



Quere/ou

Action: cf groupe paho



# BASES BIOLOGIQUES DE L'AQUACULTURE

M. R. T.

GUIDEL

MINISTRE DE LA RECHERCHE ET DE LA TECHNOLOGIE

5 - 7 Septembre 1990



## RESUMES DES COMMUNICATIONS

CNEVA



**GROUPEMENT DE COOPERATION SCIENTIFIQUE  
SUR LES BASES BIOLOGIQUES DE L'AQUACULTURE**

38390

H500 - BAS - B

# PROGRAMME

## MERCREDI 5 SEPTEMBRE

8h30-8h40 : Présentation de la réunion, B. CHEVASSUS

**MOLLUSQUES, Animateur J.F. SAMAIN**

8h40-8h50 : Objectifs du groupe, J.F. SAMAIN

**1. CROISSANCE**

8h50-9h10 : Besoins lipidiques des larves de *Pecten maximus*. C. SEGUINEAU, F. BRESLIN, M. LECLERC.

9h10-9h30 : Besoins en vitamines des larves de *Pecten maximus*. F. DELAUNAY, Y. MARTY, R. GALLOIS.

9h30-10h00 : Contrôle de la digestion au cours du développement :  
1) Cellules synthétisant les enzymes digestives chez la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L). E. BOUCAU-CAMOU, M. HENRY, A. DONVAL.  
2) Ultrastructure et immunocytochimie du système nerveux du Juvénile de *Pecten maximus*. A. DONVAL.

10h00-10h20 : Contrôle de la synthèse des enzymes digestives au cours du développement larvaire chez la coquille Saint-Jacques : caractérisation et aspect dynamique. J.F. SAMAIN, A. DONVAL, J.Y. DANIEL, J.R. LE COZ, F. MICHAUD, J. MOAL.

10h20-10h40 : Pause

10h40-11h00 : Recherche de substances hormonales actives sur la croissance et sur les métabolismes associés chez les Mollusques Bivalves. M. MATHIEU, J.Y. TOULLEC, I. ROBBINS, K. COUSIN.

11h00-11h20 : Caractérisation des hormones peptidiques contrôlant la croissance : étude des séquences nucléotidiques codant pour ces problèmes. A. Van VORMHOUDT, A. DONVAL, J.Y. TOULLEC, L. XU, D. SELLOS.

## 2. MIME

11h20-11h40 : Caractérisation du facteur de croissance de l'eau d'Argenton. J.C. COCHARD, L. CHEVOLOT, J.Y. DANIEL, M. HUITRIC, E. JACQ, J.R. LECOZ, Y. MARTY, M. MAZURET, P. MINER, J. MOAL, M. SALAUN, J.F. SAMAIN, V.P. VACHEROT.

11h40-12h00 : Hypothèse microalgue : nutrition larvaire de *Pecten maximus* à l'écloserie d'Argenton (Finistère). M. SALAUN, M. DIOURIS.

12h00-12h20 : Hypothèse bactérienne : recherche du mécanisme d'action du facteur de croissance de l'eau d'Argenton. E. JACQ, J. MOAL, J.Y. DANIEL, J.F. SAMAIN, J.L. NICOLAS, J.C. COCHARD, S. CORRE, P. FERA.

12h20-12h40 : Larves axéniques.  
- sur nourriture artificielle. A. HERNANDORENA, B. POUVREAU.  
- sur nourriture naturelle. J.L. NICOLAS, D. ANSQUER, B. BESSE.

**REPRODUCTION, Animateur A. FOSTIER**

- 14h00-14h10 : Objectifs du groupe, A. FOSTIER
- 14h10-14h30 : Etudes sur la motilité du sperme de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et de carpe commune *Cyprinus carpio* L. Ch. REDONDO, M.P. COSSON, R. BILLARD.
- 14h30-15h10 : Aptitude du sperme de truite (*Oncorhynchus mykiss*) à la congélation : caractérisation et influence de la température de stabulation des mâles. G. MAISSE, M. LOIR, M.L. MALEJAC, C. LABBE.  
 Aptitude à la cryopréservation des spermatozoïdes de truites (*Oncorhynchus mykiss*) stabulées à 6 et 13°C, relation avec la motilité. G. MAISSE, M.P. COSSON, R. BILLARD, M. LOIR.  
 Préparation et premières données sur la composition lipidiques de la membrane du spermatozoïde de truite arc-en-ciel. C. LABBE, G. MAISSE, M. LOIR.
- 15h10-15h30 : Contrôle hypothalamique de la sécrétion de gonadotropine chez la truite arc-en-ciel. T. BAILHACHE, G. SALBERT, J.C. GUILLET, D. BOUJARD, C. SALIGAUT, B. BRETON, C. JEGO.
- 15h30-15h50 : Influence du GABA sur la libération de gonadotrophine chez le cyprin (*Carassius auratus*). O. KAH; M.G. MARTINOLI, L. O'TOOLE, P. DUBOURG, V.L. TRUDEAU, B.D. SHOLEY, J.P. CHANG, R.E. PETER.
- 15h50-16h10 : Pause.
- 16h10-16h40 : Activité biologique *in vitro* de différents GnRH en relation avec leur dégradation hypophysaire. C. WEIL, B. BRETON, E. SAMBRONI, Y. ZOHAR.  
 Induction et synchronisation des pontes par des analogues de la gonadotrope releasing hormone : effets de la nature de l'analogue et de sa forme d'injection. B. BRETON, C. WEIL, E. SAMBRONI, T. MIKOLAJCZYK.

- 16h40-17h00 : Régulation de l'expression des gènes de la GtH - II chez l'anguille. B. QUERAT, M. JUTISZ, Y.A. FONTAINE, R. COUNIS.
- 17h00-17h20 : Liaison de vitellogénines de poissons et oiseau avec des récepteurs ovocytaires spécifiques homologues et hétérologues. F. LE MENN, J. NUNEZ-RODRIGUEZ.
- 17h20-17h50 : Isolement et caractérisation d'un ADNc complet du récepteur des oestrogènes (R.E.) chez la truite. Etude de l'expression des ARNm RE dans le foie et mise en évidence dans d'autres tissus. F. PAKDEL, S. FEON, F. LE GAC, F. LE MENN, Y. VOLOTAIRE.  
Etude de l'ARN messenger du récepteur aux oestrogènes dans l'axe hypothalamo-hypophysaire chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). G. SALBERT, P. LE GOFF, P. JEGO, Y. VALOTAIRE.
- 17h50-18h10 : Interaction entre stéroïdogénèse et spermatogénèse dans le testicule de Salmonidé. F. LE GAC, Y. VALOTAIRE, A. FOSTIER.
- 18h10-18h30 : Relations entre cellules stéroïdogènes et cellules germinales dans le testicule de roussette (*Scyliorhinus canicula*). D.H. GARNIER, P. SOURDAINE.
- 18h30-18h50 : Devenir métabolique de la 17 méthyl testostérone chez la truite arc-en-ciel. J.P. CRAVEDI.

## JEUDI 6 SEPTEMBRE

## ALGUES, Animateur B. KLOAREG

- 9h00-9h10 : Objectifs du groupe B. KLOAREG.
- 9h10-9h30 : Perspectives d'applications des biotechnologies végétales à la micropropagation et à l'amélioration génétique des algues marines d'intérêt économique. B. KLOAREG XW LIU.
- 9h30-9h50 : Evolution en culture d'explants de *Laminaria digitata* (L.) lam. (Fucophycées, laminariales). Aspects histologiques et cytologiques. H. MICALET, J. COSSON
- 9h50-10h10 : Possibilités ouvertes par la régénération de plantes à partir de protoplastes de *Sphacelaria* (Phéophycée). M. MEJJAD, B. WOLFERSBERGER, G. DUCREUX.
- 10h10-10h30 : Mise au point de techniques de production et de régénération de protoplastes chez les Phéophycées et les Rhodophycées. H. BENET, C. BOYEN, Y. LE GALL, E. ZABLACKIS, B. KLOAREG.
- 10h30-10h50 : Pause
- 10h50-11h10 : Analyse de quelques facteurs contrôlant le développement du Thalle des protoplastes de *Sphacelaria* (Phéophycée). G. ABDELMOUMENAOUI, J. AITBARHOUCHE, G. DUCREUX.
- 11h50-11h30 : Etude du génome plastidial de quelques macrophytes marins. S. de GOER, C. BOYEN, T. BARBEYRON.
- 11h30-11h50 : La photosynthèse des algues brunes : originalité des complexes pigments-protéiques. C. BERKALOFF, C. PASSAQUET, J.C. DUVAI, L. CARON.



11h50-12h10 : Etude des sites de synthèse des protéines du phycobilisome chez une algue rouge. C. BERNARD, J.C. THOMAS.

**ADAPTATION, Animateur G. BOEUF**

13h30-13h40 : Objectifs du groupe G. BOEUF.

13h40-14h00 : Rôle de l'hormone de croissance et des hormones thyroïdiennes dans la smoltification du saumon atlantique. G. BOEUF, A. LE ROUX, P.Y. LE BAIL.

14h00-14h20 : Fonction thyroïdienne au cours de la smoltification et de l'adaptation à l'eau de mer chez des salmonidés (*Salmo trutta*, *Salmo salar*). J.M. LEBEL, J. LECOUP.

14h20-14h40 : Effets d'un traitement à la triiodothyronine sur le métabolisme énergétique et les capacités d'adaptation au milieu marin des smolts de Saumon atlantique. V. MAXIME, G. BOEUF, C. PEYRAUD.

14h40-15h10 : Réceptivité du saumon atlantique à un traitement à l'hormone de croissance (GH) durant son cycle de développement. G. BOEUF, A. SEVERE, P. PRUNET, P.Y. LE BAIL.

Hormone de croissance (GH) et adaptation à l'eau de mer des Salmonidés : mise en évidence d'un effet branchial de la GH. P. PRUNET, M. PISAM, G. BOEUF, M. AVELLA, J.P. CLAIREAU.

15h10-15h30 : Pause.

15h30-15h50 : Effets de la prolactine sur l'adaptation à l'eau de mer des Salmonidés. P. PRUNET, G. BOEUF.

15h50-16h10 : Adaptation osmotique chez les poissons euryhalins : influence de la salinité sur l'équilibre acido-basique extra et intracellulaire. G. NONNOTTE, J.P. TRUCHOT.

- 16h10-16h30 : Evolution des flux branchiaux sortants de sodium au cours de la smoltification. de *Salmo salar*. F. SOLA, M. BORNANCIN, G. BOEUF.
- 16h30-16h50 : Etude de l'échange transbranchial de Na<sup>+</sup> chez les smolts et post smolts de *Salmo salar* transférés directement en eau de mer. J.M. NANCE, M. BORNANCIN, F. SOLA, G. BOEUF, J.M. DUTIL.
- 16h50-17h20 : Effets de transferts directs d'eau douce en eau de mer sur le métabolisme énergétique des smolts de saumon atlantique. V. MAXIME, G. BOEUF, C. PEYRAUD.  
Etude chez le Saumon atlantique des effets respiratoires et des modifications de l'état acido-basique du compartiment extra-cellulaire provoqués par un transfert direct d'eau de mer en eau douce. J. MAXIME, S. THOMAS, C. PEYRAUD.
- 17h20-17h40 : Pause.

### PATHOLOGIE

- 17h40-18h00 : Résistance génétique aux bactéries et viroses des salmonidés : approche des facteurs en cause. M. DORSON.
- 18h00-18h20 : Yersiniose des salmonidés, étude comparée de différents modes de vaccination. M. VIGNEULE.
- 18h20-18h40 : Etude de l'absorption du vaccin anti *vibrio* distribué par voie digestive chez trois espèces de poissons : la truite *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), le bar *Dicentrarchus labrax* L. et le turbot (*Scophthalmus maximus* L.).

