

Travail de fin d'études

Auteur : Tchiedjo, Marie Dieudonnée Laure

Promoteur(s) : Nivelles, Renaud

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master de spécialisation en gestion des ressources aquatiques et aquaculture

Année académique : 2021-2022

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/16296>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

FACULTE DES SCIENCES

Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture

Travail de fin d'étude

**EFFET D'UNE SAPOGENINE PHYTOSTEROÏDE SUR LES PERFORMANCES DE
CROISSANCE ET L'INVERSION SEXUELLE DU POISSON CHAT AFRICAIN,**

Clarias gariepinus (Burchell, 1822)



Présenté par :

TCHIEDJO Marie Dieudonnée Laure

Promoteur : Renaud NIVELLE

Année Académique 2021-2022

DEDICACE

A

Ma famille pour le soutien sans faille que vous m'apportez continuellement dans la réalisation
de mes ambitions

Je vous aime profondément

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail a nécessité l'aide de nombreuses personnes et en guise de gratitude, je tiens à adresser mes sincères remerciements à :

- DIEU TOUT PUISSANT à qui je rends grâce pour tout ce qu'il m'apporte au quotidien ;
- L'Académie de Recherche et d'Enseignement Scientifique (ARES) pour l'octroi de la bourse ;
- Dr Carole ROUGEOT pour son encadrement, sa compréhension, sa disponibilité permanente, sa promptitude à corriger le travail et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée dans la réalisation de ce travail.
- Dr Renaud NIVELLE pour son encadrement, sa gentillesse, sa capacité à mettre tout le monde à l'aise ;
- Mr Christian PRIGNON pour son accompagnement permanent, sa rigueur dans le travail et pour toutes les marques d'attention dont il nous a couvert ;
- Dr Vincent GENNOTTE pour tout le soutien scientifique, son accessibilité et sa gentillesse ;
- Mr Thomas LAGASSE pour qui il n'y a pas assez de mots pour exprimer ma profonde gratitude ;
- Mr Bodelaire DEGILA pour ses conseils divers et sa disponibilité ;
- Ma petite Lydie BAMBI et mon compagnon de misère Elisé THEOPHILE avec qui nous avons bravé toutes les difficultés entre les voyages interminables dans le bus « 9 », l'absence de week-end et bien d'autres ;
- Tous mes camarades de la promotion de Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture (GERAA) 2021-2022.

RESUME

Depuis quelques années, les composés phytochimiques font l'objet de nombreuses études dans le but de déterminer s'ils constituent des alternatives fiables au remplacement des hormones de synthèse en aquaculture, aussi bien en tant que modulateurs endocriniens que promoteurs de croissance. Ces derniers représentent une grande diversité de molécules possédant un large éventail de propriétés dont celle d'intervenir dans les processus d'inversion sexuelle chez les poissons par action androgénique et/ou oestrogénique. Le poisson chat africain *Clarias gariepinus* de par sa large distribution à travers le monde et son type de déterminisme pouvant être influencé par des facteurs exogènes, constitue un excellent sujet pour cette étude dont le but est d'évaluer l'effet d'une sapogénine phytostéroïde (la diosgénine) sur l'inversion sexuelle et les performances de croissance chez les poissons.

A cette fin, trois doses croissantes (30, 300 et 3000 mg/kg d'aliment) de diosgénine et une dose unique de 17 α -méthyltestostérone (50 mg/kg d'aliment) servant de contrôle positif ont été incorporés aux aliments qui ont servi à la nutrition des larves de *Clarias gariepinus* pendant 30 jours. Les effets de la diosgénine sur l'inversion sexuelle et les performances de croissance ont été évalués au bout de 60 jours avec la détermination du sexe ratio par squash gonadique, la détermination du taux de survie et l'estimation du poids moyen.

Les résultats obtenus montrent que les taux de survie moyens dans les traitements étaient compris entre 7,7% (D3000) et 46,9% (D30). Et les poids moyens compris entre 6g (D3000) et 9,3g (D30). Ainsi, les performances de croissance ont été meilleures à la dose la plus faible de diosgénine (D30) contrairement à celles à la dose la plus forte (D3000). Les sexes ratios moyens dans tous les traitements ont été significativement différent du control ($p < 0,01$ et $p < 0,001$). Une augmentation de la proportion des mâles à la dose de diosgénine la plus forte (D3000) a été observé et un effet contraire aux autres doses (D30 et D300).

Ces résultats suggèrent que ce composé peut en fonction des doses, stimuler la croissance et/ou jouer le rôle de modulateur endocrinien dans les processus d'inversion sexuelle chez le clarias. La diosgénine présente une similarité structurale avec les œstrogènes et de ce fait, ce potentiel effet féminisant observé pourrait être due à une activation de la voie femelle par sa fixation aux récepteurs oestrogéniques. Quant à l'effet masculinisant observé à dose élevé de diosgénine, il résulterait de la capacité des saponines stéroïdiennes à inhiber l'activité de l'aromatase.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
I-Déterminisme du sexe et différenciation gonadique chez les téléostéens	2
I-1-1 Les facteurs génétiques du déterminisme et de la différenciation du sexe	3
I-1-2 Les facteurs environnementaux du déterminisme et de la différenciation du sexe ...	4
I-1-3 Influence de l'interaction entre déterminisme génétique et environnemental sur les processus de détermination du sexe et de différenciation gonadique	6
II-Mécanismes hormonaux impliqués dans la différenciation sexuelle chez les téléostéens .	8
III- Inversion hormonale sexuelle chez les téléostéens	9
III-1 Description de quelques composés phytochimiques et leurs origines.....	11
III-2 Mécanisme d'action des composés phytochimiques dans les processus de maculinisation chez certains téléostéens.....	14
IV- Clarias gariepinus : Cas expérimental.....	14
MATERIELS ET METHODES	16
II-1 Production de larves	16
II-1-1 Sélection et préparation des géniteurs à la reproduction	16
II-1-2 Reproduction artificielle	16
II-2 Dispositif expérimental et élevage larvaire	17
II-2-1 Dispositif expérimental.....	17
II-2-2 Elevage larvaire	18
II-3 Préparation des aliments hormonés	19
II-4 Paramètres évalués	20
II-4-1 Sexage et estimation du sexe ratio.....	20
II-4-2 Poids moyen et taux de survie	20
II-5 Analyses statistiques.....	20
RESULTATS	22
III-1 Taux de survie	22

III-2 Poids moyen	23
III-3 Description de la structure gonadique et analyse du sexe ratio des juvéniles.....	24
III-3-1 Description de la structure gonadique	24
III-3-2 Analyse du sexe ratio et taux d'inversion sexuelle	26
DISCUSSION	30
IV- 1 Effet des traitements sur la survie	30
IV- 2 Effets des traitements sur le poids moyen.....	31
IV- 3 Effets des traitements sur le sexe ratio et le taux d'inversion sexuelle.....	33
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	36
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Systèmes de détermination du sexe chez les espèces gonochoriques.....	3
Figure 2 : Stéroïdogénèse chez les poissons. P450arom : aromatasase ; P450c11 : 11 β -hydroxylase ; HSD : hydroxystéroïde déshydrogénase.....	8
Figure 3 : Structure chimique d'un hétéroside (salicyline)	11
Figure 4 : Structure chimique de la diosgénine	13
Figure 5 : Présentation du dispositif expérimental de 15 aquariums superposés, 9 aquariums disposés sur le premier étage et 6 sur le deuxième	17
Figure 6 : Circuit expérimental de 15 aquariums de 50 litres alimentés en eau de puits chauffée dans un bac de charge à l'aide d'une résistance électrique	18
Figure 7 : Taux de survie moyen des juvéniles de Clarias à J60 traités à des doses croissantes de diosgénine.....	22
Figure 8 : Taux de survie dans les familles de juvéniles de Clarias à J60 traités à des doses croissantes de diosgénine	22
Figure 9 : Poids moyen à J60 dans les familles de juvéniles de Clarias nourris à des doses croissantes de diosgénine	23
Figure 10 : Structure microscopique d'une gonade mâle de Clarias gariepinus observée après squash gonadique et coloration à l'acétocarmin	24
Figure 11 : Structure microscopique d'une gonade femelle de Clarias gariepinus observée après squash gonadique et coloration à l'acétocarmin	25
Figure 12 : Structure microscopique d'une gonade femelle de Clarias gariepinus supposée en cours de différenciation observée après squash gonadique et coloration à l'acétocarmin.....	25

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Taux de masculinisation via l'alimentation à la MT obtenus chez quelques espèces de poissons en élevage	10
Tableau 2 : Quantités de solution mère de diosgénine et d'éthanol utilisées par dose pour la préparation de 100g d'aliment hormoné.	19
Tableau 3 : Evolution temporelle des poids moyens (g) des larves de Clarias nourries à des doses croissantes de diosgénine	23
Tableau 4 : Sexes ratios moyens chez les juvéniles de Clarias à J60 traités à des doses croissantes de diosgénine	26
Tableau 5 : Taux d'inversion (%) chez les juvéniles de Clarias à J60 traités à la 17 α méthyltestostérone et à des doses croissantes de diosgénine	27
Tableau 6 : Sexes ratios à J60 dans les familles de juvéniles de Clarias traités à des doses croissantes de diosgénine	28

LISTE DES SIGLES

ESD Environmental Sex Determination

TI Taux d'inversion sexuelle

GSD Genetic Sex Determination

GSD + TE Genetic Sex Determination + Temperature Effect

JPE Jour post éclosion

MT 17 α méthyltestostérone

INTRODUCTION

L'étude du déterminisme du sexe et de la différenciation gonadique revêt un caractère essentiel dans le domaine de la biologie de la reproduction chez les vertébrés (Guerrero-Estévez & Moreno-Mendoza, 2010). Le déterminisme du sexe peut être défini comme un processus impliquant des facteurs génétiques ou environnementaux à l'issue duquel le sexe (mâle ou femelle) d'un individu est établi dans une simple décision binaire (Ospina-Álvarez & Piferrer, 2008). La différenciation sexuelle quant à elle représente la réalisation physique du processus de détermination du sexe se traduisant par un développement physiologique et tissulaire des gonades indifférenciées en ovaires ou en testicules. Il en résulte le sexe gonadique ou phénotypique (Piferrer & Guiguen, 2008). Les diverses stratégies de reproduction et leur grande diversité spécifique font des téléostéens de bons sujets pour l'étude de ces deux phénomènes (Tenugu & Senthilkumaran, 2022). Des scientifiques considèrent que la recherche sur la détermination du sexe chez les poissons sert à sa compréhension, à fournir des données cruciales sur la plasticité du processus de détermination du sexe, à fournir des exemples uniques de ce type de processus, à étudier et à tester les concepts théoriques de la détermination du sexe chez les vertébrés, ceci allant des mécanismes évolutifs aux processus biochimiques (Devlin & Nagahama, 2002). Toutefois, cette recherche est confrontée à deux principaux défis qui sont ceux de maîtriser les rouages de la variation des phénotypes comportementaux et/ou physiologiques et les mécanismes par lesquels les facteurs environnementaux produisent une variation phénotypique (Godwin, 2010). En effet, la manipulation expérimentale chez les poissons par le biais de facteurs environnementaux rend possible une inversion sexuelle, un phénomène par lequel le sexe phénotypique ne correspond plus au sexe génotypique (Budd et al., 2015). Les premières mises en évidence du rôle des stéroïdes sexuels exogènes dans les processus d'inversion de sexe ont été faites en 1969 chez le Medaka (Yamamoto, 1969). Dès lors, l'utilisation de ces molécules de synthèse ont pris de l'ampleur et ont occupé une place de choix dans la recherche sur la différenciation sexuelle et les pratiques aquacoles. L'impact négatif de ces composés sur l'environnement et sur la santé humaine a été révélé au cours de ces dernières années par le biais de nombreuses études (Leet et al., 2011; Rivero-Wendt et al., 2013; Mlalila et al., 2015; Nian et al., 2017). De ce fait, leurs utilisations ont été proscrites dans de nombreux pays et des solutions plus respectueuses de l'environnement sont de plus en plus recherchées telles que les composés phytochimiques (Ndakalimwe et al., 2017). Les phytoandrogènes interviennent dans les processus d'inversion sexuelle chez les poissons (Godwin et al., 2003). Ainsi, ces composés semblent donc être des alternatives fiables au

remplacement des hormones de synthèse en aquaculture aussi bien comme promoteurs de croissance ou modulateurs endocriniens (Chakraborty et al., 2014). Des études sur plusieurs espèces animales dont des espèces de poissons telles que *Oreochromis niloticus*, *Clarias gariepinus* ont d'ailleurs permis de mettre en lumière leur pouvoir œstrogénique ou androgénique (Eng et al., 2001; Francis et al., 2002; Miyahara et al., 2003; Turan & Akyurt, 2005; Golan et al., 2008). Ce mémoire s'inscrit donc dans un cadre de contribution à la compréhension des mécanismes de déterminisme du sexe et de différenciation sexuelle chez les poissons. Le poisson chat africain *Clarias gariepinus* de par sa large distribution à travers le monde et son type de déterminisme génétique influencé par les facteurs environnementaux, constitue un excellent sujet d'étude pour l'évaluation de l'effet d'une sapogénine phytostéroïde sur l'inversion sexuelle et les performances de croissance chez les poissons.

I-1 Déterminisme du sexe et différenciation gonadique chez les téléostéens

La manifestation du sexe chez les vertébrés est le résultat de deux processus étroitement liés : le déterminisme du sexe et la différenciation gonadique subséquente (Fernandino et al., 2013). Chez les téléostéens, ces mécanismes ont pour résultante divers modes de reproduction à savoir : le gonochorisme ou les sexes séparés, l'hermaphrodisme et l'unisexualité (Price, 1984). C'est l'existence de cette diversité de stratégies de reproduction en terme de sexualité qui constitue l'une des propriétés fascinantes des poissons osseux (Tenugu & Senthilkumaran, 2022). Ainsi, la détermination du sexe est utilisée pour décrire les processus et variables génétiques et environnementales qui influencent la différenciation sexuelle, tandis que la différenciation sexuelle est utilisée pour décrire la réalisation physique de ces événements en termes de développement testiculaire ou ovarien (Devlin & Nagahama, 2002). Elle est initiée dès lors que le sexe a été établi par les déterminants du sexe qui peuvent être génétiques, et/ou environnementaux (Penman & Piferrer, 2008). Deux modèles de différenciation des gonades ont été décrits chez les téléostéens, les gonades immatures peuvent soit se développer directement de façon différenciée en un ovaire ou un testicule on parle de gonochorisme primaire (Atz, 1964) (*Oncorhynchus kistuch*, *Cyprinus carpio*) (Piferrer & Donaldson, 1989; Komen et al., 1992), soit de façon indifférenciée avec tous les individus qui développent une gonade initiale de type ovarien qui se différencie par la suite en testicule ou en ovaire proprement dit (*Danio rerio* (zebrafish), *Chapalichthys encaustus*) (Maack & Segner, 2003; Guerrero-Estévez & Moreno-Mendoza, 2012). Chez la plupart des espèces gonochoriques, le développement gonadique des femelles précède celui des males. Les ovogonies entrent en méiose et on observe une prolifération des cellules somatiques qui aboutit à la formation de la

cavité ovarienne (Nakamura et al., 1998; Devlin & Nagahama, 2002). La différenciation testiculaire quant à elle, peut intervenir plusieurs jours voire plusieurs mois plus tard en fonction des espèces et se caractérise par l'apparition de spermatogonies et la structuration des cellules germinales et somatiques en lobules accompagnés d'une différenciation du système vasculaire du testicule (Piferrer, 2001). Les systèmes de déterminisme du sexe sont très variés chez les poissons téléostéens (Mank & Avise, 2009). Trois facteurs principaux influencent l'hérédité du sex-ratio (facteurs sexuels majeurs et mineurs et différences environnementales) et les principaux types de systèmes déterminant le sexe chez les poissons gonochoriques (**Figure 1**). On a d'une part, les systèmes de détermination génotypique (GSD) qui ont lieu dès la fécondation et d'autre part les systèmes de détermination environnementale (ESD) qui ont lieu après la fécondation. Il existe également une détermination sexuelle qui résulte de la combinaison des deux systèmes à la fois de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux dans des proportions différentes (GSD + ESD).

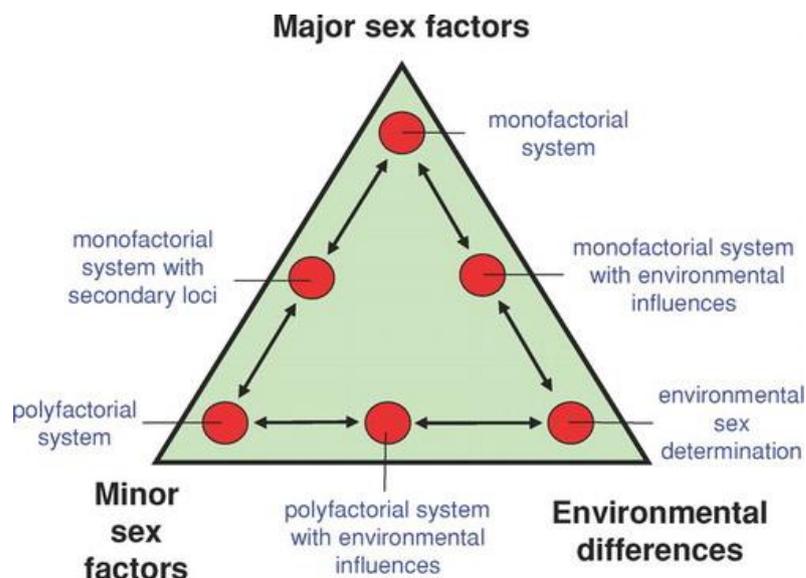


Figure 1 : Systèmes de détermination du sexe chez les espèces gonochoriques

(Penman & Piferrer, 2008)

I-1-1 Les facteurs génétiques du déterminisme et de la différenciation du sexe

La détermination génétique du sexe prend en compte tous les facteurs dont la présence ou l'absence influence le devenir du sexe (Subramoniam, 2013). Les espèces dont le déterminisme du sexe est génétiquement dépendant sont dites espèces GSD. Chez ces espèces, la détermination du sexe a lieu dès la fécondation et fait intervenir deux principaux groupes de

gènes : les gènes déterminants majeurs ou gènes sexe-déterminants et les gènes déterminants mineurs (Devlin & Nagahama, 2002; Mei & Gui, 2015; Nivelles, 2021).

