAO: Rome, 22p.
- Price, K. R. et Fenwick, G. R. (1985). Naturally occurring oestrogens in foods - a review. *Food Additives Contaminants*, **2**: 73-106.
- Rhaman, M. M. ; Varga, I. ; Choudhury, S. N. (1992). *Manual on African Magur (Clarias gariepinus) culture in Bangladesh*. FAO: Rome, 21p.
- Sauvant, D.; Perez, J.-M. et Tran, G. (2002). *Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage*. Editions INRA : Paris, 301p.
- Schulz, R. W. ; van der Wind, F. ; Janssen-Dommerholt, C. ; Peute, J. ; Mylanos, C. C. ; Zohar, Y. ; Swanson, P. et Goos, H. J. T. (1997). Modulation of testicular androgen production in adolescent African catfish (*Clarias gariepinus*). *General and Comparative Endocrinology*, **108**: 56-66.
- Shinomiya, A. ; Hamaguchi, S. et Shibata, N. (2001). Sexual differentiation of germ cell deficient gonads in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Journal of Experimental Zoology*, **290**: 402-410.
- Sorbera, L. A. ; Asturiano, J. F. ; Carrillo, M. ; Zanuy, S. (2001). Effets of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine Teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of reproduction*, **64**: 382-389.
- Tchoudakova, A. ; Kishida, M. ; Wood, E. et Callard, G. V. (2001). Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **78**: 427-439.
- Teugels, G. G. (1996). Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (*Ostariophysi, Siluroidei*): an overview. *Aquatic Living Resources*, **9**: 9-34.
- Trant, J. M. ; Lerhter, J. ; Gregory, T. ; Nunez, S. et Wunder, J. (1997). Expression of cytochrome P450 aromatase in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **61**(3-6): 393-397.
- Tucker, C. S. (1985). *Channel catfish culture*. Elsevier Science Publishers B.V.: Netherlands, 647p.
- Tzchori, I. ; Degani, G. ; Elisha, R. ; Eliyahu, R. ; Hurvitz, A. ; Vaya, J. et Moav, B. (2004). The influence of phytoestrogens and oestradiol-17 β on growth and sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture Research*, **35**(13): 1213-1219.
- van den Hurk, R. ; Resink, J. W. ; Peute, J. (1987). The seminal vesicle of the African catfish, *Clarias gariepinus*. A histological, histochemical, enzyme-histochemical, ultrastructural and physiological study. *Cell Tissue Res.*, **247**(3): 573-582.
- van der Kraak, G. et Lister, A. (date non précisée). Mechanisms and effects of endocrine disruption in fish: are they ecologically relevant? Non publié, 4p.
- Van Weerd, J. H. (1995). Nutrition and growth in *Clarias* species - a review. *Aquat. Living Resour.*, **8**: 395-401.
- Villeneuve, D. L. ; Villalobos, S. A. ; Keith, T. L. ; Snyder, E. M. ; Fitzgerald, S. D. et Giesy, J. P. (2002). Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenin concentrations in sexually mature male carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, **47**: 15-28.
- Woynarovich, E. et L. Horvath, 1980. The artificial propagation of warmwater finfishes: A manual for extension. *FAO Fisheries Technical Paper*, **201**: 183p.

Références bibliographiques

- Yalçın, S. ; Solak, K. et Akyurt, I. (2001). Certain reproductive characteristics of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1882) living in the river Asi, Turkey. *Turk J. Zool.*, **25**: 453-460.
- Yaron, Z. (1995). Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, **129**: 49-73.
- Zhang, F. ; Mace, F. et Smith D. L. (2000). Mineral nitrogen availability and isoflavonoid accumulation in the root systems of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J. Agronomy & Crop Science*, **184**: 197-204.
- Zhang, L. ; Khan, I. A. et Foran, C. M. (2002). Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **132**: 203-211.

Références Internet :

FAO (2005). Database: <http://apps.fao.org/default.jsp>
www.planetcatfish.com

24 AOUT 2005

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20