## VENDREDI 7 SEPTEMBRE

## AQUACULTURE TROPICALE, Animateur B. JALABERT

- 8h30-8h40 : Présentation des objectifs du groupe B. JALABERT.
- 8h40-9h00 : Etude du cycle reproducteur du Loup Tropical *Lates calcarifer* introduit en Polynésie française. Y. GUIGUEN, J. FUCHS, B. JALABERT.
- 9h00-9h20 : Inversion sexuelle chez le mérrou *Epinephelus microdon* hermaphrodite protérogyné : analyse de la stéroïdogénèse gonadique. L. DEBAS, B. JALABERT, J. FUCHS, G. NEDELEC, A. BENNET, A. FOSTIER.
- 9h20-9h40 : Etude du cycle nyctéméral de la prise d'aliments chez *Hoplosternum littorale*. T. BOUJARD, Y. MOREAU, P. KEITH, P. LUQUET.
- 9h40-10h10 : Influence de la fréquence et de la période de nourrissage sur la croissance d'un silure africain *Heterobranchus longifilis* (Claridae). N. KERDCHUEN, M. LEGENDRE.  
Influence des lipides alimentaires sur la croissance et la composition en acide gras des larves de silure africain *Heterobranchus longifilis*. M. LEGENDRE, N. KERDCHUEN, G. CORRAZE, P. BERGOT.
- 10h10-10h30 : Pause.
- 10h30-10h50 : Détermination des différents substrats participant à la couverture des besoins énergétiques chez l'atipa *Hoplosternum littorale* par analyse des compositions corporelles et par calorimétrie indirecte. Y. MOREAU, F. MEDALE, T. BOUJARD, P. LUQUET.

10h50-11h10 : Activité de la flore bactérienne dans le tube digestif des poissons d'eau douce de Guyane française. M. LESEL, R. LESEL, P. LUQUET.

11h10-11h30 : Adaptation des Tilapias aux eaux saumâtres. T. DOUDET.

11h30-11h50 : Tentative d'amélioration de productivité des étangs de pisciculture par des support en bambous. S. HEM.

**CROISSANCE, Animateur modérateur B. FAUCONNEAU**

13h30-13h10 : Présentation des objectifs du groupe. B. FAUCONNEAU.

13h10-13h40 : Descripteurs morphologiques et histologiques de la croissance vertébrale chez la truite : Premiers résultats. J. MEUNIER, M. RAMZU.

13h40-14h10 : Croissance musculaire des poissons d'élevage. B. FAUCONNEAU.

14h10-14h40 : Les dépôts lipidiques chez les Poissons d'élevage. G. CORRAZE.

14h40-15h10 : Contrôle endocrinien de la croissance. P.Y. LE BAIL.

15h10-15h40 : Déterminisme génétique de la croissance globale et tissulaire. E. QUILLET.

**MOLLUSQUES**

# BESOINS LIPIDIQUES DES LARVES DE *Pecten maximus*

Franck DELAUNAY\*, Yanic MARTY\*\* et Robert GALOIS\*\*\*

\* IFREMER, Centre de Brest, DRV/A - BP 70, 29280 PLOUZANE.

\*\* Laboratoire d'océanographie chimique, CNRS (URA 322),  
Université de Bretagne Occidentale, 6, Av. La Gorgeu, 29287  
BREST Cedex.

\*\*\* Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture de  
L'Houmeau, BP 5, 17137 L'HOUMEAU.

**Mots-clés :** *Pecten maximus*, larves, phytoplancton, triglycérides, phospholipides, acides gras, bioconversions.

L'amélioration de la fiabilité des élevages larvaires de mollusques requiert une meilleure connaissance des besoins nutritionnels. L'étude des besoins lipidiques des larves de *Pecten maximus* est motivée par le fait que plusieurs travaux ont mis en évidence chez les larves d'invertébrés marins un rôle énergétique important et des possibilités d'élongation/désaturation très réduites pour obtenir les acides gras polyinsaturés très abondants et indispensables à l'intégrité membranaire. Par ailleurs, le phytoplancton utilisé comme fourrage en éclosérie, se caractérise par une variabilité de sa composition lipidique qui est interspécifique mais aussi intraspécifique en fonction des conditions de culture.

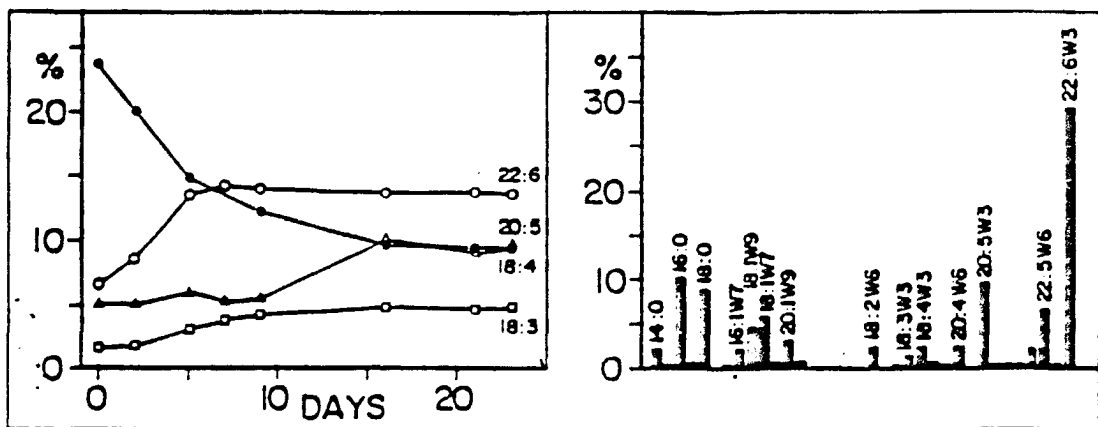
La composition en classes de lipides est très stable au cours du développement larvaire quand la croissance est normale. Par contre, le niveau de triglycérides chute fortement lorsqu'elle est altérée. Au cours de la transition nutritionnelle vitellus-algues, l'utilisation préférentielle des lipides comme source énergétique se traduit par une chute systématique de l'indice triglycérides / matière organique, lequel reste anormalement bas dans le cas de faibles croissances.

La composition en acides gras des larves se caractérise par une forte proportion d'acides gras polyinsaturés dans les fractions neutres (triglycérides) et polaires (phospholipides), (40-50 % et 50-60 % respectivement). On y retrouve essentiellement les acides gras de la série W3 comme le 18:4W3, le 20:5W3 et le 22:6W3, ce dernier représente à lui seul près de la moitié des acides gras polyinsaturés des lipides polaires.

La composition en acides gras du phytoplancton fourni aux reproducteurs et aux larves se reflète bien dans les lipides neutres des ovocytes et des larves. Les acides gras polyinsaturés de ces lipides neutres sont rapidement consommés au cours du jeûne alors que la composition des lipides polaires reste très stable. L'utilisation de régimes monospécifiques, montre que les larves sont capables, à partir d'un pool équilibré d'acides gras, d'incorporer

sélectivement certains d'entre eux comme le 22:6W3 pour donner à leurs lipides membranaires une composition optimale. Par contre, face à un déficit trop important en un ou plusieurs acides gras polyinsaturés à longues chaînes, elles semblent incapables d'effectuer les bioconversions ( $18:3 \rightarrow 18:4 \rightarrow 20:5 \rightarrow 22:6$ ) nécessaires pour maintenir cette composition. La stratégie de la larve consiste alors à remplacer l'acide gras manquant par un autre disponible dans la nourriture et de structure proche (le 22:6W3 est remplacé par le 20:5W3 par exemple).

On sait que la composition lipidique des membranes influence leur fonctionnement. Il est donc primordial, dans le cas d'animaux à développement rapide comme les larves de mollusques et régulant insuffisamment leur composition lipidique, de maîtriser l'apport en acides gras en stabilisant la composition biochimique du phytoplancton et en l'améliorant par la modulation des conditions de culture.



Variations of the main ω3 fatty acids in neutral lipids.

Fatty acid composition of polar lipids.

## BESOINS EN VITAMINES DES LARVES DE PECTEN MAXIMUS

Seguineau C, Bresdin F, Leclercq M.

Le but du travail est de connaître les besoins en vitamines dans le cadre de la production de larves de *Pecten maximus*. Les teneurs en vitamines sont déterminées dans la nourriture (les algues phytoplanctoniques) et dans les larves. Les vitamines dosées actuellement sont pour les hydrosolubles: l'acide ascorbique ( C ), la thiamine (B1 ), la riboflavine (B2 ) et pour les liposolubles la vitamine E $\alpha$  et  $\delta$ . La vitamine B1 joue un rôle de premier plan dans le métabolisme cellulaire par l'intermédiaire de son dérivé phosphorylé (le pyrophosphate de thiamine TPP) qui intervient comme coenzyme dans de nombreux systèmes enzymatiques. La vitamine B2 agit comme coenzyme pour le transfert d'hydrogène dans les réactions catalysées par les flavoprotéines. La vitamine C qui a une action réductrice est largement requise dans le métabolisme. Elle joue un rôle spécifique dans la synthèse du collagène, l'acide ascorbique est un cofacteur dans l'hydroxylation de la proline en hydroxyproline qui est un précurseur du collagène. La vitamine E dont le pouvoir antioxydant est la caractéristique principale joue un rôle dans la protection des acides gras insaturés, principalement au cours de la croissance.

### Contrôle de la qualité biochimique des algues

La composition en vitamines d'une culture d'algue a été suivie au cours du temps. La culture est réalisée dans un ballon de 20 litres, sans renouvellement du milieu nutritif. Les espèces étudiées sont *Isochysis galbana* (clone Tiso), *Pavlova lutheri* et *Skeletonema costatum*.

| Vitamines ( $\mu$ g/g) | Tiso      | Pavlova   | Skeletonema |
|------------------------|-----------|-----------|-------------|
| B1: Thiamine           | 27-30     | 15-50     | 16-137      |
| B2: Riboflavine        | 0.45-0.53 | 0.40-0.97 | 0.38-0.45   |
| C: a ascorbique        | 1262-1935 | 67-161    | 1105-1271   |
| E: tocopherol $\alpha$ | 147-284   | 109-380   | 79-175      |
| E: tocopherol $\delta$ | 1.94-5.4  | 3-12      | 2.08-3.56   |

La vitamine B2 (riboflavine) est stable dans le temps (phase exponentielle ou stationnaire de croissance), le taux moyen est peu différent selon les espèces: 0.5  $\mu$  g/g.



La vitamine B1 est toujours présente en quantité plus importante au début de la culture quelle que soit l'espèce considérée. En effet la thiamine est ajoutée au milieu de culture, on la retrouve donc dans l'algue, après quelques jours (3 ou 4) le taux de vitamine B1 est relativement stable pour toutes les espèces étudiées.

La vitamine C est stable pour une espèce donnée au cours du temps, j'usqu'à 20 jours de culture environ. Pour *Isochrysis galbana* (clone Tiso) on observe cependant une différence significative entre la phase stationnaire (1887 µg/g) et la phase exponentielle (1365 µg/g) soit une diminution de 38%.

Les différences entre les espèces sont importantes pour la vitamine C, *Pavlova lutheri* est 10 fois moins riche que *Isochrysis galbana* ou *Skeletonema costatum*.

Pour la vitamine E les variations au cours du temps sont importantes, le taux de vitamine E α ou γ augmente avec l'âge de la culture. Pour *Pavlova lutheri* la teneur en vitamine E varie d'un facteur 4 entre le début de la culture J2: 100 µg/g et le jour J14: 400 µg/g.

Les teneurs en vitamines B1 et E varient au cours de la culture pour une espèce donnée, ce qui pose un problème pour la reproductibilité des élevages.

Pour les différentes espèces cultivées dans les mêmes conditions de température, d'éclairement et de sels nutritifs la composition en vitamine peut être très différente. Par exemple, *Pavlova lutheri* est 10 fois moins riche en vitamine C que *Isochrysis galbana* (clone Tiso) ou *Skeletonema costatum*.

#### Suivis d'élevages larvaires

Un suivi d'élevage larvaire a été réalisé, les larves sont soumises à différents régimes alimentaires.

Les algues utilisées pour nourrir les larves sont: *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* (clone Tiso) et *Skeletonema costatum*. Les régimes étudiés sont: soit le mélange des 3 espèces en proportion égale en nombre de cellules (conditions standards), soit chaque espèce utilisée seule.

Le jeûne a été étudié soit en mettant des larves à jeûn au début de l'élevage, soit après quelques jours de régime alimentaire normal (mélange des 3 espèces d'algues).