Les gènes déterminants majeurs définissent le sexe par l'action d'un seul gène qui est le plus souvent localisé sur un chromosome sexuel et induit la différenciation sexuelle vers l'un ou l'autre sexe. Ce sont le plus souvent des systèmes mono-factoriels à hétérogamétie mâle, comme chez les mammifères XX/XY (*Oryzias latipes*), soit à hétérogamétie femelle comme chez les oiseaux ZZ/ZW (*O. aureus*). Ou aussi des cas d'espèces (e. g *Brachyhyopomus pinnicaudatus*, *Coregonus sardinella*) possédant des chromosomes sexuels multiples (X, Y et W) (Guiguen, 2015). Chez les espèces qui développent une gonade indifférenciée, lorsque le gène déterminant majeur est exprimé il détermine directement la différenciation de la gonade en ovaire ou en testicule (Mei & Gui, 2015). Les téléostéens ne présentent pas tous le même gène sexe déterminant comme chez les mammifères, on observe une variabilité interspécifique. Le gène majeur *dmy* ou *dmrt1b* associé à la différenciation testiculaire et porté par le chromosome Y a été le premier à être identifié chez le medaka japonais, *Oryzias latipes* et par la suite chez *O. curvinotus*, (Nanda et al., 2002; Matsuda, 2005). Mais chez d'autres espèces de medaka, comme *O. luzonensis* un autre gène assurant le même rôle a été identifié (Myosho et al., 2012). Chez le poisson-chat africain, le gène *dmrt1* est exprimé exclusivement dans les testicules des adultes. Son rôle dans la différenciation testiculaire est confirmé par sa présence dans les gonades mâles en développement (Santi, 2017).

Les gènes déterminants mineurs préalablement activés par les gènes déterminants majeurs, vont induire la différenciation sexuelle grâce à la production d'hormones stéroïdiennes qui vont stimuler la formation de gonade mâle ou femelle phénotypiquement conforme au génotype (Nakamura, 2010; Heule et al., 2014). L'un de ces gènes est le gène *cyp19a1* dont la régulation est assurée par l'action combinée de deux autres gènes (*sf-1* et *foxl2*). Il a une importance dans le déterminisme et la différenciation sexuelle chez les téléostéens car il code pour la production d'aromatase (Guerrero-Estévez & Moreno-Mendoza, 2010). L'aromatase est l'enzyme réticulaire endoplasmique qui catalyse la production d'œstrogènes à partir d'androgènes (Rasheeda et al., 2010). Elle stimule la synthèse de l'œstradiol à travers la transformation de la testostérone en œstradiol et de l'androsténédione en œstrone. Il en résulte une inversion sexuelle des femelles génétiques en mâles phénotypiques (Guiguen et al., 2010).

I-1-2 Les facteurs environnementaux du déterminisme et de la différenciation du sexe

Les espèces dont le système de détermination du sexe est uniquement environnemental sont dites espèces ESD. Chez celles-ci, le sexe est influencé par l'environnement dans lequel il

se trouve au début de l'ontogénèse (Brown et al., 2014). Les téléostéens présentent une variété de stratégies d'ESD et constituent de ce fait des modèles intéressants pour observer l'effet de l'environnement sur le devenir gonadique (Devlin & Nagahama, 2002; Strüssmann & Nakamura, 2002; Strüssmann et al., 2005; Penman & Piferrer, 2008). Chez les espèces ESD, la détermination du sexe a lieu après la fécondation suite à l'action de facteurs environnementaux qui peuvent être abiotique ou biotique. Le déterminisme environnemental du sexe le plus connu chez les poissons est celui dépendant de la température (Ospina-Álvarez & Piferrer, 2008) mais, d'autres facteurs de l'environnement peuvent avoir un effet sur le devenir du sexe chez les poissons, tel que le pH ou le taux d'oxygène de l'eau (Guiguen, 2015).

I-1-2-1 La température

La température correspond au principal facteur environnemental qui influence la différenciation sexuelle (Baroiller et al., 1999). Elle peut donc être responsable de la féminisation, comme de la masculinisation des espèces dites TSD (espèces dont le déterminisme du sexe dépend de la température) à des stades précoces de leur développement. Chez les téléostéens, il a été rapporté que de nombreuses espèces (environ 60) présentent un déterminisme du sexe et une différenciation sexuelle due à la température conduisant à une différenciation des femelles à génotypes XX en males (Ospina-Álvarez & Piferrer, 2008). Chez *Paralichthys olivaceus* de fortes températures provoque la suppression de la synthèse des œstrogènes dans la gonade des femelles génétiques (XX) durant les stades de la différenciation du sexe aboutissant en une masculinisation des femelles (Yamaguchi et al., 2007). Chez les stades indifférenciés du poisson zèbre, les hautes températures auraient pour effet une induction de l'apoptose des ovocytes, un épuisement de l'activité de l'aromatase P450 conduisant à une différenciation testiculaire (Uchida et al., 2004).

I-1-2-2 L'hypoxie, le pH, les interactions sociales

L'hypoxie a présenté un effet sur la différenciation sexuelle chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) avec une déviation du sexe ratio en faveur des males (Shang & Wu, 2004; Shang et al., 2006). D'autres études ont montré que les conditions de pH ont également une influence sur la différenciation sexuelle chez certaines espèces de Poeciliidés (*Xiphophorus helleri*) et de Cichlidés (*Apistogramma* spp). Les pH acides induisant le sexe ratio en faveur des mâles et les Ph alcalins en faveur des femelles (Rubin, 1985; Römer & Beisenherz, 1996; Oldfield et al., 2006). De nombreux auteurs font également état des interactions sociales comme facteur influençant la différenciation sexuelle chez plusieurs espèces de poissons. Avec par exemple, de fortes densités qui induisent une masculinisation des individus chez les anguilliformes

(Davey & Jellyman, 2005) tandis qu'à de faibles densités, un pourcentage de femelles plus élevé (Krueger & Oliveira, 1999). Chez le poisson paradis (*Macropodus opercularis*) quant à lui l'isolement favorise la différenciation masculine et le regroupement, la féminisation des individus (Francis & Barlow, 1993).

I-1-2-3 La photopériode

Les études sur *Leuresthes tenuis* et *Chirostoma estor*, appartenant à la même famille que la capucette (*Menidia menidia*) ont permis d'observer l'effet de la photopériode sur la détermination du sexe et la différenciation sexuelle chez les poissons. Chez la première, il a été mis en évidence qu'un prolongement de la photopériode à une durée de 15h entraînait une augmentation de la proportion de femelles chez les individus exposés (Brown et al., 2014). Tandis que chez la deuxième, une illumination continue entraînait une déviation du sexe ratio en faveur des males avec une proportion de 73% chez les individus traités contre 40% dans le contrôle (Corona-Herrera et al., 2018).

I-1-3 Influence de l'interaction entre déterminisme génétique et environnemental sur les processus de détermination du sexe et de différenciation gonadique

Chez les Téléostéens, la flexibilité du processus de différenciation gonadique est observable même chez les espèces présentant un fort déterminisme génétique (Gennotte, 2014). En effet, la détermination génétique et environnementale du sexe représente les deux extrémités d'un continuum, avec une possible interaction de ces deux systèmes (Sarre et al., 2004). Ces modèles de déterminisme sont très fréquents chez les espèces dont la détermination génétique du sexe est polyfactorielle, ayant une particularité de produire des sexe ratios variables sous l'influence des facteurs environnementaux (Penman & Piferrer, 2008). Ici, le sexe est initialement défini lors de la fécondation par des facteurs génétiques et peut par la suite être modifié par l'environnement, en conduisant la différenciation sexuelle phénotypique vers la voie opposée à celle initialement définie lors de la fécondation génotypique (Sarre et al., 2004; Bachtrog et al., 2014). Ces espèces sont dites GSD + ESD. Toutefois, il existe une controverse dans cette appellation au sein de la communauté scientifique. Certains scientifiques les qualifient plutôt de GSD + TE (Temperature Effect) car, des manipulations faites artificiellement pour mettre en évidence l'influence de l'environnement sur la détermination du sexe chez les poissons, seules les expositions aux variations de température (hautes ou basses) sont susceptibles d'être réellement retrouvés dans l'environnement naturel des sujets étudiés (Nivelle, 2021). Ainsi, la température est l'un des principaux facteurs environnementaux qui va influencer la différenciation sexuelle chez les espèces de téléostéens présentant un

déterminisme génétique du sexe (Ospina-Álvarez & Piferrer, 2008; Baroiller & D’Cotta, 2016). Le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) est un des modèles phares de ce type de déterminisme avec des températures de l’ordre de 34 °C et plus, qui agissent sur le processus de différenciation sexuelle en orientant le phénotype gonadique (Baroiller & Clota, 1997; Baroiller & D’Cotta, 2001; Bezault et al., 2007). Ces hautes températures auraient pour effet une réduction de l’expression des gènes impliqués dans le développement ovarien induisant une différenciation testiculaire (D’Cotta et al., 2001; Poonlaphdecha et al., 2013). La sole (*Cynoglossus semilaevis*) à système chromosomique ZW/ZZ présente le même type de déterminisme (Shao et al., 2014). Chez *Clarias gariepinus*, la déviation du sexe ratio en faveur des males chez des sujets exposés à de fortes températures au stade larvaire en fait également un bon exemple (Santi et al., 2016).

Les stéroïdes sexuels exogènes sont des facteurs externes qui influencent la différenciation gonadique des espèces à déterminisme génétique sous influence environnementale. Ils agissent comme des inducteurs artificiels de différenciation en mâle ou femelle (Almin, 2015). Ils ont démontré à travers de nombreuses études, leur efficacité dans les traitements d’inversion sexuelle de plusieurs espèces de poissons (Ahmed et al., 2015; Robert, 2019; Rodrigo Zhouri et al., 2022). L’étude de Yamamoto en 1969 a été la première à mettre en évidence un effet de l’administration d’androgènes et d’œstrogènes de synthèse sur l’inversion du sexe chez le medaka (*Oryzias latipes*) pendant sa période de différenciation sexuelle. Ainsi, un phénotype mâle peut être induit par des traitements aux androgènes ou des inhibiteurs d’aromatase et un phénotype femelle par des traitements aux œstrogènes (Baroiller et al., 1999). En aquaculture sont principalement utilisés comme inducteurs artificiels, la 17 α -méthyltestostérone pour la différenciation testiculaire et la 17 α -éthynylœstradiol pour la différenciation ovarienne. Chez *Clarias gariepinus*, il a été rapporté qu’une dose de 17 MT à 60 mg/kg d’aliment permettait d’obtenir jusqu’à 80,86 % de males (Enuekwe & Okonji, 2019). Chez la perche eurasiennne, des proportions de 100% de males de génotype XX ont été obtenus avec le même stéroïde à une dose 40mg/kg d’aliment administré à 70 mg de poids corporel pendant 30 jours (Rougeot et al., 2002). Le traitement par immersion des embryons de tilapia XY à des doses de 2000 μ g/l de 17 α -éthynylestradiol, entraîne jusqu’à 91% de féminisation de (Gennotte et al., 2015). Chez la truite arc-en-ciel, un traitement par immersion avec la 17 MT à 400 μ g/l pendant 2h, une semaine après l’éclosion et chaque semaine pendant cinq semaines dès le début de la phase d’alimentation soit 7 immersions au total entraîne l’obtention de 100% de males. La durée de chaque immersion pouvant être réduite à 1h et fournir des résultats similaires (Weber et al.,

2020; Weber & Leeds, 2022). Le moment de l'application est donc le premier facteur à étudier, car les traitements appliqués après le début de la différenciation sexuelle ont souvent un effet réduit ou nul (Rougeot et al., 2002).

II-Mécanismes hormonaux impliqués dans la différenciation sexuelle chez les téléostéens

La stéroïdogenèse est le processus de synthèse des stéroïdes sexuels qui intervient chez les téléostéens dès les premiers stades de vie, avant pendant et après la différenciation histologique des gonades (Piferrer, 2001). Ces stéroïdes sexuels jouent un rôle déterminant dans le développement gonadique en agissant localement ou en effectuant des rétrocontrôles positifs ou négatifs sur le cerveau et l'hypophyse (Fontaine, 2014). Ils sont synthétisés grâce à une série de réactions enzymatiques catalysées principalement par plusieurs cytochromes P450 ainsi que par des hydroxystéroïdes déshydrogénases (**Figure 2**). Le précurseur de la synthèse de ces deux stéroïdes est un substrat androgénique qui est la testostérone. Elle est au carrefour métabolique des enzymes 11 β -hydroxylase et aromatasase qui sont toutes deux responsables de la synthèse directe du principal stéroïde sexuel endogène femelle (17 β -œstradiol) et de la 11 β -hydroxytestostérone (11 β -OHT). Cette dernière subit ensuite une transformation catalysée par l'enzyme 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β -HSD) pour donner la 11-cétotestostérone (11KT, principal androgène bioactif chez le poisson) (Fernandino et al., 2013). Chez les poissons, la 11KT et le 17 β -œstradiol sont les deux hormones inductrices de la différenciation sexuelle mâle et femelle (Baroiller et al., 1999; Devlin & Nagahama, 2002).

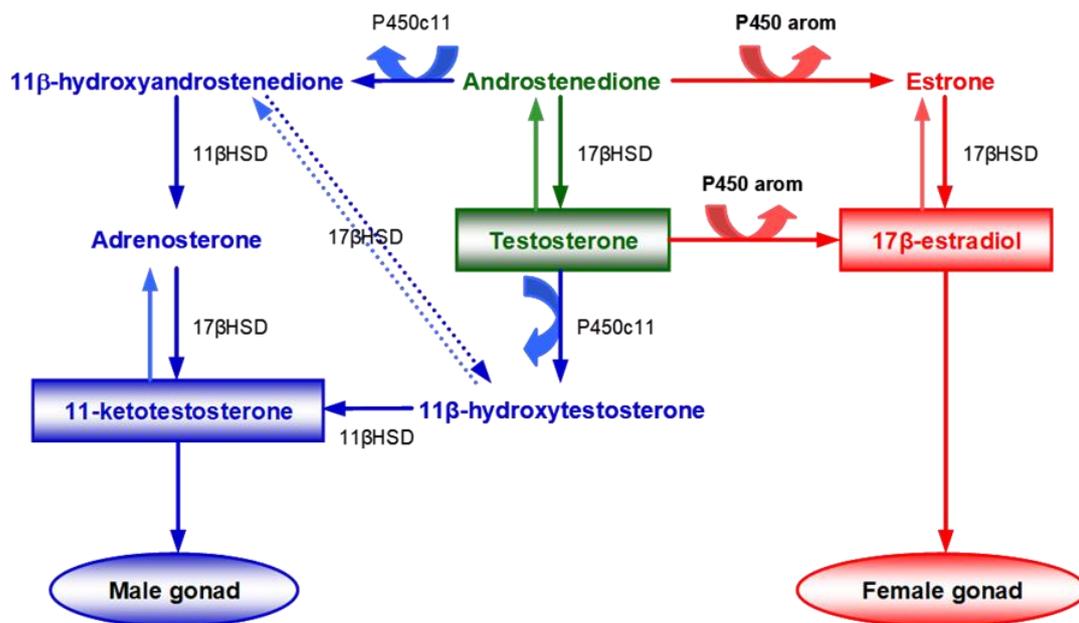


Figure 2 : Stéroïdogenèse chez les poissons. P450arom : aromatasase ; P450c11 : 11 β -hydroxylase ; HSD : hydroxystéroïde déshydrogénase (Gennotte et al., 2008).

Plusieurs études font état du fait que la différenciation ovarienne chez certaines espèces serait due à la présence de 17β -œstradiol, tandis que la différenciation testiculaire serait une conséquence de l'absence de cette hormone (Nakamura et al., 2003; Ijiri et al., 2008; Golan & Levavi-Sivan, 2014). Les androgènes ne jouant donc qu'un rôle de maintien de la différenciation testiculaire (Tokarz et al., 2015; Baroiller & D'Cotta, 2016). En effet, la nécessité de la présence des œstrogènes dans les processus de différenciation ovarienne a été révélé grâce à des études sur l'inhibition de l'activité de l'aromatase (Uchida et al., 2004; Ruksana et al., 2010; Gennotte et al., 2015; Breton et al., 2019). Une suppression de cette activité pendant la période critique de différenciation sexuelle chez des sujets, entraîne une réduction de la production d'œstrogènes (Steele et al., 1987; Gennotte, 2014). De plus des niveaux insuffisants d'œstrogènes dans les ovaires conduisent à une dégénérescence des ovocytes qui s'accompagne d'une transformation progressive des ovaires en testicules (Jiang et al., 2022). Toutefois, ce processus de différenciation ovarienne n'est pas identique chez tous les téléostéens. Chez certaines espèces telle que le medaka, celle-ci ne dépend pas de la présence d'œstrogènes car les cellules stéroïdogéniques sont absentes aux premiers stades de la différenciation gonadique (Strüssmann & Nakamura, 2002). La différenciation sexuelle pourrait donc également être conditionnée chez certaines espèces par le rapport 11KT sur E2, induisant une différenciation mâle avec un excès de 11KT et une différenciation femelle avec un excès de E2 (Bogart, 1987; Baroiller et al., 1999; Rougeot et al., 2007). Les niveaux d'hormones en régulant, via des mécanismes de rétroaction, la baisse ou la hausse de l'expression de certains gènes impliqués dans les processus de différenciation sexuelle tels que le gène *foxl2* (Jiang et al., 2022), participent au développement des gonades vers l'un ou l'autre des sexes. Chez *Clarias gariepinus*, la mesure de l'expression de ce gène dans les gonades femelles en différenciation présente une augmentation progressive et atteint des niveaux relativement très élevés (Raghuv eer & Senthilkumaran, 2010; Raghuv eer et al., 2011).

III- Inversion hormonale sexuelle chez les téléostéens

L'inversion du sexe par des hormones stéroïdiennes est très couramment utilisée chez les poissons et se traduit par la production d'individus monosexes ou inversés dont le phénotype est opposé au génotype. Les applications de cette technique de contrôle de sexe sont diverses et revêtent aussi bien un intérêt économique que scientifique. Les animaux d'aquaculture plus particulièrement, présentent des phénotypes sexuels et des mécanismes sous-jacents d'une telle diversité que cette particularité leur confère un profil spécial dans l'élaboration des recherches sur le déterminisme du sexe. Ce domaine étant l'un des plus importants des sciences de la vie

(Li et al., 2022). Les hormones utilisées dans le cadre de ces manipulations peuvent être de nature synthétique ou naturelle et ont des modes d’actions différents. Leurs efficacités étant fonction de leur mécanisme d’action, du moment d’application, de la durée, de la dose et de la nature de l’hormone administrée (Gennotte, 2014). L’hormone synthétique la plus largement utilisée en aquaculture est la 17 α -méthyltestostérone avec de forts taux de succès de masculinisation enregistrés chez diverses espèces (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Taux de masculinisation via l’alimentation à la MT obtenus chez quelques espèces de poissons en élevage

Espèces	Doses (mg/kg d’alt)	Durée	% de masculinisation	Références
Truite arc-en-ciel (<i>O. mykiss</i>)	3	60	100%	Weber et al., (2020)
Poisson-chat (<i>C. gariepinus</i>)	60	35	80,86%	Enuekwe & Okonji, (2019)
Perchaude (<i>P. flavescens</i>)	20 et 50	60	100%	Othman et al., (2022)
Tilapia (<i>O. niloticus</i>)	60	28	≥ 94%	Rodrigo Zhouri et al., (2022)
Perche (<i>P. fluviatilis</i>)	40	30	100%	Rougeot et al., (2002)

Ces hormones sont fréquemment administrées de façon orale après incorporation aux aliments ou encore par immersion dans des solutions hormonées de concentration variable (Pandian & Koteeswaran, 1999). Toutefois malgré le succès de cette molécule, son utilisation suscite des préoccupations tant d’ordre environnemental que de santé publique (Leet et al., 2011; Mlalila et al., 2015; Nian et al., 2017). En effet, seule une partie de l’hormone incorporée dans les aliments est consommée par les poissons et utilisée dans le processus d’inversion sexuelle. Le reste étant susceptible de se retrouver dans la nature sous forme de résidus et de métabolites actifs adsorbés par les sédiments (Ong et al., 2012). Ces molécules adsorbées peuvent devenir des perturbateurs endocriniens qui vont affecter la faune naturelle non ciblée. Par exemple, chez un poisson indigène du Brésil *Astyanax bimaculatus*, il a été démontré que la MT engendre une

toxicité cytogénétique et une inhibition significative de la production de spermatozoïdes chez les sujets exposés (Rivero-Wendt et al., 2013). Au regard de ces effets négatifs, en raison des inquiétudes des consommateurs, et des interdictions d'utilisation de ces hormones synthétiques dans certains pays, les recherches sont de plus en plus axées vers des composés naturels contenus dans les plantes ayant pour appellation « composés phytochimiques ». En fonction de leur nature, ils ont de nombreux effets bénéfiques pour les poissons (Chakraborty & Hancz, 2011; Mansour et al., 2018; Abaho et al., 2021).

III-1 Description de quelques composés phytochimiques et leurs origines

Les composés phytochimiques sont les métabolites secondaires des plantes par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Leur utilisation par l'homme à des fins thérapeutiques a une longue histoire principalement dans les pays d'Asie (Ji et al., 2009). Ils font de plus en plus l'objet d'une forte sollicitation pour des recherches de toutes sortes avec pour but d'améliorer leurs propriétés naturelles ou de diminuer leurs effets secondaires ou toxiques (Krief, 2003). Ce sont principalement des hétérosides constitués d'une partie glucidique (appelée glycone) faite d'un sucre simple ou plusieurs sucres, et d'une partie non glucidique appelée aglycone ou génine qui leur confèrent leurs propriétés spécifiques (**Figure 3**).

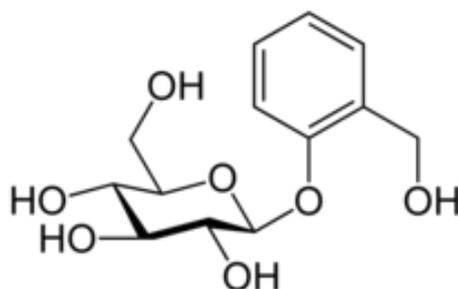


Figure 3 : Structure chimique d'un hétéroside (salicyline)

Les aglycones ou génines ont des natures chimiques très variées. Il peut s'agir d'un alcool, d'un phénol, d'un stéroïde etc. En se basant sur leur structure chimique, ces composés peuvent donc être classés en composés phénoliques (flavonoïdes, tanins), en terpènes et en alcaloïdes. Chacune de ces classes renferment une grande diversité de molécules qui possèdent un large éventail de propriétés. Chez les poissons, elles ont des propriétés antimicrobiennes, des fonctions sur la différenciation gonadique et la croissance en favorisant d'une part les processus androgènes et anabolisants et d'autre part en stimulant la digestion, l'appétit et l'immunité (Citarasu, 2010; Chakraborty & Hancz, 2011; Chakraborty et al., 2014; Ndakalimwe et al., 2017).

III-1-1 Les composés phénoliques (flavonoïdes)

Les flavonoïdes sont des composés phytochimiques de la famille des polyphénols qui sont présents dans les plantes (fruits, légumes) sous forme libre ou sous forme d'hétérosides (Hulse, 1980). Ce groupe est constitué de flavones dont la principale est l'apigénine, de flavonols tels que la quercétine, le kaempférol, d'isoflavones (génistéine, daidzéine) et des anthocyanidines (cyanidine) (Namsi et al., 2019). Les flavonoïdes ont des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives qui leur sont conférées par leur capacité à moduler l'activité de certaines enzymes et à changer le comportement d'un certain nombre de systèmes cellulaires (Ghedira, 2005; Ngene et al., 2015). Ils ont également des propriétés géoprotectrices et/ou cytoprotectrices en exerçant une action de contrôle sur des dysfonctionnements mitochondriaux, du stress oxydant, de l'inflammation, de l'angiogenèse et de la mort cellulaire (Upadhyay & Dixit, 2015; Carito et al., 2016).

III-1-2 Les terpénoïdes (les saponosides)

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels qui peuvent avoir une structure cyclique ou à chaîne ouverte que l'on retrouve dans des extraits d'huiles essentielles de plantes telles que la sauge, le romarin, la cannelle et également dans les résines végétales dont la molécule de base est l'isoprène. Les terpénoïdes correspondent à un groupe de substances dérivées de terpènes qui se retrouvent aussi bien chez les animaux terrestres et marins, (squalène, cholestérol, sesquiterpènes et des diterpènes) que chez les végétaux mais dans ce dernier cas dans une exceptionnelle diversité (Krief, 2003). En effet, ce sont des métabolites secondaires qui représentent environ 60% des produits dérivés de terpènes chez les végétaux. En fonction du nombre d'atomes de carbones on distingue les monoterpènes (10), sesquiterpènes (15), diterpènes (20), sesterterpènes (25), triterpènes (30) et tétraterpènes (40). Les triterpènes dans la nature sont retrouvés sous forme tétracycliques, pentacycliques ou acycliques, cette dernière étant la plus rare. Ce sont des précurseurs de stéroïdes, de phytostérols et de saponosides. Des propriétés anti-inflammatoires, décongestionnantes, antiseptiques, antivirales, antifongiques, anti-parasitaires, mucolytiques, cholagogues, et cicatrisantes leur sont attribuées (Soualeh & Soulimani, 2016). Celles-ci justifient leur utilisation dans plusieurs secteurs d'activité à savoir la nutrition humaine et animale, l'industrie du parfum et le secteur pharmaceutique (Malecky, 2008). Le squalène est un hétéroside triterpénique acyclique qui sert de précurseur à d'autres triterpènes et aussi à des stéroïdes végétaux. C'est la molécule indispensable à la synthèse de cholestérol et donc par le même biais à celle de stéroïdes sexuels (testostérone). Les hormones

stéroïdiennes sont donc chez les animaux, des produits dérivés synthétisés à partir de précurseurs triterpénoïdes. Les saponosides triterpéniques sont souvent des hétérosides ayant un squelette pentacyclique oléananes ou ursanes, caractérisés par leurs propriétés tensioactives qui leur confère la capacité de dissoudre dans l'eau et former des solutions moussantes (Bruneton, 2009). Les produits d'hydrolyse d'une saponine sont un hydrate de carbone (sucre) et un aglycone ou génine appelé dans ce cas sapogénine. Cette dernière peut être soit un triterpène, soit un stéroïde. La pénnogénine, la namogénine, dracaenogénine, la diosgénine etc sont quelques exemples de génines de type stéroïdique mises en évidence et utilisées dans le cadre de travaux scientifiques (Tran et al., 2001; Petropoulos, 2002; Tapondjou et al., 2008). Cette classe de molécules présente des propriétés diverses à savoir anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobienne, antiparasitaire, cytotoxique, antitumorale, immunostimulante et immunomodulatrice, antiapoptotiques (Nkwokap, 2010). Bien que la toxicité de ces molécules chez les hétérothermes (poissons inclus) ait été démontré à certaines concentrations, les extraits de plantes qui en contiennent peuvent avoir un potentiel d'exploitation dans les systèmes de production de poissons (Makkar et al., 2007). En effet, elles sont présentes dans de nombreuses plantes et servent parfois de base à la synthèse des stéroïdes. La diosgénine (**figure 4**) notamment est une sapogénine phytostéroïde qui est utilisée comme matière première pour la production d'hormones stéroïdiennes (Chen et al., 2015). Elle est naturellement présente en abondance dans des plantes médicinales, telles que le fenugrec (Petropoulos, 2002) et l'igname sauvage (*Dioscorea zingiberensis*) dont elle en est le principal métabolite secondaire (Qin et al., 2009). C'est une molécule qui au cours de ces dernières années a gagné en importance de par ses actions curatives sur des maladies potentiellement mortelles à l'instar des maladies cardiovasculaires, le cancer, les troubles du système nerveux, l'asthme, le diabète et bien d'autres (He et al., 2012; Wang et al., 2015; Parama et al., 2020).

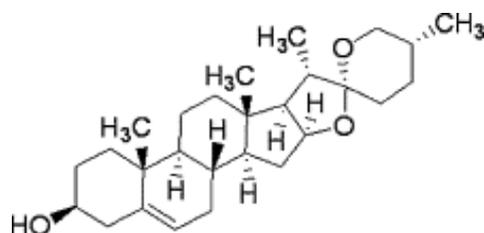


Figure 4 : Structure chimique de la diosgénine

III-1-3 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes constituent une classe importante de molécules organiques d'origine naturelle de structure chimique azotée et basique, possédant un squelette hétérocyclique et

dérivée d'un acide aminé. Ils sont retrouvés dans les plantes et sont stockés dans celles-ci en tant que produits de différentes voies biosynthétiques (Demir, 2019). Ce sont les principes actifs de nombreuses plantes médicinales ou toxiques. Ainsi, leurs effets pharmacologiques sont divers et variés d'où leurs utilisations comme base à la formulation de plusieurs molécules thérapeutiques (Marouf & Reynaud, 2007). Les propriétés physico-chimiques qui leur sont attribuées diffèrent selon la structure de base des composés mais d'une façon générale la plupart partagent des propriétés communes qui vont d'une action antalgique à cancéreuse en passant par des propriétés antibactériennes, antifongiques, analgésiques et antispasmodiques (Tangara et al., 2022).

III-2 Mécanisme d'action des composés phytochimiques dans les processus de maculinisation chez certains téléostéens

En aquaculture, les composés phytochimiques se révèlent être au fil du temps une alternative naturelle aux produits chimiques utilisés tant d'un point de vue thérapeutique que d'un point de vue production. En effet ils sont de plus en plus utilisés comme médicaments ou encore dans les manipulations d'inversion sexuelle des poissons d'élevage, ceci en raison de la nécessité de réduire l'impact négatif de cette activité sur l'environnement et la santé humaine (Abaho et al., 2021). Ces composés peuvent induire une masculinisation chez certaines espèces de poissons à travers des mécanismes d'action qui diffèrent en fonction de leur nature chimique. Chez le tilapia, il a été démontré que des composés phytochimiques telles que des saponines stéroïdiennes et des flavonoïdes agissent sur les processus de différenciation gonadique en inhibant l'activité de l'aromatase. Cette inhibition conduisant à un abaissement des taux d'œstrogènes ayant pour conséquence un développement de la gonade indifférenciée en testicule (Francis et al., 2001; Francis et al., 2002; Miyahara et al., 2003; Golan et al., 2008; Tarigan et al., 2017). Ils peuvent en se fixant aux sites de liaisons des récepteurs oestrogéniques inhiber la biosynthèse des œstrogènes endogènes entraînant également une déviation du sexe ratio en faveur des males (Eng et al., 2001; Miyahara et al., 2003; Golan et al., 2008). Ces composés ont la même action que les androgènes qui exercent des fonctions semblables à la testostérone chez les organismes animaux en stimulant les caractéristiques de reproduction male (Turan & Akyurt, 2005).

IV- *Clarias gariepinus* : Cas expérimental

Le poisson chat africain *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fait partie du sous-branchement des vertébrés, de l'ordre des siluriformes, de la famille des Clariidés et du genre *Clarias*. Ce poisson d'eau douce est largement distribué dans le monde. En Afrique, il est très

apprécié pour sa chair ce qui rend sa commercialisation facile (Pruszyński, 2003) et selon sa localisation géographique, elle a été décrite sous différentes appellations à savoir *Clarias lazera* (partie septentrionale et centrale), *Clarias senegalis* (partie orientale), *Clarias mossambicus* (partie occidentale) et *Clarias gariepinus* (partie méridionale) (Viveen et al., 1985). Sa peau sans écaille est couverte de mucus et pigmentée de noir sur la partie dorsale et latérale du corps. Exposé à la lumière, il prend une coloration plus claire. Les Clariidae se distinguent des autres siluriformes par l'absence d'épine dorsale, la présence de nageoires dorsale et anale très longues et par un corps de type anguilliforme (Lévêque et al., 1990). D'autre part, ils sont caractérisés par quatre paires de barbillons plus un organe suprabranchial, formé de branchies et d'organes arborescents permettant aux poissons de pratiquer une respiration aérienne. En milieu naturel, *Clarias gariepinus* est omnivore et consomme des insectes, des crabes, du plancton, des poissons, des cadavres, des plantes et des fruits (Fermon, 2011). Les températures tolérées par cette espèce varient entre 8 et 35°C avec celles associées à un optimum de croissance comprise entre 28 et 30°C (Teugels, 1986). Dans la nature, la maturité sexuelle est atteinte vers un âge d'environ 2 ans et est surtout influencée par la température, la photo périodicité, le régime alimentaire etc. En Afrique, dans la majorité des pays la période de reproduction de cette espèce débute à la saison des pluies. Les crues semblent donc être l'élément déclencheur de la fraie (Richter, 1976; Viveen et al., 1985). Une parade de plusieurs heures précède la ponte au cours de laquelle le mâle se met en U autour de la tête de la femelle. Celle-ci dépose des œufs de couleur verdâtre par petits groupes qui vont être fécondés par le sperme relâché par le mâle. Ils vont ensuite adhérer à la végétation submergée et vont éclore après 24 à 36 en fonction de la température de l'eau. Il n'y a pas de garde parentale des œufs par les géniteurs. Une fois la fraie terminée, ils retournent en eau profonde. Plusieurs pontes peuvent se succéder au cours de la même saison de ponte (Géoffroy et al., 2019). Le développement des stades embryonnaire et larvaire est rapide à tel point que 48 à 72 heures après la fécondation, les larves nouvellement produites sont capables de nager librement dans la colonne d'eau. Elles vont ensuite rester dans les zones inondées pour migrer une fois une taille de 1,5 à 2,5 cm de long atteinte (Fermon, 2011). De par sa facilité d'adaptation aux systèmes d'élevage intensifs, sa grande capacité de reproduction tant chez les femelles que les mâles, son régime alimentaire omnivore qui permet de les nourrir avec une grande variété d'aliments artificiels peu coûteux, sa tolérance à des hautes densités d'élevage ainsi qu'aux mauvaises conditions environnementales et sa croissance rapide (Hecht et al., 1996), le poisson-chat *Clarias gariepinus* est une espèce de choix pour l'aquaculture dans les pays tropicaux.

MATERIELS ET METHODES

Les expérimentations sont réalisées selon les recommandations européennes en matière de bien-être animal et selon les directives du Comité d'Ethique de l'Université de Liège.

II-1 Production de larves

Les larves utilisées au cours de cette étude ont été obtenues par reproduction artificielle de poissons-chats africains domestiqués à l'UGeRRA.

II-1-1 Sélection et préparation des géniteurs à la reproduction

Après anesthésie à la benzocaïne (0,4 ml/L), trois femelles matures de poids moyen d'environ 5kg sont sélectionnées sur base des critères tels que : un abdomen mou, flasque et dilaté, une papille génitale protubérante et très irriguée ajouté à l'émission de quelques ovocytes. Le choix des males est quant à lui uniquement basé sur leur corpulence (min 0,5 à 1 kg). Les géniteurs des deux sexes ainsi sélectionnés, sont stockés dans des bassins séparés. Par la suite, une hormone de synthèse composée de GnRH analogue de saumon et d'un inhibiteur de la dopamine, l'Ovaprim® (Syndel, Canada) est utilisé comme inducteur de ponte pour les femelles. Avant l'injection, les géniteurs sont anesthésiés avec de la benzocaïne. Une seule injection définitive à raison de 0,5 ml/ kg de poids corporel est administré à chaque femelle (soit 2,5 ml/femelle). L'injection est effectuée en soirée (20h30 – 21h) de manière à pouvoir récolter les œufs le lendemain matin vers 9h -10h. En effet, le délai d'action de l'hormone étant fonction de la température, celle de 28°C dans le milieu d'élevage conduit à ce que la ponte ait lieu environ 8h après l'injection hormonale.