Des prélèvements de larves ont été faits de J2 à la métamorphose. Les variations de la composition en vitamines de la nourriture sont suivies par des prélèvements réguliers d'algues au cours de l'élevage.

Les analyses des différentes vitamines sont en cours.

# CONTROLE DE LA DIGESTION AU COURS DU DEVELOPPEMENT :

## 1. CELLULES SYNTHETISANT LES ENZYMES DIGESTIVES CHEZ LACOUILLE SAINT-JACQUES *PECTEN MAXIMUS* (L)

Eve Boucaud-Camou, *Université de Caen*, Monique Henry, *Université d'Aix-Marseille*  
Anne Donval, *Université de Brest*

L'investigation histo-enzymologique de l'ensemble de l'appareil digestif a montré que les principaux organes synthétisant des enzymes digestives (extra ou intracellulaires) étaient la glande digestive d'une part, l'estomac d'autre part. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés à la structure et à la cytochimie des différents types cellulaires trouvés dans ces organes chez des Coquilles à différents stades du développement (larve, juvénile, adulte).

### **Glande digestive**

Dans la glande digestive, au vu de leurs activités enzymatiques, trois types cellulaires paraissent intéressants : les cellules sécrétrices ( sécrétion d'enzymes extracellulaires, surtout des glucanases) et les cellules digestives (digestion intracellulaire par enzymes lysosomiques) des tubules, les cellules à bordure en brosse (absorption dans laquelle semblent impliquées différentes dipeptidases) des conduits principaux et secondaires.

Le processus de digestion est continu dans la glande digestive : absorption, digestion intracellulaire, rejet des sphérules de fragmentation et lyse. Certaines régions du tubule deviennent fonctionnelles à partir des cellules indifférenciées des cryptes sombres disséminées dans le tubule, tandis qu'une autre région dégénère. Il apparaît donc que, dans nos conditions expérimentales, la sécrétion enzymatique est continue.

### **Estomac**

Dans l'estomac, deux types cellulaires principaux, le type A et le type B sont présents. Le type B a tous les caractères d'une cellule sécrétrice de type séreux et serait responsable de l'activité enzymatique digestive de type extracellulaire (glucanases) décelée dans l'estomac. En effet, une forte activité amylasique a été localisée dans l'estomac, au niveau de la lumière, du stylet stomacal et de certaines cellules glandulaires de son épithélium. Une activité cellulase a également été décelée, toutefois moins forte que dans la glande digestive. Des estérases non spécifiques sont également présentes; la partie apicale des cellules montre une forte activité phosphatasique acide alors que l'activité phosphatasique alcaline est négative.

Certaines enzymes ont une localisation particulière notamment plusieurs peptidases (AMP I, DAP II et DAP IV) et l'acétylglucosaminidase présentes seulement dans certaines régions de l'estomac

### **Contrôle de la synthèse et de la sécrétion de l'amylase**

L'amylase nous est apparue comme un bon modèle expérimental : en effet une forte activité amylasique est présente à la fois dans l'estomac et la glande digestive, et elle présente de nettes variations au cours de la digestion

L'amylase a été purifiée, ce qui a permis la production d'anticorps, utilisé pour l'immunocytochimie et les immuno-dosages

Les cellules de l'estomac et de la glande digestive ont été isolées par action mécanique et enzymatique et séparées sur gradients de Percoll. L'activité amylasique s'est révélée plus forte dans les gradients correspondants aux cellules de l'estomac, ce qui confirme les données cytochimiques. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler de préférence sur ce matériel. L'étude de l'action de différentes hormones (CCK, gastrine, hormone de croissance...) sur la synthèse et la sécrétion d'amylase sera étudiée sur ce modèle *in vitro*.

**ULTRASTRUCTURE ET IMMUNOCYTOCHIMIE DU SYSTEME NERVEUX  
DU JUVENILE DE PECTEN MAXIMUMS**

Anne DONVAL

Laboratoire de biologie marine  
Faculté des Sciences - Brest

Le système nerveux de Pecten maximus consiste en deux ganglions cérébroïdes, une paire de ganglions pédieux et un ganglion viscéral. Les observations en microscopie optique et électronique montrent une organisation identique, ils sont entourés par le perineurium, les corps cellulaires forment un cortex externe tandis que les prolongements axoniques constituent le neuropile central. Dans le cortex, composé en majeure partie de neurones de petite taille, des cellules gliales et des cellules neurosécrétrices ont également été identifiées. Selon leurs caractéristiques cytoplasmiques, aspect de l'ergastoplasme, abondance de granules peptidergiques, trois types principaux de cellules neurosécrétrices sont différenciés. Une classification des différents axones composant le neuropile a été établie d'après l'aspect des vésicules axonales, mettant en évidence chez les juvéniles de Pecten maximus l'existence de systèmes de transmission peptidergique, aminergique et cholinergique.

La localisation de peptides apparentés aux hormones de vertébrés a été recherchée par des techniques d'immunofluorescence et d'immunohistochimie. Parmi la dizaine d'antisera testés, des réactions positives ont été trouvées avec les antisera suivants : anti gastrine, anti CCK, anti calcitonine. Les cellules neurosécrétrices positives sont localisées dans les ganglions cérébroïdes et viscéraux où elles sont dispersées parmi les autres neurones. Aucune réaction n'a été détectée dans les ganglions pédieux.

# CONTROLE DE LA SYNTHÈSE DES ENZYMES DIGESTIVES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT LARVAIRE CHEZ LA COQUILLE SAINT-JACQUES : CARACTÉRISATION ET ASPECTS DYNAMIQUES

*SAMAIN JF.\* , A. DONVAL\*\* , J.Y. DANIEL\* , J.R. LE COZ\* , F. MICHAUD\* , J. MOAL\**

\* IFREMER, Centre de Brest, DRV/PA, BP 70, 29280 PLOUZANE

\*\* Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire Zoologie, 6, Ave Le Gorgeu,  
29283 BREST Cedex

Les propriétés catalytiques des enzymes digestives des coquilles St Jacques, des huîtres et des palourdes ont été étudiées afin de réaliser des mesures quantitatives d'activité. La mesure des activités de l'amylase, de la laminarinase hydrolysant respectivement l'amidon (chlorophycées, chryptophycées, ...) et la laminarine (diatomées) ont été mises au point et automatisées sur Technicon. Les activités protéasiques, chymotrypsine et trypsine, ont été recherchées sans succès sur caséine et sur pseudo substrats spécifiques. L'étude enzymologique du lysozyme (digestion des parois bactériennes) réalisé chez la palourde suggère l'existence de deux enzymes différentes par leur pH optimum et leur sensibilité aux ions  $\text{Na}^+$  et à la force ionique. Par filtration sur gel deux monomères de l'ordre de 16 000 daltons seraient actifs respectivement à pH 7,1 et 5,5 et n'auraient pas la même sensibilité aux ions. Ils se polymériseraient en dimères ou en polymères inactifs à faible force ionique, avec une possibilité de réversibilité. Les deux activités monomériques pourraient correspondre aux deux rôles physiologiques présumés du lysozyme : défense et digestion. Elles sont en cours de caractérisation dans les hémocytes, dans les cellules digestives et sécrétrices de la glande digestive, dans le système circulant (pH 7) et dans les lysosomes (pH 5).

Les activités enzymatiques digestives évoluent au cours du développement de la larve de coquille St Jacques. L'activité de la laminarinase et du lysozyme sont observables dès le deuxième jour après l'éclosion celle de l'amylase à partir de J5. L'activité augmente ensuite jusqu'à la métamorphose. Cependant ces activités sont soumises à de grandes fluctuations probablement en relation avec le régime alimentaire. La mise à jeûn soudaine provoque des activations de l'amylase et de la laminarinase comme cela a été observé chez des crustacés suggérant des mécanismes compensatoires permettant d'optimiser l'assimilation en fonction de l'ingestion et des besoins des larves. Des rythmes d'activité ont été observés après une semaine. Un pic de gastrine-like précéderait l'apparition du pic d'amylase après la prise de nourriture. Une étude approfondie de ces phénomènes est en cours.

## Recherche de substances hormonales actives sur la croissance et sur les métabolismes associés chez des Mollusques Bivalves.

M. MATHIEU<sup>1</sup>, J.Y. TOULLEC<sup>2</sup>, I. ROBBINS<sup>1</sup> et K. COUSIN<sup>3</sup>.

1 : Laboratoire de Zoologie, Université de Caen.

2 : Laboratoire de Zoologie, Université de Caen et Laboratoire de Biologie Marine, Concarneau.

3 : Laboratoire de Zoologie, Université de Caen et

Laboratoire de Pathologie des Invertébrés Marins, IFREMER, La Tremblade.

Compte tenu des particularités biologiques des Mollusques Bivalves (centres nerveux neurosécréteurs difficiles ou impossibles à extirper, système circulatoire ouvert sur le milieu externe et ne permettant pas une diffusion rapide et homogène des substances injectées, hétérogénéité des populations naturelles), nous avons choisi une approche *in vitro* des mécanismes de régulation interne, fondée sur l'utilisation de suspensions de cellules dissociées et s'appuyant sur des bioessais spécifiques permettant de quantifier des actions hormonales.

Le but poursuivi est la mise en évidence d'une ou de plusieurs substances stimulant les voies métaboliques caractéristiques de la croissance.

L'incorporation de leucine tritiée est linéaire pendant au moins 6 heures dans les suspensions de cellules dissociées de bord de manteau de coquille Saint Jacques (*Pecten maximus*). Cette zone a été choisie car elle ne contient ni cellules germinales ni cellules de réserves et qu'elle est directement concernée par la croissance linéaire de l'animal. Un extrait de ganglions cérébroïdes de moule (*Mytilus edulis*) stimule les synthèses protéiques dans des cellules dissociées provenant de plusieurs espèces de bivalves (*Mytilus edulis*, *Ruditapes philippinarum* et *Crassostrea gigas*); quelquesoit l'espèce ayant fourni les cellules cibles, la stimulation présente une réponse de type effet-dose.

Initialement identifié à partir d'extraits de ganglions cérébroïdes de la moule *Mytilus edulis*, le F.A.S.P. (Facteur Activateur des Synthèses Protéiques) a également été localisé dans l'hémolymphe de la moule et de la coquille Saint Jacques, *Pecten maximus*.

La filtration sur gel BIOGEL P 4 (BIORAD) des extraits de ganglions cérébroïdes ou d'hémolymphe a permis de préciser le poids moléculaire du F.A.S.P., très proche de 1000 Da.

Le traitement par la trypsine (immobilisée sur des billes de verre) des extraits de ganglions cérébroïdes ou d'hémolymphe provoque une diminution significative de l'activité du F.A.S.P. La même expérience sera effectuée sur les extraits partiellement purifiés par filtration sur gel afin de confirmer la nature

peptidique du F.A.S.P. . L'extraction acide des ganglions cérébroïdes ou de l'hémolymphe ne permet pas de conserver l'activité du F.A.S.P.

Cette activité disparaît totalement après traitement des extraits à 100°C pendant 10 minutes.

Une des caractéristiques des hormones de croissance actuellement connues réside dans leur non-spécificité vis à vis des cellules cibles. Après filtration sur gel, les fractions présentant une activité stimulatrice sur les synthèses protéiques des cellules de bord de manteaux ont été testées avec succès sur d'autres cellules somatiques (branchie) . De plus, le FASP active également l'incorporation de thymidine et d'uridine marquées dans les cellules des bords de manteaux.

La recherche d'une éventuelle parenté immunologique entre le facteur activateur des synthèses protéiques et des peptides connus a été entreprise dans le but de faciliter sa détection lors des différentes étapes de la purification et dans celui d'en quantifier la concentration dans les différents extraits. La possibilité d'utiliser des techniques de chromatographie d'affinité et des sondes de cDNA de vertébrés est également envisagée.

Trois familles de peptides connus chez les Vertébrés ont été retenues dans le cadre de cette étude :

- la somatostatine.
- l'hormone de croissance humaine.
- l'insuline et les peptides apparentés (IGF, somatomédines).

\* Une molécule apparentée à la somatostatine de vertébré et d'un poids moléculaire semblable a été identifiée par immunocytochimie (ganglions cérébroïdes de *Mytilus*) et par RIA (hémolymphe *Pecten*, ganglions *Mytilus*). Contrairement à des résultats publiés chez les gastéropodes. Cette molécule "somatostatin-like" n'apparaît pas impliquée dans la stimulation de la croissance chez les Bivalves.

\* Une molécule apparentée à l'hormone de croissance (GH) de vertébré et d'un poids moléculaire semblable a été identifiée (RIA) dans la glande digestive et l'hémolymphe de *Pecten maximus*. sa purification ainsi que la recherche de son effet biologique sont poursuivis.

\* La recherche chez la moule d'un gène codant pour une molécule apparentée à l'insuline a été initiée à partir de la séquence d'un gène de la PréProInsuline de Mollusque (P.I.M.) découverte chez la limnée par l'équipe de biologie d'Amsterdam (Smit *et al.*, '88).

CARACTERISATION DES HORMONES PEPTIDIQUES  
CONTROLANT LA CROISSANCE :  
ETUDE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES  
CODANT POUR CES PROBLEMES

A. VAN WORMHOUDT, A. DONVAL, J.Y. TOULLEC, L.XU et D. SELLOS  
Laboratoire de biologie marine

Chez le pecten, des molécules apparentées aux gastrines/CCK et aux hormones de croissance ont été mises en évidence.

En ce qui concerne les hormones de type gastrine, ces molécules augmentent après la prise de nourriture. Par fractionnement sur colonne de G 50 SF, des peptides de masse moléculaire comprise entre 1000 et 1500 Da. sont caractérisés dans les ganglions cérébroïdes, la glande digestive et l'hémolymphe. Des précurseurs de grande taille (20 KDa), sont présents à la fois dans les ganglions cérébroïdes et la glande digestive.

En ce qui concerne les facteurs apparentés à l'hormone de croissance, une procédure de purification calquée sur celle utilisée pour l'analogue de l'hormone de croissance de crustacé a été utilisée. Le peptide extrait du pecten est de masse moléculaire voisine de 25 KDa. Il est moins retenu sur colonne échangeuse d'anions et est plus fortement hydrophobe que la GH-like de crustacé. La détermination partielle de sa séquence devrait nous permettre d'obtenir des oligonucléotides de synthèse, nous conduisant à rechercher, dans une banque de C-DNA, les DNA copies des messagers codant pour ces hormones. En effet, bien qu'une étude préliminaire ait mis en évidence une hybridation des ARN messagers extraits de la glande digestive, avec une sonde C-DNA codant pour la gastrine humaine, aucun clone positif n'a pu être obtenu par hybridation de cette sonde avec une banque de C-DNA effectuée à partir des messagers de ce tissu.

## CARACTERISATION DU FACTEUR DE CROISSANCE DE L'EAU D'ARGENTON

J.C.COCHARD\*, L.CHEVOLOT\*\*, J.Y DANIEL\*, M.HUITRIC\*, E.JACQ\*\*\*,  
J.R.LE COZ\*, Y.MARTY\*\*, M.MAZURET, P.MINER\*, J.MOAL\*, M.SALAUN\*\*\*\*, J.F.SAMAIN\*, J.P.VACHEROT\*.

\* Laboratoire P.M.D.C. Mollusques, IFREMER, Centre de Brest, B.P.70 , 29263 PLOUZANE

\*\* U.A. CNRS 322, Université de Bretagne Occidentale, 29287 Brest Cédex

\*\*\* MICROMER, rue Ch. Cadiou, Z.I. du Vernis, 29200 Brest

\*\*\*\* Laboratoire de Biologie Marine, Université de Bretagne Occidentale, 29287 Brest Cedex

L'écloserie IFREMER d'Argenton est tributaire d'un ancien vivier à crustacés de 3500 m<sup>2</sup> qui communique avec l'océan par une vanne à clapet aux marées hautes de coefficients supérieurs à 60. La vitesse de croissance des larves de coquille saint-Jacques qui sont élevées dans l'eau de ce vivier filtrée à 1 µm est toujours supérieure à celle de larves élevées de façon identique dans l'eau provenant de l'extérieur du vivier.

Par une série de bioessais il a pu être montré que le facteur favorisant la croissance dans l'eau du vivier :

- est retenu par un filtre de 0,2 µm; les deux types d'eau ne diffèrent plus significativement dans ce cas ;
- il peut être repris sur le filtre ou concentré par filtration tangentielle;
- son incidence sur la croissance est une fonction de sa concentration ;
- il est présent dans l'eau pompée à l'extérieur du vivier mais en plus faibles quantités ;
- il est présent tout au long de l'année mais il n'a pas été possible de le concentrer suffisamment en hiver pour compenser la diminution saisonnière de la croissance des larves de coquille saint-Jacques observée sur tous les sites où cette espèce est élevée;
- il est présent dans l'eau utilisée à l'écloserie du Tinduff où un bassin de décantation de 200 m<sup>3</sup> provoque une augmentation de sa concentration similaire à celle constatée à Argenton ;
- l'érythromycine et l'acide oxolinique ajoutés à l'eau des élevages ne suppriment pas ses effets ;
- il est détruit par chauffage à 80°C.

La comparaison des deux types d'eau révèle peu de différences entre les paramètres chimiques. La teneur en ammoniacque apparaît supérieure dans l'eau du vivier (0,5 à 0,9 µatg.l<sup>-1</sup> contre 0,3 à 0,4 µatg.l<sup>-1</sup> en décembre), de même le taux de nitrate est apparu légèrement supérieur à la même époque (0,35 à 0,4 µatg.l<sup>-1</sup> contre 0,2 à 0,3 µatg.l<sup>-1</sup>). Les autres sels nutritifs (nitrites, phosphates, silice) sont en concentration très similaires pour les deux eaux ; il en va de même pour le pH.

Le carbone organique total (COT) équivalent en hiver (1,2 mg.l<sup>-1</sup> ) devient plus abondant dans le vivier en été (3,4 contre 2,2 mg.l<sup>-1</sup>) ce que confirment les dosages de carbohydrates et d'acides gras. L'analyse du spectre de ces derniers montre en outre des différences dans le rapport 22:6 n<sup>-3</sup>/20:5 n<sup>-3</sup> qui est supérieur à 1 dans l'eau du vivier et inférieur dans l'autre. Les acides gras polyinsaturés 16:4 n<sup>-3</sup> et 18 n<sup>-(?)</sup> ainsi que les marqueurs bactériens peu abondants dans l'eau extérieure sont bien représentés dans l'eau du vivier.



Les dénombrements bactériens confirment cette observation : la flore totale (épifluorescence) est 5 à 10 fois plus abondante dans l'eau du vivier avant filtration à 1  $\mu\text{m}$ , cette différence s'estompe après filtration ; les flores hétérotrophe totale et de vibrionacés sont très semblables.

L'étude du phytoplancton par mesure de la chlorophylle "a", des phaeopigments et par comptage en épifluorescence montrent une abondance plus forte dans l'eau du vivier (30%) mais à des concentrations très faibles en regard des algues utilisées comme fourrage ( 300 cellules.ml<sup>-1</sup> contre 50 000 distribuées). Ces observations ont été confirmées par la cytofluorimétrie de flux qui révèle en outre que les populations du vivier sont surtout constituées de petits flagellés alors que celles de l'extérieur sont dominées par des cyanobactéries. Dans tous les cas la biomasse phytoplanctonique des deux est extrêmement faible relativement aux algues distribuées. L'observation directe par MEB montre une charge particulaire plus grande due à une plus forte quantité de débris. Certaines formes caractéristiques de phytoplancton n'ont été observées que dans l'eau du vivier.

L'étude de l'équipement digestif des larves (laminarinase, amylase, lysozyme) révèle une grande activation du lysozyme et dans une moindre mesure de l'amylase par l'eau du vivier. Ceci traduit une alimentation plus riche en bactéries et en particules contenant de l'amidon ou du glycogène.

Les productions primaire et bactérienne ont été étudiées par mesure de l'incorporation de bicarbonate <sup>14</sup>C, de thymidine <sup>3</sup>H et d'un mélange d'acides aminés <sup>3</sup>H. Il apparaît que la production primaire de ces eaux est faible en général, elle ne diffère pas significativement entre les deux eaux. La production bactérienne de l'eau du vivier est significativement plus forte au moins au remplissage des bacs d'élevages.

L'ensemble de ces observations plaide pour la nature biologique du phénomène constaté. Il conduit à proposer deux hypothèses principales pour expliquer les meilleures performances des larves élevées dans l'eau du vivier:

- la production bactérienne plus intense représenterait un apport alimentaire significatif;
- en raison de leur biomasse et de leur production faible les microalgues caractérisant l'eau du vivier ne peuvent jouer qu'un rôle qualitatif si elles sont ingérées.

# NUTRITION LARVAIRE DE *PECTEN MAXIMUS* A L'ECLOSERIE D'ARGENTON (FINISTERE)

Michel SALAUN,  
Laboratoire de Biologie Marine,  
Faculté des Sciences 29287 BREST Cedex

Marcel DIOURIS,  
Laboratoire de Physiologie Végétale,  
Faculté des Sciences 29287 BREST Cedex

En raison d'une meilleure croissance observée chez les larves élevées dans l'eau provenant d'un vivier contigu à l'écloserie comparativement à celles élevées dans l'eau du large, l'apport des algues du milieu naturel dans l'alimentation des larves a été étudié : le nombre de cellules chlorophylliennes apportées au moment du renouvellement de l'eau dans les bacs d'élevage et détectées en microscopie optique, électronique ainsi qu'au cytofluorimètre est insignifiant ( $300 \text{ cellules.ml}^{-1}$ ) devant la quantité d'algues distribuées aux larves. L'absence d'incorporation de  $^{14}\text{C}$  dans l'eau des bacs tend également à prouver qu'elles ne sont pas productives. Cette amélioration de la croissance larvaire (= 30 %), ne pourrait s'expliquer que si les algues présentes apportent un élément essentiel stimulant la croissance. Cependant, une activité hétérotrophe significative a été mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée dans l'eau du vivier. Elle correspondrait à la production d'algues hétérotrophes ou d'une bactérie ; la présence d'une grosse bactérie libre a en effet été mise en évidence dans l'eau du vivier à une concentration 5 à 10 fois supérieure à celle existant dans l'eau extérieure au vivier.

Bien que celle-ci soit faible, l'ingestion d'organismes chlorophylliens de taille inférieure à  $2 \mu\text{m}$ , en proportion élevée, a mis en évidence la capacité des larves à capter le picoplancton et comme le prouve les observations en microscopie à transmission, bactéries et cyanobactéries sont également ingérées. Afin de connaître la valeur alimentaire des algues présentes dans l'eau du vivier, différentes souches ont été isolées au CREMA et à la Station Biologique de Roscoff : 3 souches de picoplancton (=  $1,5 \mu\text{m}$ ), une cyanobactérie ( $0,75 \mu\text{m}$ ) et un *Pyramimonas* (=  $4 \mu\text{m}$ ). Cette dernière, utilisée pour nourrir les élevages, donnerait des résultats

équivalents à ceux obtenus avec *Isochrysis galbana* (clone T. iso) au niveau de la croissance larvaire. *Pyramimonas* aurait également par une composition biochimique proche de celle de I.iso, avec cependant des différences au niveau des triglycérides et des glycolipides. Les autres souches isolées ont été également testées sur les larves : les résultats seront exprimés en terme de croissance, d'ingestion et d'assimilation.

Le suivi du bol alimentaire en épifluorescence n'a pas permis de déceler chez les différentes souches de picoplancton étudiées, bien qu'elles soient ingérées en grande quantité (R07, R08, R09) et chez *Nanochloropsis* de trace de digestion du chloroplaste contrairement à *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema costatum*. Il apparaît également que la capacité des larves à ingérer et digérer les algues varie en fonction de l'âge des individus et de la taille des cellules captées. L'étude en microscopie électronique à transmission des algues picoplanctoniques ingérées montre que celles-ci ne seraient digérées que partiellement. La paroi cellulaire et le(s) chloroplaste(s) apparaissent souvent intacts même après 8 h de présence dans l'estomac tandis que d'autres organites intracellulaires et certains globules de réserves sont altérés.