II-1-2 Reproduction artificielle

Une fois le temps d'action de l'hormone respecté, les femelles sont pêchés et anesthésiés dans de la benzocaïne et les œufs récoltés par stripping. Le sperme qui sert à la fécondation de ces œufs est prélevé directement à partir des testicules des males préalablement euthanasiés par surdosage (10 ml/L) de benzocaïne. La fécondation est effectuée suivant le principe de la fécondation dite sèche. Les gamètes sont délicatement mélangés de manière homogène avant d'ajouter de l'eau (eau de l'écloserie) dans le but d'activer la fécondation. La quantité d'eau à ajouter est plus ou moins égale au volume des œufs à féconder. Deux à trois minutes après ce mélange, les œufs sont rincés 3 à 4 fois avec de l'eau de l'écloserie pour se débarrasser de toute substance susceptible de faire développer rapidement des champignons. Par la suite, les œufs sont transférés séparément en écloserie dans des bouteilles Zug de 1,5 l pour incubation jusqu'à l'éclosion (T° comprise entre 25 et 27°C). Les premières éclosions ont lieu après environ 24h et après, 48h la majeure partie des œufs ont éclos. Le troisième jour post-éclosion les larves

sont ensuite récoltées et dénombrées. Les larves issues de trois pontes différentes sont obtenues, constituant ainsi trois familles.

II-2 Dispositif expérimental et élevage larvaire

L'expérimentation se déroule en deux phases : une première (durée : 30 jours) correspondant à la phase d'inversion sexuelle et une deuxième (durée : 30 jours) à une phase de croissance jusqu'au sexage. Deux hormones sont utilisées d'une part, une phytohormone de synthèse la diosgénine incorporé à différentes doses dans l'aliment. Et d'autre part, la 17 α -méthyltestostérone (17 MT) incorporé à une dose unique de 50 mg/kg d'aliment.

II-2-1 Dispositif expérimental

Au troisième jour post éclosion, les larves issues des trois pontes sont transférées dans 15 aquariums de 50 l contenant chacun un lot de 500 larves. Disposés de façon aléatoire sur deux étagères, ces 15 aquariums correspondent à cinq traitements représenté chacun en triplicat :

- Un traitement représentant le témoin négatif noté **DO** pour lequel les larves sont nourries avec de l'aliment sans hormone ;
- Un autre représentant le témoin positif noté **MT** pour lequel les larves sont nourries avec de l'aliment incorporé à la 17 α -méthyltestostérone (17 MT) à une dose unique de 50 mg/kg d'aliment ;
- Trois traitements notés **D30**, **D300**, et **D3000** correspondant respectivement à l'incorporation de la diosgenine dans l'aliment à des doses de 30, 300 et 3000 mg/kg d'aliment.

Tous les répliqués marqués de l'indice n°1 correspondent à la ponte d'une femelle noté 1, ceux marqués de l'indice n°2 correspondent à la ponte d'une femelle noté 2. Il en est de même pour ceux marqués de l'indice n°3. La descendance de chaque ponte va constituer les familles 1, 2 et 3.

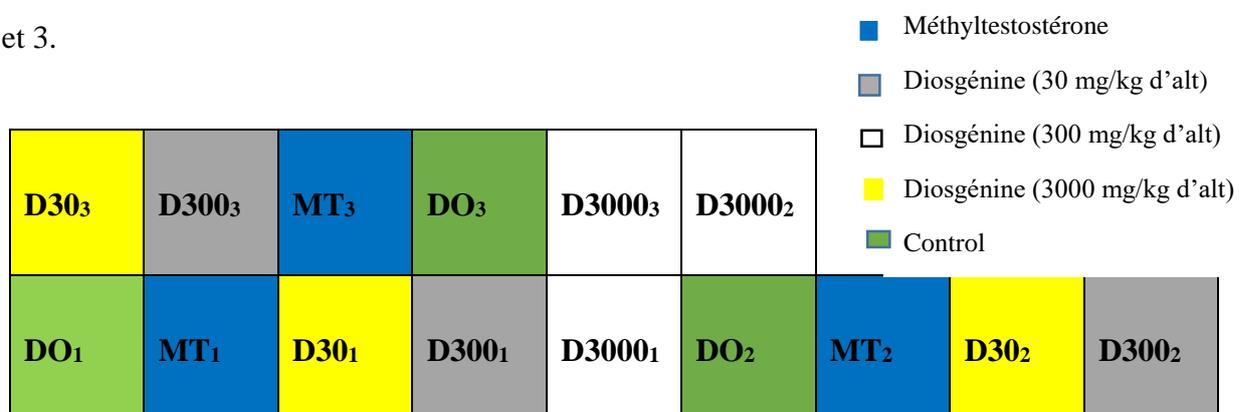


Figure 5 : Présentation du dispositif expérimental de 15 aquariums superposés, 9 aquariums disposés sur le premier étage et 6 sur le deuxième



Figure 6 : Circuit expérimental de 15 aquariums de 50 litres alimentés en eau de puits chauffée dans un bac de charge à l'aide d'une résistance électrique

II-2-2 Elevage larvaire

La phase d'inversion sexuelle (du 19/06/2022 au 18/07/2022) consiste à nourrir les lots de poissons traités avec de l'aliment hormoné à différentes doses dans un élevage en circuit ouvert afin d'éviter que les hormones incorporés dans les aliments ne contaminent tout le circuit. La deuxième phase, celle de croissance (du 19/07/2022 au 17/08/2022) quant à elle se fait en circuit fermé et consiste à nourrir les sujets avec un aliment sans hormone (normal) jusqu'à un âge qui permet d'effectuer le sexage. La température dans les aquariums est maintenue entre 22°C et 27°C tout au long de l'expérimentation et la photopériode à 12h de jour et 12 de nuit. Les larves sont nourries 5 fois par jour ad libitum avec des aliments dont la granulométrie des aliments est fonction de leur âge. De 3JPE à 15 JPE, elle est de 150 μm et de 15 JPE à 63 JPE de 300 μm . Les aquariums sont nettoyés et siphonnés deux fois par jour afin d'enlever les restes d'aliments sur les parois et dans le fond ceci dans le but d'éviter un développement de champignons qui serait préjudiciable pour la croissance et la survie des larves. Les sujets dont la taille est trois fois supérieures aux autres sont considérés comme cannibales avérés et sont régulièrement éliminés des aquariums.

II-3 Préparation des aliments hormonés

La préparation des aliments pour l'inversion sexuelle est faite à partir d'un aliment commercial « Gemma micro » qui est composé de protéines brutes (59%), de matières grasses brutes (14%), cellulose brute (0,2%), de cendres brutes (13%), de phosphore (2%) de calcium (1,5%) et de sodium (0,7%). La méthode d'incorporation des hormones dans l'aliment que nous avons choisie est celle utilisant l'évaporation de l'alcool (Guerrero, 1975), elle est également la plus largement utilisée (Pandian & Sheela, 1995).

L'incorporation de la diosgénine à l'aliment nécessite la préparation d'une solution mère en faisant dissoudre 5g d'hormone dans 540 ml d'éthanol. La solution est placée sur un agitateur magnétique pendant quelques minutes pour permettre son homogénéisation. Pour tous les traitements, 100g d'aliment sont préparé chaque fois que nécessaire. La préparation de cette quantité d'aliment nécessite des ajouts de quantités précises de solution mère et d'éthanol qui sont fonction des doses de diosgénine que l'on souhaite incorporer à l'aliment (**Tableau 2**). L'incorporation quant à elle de la 17 α -méthyltestostérone (17 MT) dans 100 g d'aliment se fait chaque fois, en faisant dissoudre 5mg d'hormone dans 50 ml d'éthanol. Les solutions obtenues pour chaque hormone sont mélangées à l'aliment et bien remuées de façon à ce que l'hormone s'incorpore bien à l'aliment. Les mélanges sont mis dans des contenants en papier aluminium et placés sous la hotte pendant 24h pour permettre l'évaporation de l'éthanol. Les aliments hormonés obtenus sont conservés à 4°C au réfrigérateur pendant toute la durée de l'expérimentation pour éviter l'altération des hormones incorporés dans l'aliment.

Tableau 2: Quantités de solution mère de diosgénine et d'éthanol utilisées par dose pour la préparation de 100g d'aliment hormoné.

Doses	30mg/kg	300 mg/kg	3000 mg/kg
Solution mère de diosgénine	0,33 ml	3,3 ml	33 ml
Solution d'éthanol	32,67 ml	29,7 ml	0 ml

II-4 Paramètres évalués

II-4-1 Sexage et estimation du sexe ratio

La technique du squash gonadique et de la coloration à l'acétocarmin est utilisée pour déterminer le sexe des poissons juvéniles (Guerrero & Shelton, 1974). Après 60 jours d'élevage, 50 poissons par lot (ou tous les poissons si le nombre total était inférieur à 50) sont prélevés au hasard et euthanasiés avec une surdose de 200 mg/l de benzocaïne. Un fragment de gonade est prélevé sur chaque individu sacrifié, et coloré avec quelques gouttes d'acétocarmin et ensuite est écrasé avec une lamelle couvre-objet et observé au microscope optique (grossissement 40 ×). Le sexe phénotypique est évalué sur la base de la présence d'ovocytes dans la gonade femelle et sur la morphologie lobulaire du testicule pour les mâles. Le pourcentage de sexe ratio (SR) est estimé pour chaque traitement en utilisant la formule suivante :

$$\text{SR (\%)} = \text{Nombre de males observés} / \text{Nombre total sexés} * 100$$

Le taux d'inversion sexuelle est déterminé sur base de la formule suivante :

$$\text{TS (\%)} = \text{F (males lots traités)} - \text{F (males lots témoins)} / 1 - \text{F (males lots témoins)} * 100$$

II-4-2 Poids moyen et taux de survie

L'évaluation de la croissance des larves tout au long de l'expérimentation, est faite tous les 14 jours en prélevant dans chaque aquarium, 50 individus qui sont pesés dans le but de déterminer les poids moyens des larves dans chaque aquarium. Des pêches de contrôle sont donc faites à J15, J30, J45 et à J60. A la fin de l'expérience, tous les juvéniles sont dénombrés et l'évaluation du taux de survie est faite en utilisant la formule suivante :

$$\text{TS (\%)} = \text{Nombre d'individus restants} / \text{Nombre d'individus initial} * 100$$

II-5 Analyses statistiques

Les données brutes recueillies sont enregistrées dans le logiciel Excel 2016. Le logiciel R 4.0.2 (2020) nous permettant de réaliser l'analyse des données et de mettre en exergue l'effet des différents traitements sur les paramètres évalués. Les données sont analysées par une ANOVA à un facteur pour tester les effets des traitements sur le taux de survie et le poids moyen suivi par un test post hoc de Tukey pour comparer les moyennes deux à deux. Le sexe ratio des

lots est analysé à l'aide du test du chi carré de contingence 2×2 (χ^2). Dans un premier temps, la moyenne du sexe ratio des contrôles est comparé à un sexe ratio théorique de 50 :50 puis la moyenne de chaque traitement est comparée à celle des contrôles. Dans un deuxième temps, les sexes ratios des groupes traités de chaque famille sont comparés à ceux de leurs contrôles respectifs.

RESULTATS

III-1 Taux de survie

Les taux de survie moyens dans les traitements au terme de cette expérimentation d'une durée de 60 jours, montrent une forte variation avec des valeurs comprises entre 46,9% (D30) et 7,7% (D3000). Le test post hoc de Tukey montre d'ailleurs des différences significatives entre les traitements D30 - D300 et le traitement D3000 ($p < 0,05$, **Figure 7**).

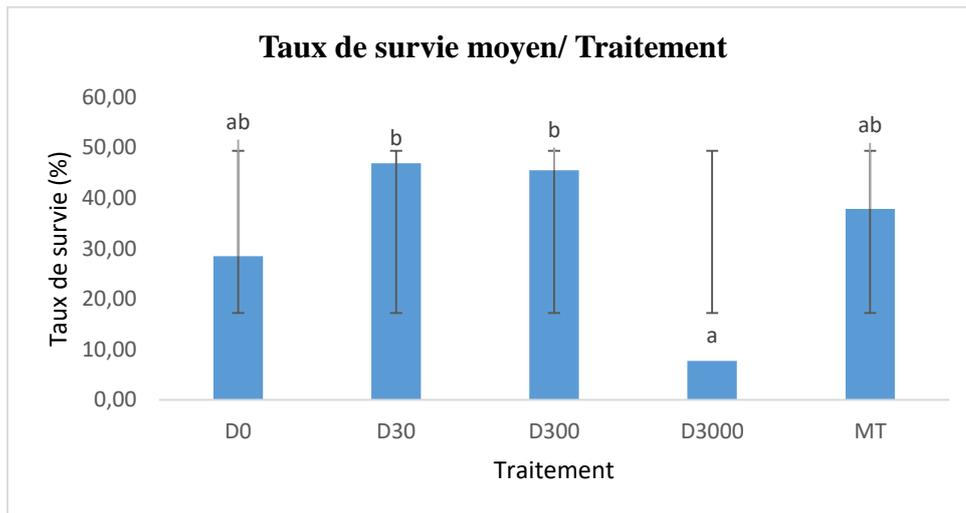


Figure 7 : Taux de survie moyen des juvéniles de Clarias à J60 traités à des doses croissantes de diosgénine

L'effet des traitements sur les taux de survie présente quelques variations en fonction des trois familles présentes (F_1 , F_2 et F_3). En effet, les lots de poissons provenant de la famille 2 présentent les valeurs les plus élevées dans le control et à tous les traitements sauf celui dosé à 3000 mg de diosgénine par kg d'aliment (**Figure 8**).

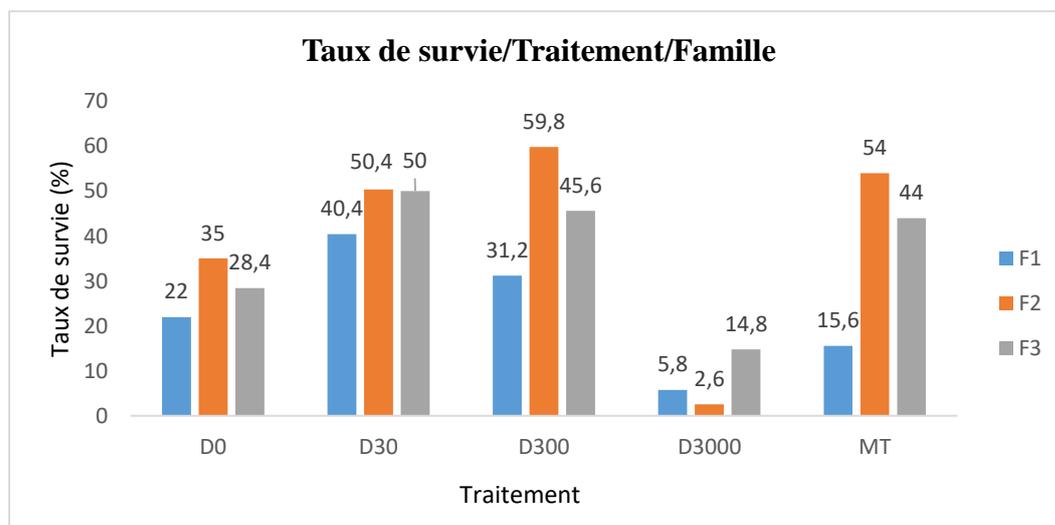


Figure 8 : Taux de survie dans les familles de juvéniles de Clarias à J60 traités à des doses croissantes de diosgénine

III-2 Poids moyen

La cinétique de croissance des larves tout au long de l'expérimentation, basée sur une estimation bimensuelle du poids moyen d'une larve dans chaque traitement est présentée dans le tableau 3. Le poids moyen le plus faible est observé dans le traitement D3000 à la période correspondant à celle de l'arrêt du nourrissage à l'aliment hormoné (J30). Ce traitement présente d'ailleurs à J30, une différence significative avec l'ensemble des autres traitements ($p < 0,05$). A J60 période de fin d'expérimentation, le même traitement présente toujours le poids moyen le plus faible avec une valeur de 6,03g. Le poids moyen le plus élevé quant à lui est enregistré dans le traitement D30 avec une valeur de 9,26g suivi de près par celui du traitement à la MT avec une valeur de 8,58 g. Les tests statistiques révèlent d'ailleurs qu'à cette période, les poids moyens entre les traitements D30 et D3000 diffèrent significativement ($p < 0,05$).

Tableau 3 : Evolution temporelle des poids moyens (g) des larves de Clarias nourries à des doses croissantes de diosgénine

	Traitement	DO	MT	D30	D300	D3000
Jours de contrôle	J1	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
	J15	0,084	0,092	0,072	0,093	0,048
	J30	0,367^b	0,331^b	0,301^b	0,323^b	0,176^a
	J45	2,121	2,125	1,901	1,905	0,944
	J60	8,254^{ab}	8,583^{ab}	9,265^b	7,314^{ab}	6,036^a

D'une façon générale, la variation des poids moyens enregistrés dans les traitements au cours de l'expérimentation ne montrent aucune différence notable quant à l'origine familiale des lots étudiés.

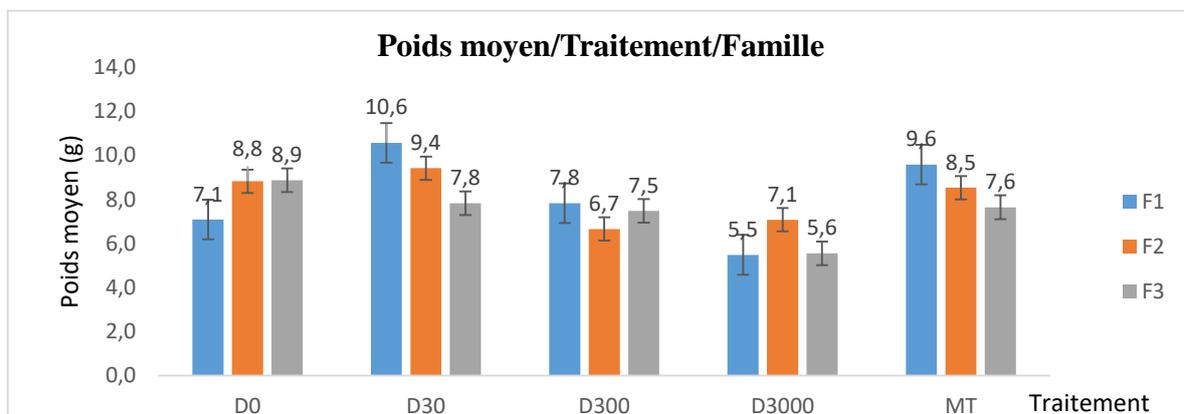


Figure 9 : Poids moyen à J60 dans les familles de juvéniles de Clarias nourris à des doses croissantes de diosgénine

III-3 Description de la structure gonadique et analyse du sexe ratio des juvéniles

Après 60 jours d'élevage, 50 individus sont prélevés dans chaque traitement et chaque famille et leurs gonades sont utilisés pour la détermination et l'analyse du sexe ratio. Ainsi, 15 lots correspondant à 5 traitements et trois familles subissent un sexage.