La relative imprécision de l'étude de la nutrition au microscope à épifluorescence nous a conduit à utiliser une méthode d'analyse plus fine de l'ingestion et de la digestibilité des algues par les larves : l'alimentation des larves par des algues marquées au  $^{14}\text{C}$ .

Dans une première expérience, trois algues ont été testées : *Pavlova lutheri*, une souche de picoplancton dénommée R08 et une cyanobactérie. Celles-ci ont été distribuées, d'une part à la même concentration (60 C/ $\mu\text{l}$ ) et d'autre part à la même biomasse en tenant compte des volumes spécifiques. Dans les différents cas, l'ingestion, l'excrétion fécale et l'assimilation ont été analysées.

Dans une seconde expérience, afin de connaître dans le mélange distribué régulièrement aux larves *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* (aff. T.iso), *Skeletonema costatum*, la part quantitative de chaque espèce dans l'ingestion et l'assimilation au cours de la vie larvaire (4, 9, 14 et 18 jours) chaque algue a été marquée au  $^{14}\text{C}$  et distribuée aux larves en association avec les deux autres non marquées.

Enfin, la vitesse d'ingestion a été mesurée chez les larves durant un cycle de 24 heures dans le but de voir si la réplétion du tube digestif n'impliquerait pas une réduction de prise en charge des particules alimentaires.

Recherche du mécanisme d'action  
du facteur de croissance de l'eau d'Argenton

- hypothèse bactérienne -

JACQ E., MOAL J., DANIEL J.Y., SAMAIN J.F., NICOLAS J.L., COCHARD J.C., CORRE S., FERA P. avec la collaboration technique de l'écloserie d'Argenton.

RESUME:

Pour expliquer le taux supérieur de croissance entre les larves élevées avec l'eau du vivier d'Argenton comparativement à l'eau de mer, une influence des bactéries a été envisagée. Aussi, depuis 1987, les eaux de mer Extérieure et Vivier ont été caractérisées bactériologiquement et différents mécanismes d'action ont été testés.

La microflore bactérienne des basses d'élevage larvaire de *Scotus maximus* a été analysée et comparée selon l'origine de l'eau au cours de différents élevages en conditions standardisées, c'est à dire sur une eau filtrée à 1µm et en présence de chloramphénicol.

Au temps initial, les densités bactériennes sont légèrement supérieures dans l'eau du vivier (le rapport reste faible, environ de 1.5 à 2 mais est systématiquement à l'avantage de l'eau du vivier). Les eaux d'origine sont caractérisées par la diversité des peuplements et par des bactéries de petite taille dont un très faible pourcentage (< 1%) est cultivable sur le milieu de Zschell.

L'addition d'antibiotique, la présence des larves et des algues modifient profondément l'environnement des bactéries et se traduisent par une évolution des peuplements. En effet, après un cycle d'élevage de 48 heures les souches isolées se caractérisent par leur résistance au chloramphénicol (avec disparition des bactéries du groupe des "vibrio"), une augmentation de leur volume cellulaire (facteur 2 à 5) et des changements de métabolismes. En effet, si les densités totales, dénombrées par microscopie à épifluorescence, sont stables sur le cycle de 48 heures, les pourcentages de cellules cultivables sur milieu de culture évoluent d'une valeur inférieure à 1% au temps initial jusqu'à atteindre des valeurs proches de 100% au temps final. Par contre, l'analyse taxonomique, réalisée à l'aide du système API ne fait pas apparaître de souches caractéristiques de l'une ou l'autre des deux eaux, ni à l'origine ni au cours de l'élevage, à une exception près (1988).

Si aucune variation n'est observée entre les densités bactériennes au début et fin de cycle, les pentes des courbes de croissance des densités bactériennes sont différentes, la cinétique de croissance étant plus rapide dans le cas de l'eau du vivier. Ceci est confirmé par des essais de croissance des bactéries sur différents milieux de culture qui montrent que les bactéries issues du vivier réagissent plus rapidement à l'apport organique comparativement aux bactéries de l'eau extérieure pour lesquelles une phase d'adaptation semble nécessaire.

Ces quelques observations permettent de penser à une différence dans l'état physiologique des peuplements bactériens. Les bactéries du vivier placées dans un environnement plus favorable, d'un point de vue charge organique, seraient plus aptes à répondre aux changements des conditions du milieu: baisse de la compétitivité par action sélective des antibiotiques, apport organique par addition des larves et des algues.

La production bactérienne après 48 heures d'élevage larvaire, calculée à partir de la relation obtenue sur milieu enrichie entre les taux de division et de croissance est faible (2 divisions par jour) et identique pour les deux eaux. Par contre, les mesures de production réalisées à l'aide de traceurs isotopiques: thymidine et acides aminés présentent une activité initiale supérieure dans l'eau du vivier. Cette activité bactérienne est fortement inhibée par la présence d'antibiotiques pendant 24 heures, puis réapparaît généralement après ce laps de temps plus intense qu'initialement (de l'ordre de 15-20 divisions par jour). Cette production mesurée par incorporation de thymidine dans l'ADN bactérien est une production potentielle puisque mesurée en l'absence de prédateurs dans un sac à dialyse. L'environnement organique participe à l'expression de cette production puisqu'elle ne se manifeste pas en l'absence des algues ou des larves.

Ces différentes études ont permis de mettre au point un modèle qui illustre l'influence de la productivité propre à chacune des eaux, des densités bactériennes initiales, des apports de matière organique (eau mais aussi larves) et des phénomènes de grazing entre les larves et les bactéries. Ce dernier point se trouve confirmé par trois observations: présence de bactéries dans le tube digestif des larves, présence d'acides gras bactériens dans les larves et taux de lysozyme supérieure dans les larves de l'eau du vivier. À partir de ce modèle il a été confirmé que la production bactérienne dans l'eau du vivier, au cours de l'élevage, est supérieure à celle de l'eau extérieure.

Cette biomasse bactérienne produite dans les élevages pourrait soit par apport nutritif quantitatif ou qualitatif, soit par modification de l'environnement bactérien (effet probiotique) correspondre au facteur stimulateur de croissance présent dans l'eau du vivier.

Bien que l'hypothèse d'un apport nutritif bactérien soit plausible, des tests effectués sur des élevages en petit volume (2 l) ne démontrèrent aucun effet positif sur la croissance des larves de l'addition de substrat bactérien ou d'un inoculum bactérien. L'addition d'antibiotiques en supplément au chloramphénicol, érythromycine et acide oxolinique bien qu'influent une fraction de la population résistante au chloramphénicol, ne modifia pas les croissances larvaires. Ces arguments ne supportent donc pas l'hypothèse bactérienne en tant que complètement quantitatif nutritionnel dans l'explication du facteur de croissance.

L'aspect qualitatif, lui ne peut être complètement écarté à partir des résultats taxonomiques car ces analyses ne peuvent s'effectuer que sur la fraction dominante du peuplement. Les interactions entre larves et bactéries peuvent, en effet être très complexes. Ainsi, une souche bactérienne, isolée des sacs d'élevage présente une activité favorable à la survie et à la croissance larvaires en l'absence de chloramphénicol et plutôt dépressive en milieu axénique. Un effet de cette nature, dans le mesure où dans l'eau du vitier les bactéries sélectionnées se développent plus rapidement que dans l'eau extérieure, pourrait donc participer à la présence du facteur X d'Argenton.

## LARVES AXENIQUES

Le développement des bactéries dans les élevages représente une biomasse relativement faible mais à fort turn-over. La microflore est capable de se multiplier rapidement et d'absorber très vite les éléments dissous. Pour déterminer des besoins nutritionnels comme pour mettre en évidence le rôle de cette microflore il est nécessaire de s'extraire de sa présence. Cependant l'obtention de larves axéniques de bivalves est assez rhédibitoire. Les contaminations sont fréquentes et les larves n'ont pas toujours un développement optimal pour différentes causes (qualité des géniteurs, stress de la décontamination...). Deux méthodes ont été utilisées pour les obtenir :

1-le prélèvement stérile des gamètes dans les gonades et fécondation en milieu stérile. Seules l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et la moule (*Mytilus edulis*) donnent des oeufs viables par cette méthode.

2-la décontamination aux antibiotiques (les oeufs ne résistants aux antiseptiques).

De 30 à 50% des lots sont axéniques par ces méthodes..

Plusieurs objectifs ont été poursuivis:- mise au point d'un aliment artificiel permettant de déterminer les besoins nutritionnels

microflore bactérienne

- mise en évidence de l'influence de la

bactériens, soit dissous.

- recherche de facteurs de croissance soit

### 1) Larves axéniques sur nourriture artificielle:

**Définition d'un milieu nutritif de synthèse pour l'élevage axénique des larves de *Crassostrea gigas***

A.Hernandorena, B. Pouvreau

Compte tenu de nos connaissances limitées sur les besoins des larves d'huîtres, la définition d'un milieu nutritif de synthèse constitue un travail difficile qui se justifie par un enjeu économique important. L'idée de transférer la méthodologie mise au point pour l'élevage axénique de microcrustacés à l'élevage d'autres espèces de filtreurs de particules revient à Conklin et Provasoli (1978). Cette idée reprise reprise aux U.S.A. par Langdon (1983) a été mise en oeuvre pour l'élevage axénique des larves de *Crassostrea gigas*. L'auteur a réussi à produire des larves stériles sans utiliser d'antibiotique mais n'a pas résolu le problème difficile posé par l'alimentation de ces larves avec un milieu artificiel dont la phase particulaire était préparée selon les principes définis par Provasoli et ses collaborateurs. Nous avons entrepris la même démarche avec un nouveau milieu nutritif mis au point pour l'élevage de larves d'*Artemia* (Hernandorena,1990). Les qualités physico-chimiques des particules leur confèrent une vitesse de sédimentation plus faible et ne perturbent pas l'activité locomotrice des nauplii à des concentrations 40 fois supérieures à celles utilisées dans le milieu "Provasoli". Elles conviendraient mieux à l'alimentation des larves d'huîtres que celles préparées pour les larves de microcrustacés. Les résultats des essais préliminaires destinés à définir un protocole expérimental, sont encourageants. L'utilisation d'un milieu nutritif défini de façon empirique et contenant des produits complexes, devrait nous permettre de déterminer ultérieurement les besoins nutritifs de larves d'huîtres.

références:

Conklin D.E., L. Provasoli (1977). Biol. Bull. 152: 337-350

Conklin D.E., L. Provasoli (1978). Biol. Bull. 154: 47-54

Hernandorena A. (1990) soumis à publication

Langdon C.J.(1983.) Biol. Bull. 1964: 227-235

Provasoli L., A. d'Agostino (1969). Biol. Bull. 136: 434-453



## 2) Larves axéniques sur nourriture naturelle:

J.L. Nicolas, D. Ansquer, B. Besse.

Malgré les difficultés méthodologiques, les élevages axéniques réussis indiquent que la microflore bactérienne associée aux élevages n'influence pas sensiblement la croissance. Cependant certaines fractions de la microflore peuvent induire des croissances plus élevées ou les réduire. Les courbes de croissance des larves axéniques et des larves recontaminées en fonction des doses de nourritures (*Pavlova lutheri* axénique) sont similaires avec un point d'inflexion entre 10 et 20 cell./ $\mu$ l d'algue distribuée quotidiennement (fig.1).

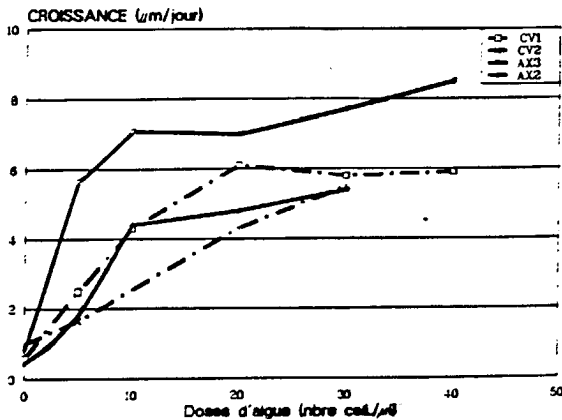


Fig.1

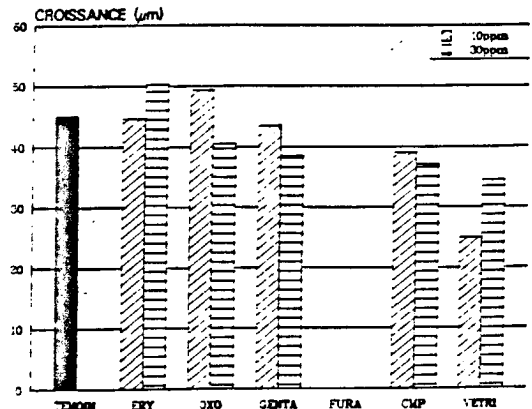


Fig.2

Les premiers essais de screening de substances dissoutes sur des larves de *Pecten maximus* font apparaître que certains antibiotiques sont toxiques (furane, vétrimosulf) à des doses thérapeutiques. D'autres le deviennent à des doses plus importantes (oxolinate, gentamycine). Un effet positif mais non encore significatif est observé avec l'érythromycine à dose élevée (fig.2).

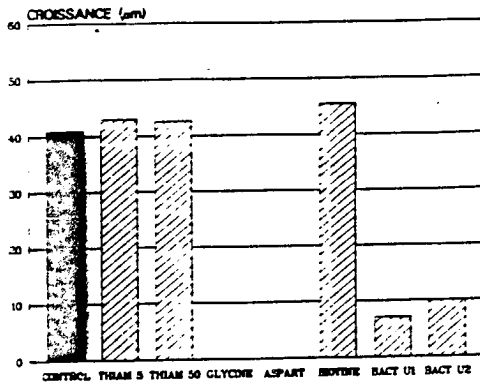


Fig.3

Les bactéries ajoutées déprécient la croissance bien qu'une espèce ait un effet probiotique lorsqu'elle est mise en grande quantité dans les élevages non axéniques. Les acides aminés se révèlent toxiques aux doses testées. Les vitamines (thiamine et biotine) ont peu d'effet. La biotine semble toutefois accélérer la croissance (fig. 3). En règle générale, la variabilité entre les lots d'une même condition nécessiterait plus de réplicats pour conclure sur des augmentations de croissance de 10% environ.

La comparaison de la composition en acides gras des élevages axéniques et conventionnels a été commencée. Elle requiert de grandes quantités de larves. Les larves d'huîtres conventionnelles possèdent des marqueurs bactériens en grande quantité qui n'ont pas été observés chez les larves axéniques mais ce premier résultat demande à être confirmé. Chez les larves de coquilles *St jacques*, il n'y a pas de différences très marquées.

REPRODUCTION

# **Studies on the Sperm Motility in the Rainbow Trout, Oncorhynchus mikiss, and the Common Carp, Cyprinus carpio L.**

Ch. Redondo<sup>1)</sup>, M.-P. Cosson<sup>2)</sup> and R. Billard<sup>3)</sup>

1) Dept.Patol.Animal. Cátedra de Cirugía y Reprod. Fac.Veterinaria. Univ. Zaragoza. Spain. 177, Av.Miguel Servet.50013-Zaragoza.Spain.

2) Lab.Biologie Cellulaire Marine. CNRS UA 671.F-06230-Villefranche/Mer. France.

3) Lab.Ichthyol.Gen.et Appl. MNHN. 43,rue Cuvier.F-75231-Paris.France.

## **INTRODUCTION**

Since the middle of the 80's , the cooperation between the MNHN (Paris) and the CNRS (Villefranche/Mer) has been focused on the biodynamic aspects related to the male fertility in teleost fish species, specially Rainbow Trout, O.mikiss, and the Common Carp, C.carpio L. The subject of particular attention was sperm motility, for which regulating factors as pH, influence of monovalent and divalent ions, temperature and osmotic pressure have been analysed.

### **Trout Spermatozoa**

The use of dark-field microscopy and stroboscopic illumination techniques (Cosson *et al.*,1985) allowed the intensive analysis of trout spermatozoa. Motility was inhibited, in a reversible way, by dilution in a media containing high K<sup>+</sup> concentrations. After dilution, 100% of spermatozoa were motile for about 30 s., with a flagellar beating frequency of 50-60 Hz/s. After 30 s. this frequency declined to 15 Hz. After 60 s., 5-15% of spermatozoa kept beating (12-7 Hz) were 80-85% stopped abruptly swimming.

#### **a) *Effect of pH and Temperature:***

Motility of salmonid spermatozoa is strongly influenced by external pH (see Stoss,1983). Motility measured by the beat frequency of the flagellum declined more rapidly at pH 8-10 than at pH 9. The initial frequency was also higher at pH 9. The time before all spermatozoa stopped moving decreased when temperature increased: 5 min. at 5°C and less than 30 sec. at 25°C. Longest duration of motility was observed at pH around 9. Initial beating frequencies increased with temperature: 15 Hz at 5°C, 45 Hz at 15°C and >80 Hz at 25°C (Cosson and Billard,1986).

## b) Monovalent and Divalent ions:

Early literature pointed to  $K^+$  concentration as the factor responsible for trout sperm immobilization in the seminal plasma (Schlenk and Kahmann, 1935; Scheuring, 1928; Baynes et al., 1981; Benau and Ternier, 1980). Our work showed the need for external  $Ca^{++}$  to initiate movement: it was inhibited in presence of EGTA or in presence of the  $Ca^{++}$  channel blocker Demethoxyverapamil. Flagellar beating could be initiated through an important rise of external calcium or through the use of the calcium ionophor A23187 (Cosson et al., 1986). Monitoring the internal  $Ca^{++}$  by the fluorescent quinoline  $Ca^{++}$  - indicator, an increase of the internal Quin-2 fluorescence was observed upon initiation of flagellar movement (27-57nM to 160-350nM final  $Ca^{++}$ ). The free  $Ca^{++}$  remained elevated after the cessation of movement. In presence of Demethoxyverapamil neither sperm motility nor fluorescence increases were observed, which suggested that the increase of internal free  $Ca^{++}$  was produced by a flux of external  $Ca^{++}$  into the cell (Cosson et al., 1989).

## c) *Changes in ATP concentration following the activation of flagellar movement:*

For freshwater fishes, the motile period of sperm is extremely brief. The work carried out in our laboratory showed that the activation of motility induced a rapid decrease of ATP. In the absence of  $Ca^{++}$ , and after the cessation of motility, ATP increased slowly back to its original concentration? In the presence of millimolar concentrations of  $Ca^{++}$ , the concentration of ATP decreased to a very low level and remained low thereafter. The progressive decrease of the flagellar beat frequency observed during the period of trout sperm movement seemed to be related to the rapid exhaustion of intraflagellar ATP. Motility could be reinduced in sperm that had recovered high concentrations of ATP, demonstrating the functional integrity of the motile apparatus even after flagellar arrest (Christen et al., 1987).

## Carp Spermatozoa

The study of carp sperm biology, carried out in our laboratory in the last three years showed that it is possible to obtain semen from mature males even out of the natural spawning season, but a high variability could be observed in the initial motility of sperm samples obtained by hormonal stimulation of spermiation.

a) *Carp Sperm Quality and Ageing:*

The induction of spermiation by application of homologue carp pituitary extracts was followed by the obtention of samples with variable ability to initiate movement (0-100%). Beside this fact, good quality sperm (>80%) lost its initial quality very quickly after collection from the males (8-10 hours) in spite of previous results, showing preservation periods over 2 days (Saad *et al.*,1988). Either low initial quality nor ageing could be associated to the variation of any other sperm parameters (sperm colume, % of cells per sample, osmotic pressure of seminal plasma or K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> contents in the latter).

b) *Effect of Incubation in Simple Ionic Media:*

Low quality or aged sperm samples, incubated in media containing high concentrations of K<sup>+</sup> or Na<sup>+</sup> (150-200 mM) recuperated their initial percentage of motile cells after incubation periods ranging from 30 min. to 2 hours. This recuperation was independent of the pH and specific for both cations. Incubation in non-ionic media (sucrose, mannitol, glucose, Choline chloride) with the same osmotic pressures, inhibited motility in an irreversible way (Redondo *et al.*In Preparation).

c) *Carp Sperm Motility Patterns:*

The initial beat frequencies immediately after dilution were around 70 Hz but declined very rapidly to reach 10 Hz 40 to 50 sec. later, when activated in distilled water (Billard and Cosson,1989).

## Acknowledgements

This work was partly supported by the French program "Bases Biologiques de l'Aquaculture" and a predoctoral fellowship of the spanish M.E.C. (Aid Nr. PG-25.141.920 / 88) to Ch.Redondo.

## REFERENCES

Baynes, S.M., A.P. Scott and A.P. Dawson (1981). Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. *J.Fish Biol.*,19: 259-267

Benau D. and C.Terner (1980). Initiation, prolongation and reactivation of the motility of salmonid spermatozoa. *Gamete Res.*,3: 247-257

Cosson M.-P., R.Billard, J.-L.Gatti and R.Christen (1985). Rapid and quantitative assessment of trout sperm motility using stroboscopy. *Aquaculture*,46: 71-75

Billard R., R.Christen, M.-P.Cosson, J.L.Gatti, L.Letellier, P.Renard and A.Saad (1986). Biology of the gametes of some teleost species. *Fish Physiol.Biochem.*, Vol.2,1-4 pp:115-120

Billard, R. and M.-P. Cosson (1988). Sperm motility in rainbow trout, *Parasalmo mikiss*; effect of pH and temperature. In: *Reproduction in fish. Basic and applied aspects in endocrinology and genetics*. Tel-Aviv, Israel, 10-12 November 1986. Ed.INRA, Paris,1988 (les Colloques de l'INRA N° 44). pp: 161-167

Billard R. and M.-P. Cosson (1989). Measurements of sperm motility in trout and carp. In: *Aquaculture- A biotechnology in progress*. N.De Pauw, E.Jaspers, H.Ackerfors, N.Wilkins (Eds.) European Aquaculture Society, Bredene, Belgium.pp: 499-503

Cosson M.-P., R.Billard and L.Letellier (1989). Rise of internal Ca<sup>++</sup> accompanies the initiation of trout sperm motility. *Cell Mot. Cytosquel.*,14: 424-434

Stoss J. (1983). Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: *Fish Physiology*. W.S.Hoar, J.D.Randall, E.M.Donaldson (Eds.) Academic press. New York. Vol.IX B. : 305-350

APTITUDE DU SPERME DE TRUITE (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) A LA  
CONGELATION : CARACTERISATION ET INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE  
STABILISATION DES MALES.

par G. MAISSE, M. LOIR, Marie-Laure MALEJAC et Catherine LABBE.

INRA, Laboratoire de Physiologie des Poissons  
Campus de Beaulieu, 35042 RENNES CEDEX

Plusieurs auteurs ont mis en évidence une grande variabilité de l'aptitude à la congélation du sperme de truite. Ces observations nous ont conduit à mettre en place un certain nombre d'expérimentations destinées à vérifier l'hypothèse de Baynes et Scott (1982) selon laquelle les altérations de la membrane des spermatozoïdes pourraient avoir une influence directe sur la réussite de la fécondation après décongélation.

Dans un premier temps, l'aptitude du sperme à supporter la congélation (Legendre et Billard, 1980) a été reliée à la concentration dans le fluide séminal de la protéine 42 KD, constituant majeur de la membrane des spermatozoïdes (Maisse *et al.* 1988). Dans les travaux suivants, le rôle déterminant de cette membrane lors de la congélation et la variabilité de son état suivant les éjaculats ont été mis en évidence après incubation des spermatozoïdes 24 heures dans des solutions hypotoniques et observation de leurs réactions (gonflement, éclatement, colorabilité ou non par l'iodure de propidium) (Maléjac *et al.* 1990). Dans les deux cas, les fortes pressions osmotiques séminales (> 280 mOsmoles) ont été associées à une faible aptitude à la congélation.

Par ailleurs la fraction protéique du fluide séminal a été partiellement caractérisée (Loir *et al.* 1990) et la présence de lipoprotéines (HDL) a été mise en évidence. Ces HDL, en faible quantité, pourraient éventuellement jouer un rôle dans la préservation de la membrane pendant le stockage dans le canal déférent.