III-3-1 Description de la structure gonadique

Le sexage par squash gonadique est réalisé au terme de notre expérience et permet de mettre en évidence trois types de morphologie structurale des gonades à savoir :

- Un tissu mâle qui se présente sous la forme d'une structure lisse (**Figure 10**) ;
- Un tissu femelle qui se présente sous la forme d'une structure présentant des ovocytes définis de façon claire et distincte (**Figure 11**) ;
- Un tissu gonadique dont la structure non clairement définie ne permet pas de confirmer le sexe. Sa structure est plus proche de celle d'une femelle, avec la présence d'ovocytes non clairement définis mais présentant à des endroits des parties lisses faisant penser à un mâle. Nous avons supposé qu'il s'agit de femelles en pleine phase de différenciation (**Figure 12**).

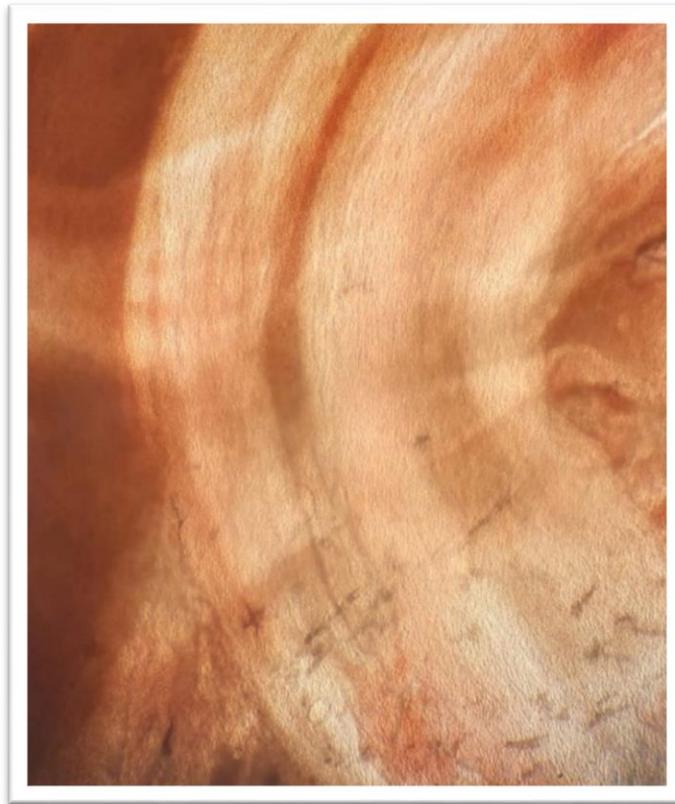


Figure 10 : Structure microscopique d'une gonade mâle de *Clarias gariepinus* observée après squash gonadique et coloration à l'acétocarmin

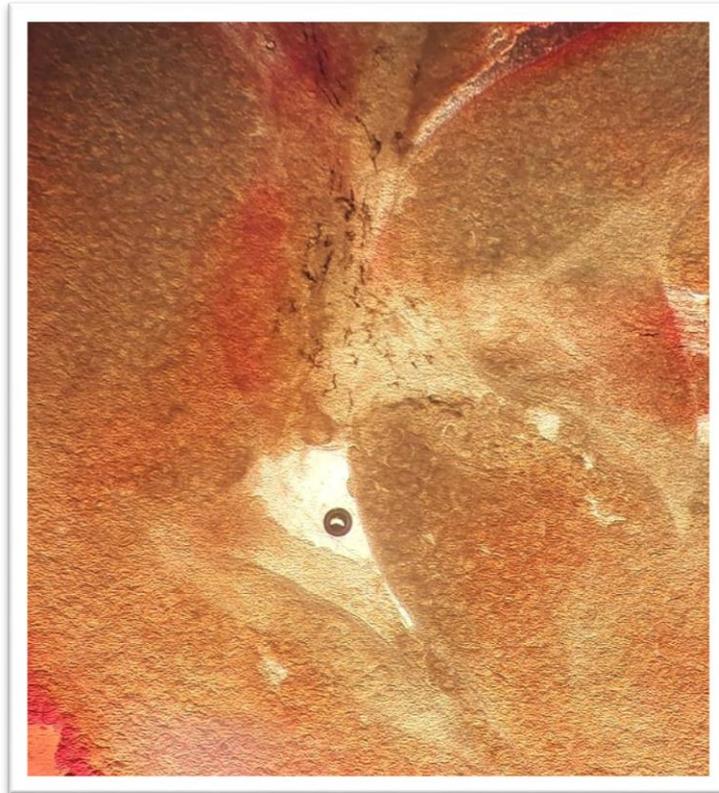


Figure 11 : Structure microscopique d'une gonade femelle de *Clarias gariepinus* observée après squash gonadique et coloration à l'acétocarmin

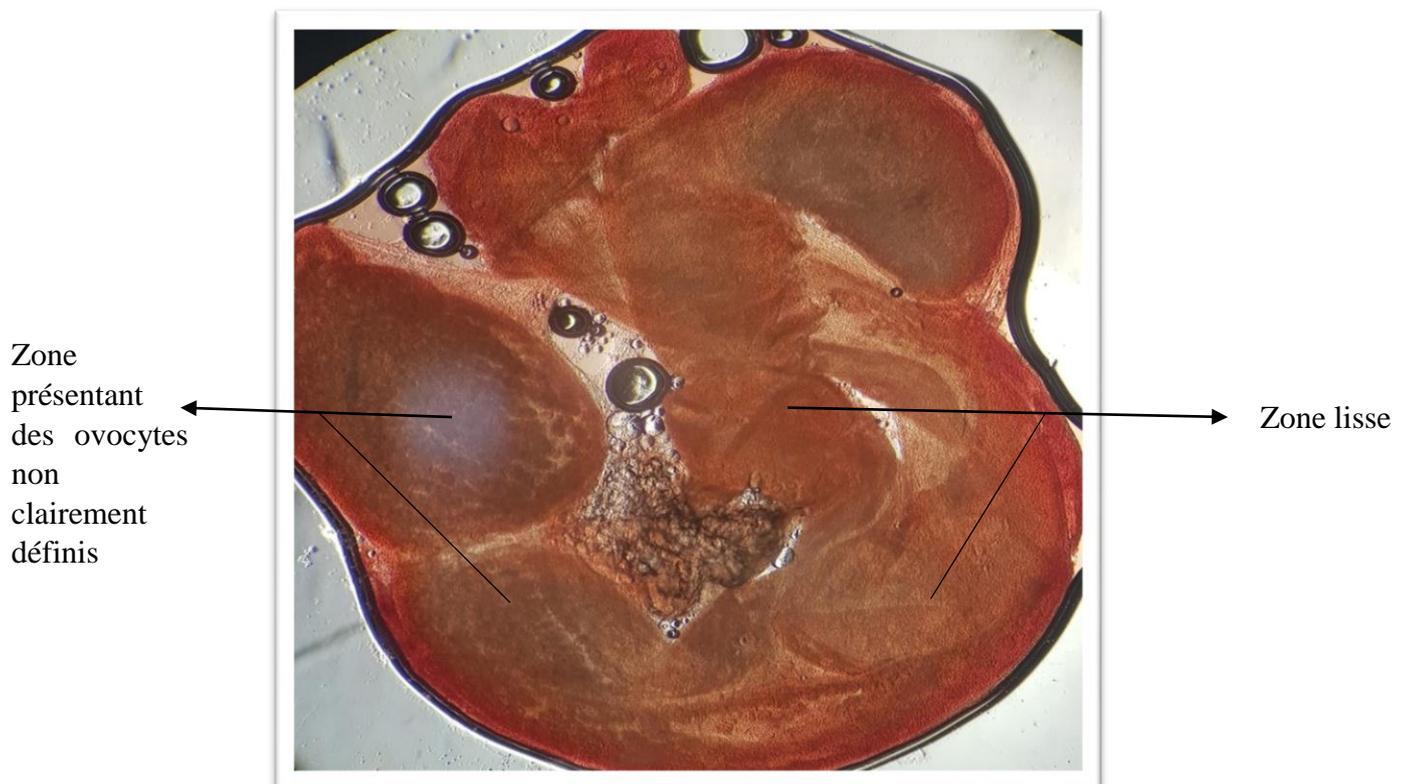


Figure 12 : Structure microscopique d'une gonade femelle de *Clarias gariepinus* supposée en cours de différenciation observée après squash gonadique et coloration à l'acétocarmin

III-3-2 Analyse du sexe ratio et taux d'inversion sexuelle

Dans un premier temps une comparaison du sexe ratio est effectuée entre les groupes traités (MT et diosgénine) et le contrôle (D0), ensuite une autre entre les groupes traités à la diosgénine et le témoin positif (MT). Ensuite, deux autres comparaisons du sexe ratio sont effectuées l'une entre chaque famille traitée (à la diosgénine et à la MT) et son contrôle respectif, (D0) et l'autre entre chaque famille traitée à la diosgénine et son témoin positif respectif (le traitement à la MT). Le taux d'inversion sexuelle (TI) est calculé pour chaque traitement dans le but d'évaluer les niveaux d'inversion sexuelle (masculinisation et/ou féminisation) par rapport à la fréquence respective de femelles ou de mâles présents dans le control et susceptibles d'être masculinisés ou féminisés. Sont considérés comme femelles les individus qui présentent des ovocytes clairement définis. Le taux d'inversion peut prendre des valeurs positives comme négatives. Lorsqu'il est négatif il indique qu'un effet contraire à celui escompté a eu lieu (masculinisation au lieu de féminisation ou féminisation au lieu de masculinisation).

III-3-2-1 Analyse du sexe ratio et du taux d'inversion en fonction des traitements

En moyenne, le sexe ratio de 49 % de femelles et de 51% de mâles obtenu dans les groupes contrôles n'est pas significativement différent d'une valeur théorique de 50 :50 ($p < 0,001$). Dans les traitements à la MT et à la diosgénine (dose 3000 mg/kg d'aliment), les sexes ratios fortement biaisés en faveur des mâles différent significativement de celui du contrôle avec des pourcentages respectifs de 98% et 58% de mâles. Les traitements D30 et D300 quant à eux, diffèrent significativement des groupes contrôles avec des sexes ratios fortement biaisés en faveur des femelles (**Tableau 4**). L'ensemble des groupes traités à la diosgénine sont significativement différent du témoin positif (la MT). Il est également à noter que les groupes control et MT ont un pourcentage nul de femelles supposé en différenciation.

Tableau 4 : Sexes ratios moyens chez les juvéniles de Clarias à J60 traités à des doses croissantes de diosgénine

Traitement	N. sexés	% F	% M	% FD	%F+%FD	X ²
Control	50	49	51	0	49	0,02
MT	50	2	98	0	2	58,14***
D30	50	50	36	14	64	16,596***
D300	50	62	33	5	67	10,38**
D3000	50	34	58	8	42	11,16**

Nombre sexés : nombre de poissons sexés ; % M : pourcentage mâle ; % F : pourcentage femelle ; % FD : pourcentage femelles supposées en différenciation ; %F+%FD : pourcentage femelle et femelle supposées en différenciation ; X² : chi carré ; ** $\alpha = 0,01$; *** $\alpha = 0,001$

Le traitement à la MT est choisi comme témoin positif car les capacités androgéniques de cette molécule ont déjà été prouvées sur cette espèce. En effet, une masculinisation importante des sujets est observée dans les groupes traités à la MT avec obtention d'un taux moyen d'inversion sexuelle de 95,9%. Dans les groupes traités à la diosgénine à 3000 mg/kg d'aliment, une masculinisation en moyenne de l'ordre de 14,3% est obtenue. Les traitements D30 et D300 présentent quant à eux des taux d'inversion sexuelle négatifs indiquant un effet contraire à ce qui était prévu ce qui suggère que la diosgénine à ces doses a eu un effet féminisant chez cette espèce. Ainsi donc, on enregistre en moyenne des taux d'inversion négatifs de -30,6% dans les groupes traités à 30 mg de diosgénine/kg d'aliment et de -36,7% dans ceux traités à la diosgénine à 300 mg/kg d'aliment (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Taux d'inversion (%) chez les juvéniles de Clarias à J60 traités à la 17 α méthyltestostérone et à des doses croissantes de diosgénine

Traitement	Taux d'inversion (%)
MT	95,9
D30	-30,6
D300	-36,7
D3000	14,3

III-3-2-2 Analyse du sexe ratio et du taux d'inversion sexuelle en fonction des traitements et des familles

Les sexes ratios dans les groupes contrôles des familles 1 et 2 ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$) d'une valeur théorique de 50% de mâles et 50% de femelles. Seul le sexe ratio du lot control de la famille 3 diffère significativement d'un ratio théorique de 50 :50 avec 68% de femelles et 32% de mâles. Dans les trois familles, la proportion de mâles ou de femelles varie en fonction des traitements administrés aux individus (**Tableau 6**). La famille 1 montre la plus faible sensibilité aux traitements seul celui à la MT présente une différence significative du sexe ratio avec son témoin respectif ($p < 0,001$). La famille 2 quant à elle présente à tous les traitements une différence significative du sexe ratio par rapport à son control ($p < 0,001$). Cette famille semble plus sensible aux traitements que la précédente en ce sens que dans les traitements D30 et D300, on relève une augmentation significative de la proportion de femelles comparé à leur control avec des valeurs respectives de 50% et 78%.

Tandis que dans les traitements MT et D3000, on note une augmentation significative de la proportion de mâles par rapport à leur control (98% et 84%). Seul le traitement D300 semble n'avoir aucun effet sur les individus de la famille 3. Des différences significatives ($p < 0,001$) entre les traitements MT, D30 et D3000 et leur control sont observées. Dans le groupe traité à la dose 30 mg de diosgénine/kg d'aliment, on note une augmentation de la proportion de femelles (70%) et une baisse de celle des mâles par rapport au témoin ceci suppose que le sexe ratio semble avoir été biaisé en faveur des femelles. Dans les traitements MT et D3000 on note cependant une augmentation de la proportion de mâles.

Tableau 6 : Sexes ratios à J60 dans les familles de juvéniles de Clarias traités à des doses croissantes de diosgénine

	Traitement	%F	%M	%FD	%F+%FD	X ²
Famille 1	Control	38	62	0	38	2.92
	MT	2	98	0	2	40.5***
	D30	30	58	12	42	13.07
	D300	42	56	2	44	2.51
	D3000	52	41	7	59	13.46
Famille 2	Control	42	58	0	42	1.288
	MT	2	98	0	2	46.62***
	D30	50	34	16	66	22.956***
	D300	78	14	8	86	45.688***
	D3000	8	84	8	16	35.88***
Famille 3	Control	68	32	0	68	6.698
	MT	2	98	0	2	95.736***
	D30	70	16	14	84	19.362***
	D300	66	30	4	70	4.094
	D3000	42	48	10	52	19.346***

Nombre sexés : nombre de poissons sexés ; % M : pourcentage mâle ; % F : pourcentage femelle ; % FD : pourcentage Femelles en différenciation ; ; %F+%FD : pourcentage femelle et femelle supposées en différenciation ; X² : chi carré ; ** $\alpha = 0,01$; *** $\alpha = 0,001$

Les taux d'inversion varient dans les groupes traités en fonction de l'origine familiale des sujets. Tout d'abord dans la famille 2 dans laquelle on observe des différences très significatives entre les sexes ratios de tous les traitements et celui du control, les traitements MT et D3000 présentent des taux de masculinisation respectifs de 95,2% et 61%. Les traitements D30 et D300

de la même famille présentent des taux d'inversion sexuelle négatifs assez élevés de -57,1% et -104,7 % ce qui pourrait suggérer qu'à ces deux doses la diosgénine conduit à une féminisation des individus de cette famille. La famille 3 présente une sensibilité similaire à celle de la F2 avec des taux d'inversion positifs enregistrés aux traitements MT et D3000 respectivement de 97,1% et 23,5% supposant une masculinisation des sujets et un taux d'inversion négatif de -23,5% au traitement D30 suggérant un effet contraire à celui attendu (féminisation). On constate donc que l'intensité de l'effet de la diosgénine varie en fonction de la dose et de l'origine familiale des individus traités.

DISCUSSION

IV- 1 Effet des traitements sur la survie

Les larves de clarias ont été nourries dans des conditions optimales en terme de fréquence de nourrissage et de ration. Ainsi, les taux de survie moyens que l'on a enregistré sont similaires à ceux obtenus dans de nombreuses études sur l'alimentation des larves de poisson chat africain avec de l'aliment inerte dès la résorption de leurs sacs vitellins. Le taux de survie moyen de 28,4% dans le témoin se rapproche de celui de 30,4% obtenu dans un élevage de 42 jours des larves de la même espèce, nourries avec un aliment inerte de composition similaire à celle que nous avons utilisée (Egwenomhe et al., 2017). La fréquence de nourrissage est primordiale chez les jeunes poissons car elle influence la survie, la croissance, et leur composition corporelle (Marimuthu et al., 2010; Muntaziana et al., 2017). Une fréquence de nourrissage de minimum 5 fois par jour a été choisie pour notre expérimentation et les résultats obtenus pour les taux de survie moyens de 46,9% et 45,5% dans les traitements D30 et D300 se rapprochent de celui de 47,5%, obtenus chez des individus de la même espèce nourris à la même fréquence pendant 30 jours et s'éloignent de ceux dont la fréquence de nourrissage étaient inférieure à cinq (Okomoda et al., 2019).

Le taux de survie moyen le plus faible de 7,7% a été observé dans le traitement à 3000 mg de diosgénine par kg d'aliment, qui correspond à la plus forte dose administrée aux sujets d'étude. Une observation des résultats des taux de survie par famille et par traitement nous permet également de constater que la famille F2 a présenté à presque tous les traitements, les taux de survie les plus élevés comparés aux deux autres familles F1 et F3. Seul le traitement D3000 affiche un taux de survie en F2, extrêmement plus faible d'une valeur de 2,6%. Ces données permettent donc de mettre en exergue l'effet que cette concentration de diosgénine a sur les larves de Clarias. L'administration orale d'une dose de 3000 mg de diosgénine par kg d'aliment à des larves de *Clarias gariepinus* serait donc une dose toxique qui entraîne des mortalités massives des stades larvaires de cette espèce. En effet, il a été rapporté que les saponosides peuvent être toxiques à certaines concentrations pour les hétérothermes (Makkar et al., 2007). De plus, une étude de la toxicité aiguë et subchronique des saponines stéroïdiennes sur des rats ayant été gavés à des doses de 127,5, 255 et 510 mg/kg/jour pendant 30 jours a permis de mettre en évidence la toxicité dose-dépendante de ces composés phytostéroïdiens sur le comportement général, la mortalité et les modifications histopathologiques du foie des rats en exposition aiguë. En exposition subchronique, la dose de 510 mg/kg/jour a un effet toxique qui entraîne une augmentation de la bilirubine totale dans le sérum et diminue de manière significative la teneur en protéines dans leur foie. Les résultats du dosage du sérum des rats exposés indiquent que la diosgénine était le principal métabolite retrouvé (Qin et al., 2009). Des études impliquant

d'autres composés phytochimiques contenus dans des extraits de plantes ont été réalisées sur le clarias. Une étude de 90 jours sur l'évaluation de l'effet de la poudre d'arachide sur l'inversion sexuelle des larves de clarias fait état du fait qu'une augmentation du pourcentage d'incorporation de la poudre d'arachide à 20% dans l'aliment diminuait le taux de survie passant de 42,5% (à 10% d'incorporation) à 26,2% (Dougnon et al., 2015). Il a également été démontré que l'intégration du pollen de pin (*Pinus tabulaeformis*) dans l'alimentation des larves de Clarias et du tilapia aux mêmes fins de recherche n'affecte pas de façon significative la survie qui reste de l'ordre de 65% indépendamment du fait que les doses croissent (Adenigba et al., 2017; Nian et al., 2017). Au regard de toutes ces observations, il en ressort donc que l'utilisation des composés phytochimiques affecte le taux de survie dès lors que la dose administrée devient toxique pour les sujets exposés à des doses optimales, ils ne sont pas nocifs pour les jeunes stades de poissons tels que *Clarias gariepinus*. De façon générale dans cette étude, les taux de survie ont varié en fonction de la différence génétique interfamiliale des individus traités. Le taux de survie moyen de 37,8% obtenu dans le traitement MT à la méthyltestostérone est relativement plus bas que ceux compris entre 75,9% à 86,8% enregistrés avec l'utilisation de la même hormone à une dose de 60 mg/kg d'aliment administré pendant 28 jours dans le cadre d'une inversion sexuelle des larves de poisson chat africain (Eneukwe & Okonji, 2019). Les analyses statistiques pour la précédente étude n'ont présenté aucune différence significative entre la survie et la dose d'incorporation de la MT à l'aliment. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus (36,5%) dans une étude dans laquelle la même dose de MT a été utilisée pour l'inversion sexuelle du clarias (Adoumandjali, 2008). Ils se rapprochent également des taux de survie (34,5%) enregistré chez des juvéniles de clarias (70 JPE) exposé à 36°C à 12-14 JPE (Santi, 2016). Un traitement par immersion à la méthyltestostérone chez les larves de la même espèce à une dose de 50 µg/L présente un taux de 43,6% après 60 jours d'élevage (Marx & Sukumaran, 2011), valeur qui se rapproche beaucoup plus de la nôtre. L'administration par voie alimentaire d'une hormone analogue le propionate de testostérone à une dose similaire à la nôtre soit 50 mg/kg d'aliment chez des larves de Clarias de 5 jours élevé pendant 40 jours, donne un taux de survie de 25,4% relativement plus faible que celui que nous avons enregistré (Alam & Uddin, 1998).

IV- 2 Effets des traitements sur le poids moyen

Au regard des résultats de poids moyen obtenu à la fin de l'alimentation hormoné (J30), il semblerait que la diosgénine à la dose de 3000 mg/kg d'aliment a fortement réduit la croissance des larves de Clarias. Il existe d'ailleurs des différences très significatives entre ce traitement et l'ensemble des autres traitements ($p < 0,01$). Ce retard de croissance serait la raison

pour laquelle le même traitement à la fin de l'expérimentation, présente le poids moyen le plus faible. Toutefois, il est à noter que le traitement à la dose la plus faible de diosgénine soit 30 mg/kg d'aliment induit le poids moyen le plus élevé et diffère significativement de celui dosé à 3000 mg/kg d'aliment ($p < 0,01$). Ainsi, comme l'a souligné Paracelse en disant « Tout est poison, rien n'est poison : c'est la dose qui fait le poison ». Il semblerait que la diosgénine à forte dose affecte négativement la croissance des larves de cette espèce mais qu'à la dose de 30 mg/kg d'aliment elle l'influence positivement. En effet, les saponines sont très toxiques pour les poissons lorsqu'elles se retrouvent dans l'eau. Elles abaissent les paramètres sanguins tels que le taux d'hématocrite et de globules rouges chez plusieurs espèces de poissons (Francis et al., 2002). Cette baisse du niveau de globules rouges va donc rendre l'oxygène moins disponible ce qui pourrait entraîner un ralentissement du métabolisme qui va favoriser à la longue une baisse de la croissance. Une observation similaire faite sur la même espèce avec des phytoœstrogènes a montré qu'une augmentation des concentrations de ces composés dans des bains d'immersion entraînait au fur et à mesure une baisse de la croissance des individus exposés suggérant ainsi un niveau seuil de leur utilisation (Yilmaz et al., 2009). Il convient donc de déterminer les doses optimales auxquelles ces composés apportent des effets bénéfiques. C'est dans cet ordre d'idées que d'autres études font état du rôle des composés phytochimiques en tant que promoteur de croissance chez les poissons. Le ginseng riche en saponines, incorporé à l'alimentation d'alevins de *Oreochromis niloticus* à des doses allant de 50 à 250 mg/kg d'aliment a conduit à une amélioration significative des performances de croissance par rapport au témoin (Goda, 2008). La saponine de Quillaja un glycoside triterpénique dérivé de *Quillaja saponaria*, a été signalée comme ayant le potentiel d'augmenter la croissance des espèces de poissons d'élevage en favorisant la voie de la chaîne respiratoire améliorant ainsi la disponibilité de l'énergie d'où va résulter une augmentation de la croissance (Chakraborty et al., 2014). Les poids moyens des traitements à la diosgénine aux doses de 30 et 300 mg/kg d'aliment, respectivement de 9,3g et 7,4g se rapprochent et sont même meilleurs que ceux enregistrés (7.6 ± 0.13 g) chez des larves de *Clarias* nourries pendant 62 jours avec des aliments incorporés à un taux de 1,5% d'un mélange de poudre d'ail et de gingembre (Nyadjeu, 2020). Nos résultats sont également similaires à ceux obtenus chez des juvéniles (120 jours) de la même espèce ayant subi des traitements par immersion à des doses comprises entre 3 et 9 g/30l d'extrait de *Tribulus terrestris* pendant les 30 premiers jours de leur expérimentation. Il en ressort que les groupes traités ont présenté une meilleure croissance comparé au témoin avec des valeurs respectives de 9,2 g, 8,9 g et 13,2 g (Turan & Çek, 2007). Le principal métabolite de cette plante étant une saponine stéroïdienne (Dinchev et al., 2008) à l'instar de la diosgénine. Le traitement

à la MT compte tenu des effets anabolisants connus de cette hormone, induit le deuxième poids le plus élevé de cette expérimentation. La 17 α méthyltestostérone entraîne l'augmentation de la croissance et de la production de la biomasse de *Clarias gariepinus* (Enuekwe & Okonji, 2019). La variabilité génétique au sein des trois familles des sujets étudiés n'a pas sensiblement influencé l'effet des traitements sur le poids moyen.

IV- 3 Effets des traitements sur le sexe ratio et le taux d'inversion sexuelle

Le sexage des sujets à la fin de l'expérience nous a permis de déterminer trois types de structure gonadique à savoir un tissu gonadique male, un femelle et un autre type que l'on a classé dans une autre catégorie comme étant des femelles supposées en pleine phase de différenciation. La présence de cette catégorie d'individus peut être due au fait que les individus d'une même descendance n'ont pas la même vitesse de croissance ou encore à un effet de la diosgénine. L'analyse du sexe ratio en fonction des traitements nous a montré un sexe ratio dévié en faveur des femelles, dans les traitements à la diosgénine aux doses de 30 et 300 mg/kg d'aliment ce qui suppose qu'à ces doses cette molécule aurait une action féminisante sur le *Clarias*. En effet, c'est un phytostéroïde qui sert de précurseur à la production de corticostéroïdes, d'hormones sexuelles, de contraceptifs oraux et d'autres médicaments stéroïdiens (Raina & Misra, 2020). Son effet oestrogénique a déjà été mis en évidence par traitement concomitant avec des œstrogènes, sur des souris ovariectomisées chez qui elle a stimulée en particulier à la dose la plus élevée (40 mg/kg de poids corporel) la croissance de la glande mammaire (Accatino et al., 1998). Ce potentiel oestrogénique découlerait de sa similitude structurelle avec les œstrogènes (Chen et al., 2015). Dans une autre étude mettant en évidence son rôle sur le dysfonctionnement métabolique chez des souris, il a été démontré que la diosgénine considéré comme un précurseur de la synthèse des hormones stéroïdiennes augmentait significativement l'expression nucléaire des récepteurs Er β (Wang et al., 2015) en activant leurs activités transcriptionnelles (Wu et al., 2015). Ainsi, elle agirait donc potentiellement chez le *Clarias* en se fixant sur les récepteurs oestrogéniques et permettrait donc d'activer la voie femelle conduisant à une différenciation des génotypes males en femelles. Cependant, il a été prouvé qu'à certaines doses (20 à 200 mg/kg) chez des rats femelles immatures, la diosgénine n'exprimait pas d'activité oestrogénique (Medigović et al., 2014). Il existe donc des variations importantes quant à l'efficacité des composés phytochimiques dans les processus d'inversion sexuelle chez les poissons (Turan et al., 2021). L'évaluation de l'effet de l'administration combinée de phytoestrogènes sur la différenciation sexuelle de *Clarias gariepinus* par des traitements d'immersion de larves nouvellement écloses a donné des

proportions de femelles de 56 %, 61.5 %, et 69.8 % respectivement aux doses de 630, 750 et 1500 mg de genesis par 30 l (mélange commercial de phytoestrogène) (Yilmaz et al., 2009). Les proportions de femelles que nous avons obtenus dans les traitements à 30 et à 300 mg de diosgénine par kg d'aliment se rapprochent de ces dernières. Nos résultats s'éloignent cependant de ceux obtenus dans une étude sur l'évaluation de l'effet d'un extrait de trèfle rouge sur l'inversion sexuelle du poisson chat *Clarias gariepinus* dont l'activité oestrogénique a été prouvée comme étant principalement due aux isoflavones (formononétine, biochanine A, génistéine et daidzéine) qu'il contient (Vishali et al., 2011). Une importante déviation du sexe ratio en faveur des femelles chez le *Clarias* a été observée après un traitement par immersion à des concentrations croissantes de cet extrait (25 mg/l à 75 mg/l) allant jusqu'à 89% de femelles enregistrées à 50 mg/l (Turan et al., 2021).

Le traitement D3000 correspondant à la dose de 3000 mg de diosgénine par kg d'aliment a présenté un taux d'inversion de 14,3% correspondant à une masculinisation. Bien que ce taux soit relativement faible, on observe tout de même une déviation significative ($p < 0,01$) du sexe ratio en faveur des mâles comparé au control. Il semblerait donc que cette forte dose ait eu un effet masculinisant chez les sujets étudiés ceci serait due au fait que les composés phytochimiques les saponines stéroïdiennes incluses, peuvent réduire la production d'œstrogènes en inhibant l'activité de l'aromatase et entraîner une masculinisation des femelles génotypiques. Ils peuvent également entrer en compétition avec les œstrogènes endogènes pour les sites de liaison au récepteur des œstrogènes et supprimer la biosynthèse des œstrogènes (Golan et al., 2008). Chez des alevins de tilapia, (6 JPE) des saponines stéroïdiennes (l'une dérivant du Fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) et l'autre de *Quillaja saponaria*) ont eu comme effet d'influencer le sexe ratio en augmentant la proportion de mâles dans les lots traités allant jusqu'à 82% (Stadtlander et al., 2008). Nos résultats sont très différents de ces derniers avec un taux de masculinisation et des proportions de mâles relativement plus faibles. Les graines de fenugrec étant pourtant riches en saponines stéroïdiennes et en particulier la diosgénine (Petropoulos, 2002; Abaho et al., 2021). Il se pourrait donc que cette importante action masculinisante de l'extrait de Fenugrec qui a été observée chez le tilapia ait été due à une action combinée de plusieurs molécules phytochimiques contenues dans cette plante et non pas à la seule action de la diosgénine ce qui justifierait cette différence notable entre nos résultats et ces derniers. Un sexe ratio de plus de 65% de mâles, proportion qui différait significativement du témoin a également été observé chez les alevins de tilapia nourris avec un aliment incorporé à 700 mg/kg d'extrait de saponines de *Quillaja* (Francis et al., 2002). La diosgénine pourrait donc en fonction des doses, jouer à la fois le rôle d'agent masculinisant ou

féminisant. En effet, il a été montré que certains composés reconnus comme phytoestrogènes tel que la diadzéine peuvent créer des effets androgéniques (Chen & Chang, 2007). La daidzéine et la génistéine, principaux composés actifs de *Butea superba* considérés comme des phytoestrogènes ont permis d'obtenir des proportions de mâles de l'ordre de 72% chez des larves de tilapia nourries avec un aliment incorporé à 300 g de cet extrait de plante par kg d'aliment (Mengumphan et al., 2006).

D'une façon générale au sein des trois familles, une variation des réponses aux différents traitements est notable. Les familles 2 et 3 ont semblées plus sensibles aux effets de la diosgénine avec une augmentation marquée des proportions de femelles dans les traitements D30 et D300 suggérant un effet féminisant de la molécule et une masculinisation significative des individus dans les traitements D3000 de ces familles. Les différences significatives entre le sexe ratio des contrôles et ceux de ces traitements soutiennent ces dernières hypothèses. Le traitement à la 17 α méthyltestostérone n'a quant à lui présenté aucune variation dans les réponses des individus au sein des familles. Dans toutes les familles, on a noté une proportion de 98% de mâles qui différait très significativement de celle de tous les contrôles ($p < 0,001$). En effet, la 17 α méthyltestostérone est un androgène puissant dont la liaison aux récepteurs androgéniques est beaucoup plus forte que celle des androgènes naturels endogènes (Fitzpatrick et al., 1994). Ainsi, les propriétés d'inversion sexuelle de cette molécule synthétique semblent être due à une suppression de l'expression de l'aromatase et/ou à sa liaison forte avec les récepteurs androgéniques (Mor et al., 2001; Golan & Levavi-Sivan, 2014). Le taux d'inversion de 95,9% que nous avons enregistré pour ce traitement est relativement supérieure à celui de 72,22% obtenus dans une étude sur l'inversion du *Clarias* élevés dans des systèmes stagnants en béton et nourris avec un aliment incorporé à 50 mg/kg de MT (Robert, 2019). Nos pourcentages de mâles (98%) sont également supérieurs à celui obtenu de 81.9 % obtenu chez des individus traités pendant 35 jours à des doses de 60 mg/kg d'aliment (Enuekwe & Okonji, 2019).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'évaluation de l'effet d'une sapogénine de type phytostéroïde sur les performances de croissance et l'inversion sexuelle chez *Clarias gariepinus* nous a permis de constater que la diosgénine peut avoir une double action à la fois androgénique et oestrogénique. Elle a agi comme un phytoandrogène à la dose de 3000 mg/kg d'aliment en entraînant une déviation significative du sexe ratio en faveur des mâles. Toutefois à cette dose, la croissance a été fortement réduite et des mortalités massives ont été enregistrées réduisant ainsi considérablement le taux de survie. La diosgénine a également agi comme un agent féminisant aux doses de 30 et de 300 mg/kg d'aliment en faisant significativement dévier le sexe ratio en faveur des femelles. Il semble qu'à la dose de 30 mg/kg d'aliment, ce phytostéroïde a agi comme un promoteur de croissance car ce traitement a affiché le poids moyen le plus élevé. La différence génétique entre les individus des familles a conduit à une variabilité des réponses aux effets de cette molécule.

L'implication de la diosgénine dans les processus d'inversion sexuelle chez le Clarias ayant été démontré dans cette étude, il serait intéressant dans des études ultérieures d'affiner les gammes des doses d'incorporation de cette molécule aux aliments, pour pouvoir déterminer les doses optimales qui permettent une féminisation effective des sujets et celles qui vont augmenter le taux de masculinisation tout en réduisant la mortalité. L'application de cette molécule à d'autres espèces permettrait d'augmenter les connaissances sur son potentiel d'action dans les processus d'inversion sexuelle chez les poissons. Si son efficacité dans ces processus est avérée et que son prix est raisonnable, cette molécule pourrait être intéressante dans le cadre du contrôle du sexe en aquaculture d'autant plus que son caractère naturel la rend beaucoup plus respectueuse de l'environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abaho, I., Masembe, C., Akoll, P., & Jones, C. L. W. (2021). The use of plant extracts to control tilapia reproduction: Current status and future perspectives. *Journal of the World Aquaculture Society*, 53(3), 593–619. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jwas.12863>
- Accatino, L., Pizarro, M., Solís, N., & Koenig, C. S. (1998). Effects of diosgenin, a plant-derived steroid, on bile secretion and hepatocellular cholestasis induced by estrogens in the rat. *Hepatology*, 28(1), 129–140. <https://doi.org/10.1002/hep.510280118>
- Adenigba, I., Tumbokon, B. L. M., & Serrano, A. J. (2017). Androgenic and Anabolic Effects of *Pinus tabulaeformis* Carr. Pollen in *Clarias gariepinus*. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgheh*, 69(1). <https://doi.org/10.46989/001c.21053>
- Adoumandjali, G. (2008). *Etude de l'effet d'inversions hormonales masculinisantes (via l'alimentation) courtes et de flash thermiques sur le sexe ratio des juvéniles de poisson-chat africain Clarias gariepinus*. Université de Liège.
- Ahmed, Y. M., Adedeji, T. A., & Sogbesan, O. A. (2015). Sex Reversal and Growth Performances in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Fry Fed Dietary Genistein under Laboratory Conditions. *J. Agric. Food. Tech*, 5(5), 1–4. www.textroad.com
- Alam, M. S., & Uddin, M. Z. (1998). Effects of testosterone propionate on growth , survival and sex-ratio of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell). *Bangladesh Journal of Fisheries Research*, 2(1), 31–39.
- Almin, M. R. (2015). *Etude des mécanismes induits par de fortes températures stérilisantes chez un poisson tropical, le tilapia du Nil, #Oreochromis niloticus#*. Université François Rabelais.
- Atz, J. W. (1964). Intersexuality in fishes. *Intersexuality in Vertebrates Including Man*, 145–232.
- Bachtrog, D., Mank, J. E., Peichel, C. L., Kirkpatrick, M., Otto, S. P., Ashman, T. L., Hahn, M. W., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R., Perrin, N., Ross, L., Valenzuela, N., Vamosi, J. C., Peichel, C. L., Ashman, T. L., Blackmon, H., Goldberg, E. E., Hahn, M. W., ... Vamosi, J. C. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biology*, 12(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001899>

Baroiller, J. F., & Clota, F. (1997). *Interactions between temperature effects and genotype on #Oreochromis niloticus# sex determination* (I. S. on the B. of V. S. Determination, C. de C. I. en R. A. pour le Développement, & I. national de la recherche Agronomique (eds.)).