L'influence de la température de l'eau de stabulation (5°C et 13°C) des mâles, pendant la période de spermiation, a été testée et s'est révélée sans effet notable sur la fécondance après congélation-décongélation.

*REFERENCES :*

Baynes S. M., Scott A. P. (1982) *In Reproductive physiology of fish*. Richter C. J. J., H. S. Th. Goos ed, UDOC, ageningen, 128.

Legendre M., Billard R. (1980) *Bull. Fr. Pisc.*, 278, 11-33.

Loir M., Labbé C., Maise G., Pinson A., Boulard G., Mourot B., Chambeyron F., *Fish Physiol. Biochem.*, sous presse.

Maise G., Pinson A., Loir M. (1988) *Aquat. Living Resour.* 1, 45-51.

Malejac ML., Loir M., Maise G. (1990) *Aquat. Living Resour.* 3, 43-54.



APTITUDE A LA CRYOCONSERVATION DES SPERMATOZOÏDES DE TRUITE  
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*) STABULEES A 6 ET 13 °C:  
RELATION AVEC LA MOTILITE.

Maisse G.<sup>1</sup>, Cosson M.P.<sup>2</sup>, Billard R.<sup>3</sup> et Loir M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, Physiologie des Poissons, Rennes.

<sup>2</sup> UA 671 du CNRS, Station Marine Villefranche sur mer.

<sup>3</sup> Laboratoire d'Ichtyologie, Muséum d'Histoire Naturelle, Paris.

En decembre 1988, 50 truites Arc-en-ciel mâles (souche printanière) ont été introduites dans nos circuits fermés (Rennes) avant d'être, 3 semaines plus tard, réparties dans 2 bassins dont la température a été maintenue à 6 et 13 °C pendant toute l'expérience. A cette date (5-01), la quasi-totalité des animaux était en début de spermiation. A partir du 15-02, le sperme a été collecté régulièrement. La majorité des animaux a cessé de spermier courant mai.

Le 12-04, 18 mâles à 6 °C et 14 à 13 °C ont été prélevés (sperme et 1,5 ml de sang). Après mesure du volume, un aliquot de sperme a été stocké dans la glace pour l'étude de la motilité. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles a été déterminé avec un microscope à fond noir équipé d'un éclairage stroboscopique (Cosson et al., 1989) après dilution, soit dans le dilueur d'insémination (DIA 532; après collecte et environ 7 H plus tard), soit dans des milieux dont la molarité en KCl variait de 0 à 120 mM. Les spermatozoïdes ont été centrifugés à 500g pendant 20 min. Après que le spermocrite "500g" ait été noté, spermatozoïdes et fluide séminal (FS) ont été séparés. Les fécondations avec les spermatozoïdes frais ont été réalisées dans du DIA 532 à la dilution 10<sup>-4</sup> des culots de spermatozoïdes. Les spermatozoïdes ont été congelés en boulettes de 100 µl après dilution des culots par 3 volumes de dilueur de Mounib modifié (Malejac et al., 1990). Les fécondations ont été réalisées 6 mois plus tard, à raison de 1 boulette pour 10 ml de DIA 532 et 10 g d'œufs. La pression osmotique (PO) des FS a été mesurée avec un osmomètre cryoscopique. Les concentrations de 11-ketotestostérone (11KT) et de 17α,20β-OH-P4 (17,20P) dans le plasma sanguin et dans le FS ont été déterminées par RIA selon Fostier et al. (1982) et Fostier et Jalabert (1986). Les concentrations plasmatiques en GtH et en Prolactine (PRL) ont été mesurées selon Breton et al. (1982) et selon Prunet et Houdebine (1984.). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un logiciel STAT-ITCF.

Les valeurs moyennes des 16 variables étudiées sont présentées dans les tableaux 1, 2 et 3. La moitié seulement des variables présente des valeurs individuelles plus dispersées à 6 °C qu'à 13 °C. Cependant, une analyse des composantes principales et l'étude de la distribution des 32 individus dans les 2 plans factoriels met en évidence une plus grande dispersion des caractéristiques individuelles à 6 °C qu'à 13 °C.

L'analyse des corrélations a fait apparaître une absence de relation entre la fécondance après cryopréservation d'une part et le volume, le spermocrite, la PO du FS, les niveaux hormonaux et la motilité initiale des spermatozoïdes dans le DIA, d'autre. Par contre, aux 2 températures, il existe 1) une corrélation positive significative ou hautement significative avec la fécondance du sperme frais, 2) une corrélation positive significative avec la résistance à l'inhibition de la motilité par 10 mM de KCl, 3) une corrélation positive significative avec le maintien de la motilité durant le stockage dans la glace pendant 7 h.

Lors de travaux antérieurs (Maisse et al., 1988; Malejac et al., 1990) nous avons mis en évidence 1) le rôle déterminant de la membrane des spermatozoïdes de Truite dans la réussite de la congélation, 2) l'existence d'une relation entre PO du FS et aptitude à la congélation. Les données

obtenues ici indiquent qu'il existe en outre une relation -dont la nature est inconnue dans l'état actuel de nos connaissances- entre la capacité des spermatozoïdes à ne pas avoir leur motilité inhibée par 10 mM de KCl et leur aptitude à féconder après avoir été congelés. Ces conclusions justifient de tenter de progresser dans la connaissance de la physiologie du spermatozoïde et plus largement, de la physiologie testiculaire. Suite à nos résultats précédents nous avons proposé quelques techniques simples pour évaluer la qualité d'un éjaculat. Cette expérience suggère que l'évaluation de la fécondance du sperme frais après dilution à  $10^{-4}$  et l'estimation de la motilité après dilution dans 10 mM de KCl constituent deux autres tests envisageables.

Tableaux 1, 2 et 3: Valeurs moyennes  $\pm$  SEM des 16 variables étudiées.

| Température | Volume<br>(ml) | Spcrite<br>(%) | PO<br>(mOsm) | Fécond.<br>frais<br>(%) | Fécond.<br>congel.<br>(%) |
|-------------|----------------|----------------|--------------|-------------------------|---------------------------|
| 6 °C        | 9 $\pm$ 5,4    | 27 $\pm$ 10    | 198 $\pm$ 37 | 56 $\pm$ 20             | 23 $\pm$ 16               |
| 13 °C       | 7.2 $\pm$ 4,0  | 29 $\pm$ 3     | 241 $\pm$ 23 | 69 $\pm$ 13             | 23 $\pm$ 19               |

| Température | 11KT<br>(ng/ml) |           | 17.20P<br>(ng/ml) |               | GtH<br>(ng/ml) | PRL<br>(ng/ml) |
|-------------|-----------------|-----------|-------------------|---------------|----------------|----------------|
|             | sang            | FS        | sang              | FS            | sang           | sang           |
| 6 °C        | 34 $\pm$ 11     | 5 $\pm$ 2 | 3 $\pm$ 2         | 0,5 $\pm$ 0,5 | 1,7 $\pm$ 0,7  | 0,7 $\pm$ 0,3  |
| 13 °C       | 17 $\pm$ 12     | 3 $\pm$ 3 | 2 $\pm$ 2         | 0,6 $\pm$ 0,9 | 1,8 $\pm$ 0,5  | 1,1 $\pm$ 0,6  |

| Température | Pourcentage de spermatozoïdes mobiles |             |             |             |             |
|-------------|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|             | to                                    | DIA<br>t+7h | 0mM         | KCl<br>5mM  | 10mM        |
| 6 °C        | 64 $\pm$ 33                           | 44 $\pm$ 26 | 70 $\pm$ 27 | 56 $\pm$ 28 | 7 $\pm$ 9   |
| 13 °C       | 82 $\pm$ 11                           | 43 $\pm$ 30 | 81 $\pm$ 14 | 79 $\pm$ 14 | 22 $\pm$ 21 |

#### Références:

- Breton B., Prunet P. et Renaud P. (1982) Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 18, 753-755.  
 Cosson M.P., Billard R. et Latellier L. (1989) Cell Motil. Cytoskeleton 14, 424-434.  
 Fostier A., Billard R., Legendre M. et Marlot S. (1982) Gen. Comp. Endocrinol. 46, 423-434.  
 Fostier A. et Jalabert B. (1986) Fish Physiol. Biochem. 2, 87-99.  
 Malejac M.L., Loir M. et Maisse G. (1990) Aquat. Living Resour. 3, 43-54.  
 Maisse G., Pinson A. et Loir M. (1988) Aquat. Living Resour. 1, 45-51.  
 Prunet P. et Houdebine L.M. (1984) Gen. Comp. Endocrinol. 56, 49-57.

Remerciements. Nous remercions Mme E. Sambroni et Mr G. Pabœur qui ont aimablement accepté de doser la GtH et la Prolactine dans nos échantillons.

PREPARATION ET PREMIERES DONNEES SUR LA COMPOSITION  
LIPIDIQUE DE LA MEMBRANE DU SPERMATOZOÏDE DE TRUITE ARC EN CIEL  
(*Oncorhynchus mykiss*)

Labbé C., Maisse G., Loir M.

Laboratoire de physiologie des poissons-INRA-Campus de Beaulieu 35 042  
RENNES Cedex

La congélation du sperme de salmonidés présente un intérêt indéniable en aquaculture. La maîtrise de cette technique devrait permettre l'étalement de la production d'alevins, la conservation de souches intéressantes ou la création d'hybrides à période de reproduction différentes. Le développement de la cryoconservation est cependant limité par l'hétérogénéité de la qualité des gamètes après décongélation. Les travaux de MALEJAC *et al.* (1990) ont permis de démontrer un rôle prépondérant de la membrane plasmique dans l'aptitude du sperme à la congélation chez la truite arc en ciel. Par ailleurs, la littérature mammalienne développe le fait que la composition lipidique de la membrane, et plus précisément la composition en phospholipides et en acides gras, affecte la congélabilité des spermatozoïdes (DARRIN-BENNETT and WHITE, 1977). D'autre part, il a été montré que chez le poisson l'alimentation et la température peuvent modifier la composition lipidique des membranes de foie, de muscle ou d'intestin (HAZEL, 1984).

Dans notre étude, nous nous sommes donné pour but de développer une étude de la composition lipidique de la membrane plasmique du spermatozoïde de truite afin d'en déterminer les facteurs de variation en relation avec l'aptitude à la cryoconservation.

Dans un premier temps, nous avons dû mettre au point une technique efficace de préparation de la membrane plasmique. Les différents essais réalisés ont permis l'élaboration du protocole suivant :

Les spermatozoïdes dilués à  $7 \cdot 10^9$  cellules par ml dans un tampon isotonique contenant des inhibiteurs de protéases sont soumis à une pression de 900 PSI d'azote pendant 20 mn dans une bombe à cavitation puis à une décompression brutale provoquant l'éclatement des cellules. Les noyaux et une partie des flagelles sont éliminés par centrifugation sur coussin de sucrose 1 M tandis que la suspension restante est déposée sur un gradient continu de sucrose (1,8 M à 0,25 M) et centrifugée 2 h à 60 000 g. Quatre bandes visibles sont alors obtenues. Elles ont été caractérisées avec les outils suivants :

- dosage des protéines membranaires extraites au désoxycholate et dosage des protéines totales de chaque fraction (kit de dosage PIERCE "BCA Protein Assay Reagent")
- utilisation de marqueurs enzymatiques de la membrane plasmique (5' nucleotidase)(MICHELL et HAWTHORNE, 1965), du cytosol (lactate deshydrogénase)(kit de dosage BOEHRINGER) et des mitochondries (succino deshydrogénase)(GREEN *et al.*, 1955).
- dosage du cholestérol (kit de dosage BOEHRINGER) et des phospholipides (LANZETTA *et al.*, 1979).
- microscopie électronique et électrophorèses en 1 et 2 dimensions

Les trois bandes supérieures contiennent des vésicules membranaires, à l'exclusion de tout autre organite cellulaire, très légèrement contaminées par du cytosol. Le rapport molaire Cholestérol/Phospholipides varie entre 0,59 et 0,70. La quatrième bande contient outre du matériel membranaire de nombreux flagelles (démembrés pour la plupart) et des mitochondries intactes.