Baroiller, J-F, Guiguen, Y., & Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(6), 910–931. <https://doi.org/10.1007/s000180050344>

Baroiller, J. F., & D’Cotta, H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4), 399–409. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00267-8)

Baroiller, J.-F., & D’Cotta, H. (2016). The Reversible Sex of Gonochoristic Fish: Insights and Consequences. *Sexual Development*, 10(5–6), 242–266. <https://doi.org/10.1159/000452362>

Bezault, E., Clota, F., Derivaz, M., Chevassus, B., & Baroiller, J.-F. (2007). Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture*, 272, S3–S16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.227>

Bogart, M. H. (1987). Sex determination: A hypothesis based on steroid ratios. *Journal of Theoretical Biology*, 128(3), 349–357. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(87\)80077-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5193(87)80077-2)

Breton, T. S., Kenter, L. W., Greenlaw, K., Montgomery, J., Goetz, G. W., Berlinsky, D. L., & Luckenbach, J. A. (2019). Initiation of sex change and gonadal gene expression in black sea bass (*Centropristis striata*) exposed to exemestane, an aromatase inhibitor. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 228(September 2018), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.024>

Brown, E. E., Baumann, H., & Conover, D. O. (2014). Temperature and photoperiod effects on sex determination in a fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 461, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.07.009>

Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. Lavoisier.

Budd, A. M., Banh, Q. Q., Domingos, J. A., & Jerry, D. R. (2015). Sex Control in Fish: Approaches, Challenges and Opportunities for Aquaculture. *Journal of Marine Science and Engineering*, 3(2), 329–355. <https://doi.org/10.3390/jmse3020329>

- Carito, V., Ceccanti, M., Tarani, L., Ferraguti, G., N Chaldakov, G., & Fiore, M. (2016). Neurotrophins' modulation by olive polyphenols. *Current Medicinal Chemistry*, 23(28), 3189–3197.
- Chakraborty, S., & Hancz, C. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture*, 3. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x>
- Chakraborty, S. B., Horn, P., & Hancz, C. (2014). Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 6(1), 1–19. <https://doi.org/10.1111/raq.12021>
- Chakraborty, S., Horn, P., & Hancz, C. (2014). Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 6, 1–19.
- Chen, J.-J., & Chang, H.-C. (2007). By modulating androgen receptor coactivators, daidzein may act as a phytoandrogen. *The Prostate*, 67(5), 457–462. <https://doi.org/10.1002/pros.20470>
- Chen, Y., Tang, Y. M., Yu, S. L., Han, Y. W., Kou, J. P., Liu, B. L., & Yu, B. Y. (2015). Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(8), 578–587. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30053-4](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30053-4)
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7>
- Corona-Herrera, G. A., Arranz, S. E., Martínez-Palacios, C. A., Navarrete-Ramírez, P., Toledo-Cuevas, E. M., Valdez-Alarcón, J. J., & Martínez-Chávez, C. C. (2018). Experimental evidence of masculinization by continuous illumination in a temperature sex determination teleost (Atherinopsidae) model: is oxidative stress involved? *Journal of Fish Biology*, 93(2), 229–237. <https://doi.org/10.1111/jfb.13651>
- Davey, A. J. H., & Jellyman, D. J. (2005). Sex determination in freshwater eels and management options for manipulation of sex. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1–2), 37–52. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7431-x>
- Demir, E. (2019). *Le pavot de Californie (Eschscholtzia californica cham.) : caractéristiques, propriétés et utilisations d'une plante médicinale. Sciences pharmaceutiques. (hal-03297912).*

- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish : an overview of genetic , physiological , and environmental influences. *Aquaculture*, 208 (3-4), 191–364.
- Dinchev, D., Janda, B., Evstatieva, L., Oleszek, W., Aslani, M. R., & Kostova, I. (2008). Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. *Phytochemistry*, 69(1), 176–186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.003>
- Dougnon, J. T., Elie, M., & Messanvi, G. (2015). Effect of peanut powder (*Arachis hypogaea* L 1753) on zootechnic parameters and sex inversion in catfish *clarias gariepinus*. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(1), 78–86.
- Egwenomhe, M., Aliu, B. S., & Lawrence, E. (2017). Survival and Growth Rate of *Clarias gariepinus* Larvae Fed with *Artemia salina* and Inert Diet. *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)*, 4(1), 9–13. <https://irjet.net/archives/V4/i1/IRJET-V4I102.pdf>
- Eng, E. T., Williams, D., Mandava, U., Kirma, N., Tekmal, R. R., & Chen, S. (2001). Suppression of aromatase (estrogen synthetase) by red wine phytochemicals. *Breast Cancer Research and Treatment*, 67(2), 133–146.
- Enuekwe, R.C., & Okonji, V. A. (2019). Effects of dietary 17 -methyl testosterone on sex reversal and growth performance of african mud catfish (*Clarias gariepinus*). *Nigerian Journal of Fisheries*, 16(2).
- Fermon, Y. (2011). *La pisciculture de subsistance en étangs en Afrique: Manuel technique* ACF-International Network. 274.
- Fernandino, J. I., Hattori, R. S., Moreno Acosta, O. D., Strüssmann, C. A., & Somoza, G. M. (2013). Environmental stress-induced testis differentiation: Androgen as a by-product of cortisol inactivation. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.024>
- Fitzpatrick, M. S., Gale, W. L., & Schreck, C. B. (1994). Binding characteristics of an androgen receptor in the ovaries of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, 95(3), 399–408.

- Fontaine, R. (2014). *Etude du système dopaminergique inhibiteur de la fonction gonadotrope chez le poisson-zèbre*. <http://www.theses.fr/2014PA11T104/document>
- Francis, G., Levavi-Sivan, B., Avitan, A., & Becker, K. (2002). Effects of long term feeding of Quillaja saponins on sex ratio, muscle and serum cholesterol and LH levels in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(4), 593–603.
- Francis, G., Makkar, H., & Becker, K. (2001). Effects of Quillaja saponins on growth, metabolism, egg production and muscle cholesterol in individually reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 129(2), 105–114.
- Francis, R. C., & Barlow, G. W. (1993). Social control of primary sex differentiation in the Midas cichlid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(22), 10673–10675. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10673>
- Gennotte, G., Lemahieu, F., Rougeot, C., Nadzalie, S., & Melard, C. (2008). *Preliminary study of aromatase expression and sexual steroids level in different sexual phenotype / genotype combinations of Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. June, 2008.
- Gennotte, V. (2014). *Biologie de la reproduction et analyse du déterminisme et de la différenciation du sexe à des stades précoces chez le tilapia du Nil, Oreochromis niloticus*. <https://doi.org/https://hdl.handle.net/2268/171579>
- Gennotte, V., Mafwila Kinkela, P., Ulysse, B., Akian Djétouan, D., Bere Sompagnimdi, F., Tomson, T., Mélard, C., & Rougeot, C. (2015). Brief exposure of embryos to steroids or aromatase inhibitor induces sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 323(1), 31–38. <https://doi.org/10.1002/jez.1893>
- Géoffroy, E. O., Cloud, H. L., & Bienvenu, G. A. (2019). *Synthèse Bibliographique sur des Paramètres Biologiques et Zootechniques du Poisson-chat Africain Clarias gariepinus Burchell, 1822*.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162–169.

Goda, A. (2008). Effect of Dietary Ginseng Herb (Ginsana® G115) Supplementation on Growth, Feed Utilization, and Hematological Indices of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), Fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39, 205–214. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00153.x>

Godwin, J., Luckenbach, J., & Borski, R. (2003). Ecology meets endocrinology: Environmental sex determination in fishes. *Evolution & Development*, 5, 40–49. <https://doi.org/10.1046/j.1525-142X.2003.03007.x>

Godwin, J. (2010). Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(2), 203–216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.02.002>

Golan, M., Avitan, A., Qutob, M., Dweik, H., Abu-Lafi, S., Focken, U., Francis, G., Becker, K., Kerem, Z., & Levavi-Sivan, B. (2008). Quillaja saponins inhibit tilapia aromatase activity in vitro. *Cybium*, 32(2), 80–82.

Golan, M., & Levavi-Sivan, B. (2014). Artificial masculinization in tilapia involves androgen receptor activation. *General and Comparative Endocrinology*, 207, 50–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.04.026>

Guerrero-Estévez, S., & Moreno-Mendoza, N. (2010). Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20(1), 101–121.

Guerrero-Estévez, Sandra, & Moreno-Mendoza, N. (2010). Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20(1), 101–121. <https://doi.org/10.1007/s11160-009-9123-4>

Guerrero-Estévez, Sandra, & Moreno-Mendoza, N. (2012). Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *Journal of Fish Biology*, 80(3), 572–594. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03196.x>

Guerrero III, R. D., & Shelton, W. L. (1974). An aceto-carmine squash method for sexing juvenile fishes. *The Progressive Fish-Culturist*, 36(1), 56.

Guerrero, R. D. (1975). Use of Androgens for the Production of All-Male *Tilapia aurea* (Steindachner). *Transactions of the American Fisheries Society*, 104(2), 342–348. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1975\)104<342:UOAFTP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1975)104<342:UOAFTP>2.0.CO;2)

Guiguen, Y. (2015). Les déterminismes génétiques et environnementaux du sexe chez les poissons. *Colloque Co-Organisée Par l'Académie Des Sciences et l'Académie d'Agriculture de France*, np.

Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., & Chang, C. F. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 352–366. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2009.03.002>

He, Z., Tian, Y., Zhang, X., Bing, B., Zhang, L., Wang, H., & Zhao, W. (2012). Anti-tumour and immunomodulating activities of diosgenin, a naturally occurring steroidal saponin. *Natural Product Research*, *26*(23), 2243–2246. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.648192>

Hecht, T., Oellermann, L., & Verheust, L. (1996). Perspectives on clariid catfish culture in Africa. *Aquatic Living Resources*, *9*(S1), 197–206.

Heule, C., Salzburger, W., & Böhne, A. (2014). Genetics of sexual development: an evolutionary playground for fish. *Genetics*, *196*(3), 579–591.

Hulse, J. H. (1980). *Polyphenols in cereals and legumes: proceedings of a Symposium*. IDRC, Ottawa, ON, CA.

Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D. S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., Nakamura, M., & Nagahama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction*, *78*(2), 333–341. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064246>

Ji, S.-C., Takaoka, O., Lee, S.-W., Hwang, J.-H., Kim, Y.-S., Ishimaru, K., Seoka, M., Jeong, G.-S., & Takii, K. (2009). Effect of dietary medicinal herbs on lipid metabolism and stress recovery in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, *75*(3), 665–672.

Jiang, Y., Luo, H., Hou, M., Chen, J., Tao, B., Zhu, Z., Song, Y., & Hu, W. (2022). Aromatase inhibitor induces sex reversal in the protogynous hermaphroditic rice field eel (*Monopterus albus*). *Aquaculture*, *551*(7), 737960. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737960>

Komen, J., Yamashita, M., & Nagahama, Y. (1992). Testicular Development Induced by a Recessive Mutation during Gonadal Differentiation of Female Common Carp (*Cyprinus carpio*, L.) (sex determination/germ cells/testes/common carp/teleost). *Development, Growth & Differentiation*, *34*(5), 535–544.

- Krief, S. (2003). *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. (tel-00006170).*
- Krueger, W. H., & Oliveira, K. (1999). Evidence for Environmental Sex Determination in the American eel, *Anguilla rostrata*. *Environmental Biology of Fishes*, 55(4), 381–389. <https://doi.org/10.1023/A:1007575600789>
- Leet, J. K., Gall, H. E., & Sepúlveda, M. S. (2011). A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. *Journal of Applied Toxicology*, 31(5), 379–398. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jat.1682>
- Lévêque, C., Paugy, D., & Teugels, G. G. (1990). *Faune des poissons d'eaux douces et saumâtres de l'Afrique de l'Ouest= The fresh and brackish water fishes of West Africa: Tome 1.*
- Li, X. Y., Mei, J., Ge, C. T., Liu, X. L., & Gui, J. F. (2022). Sex determination mechanisms and sex control approaches in aquaculture animals. *Science China Life Sciences*, 65(6), 1091–1122. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-2075-x>
- Maack, G., & Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology*, 62(4), 895–906. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00074.x>
- Makkar, H. P. S., Francis, G., & Becker, K. (2007). Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal*, 1(9), 1371–1391.
- Malecky, M. (2008). *Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins.* <http://www.theses.fr/2008AGPT0032/document>
- Mank, J. E., & Avise, J. C. (2009). Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. *Sexual Development*, 3(2–3), 60–67.
- Mansour, A. T., Omar, E. A., Srour, T. M., & Yousef, M. I. (2018). Effect of three natural phytochemicals supplementation on growth performance, testosterone level and feed utilization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 408–415. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/anu.12572>

- Marimuthu, K., Cheen, A. C., Muralikrishnan, S., & Kumar, D. (2010). Effect of different feeding frequency on the growth and survival of African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings. *Advances in Environmental Biology*, 4(2), 187 – 193. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-78049297037&partnerID=40&md5=4a30c4e55aa98b7dbb2bdac5c8c3fd47>
- Marouf, A., & Reynaud, J. (2007). *La botanique de A à Z: 1 662 définitions*. Dunod.
- Marx, K. K., & Sukumaran, N. (2011). Effect of 17 [alpha]-Methyltestosterone on the sex reversal of African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 26(1/2), 13.
- Matsuda, M. (2005). Sex Determination in the Teleost Medaka, *Oryzias latipes*. *Annual Review of Genetics*, 39(1), 293–307. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.110304.095800>
- Medigović, I. M., Ristić, N., Živanović, J., oić-Jurjević, B., Filipović, B., Miloević, V., & Nestorović, N. (2014). Diosgenin does not express estrogenic activity: a uterotrophic assay. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 92 4, 292–298.
- Mei, J., & Gui, J.-F. (2015). Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish. *Science China Life Sciences*, 58(2), 124–136.
- Mengumphan, K., Samitasiri, Y., & Carandang, JR, R. (2006). The Potential of Red Kwao Kreua (*Butea superba*) in Inducing Sex Reversal on Three Strains (Red, Ghana, Chitralada) of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) and the Effect of 17- α -Methyltestosterone (MT). *Asian Fisheries Science*, 19(3), 271–279. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2006.19.3.007>
- Miyahara, M., Ishibashi, H., Inudo, M., Nishijima, H., Iguchi, T., Guillette Jr, L. J., & Arizono, K. (2003). Estrogenic activity of a diet to estrogen receptors-a and-b in an experimental animal. *Journal of Health Science*, 49(6), 481–491.
- Mlalila, N., Mahika, C., Kalombo, L., Swai, H., & Hilonga, A. (2015). Human food safety and environmental hazards associated with the use of methyltestosterone and other steroids in production of all-male tilapia. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7), 4922–4931. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4133-3>
- Mor, G., Eliza, M., Song, J., Wiita, B., Chen, S., & Naftolin, F. (2001). 17 α -Methyl testosterone is a competitive inhibitor of aromatase activity in Jar choriocarcinoma cells and macrophage-like THP-1 cells in culture. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 79(1–5), 239–246. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00162-5](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00162-5)

- Muntaziana, A., Amin, S. M. N., Kamarudin, M. S., Abd Rahim, A., & Romano, N. (2017). Feeding frequency influences the survival, growth and body lipid content of striped snakehead, *Channa striatus* (Bloch) fry. *Aquaculture Research*, 48, 2602–2606. <https://doi.org/10.1111/are.13001>
- Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2012). Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, 191(1), 163–170.
- Nakamura, M. (2010). The mechanism of sex determination in vertebrates—are sex steroids the key-factor? *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 313(7), 381–398.
- Nakamura, M., Bhandari, R. K., & Higa, M. (2003). The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1), 113–117. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030495.99487.17>
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X., & Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 362–372.
- Namsi, A., Yammine, A., Nury, T., Vervandier-Fasseur, D., Zarrouk, A., Masmoudi-Kouki, O., Latruffe, N., & Lizard, G. (2019). Induction de la différenciation neuronale par deux polyphénols présents dans le régime méditerranéen: le resvératrol et l'apigénine. *Territoires Du Vin*, 10.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., & Shima, A. (2002). A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11778–11783.
- Ndakalimwe, G., Qiang, J., Ma, X., He, J., Xu, P., & Omoregie, E. (2017). Sex-Reversal Effect of Dietary Aloe vera (Liliaceae) on Genetically Improved Farmed Nile Tilapia Fry. *North American Journal of Aquaculture*, 79, 100–105. <https://doi.org/10.1080/15222055.2016.1236046>
- Ngene, J. P., Ngoule, C. C., Kidik, C. M. P., Ottou, P. B. M., Dibong, S. D., & Mpondo, E. M. (2015). Importance dans la pharmacopée traditionnelle des plantes à flavonoïdes vendues dans les marchés de Douala est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 88, 8194–8210.

Nian, C. T., Tumbokon, B. L. M., & Serrano, A. E. (2017). Pinus Tabulaeformis pollen as replacement for 17-alpha-methyltestosterone in the diet of Oreochromis Niloticus larvae for sex reversal and growth. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 69. <https://doi.org/10.46989/001c.21042>

Nivelle, R. (2021). *Interactions génétiques et environnementales impliquées dans la détermination précoce du sexe chez un modèle de téléostéen: épigénétique, héritabilité et adaptation.*

Nkwokap, B. G. (2010). *Isolement et caractérisation des saponosides de trois plantes de la famille des araliaceae et dracaenaceae et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales .To cite this version : HAL Id : tel-00841944 E5B89631.*

Nyadjeu, P. (2020). Growth Performance, Feed Utilization And Survival Of Clarias Gariepinus Post-Larvae Fed With A Dietary Supplementation Of Zingiber Officinale-Allium Sativum Mixture. *Aquaculture & Fisheries*, 4(1), 1–10. <https://doi.org/10.24966/aaf-5523/100028>

Okomoda, V. T., Aminem, W., Hassan, A., & Martins, C. O. (2019). Effects of feeding frequency on fry and fingerlings of African catfish Clarias gariepinus. *Aquaculture*, 511, 734232. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.734232>

Oldfield, R. G., McCrary, J. K., & Mckaye, K. R. (2006). *Habitat Use, Social Behavior, and Female and Male Size Distributions of Juvenile Midas Cichlids, Amphilophus cf. citrinellus, in Lake Apoyo, Nicaragua.*

Ong, S. K., Chotisukarn, P., & Limpiyakorn, T. (2012). Sorption of 17 α -Methyltestosterone onto Soils and Sediment. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(7), 3869–3875. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1155-z>

Ospina-Álvarez, N., & Piferrer, F. (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: Prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS ONE*, 3(7), 2–4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002837>

Othman, R., Ron, X. J., Yao, H., O'Bryant, P., Rapp, D., Pei, J. C., Wu, H. J., & Wang, H. P. (2022). The effect of methyltestosterone (MT) on sex differentiation and growth in juvenile yellow perch (Perca flavescens). *Fish Physiology and Biochemistry*, 48(1), 161–171. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-01038-0>

- Pandian, T. J., & Koteeswaran, R. (1999). Lability of sex differentiation in fish. *Current Science*, 76(4), 580–583. <http://www.jstor.org/stable/24100762>
- Pandian, T. J., & Sheela, S. G. (1995). Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138(1–4), 1–22. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01075-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01075-0)
- Parama, D., Boruah, M., Yachna, K., Rana, V., Banik, K., Harsha, C., Thakur, K. K., Dutta, U., Arya, A., Mao, X., Ahn, K. S., & Kunnumakkara, A. B. (2020). Diosgenin, a steroidal saponin, and its analogs: Effective therapies against different chronic diseases. *Life Sciences*, 260, 118182. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118182>
- Penman, D. J., & Piferrer, F. (2008). Fish gonadogenesis. part I: Genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Reviews in Fisheries Science*, 16(SUPPL.1), 14–32. <https://doi.org/10.1080/10641260802324610>
- Petropoulos, G. A. (2002). *Fenugreek: the genus Trigonella*. CRC Press.
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197(1–4), 229–281.
- Piferrer, F., & Donaldson, E. M. (1989). Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*, 77(2–3), 251–262.
- Piferrer, F., & Guiguen, Y. (2008). Fish Gonadogenesis. Part II: Molecular Biology and Genomics of Sex Differentiation. *Reviews in Fisheries Science*, 16(sup1), 35–55. <https://doi.org/10.1080/10641260802324644>
- Poonlaphdecha, S., Pepey, E., Canonne, M., de Verdal, H., Baroiller, J. F., & D’Cotta, H. (2013). Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions. *General and Comparative Endocrinology*, 193, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.007>
- Price, D. J. (1984). Genetics of sex determination in fishes—a brief review. *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*, 77–89.
- Pruszyński, T. (2003). Effects of feeding on ammonium excretion and growth of the African catfish (*Clarias gariepinus*) fry. *Czech Journal of Animal Science*, 48(3), 106–112.

- Qin, Y., Wu, X., Huang, W., Gong, G., Li, D., He, Y., & Zhao, Y. (2009). Acute toxicity and sub-chronic toxicity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, *126*(3), 543–550. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2009.08.047>
- Raghuveer, K., & Senthilkumaran, B. (2010). Isolation of sox9 duplicates in catfish: localization, differential expression pattern during gonadal development and recrudescence, and hCG-induced up-regulation of sox9 in testicular slices. *Reproduction (Cambridge, England)*, *140*(3), 477–487. <https://doi.org/10.1530/rep-10-0200>
- Raghuveer, K., Senthilkumaran, B., Sudhakumari, C. C., Sridevi, P., Rajakumar, A., Singh, R., Muruganankumar, R., & Majumdar, K. C. (2011). Dimorphic Expression of Various Transcription Factor and Steroidogenic Enzyme Genes during Gonadal Ontogeny in the Air-Breathing Catfish, *Clarias gariepinus*. *Sexual Development*, *5*(4), 213–223. <https://doi.org/10.1159/000328823>
- Raina, A. P., & Misra, R. C. (2020). Evaluation of diosgenin, a bioactive compound from natural source of *Dioscorea* species: A wild edible tuber plant. ~ 1120 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *9*(1), 1120–1124.
- Rasheeda, M. K., Sridevi, P., & Senthilkumaran, B. (2010). Cytochrome P450 aromatases: Impact on gonadal development, recrudescence and effect of hCG in the catfish, *Clarias gariepinus*. *General and Comparative Endocrinology*, *167*(2), 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.03.009>
- Richter, C. J. J. (1976). The African catfish, *Clarias lazera* (C. & V.), a new possibility for fish culture in tropical regions. *Aspects of Fish Culture and Fish Breeding. Misc Pap Landbouwhogeschool, Wageningen (Netherlands)*, *13*, 51–71.
- Rivero-Wendt, C. L. G., Miranda-Vilela, A. L., Ferreira, M. F., & Borges, A. M. (2013). Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Genetics and Molecular Research : GMR*, *12*, 3862–3870. <https://doi.org/10.4238/2013.September.23.4>
- Robert, E. A. (2019). Observations of the effects of 17 α -methyltestosterone (mt) on the gonads, testes of *clarias gariepinus* broodstocks after hormone-treated feeding trial. *Scientific Research Journal*, *9*(10), 51–59. <https://doi.org/10.31364/scirj/v9.i10.2021.p1021888>

- Rodrigo Zhouri, C. e S., Alvarenga, É. R., Matta, S. V., Alves, G. F. de O., Manduca, L. G., Silva, M. A., Yoshinaga, T. T., Fernandes, A. F. A., & Turra, E. M. (2022). Masculinization protocol for Nile tilapia (*O. niloticus*) in Biofloc technology using 17- α -methyltestosterone in the diet. *Aquaculture*, 547(May 2021). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737470>
- Römer, U., & Beisenherz, W. (1996). Environmental determination of sex in *Apistogrammai* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology*, 48, 714–725.
- Rougeot, C., Krim, A., Mandiki, S. N. M., Kestemont, P., & Méléard, C. (2007). Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Theriogenology*, 67(5), 1046–1052. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.006>
- Rougeot, Carole, Jacobs, B., Kestemont, P., & Melard, C. (2002). Sex control and sex determinism study in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, by use of hormonally sex-reversed male breeders. *Aquaculture*, 211(1–4), 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00893-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00893-6)
- Rubin, D. A. (1985). Effect of ph on Sex Ratio in Cichlids and a Poecilliid (Teleostei). *Copeia*, 1985(1), 233–235. <https://doi.org/10.2307/1444818>
- Ruksana, S., Pandit, N. P., & Nakamura, M. (2010). Efficacy of exemestane, a new generation of aromatase inhibitor, on sex differentiation in a gonochoristic fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 152(1), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.02.014>
- Santi, S. (2017). *Analyse de l'effet de la température et du préférendum thermique sur les mécanismes du déterminisme sexuel et de la différenciation gonadique chez le poisson-chat Africain, Clarias gariepinus*.
- Santi, S., Gennotte, V., Toguyeni, A., Méléard, C., Antoine, N., & Rougeot, C. (2016). Thermosensitivity of the sex differentiation process in the African catfish, *Clarias gariepinus*: Determination of the thermosensitive period. *Aquaculture*, 455, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.009>
- Sarre, S. D., Georges, A., & Quinn, A. (2004). The ends of a continuum: Genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays*, 26(6), 639–645. <https://doi.org/10.1002/bies.20050>
- Shang, E. H. ., & Wu, R. . S. S. (2004). Aquatic Hypoxia Is a Teratogen and Affects Fish Embryonic Development. *Environmental Science & Technology*, 38(18), 4763–4767. <https://doi.org/10.1021/es0496423>

- Shang, E. H., Yu, R. M. K., & Wu, R. S. S. (2006). Hypoxia Affects Sex Differentiation and Development, Leading to a Male-Dominated Population in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, *40*(9), 3118–3122. <https://doi.org/10.1021/es0522579>
- Shao, C., Li, Q., Chen, S., Zhang, P., Lian, J., Hu, Q., Sun, B., Jin, L., Liu, S., Wang, Z., Zhao, H., Jin, Z., Liang, Z., Li, Y., Zheng, Q., Zhang, Y., Wang, J., & Zhang, G. (2014). Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish. *Genome Research*, *24*(4), 604–615. <https://doi.org/10.1101/gr.162172.113>
- Soualeh, N., & Soulimani, R. (2016). Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*, *14*(1), 44–57.
- Stadtlander, T., Focken, U., Levavi-Sivan, B., Dweik, H., Qutob, M., Abu-Lafi, S., Kerem, Z., & Becker, K. (2008). Treatment with saponins from *Trigonella foenum-graecum* and *Quillaja saponaria* influences sex ratio in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae. *8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008, November*, 355–364. <http://ag.arizona.edu/azaqua/ista/ISTA8/ProceedingsISTA8.htm>
- Steele, R. E., Mellor, L. B., Sawyer, W. K., Wasvary, J. M., & Browne, L. J. (1987). In vitro and in vivo studies demonstrating potent and selective estrogen inhibition with the nonsteroidal aromatase inhibitor CGS 16949A. *Steroids*, *50*(1), 147–161. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0039-128X\(83\)90068-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0039-128X(83)90068-5)
- Strüssmann, C. A., Karube, M., Miranda, L. A., Patiño, R., Somoza, G. M., Uchida, D., & Yamashita, M. (2005). Methods of sex control in fishes and an overview of novel hypotheses concerning the mechanisms of sex differentiation. *Fish Genetics and Aquaculture Biotechnology*, 65–79.
- Strüssmann, C., & Nakamura, M. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, *26*(1), 13–29.
- Subramoniam, T. (2013). Origin and occurrence of sexual and mating systems in Crustacea: A progression towards communal living and eusociality. *Journal of Biosciences*, *38*(5), 951–969. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9392-x>
- Tangara, D., Diop, A., Tirera, H., & Yaranga, B. (2022). Plante médicinale sénégalaise : dosage des compositions nutritionnelles et caractérisation des phytochimiques de *Borreria verticillata*. *J. Appl. Biosci*, *172*, 17871–17880.

Tapondjou, L. A., Ponou, K. B., Teponno, R. B., Mbiantcha, M., Djoukeng, J. D., Nguenefack, T. B., Watcho, P., Cadenas, A. G., & Park, H.-J. (2008). In vivo anti-inflammatory effect of a new steroidal saponin, mannioside A, and its derivatives isolated from *Dracaena mannii*. *Archives of Pharmacal Research*, *31*(5), 653–658.

Tarigan, R. V. B. R., Nasution, M. P., & Widjaja, S. R. Y. S. (2017). The Activities of Antifertility Ethanol Extract Guava Leaves (*Psidium Guajava* L.) based on The Analysis Of Cement and Display of Immunohistochemistry Cyclooxygenase-2 In Testis Of Mice (*Mus Musculus* L.). *JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA*, *14*(2), 219–225.

Tenugu, S., & Senthilkumaran, B. (2022). Sexual plasticity in bony fishes: Analyzing morphological to molecular changes of sex reversal. *Aquaculture and Fisheries*, December 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2022.02.007>

Teugels, G. G. (1986). A systematic revision of the African species of the genus *Clarias* (Pisces; Clariidae). *Annales-Musee Royal de l'Afrique Centrale. Sciences Zoologiques (Belgium)*.

Tokarz, J., Möller, G., Hrabě de Angelis, M., & Adamski, J. (2015). Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids*, *103*, 123–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.06.011>

Tran, Q. Le, Tezuka, Y., Banskota, A. H., Tran, Q. K., Saiki, I., & Kadota, S. (2001). New Spirostanol Steroids and Steroidal Saponins from Roots and Rhizomes of *Dracaena angustifolia* and Their Antiproliferative Activity. *Journal of Natural Products*, *64*(9), 1127–1132.

Turan, F., & Akyurt, I. (2005). Effects of androstenedione, a phytoandrogen, on growth and body composition in the African catfish *Clarias gariepinus*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, *57*, 20391.

Turan, F., & Çek, Ş. (2007). Masculinization of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Treated with Gokshura (*Tribulus terrestris*). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, *59*, 224–229. <https://doi.org/10.46989/001c.20528>

Turan, F., Akyurt, I., & Cek-yalniz, S. (2021). *Effect of Red Clover Extract on Sex Reversal and Gonadal Development in the African Catfish, Clarias gariepinus (Burchell, 1822)*. 1–7. <https://doi.org/DOI: https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20190211080201>

- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., & Iguchi, T. (2004). An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137(1), 11–20. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00178-8)
- Upadhyay, S., & Dixit, M. (2015). Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
- Vishali, N., Kamakshi, K., Suresh, S., & Prakash, S. (2011). Red clover *Trifolium pratense* (Linn.) isoflavones extract on the pain threshold of normal and ovariectomized rats—a long-term study. *Phytotherapy Research*, 25(1), 53–58.
- Viveen, W., Richter, C. J. J., van Oordt, P. G. W. J., Janssen, J. A. L., & Huisman, E. A. (1985). *Manuel pratique de pisciculture du poisson-chat africain (Clarias gariepinus)*.
- Wang, X., Liu, J., Long, Z., Sun, Q., Liu, Y., Wang, L., Zhang, X., & Hai, C. (2015). Effect of diosgenin on metabolic dysfunction: Role of ER β in the regulation of PPAR γ . *Toxicology and Applied Pharmacology*, 289(2), 286–296. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2015.09.015>
- Weber, G. M., & Leeds, T. D. (2022). Effects of duration and timing of immersion in 17 α -methyltestosterone on sex reversal of female rainbow trout. *Aquaculture Reports*, 23(September 2021), 101014. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101014>
- Weber, G. M., Leeds, T. D., & Schneider, R. P. (2020). Sex reversal of female rainbow trout by immersion in 17 α -methyltestosterone. *Aquaculture*, 528(May), 735535. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735535>
- Wu, L., Dong, H., Zhao, J., Wang, Y., Yang, Q., Jia, C., & Ma, J. (2015). Diosgenin stimulates rat TM4 cell proliferation through activating plasma membrane translocation and transcriptional activity of estrogen receptors. *Biology of Reproduction*, 92(1), 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124206>
- Yamaguchi, T., Yamaguchi, S., Hirai, T., & Kitano, T. (2007). Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(4), 935–940. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.05.208>

Yamamoto, T.-O. (1969). 3 Sex Differentiation. In W. S. Hoar & D. J. Randall (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 3, pp. 117–175). Academic Press.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60113-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60113-2)

Yilmaz, E., Çek, Ş., & Mazlum, Y. (2009). The Effects of Combined Phytoestrogen Administration on Growth Performance, Sex Differentiation and Body Composition of Sharptooth Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9, 33–37.

ANNEXES

Annexe 1 : Tableau présentant les résultats des tests Anova pour les performances de croissance

Paramètres	Différence significative	P value
Taux de survie	oui	0,0139 *
Poids moyen	oui	0,0219 *

Annexe 2 : Tableau présentant les résultats des tests post hoc de Tukey pour les performances de croissance

Paramètres	Différence significative	P value
Taux de survie	D30 - D3000	0,0163834
	D300 - D3000	0,0204091
Poids moyen	D30 – D3000	0,0183452

Annexe 3 : Tableau présentant les résultats du test X^2 pour le sexe ratio obtenus dans les traitements

Traitement	% F	% M	% FD	X2 (ddl=2)	Signification
MT	2	98	0	-	-
D30	50	36	14	86.994***	S
D300	62	33	5	93.502***	S
D3000	34	58	8	46.7***	S

Annexe 4 : Synthèse des résultats sur l'utilisation de quelques composés phytochimiques pour l'inversion sexuelle chez les poissons

Type de traitement	Doses	Méthode de traitement	Espèces	Succès de féminisation	Succès de masculinisation	Références
Génistéine (mélange commercial de phytoestrogènes)	de 630, 750 et 1500 mg/30 l	Immersion	<i>Clarias gariepinus</i>	56%, 64,2% et 69,8%	-	Yilmaz et al., (2009)
Extrait de trèfle rouge (principalement des isoflavones)	des 50 mg/l	Immersion	<i>Clarias gariepinus</i>	89%	-	Turan et al., (2021)
Extrait de <i>Butea superba</i> (Diadzéine et génistéine)	300 g/kg	Orale	<i>Oreochromis niloticus</i>	72%	-	Mengumphan et al., (2006)
Saponines stéroïdiennes dérivant du Fenugrec	150 ppm	Orale	<i>Oreochromis niloticus</i>	-	52%	Stadtlander et al., (2008)
Saponines de <i>Quillaja saponaria</i>	150 ppm	Orale	<i>Oreochromis niloticus</i>	-	73%	Stadtlander et al., (2008)
Saponines de <i>Quillaja saponaria</i>	700 mg/kg	Orale	<i>Oreochromis niloticus</i>	-	65%	Francis et al., (2002)

Annexe 5 : Tableau récapitulatif des poids moyens des juvéniles de clarias à J60 dans les familles

Famille	Traitement	Poids moyen dans chaque réplica (g)
Famille 1	D0 (Témoin)	7,08
	MT	9,58
	D30	10,56
	D300	7,82
	D3000	5,48
Famille 2	D0 (Témoin)	8,82
	MT	8,53
	D30	9,41
	D300	6,65
	D3000	7,07
Famille 3	D0 (Témoin)	8,87
	MT	7,64
	D30	7,82
	D300	7,57
	D3000	5,55