Dans un second temps, nous avons mis en place des techniques d'analyse des lipides membranaires extraits selon la méthode de FOLCH (1957) ; les phospholipides sont isolés sur colonne de silice SEP-PAK. La séparation des classes de phospholipides s'effectue par chromatographie d'exclusion en CLHP contre un solvant dont la proportion d'eau varie au cours du temps (de 2,25 % à 5,5 %).

Les premières données obtenues indiquent que l'on récupère ainsi de 4 à 7 % de diphosphatidyl-glycérol, 30 % de phosphatidyl-éthanolamine, 3 % de phosphatidyl-inositol, 10 à 12 % de phosphatidyl-sérine, 50 % de phosphatidyl-choline, 1 % de sphingomyéline et de 0,5 à 1,5 % de lysophosphatidyl-choline. La pureté des fractions obtenues a été vérifiée en chromatographie couche mince. L'analyse des acides gras à l'intérieur de chaque classe de phospholipides s'effectue, après transméthylation des échantillons, par passage en chromatographie phase gazeuse. Là encore des résultats préliminaires indiquent de fortes concentrations d'acide palmitique (16:0) mais surtout une prépondérance d'acides gras polyinsaturés 20:5(n-3) (eicosapentaénoïque) et 22:6(n-3) (docosahexaénoïque).

## BIBLIOGRAPHIE

- DARIN-BENNETT A. et WHITE I. G. (1977) Influence of the cholesterol content of mammalian sperm on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14, 466-470
- FOLCH J., LEES M. et SLOANESTANLEY G. M. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509
- GREEN D. E., MII S. et KOHOUT P. M. (1955) Studies on the terminal electron transport system : I Succinic Deshydrogenase. *J. Biol. Chem.* 217, 551-557
- HAZEL J. R. (1984) Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am. J. Physiol.* 246, R460-470
- LANZETTA P. A., ALVAREZ L. J., REINACH P. S. et CANDIA O. A. (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* 100, 95-97
- MALEJAC M. L., LOIR M. et MAISSE G. (1990) Qualité de la membrane des spermatozoïdes de truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ; Relation avec l'aptitude du sperme à la congélation. *Aquat. Living Resour.*, 3, 43-54
- MICHELL R. H. et HAWTHORNE J. N. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 333-338

## CONTROLE HYPOTHALAMIQUE DE LA SECRETION DE GONADOTROPINE CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL

BAILHACHE T., SALBERT G., GUILLET J.C.\*, BOUJARD D.\*\* , SALIGAUT C., BRETON B.\*\*\*  
et P. JEGO .

Laboratoire de Physiologie des Régulations, URA CNRS 256,

\*Laboratoire de Neurophysiologie, Université de Rennes 1,

\*\*Laboratoire de biologie de la Reproduction, URA CNRS 256,

\*\*\*Laboratoire de Physiologie des Poissons, INRA,

Campus de Beaulieu, 35042 RENNES cedex.

La régulation de la sécrétion de l'hormone gonadotrope chez les Poissons téléostéens a fait l'objet de nombreuses études et les travaux réalisés ces dix dernières années ont montré que la sécrétion de GtH était principalement sous le contrôle d'un facteur stimulateur, le GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) et d'un facteur inhibiteur, le GRIF (Gonadotropin Release Inhibitory Factor) identifié chez quelques espèces (ex; chez le Carassin, GRIF = Dopamine). La régulation de la sécrétion de GtH chez le Carassin, qui est le poisson téléostéen le plus étudié, fait aussi intervenir d'autres neuromédiateurs, par exemple, la noradrénaline et la sérotonine qui exercent un effet stimulateur sur la sécrétion de GtH (CHANG et PETER 1984, SOMOZA et al 1988).

Nous nous sommes attachés, dans un premier temps, à localiser dans le cerveau de truite, de manière plus précise, les différents facteurs réputés intervenir dans le contrôle de la sécrétion de GtH, que ce soit le GnRH ou des neuromédiateurs comme la dopamine, la sérotonine et leurs catabolites.

- La localisation des neurones à GnRH dans le cerveau de Truite a été réalisée par immunocytochimie. Ces neurones qui sont peu nombreux, sont localisés dans les bulbes olfactifs, le télencéphale ventral et l'aire préoptique. La stimulation électrique de ces régions provoque une augmentation de la sécrétion de GtH .

- L'étude de la répartition des monoamines (dopamine, noradrénaline, sérotonine) et de leurs catabolites dans différentes régions du cerveau a été réalisée par une technique de séparation et de dosage par HPLC avec détection électro-chimique. Nous avons pu montrer que les zones de libération active de la dopamine sont l'hypophyse et l'aire préoptique. En revanche, la sérotonine, qui est libérée activement dans l'aire préoptique, est indétectable dans l'hypophyse.

Les effets de l'application du GnRH et de neuromédiateurs au niveau de différents noyaux de l'hypothalamus ou au niveau de l'hypophyse ont été étudiés, dans un deuxième temps. Pour prendre en compte au mieux la particularité du complexe hypothalamo-hypophysaire chez les Poissons, (absence de système porte, innervation plus ou moins directe des cellules hypophysaires) nous nous sommes efforcés d'étudier ces structures à la fois comme un tissu nerveux et comme un tissu endocrine. Nous avons ainsi utilisé des techniques d'études électrophysiologiques et des dosages d'hormones, notamment de la GtH sécrétée par l'hypophyse.

Cette étude a été effectuée *in vitro* de manière à soustraire au mieux la préparation aux rétrocontrôles hormonaux et aux influences sensorielles. La technique de périfusion d'un demi encéphale isolé que nous avons mise au point permet non seulement la maîtrise des facteurs physico-chimiques de l'environnement de la préparation (composition du milieu, température, pH) mais aussi un accès direct aux structures hypothalamiques par des électrodes (d'enregistrement ou de stimulation) et par des micropipettes d'injection.

- En plus de son action comme gonadolibérine lorsqu'il est appliqué à l'hypophyse, le GnRH est capable de stimuler certains neurones hypothalamiques. Pour les neurones du noyau préoptique (NPO), cette stimulation aboutit, d'une part, à l'apparition à ce niveau d'une activité électrique particulière et, d'autre part, à la sécrétion accrue de GtH. Nous avons pu démontrer que la libération de GtH qui fait suite à l'application de GnRH dans le NPO ne résulte pas d'une action directe de GnRH sur l'hypophyse (diffusion à partir du point d'injection) mais est bien le résultat de l'activation de neurones hypothalamiques se projetant vers l'hypophyse. En revanche, l'augmentation d'activité électrique des neurones du Noyau Latéral du Tuber (NLT) après l'injection de GnRH dans ce noyau, n'est pas accompagnée de libération accrue de GtH.

- L'action de la noradrénaline sur la préparation se traduit par une inhibition de l'activité électrique dans le NPO et le NLT. Il s'agit là d'un effet réversible que l'on peut observer à des concentrations aussi faibles que  $10^{-9}$ M. Lorsqu'elle est injectée dans le NPO ou le NLT, la noradrénaline ne modifie pas la sécrétion de GtH par l'hypophyse. Lorsqu'elle est injectée dans l'hypophyse, la Noradrénaline stimule très fortement la sécrétion de GtH.

- Nous avons pu démontrer que la dopamine, lorsqu'elle est appliquée directement à l'hypophyse, exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de GtH, ce qui montre qu'elle exerce effectivement le rôle de GRIF chez la Truite arc-en-ciel.

- Enfin, notre préparation a permis de comparer les sécrétions de gonadotropine et de prolactine, lorsque l'hypophyse est connectée ou déconnectée de l'hypothalamus. D'une manière globale l'hypothalamus exerce une inhibition sur la sécrétion de GtH et une stimulation sur la sécrétion de Prolactine ce qui est exactement la situation inverse de ce qu'on observe chez les mammifères.

## **INFLUENCE DU GABA SUR LA LIBERATION DE GONADOTROPHINE CHEZ LE CYPRIN (*Carassius auratus*)**

O. KAH<sup>☆</sup>, M.G. MARTINOLI<sup>♣</sup>, L. O'TOOLE<sup>\*</sup>, P. DUBOURG<sup>☆</sup>, V.L. TRUDEAU<sup>\*</sup>, B.D. SLOLEY<sup>\*</sup>, J.P. CHANG<sup>\*</sup>, R.E. PETER<sup>\*</sup>. <sup>☆</sup> Lab. Cytophysiologie Fonctionnelle, URA CNRS 339, Talence, France; <sup>♣</sup>Lab. Endocrinol. Moléculaire, CHUL, Québec, Canada; <sup>\*</sup>URA CNRS 651, Nice, France; <sup>\*</sup>Dept. Zoology, U. of A., Edmonton, Canada

La participation du GABA dans les mécanismes de libération de la gonadotrophine hypophysaire (GTH) a été étudiée chez le Cyprin par des techniques morphologiques et physiologiques. Par immunocytochimie, nous montrons que le lobe antérieur de l'hypophyse reçoit de nombreuses fibres GABAergiques dont les terminaisons sont situées à proximité des cellules glandulaires, en particulier les cellules gonadotropes. De nombreux corps cellulaires à GABA ont été détectés dans des territoires cérébraux à compétence neuroendocrinienne, telles que la région préoptique et l'hypothalamus médiobasal. Des mesures effectuées par HPLC, confirment l'abondance du GABA dans ces régions (hypophyse:  $0.68 \pm 0.04$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  protéines; hypothalamus:  $1.40 \pm 0.20$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  protéines). Des injections intrapéritonéales de GABA (10 $\mu\text{g}/\text{g}$ ) à des femelles augmentent les niveaux de GTH plasmatique, mais cet effet n'est significatif que lorsque les animaux sont en période de repos sexuel ou dans les stades précoces de la maturation. Des incubations statiques ou des périfusions de cellules hypophysaires dispersées n'ont révélé aucun effet direct du GABA sur la libération de GTH. Par contre, le GABA stimule de façon dose-dépendante la libération du GnRH par des tranches d'hypophyses *in vitro*. *In vivo*, le GABA provoque une élévation de GTH plasmatique chez les femelles contrôles ou implantées pendant 5 jours à la testostérone, cependant cette réponse est bloquée chez les animaux implantés à l'œstradiol. Des lésions cérébrales induites par le glutamate de sodium suggèrent qu'une partie de l'innervation GABAergique hypophysaire pourrait être originaire du NLT. L'ensemble de ces résultats démontre que le GABA agit sur la sécrétion de GTH en stimulant la libération de GnRH au niveau hypophysaire, action qui paraît être modulée par les œstrogènes, probablement au niveau de l'hypothalamus médiobasal.

## ACTIVITE BIOLOGIQUE IN VITRO DE DIFFERENTS GnRH EN RELATION AVEC LEUR DEGRADATION HYPOPHYSAIRE.

Claudine WEIL, Bernard BRETON, Elisabeth SAMBRONI, Yonathan ZOHAR<sup>1</sup>.

Laboratoire de Physiologie des Poissons, INRA, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex

<sup>1</sup> National Center for Mariculture, IOLR, Eilat, Israël

Dans le but de l'utilisation de la gonadolibérine (GnRH) pour l'induction et la synchronisation des pontes de la truite arc-en-ciel, l'activité biologique des GnRH natifs, mammalien (LHRH) et pisciaire (sGnRH) ainsi que de certains de leurs analogues a été étudiée.

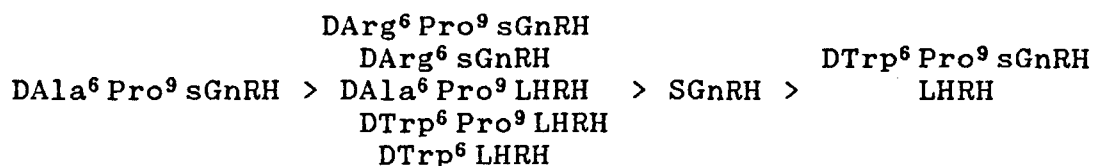
L'activité biologique de ces peptides dépend de leur voie d'administration, de leur affinité pour les récepteurs hypophysaires, de leur dégradation par l'hypophyse et différents organes (foie, rein).

Nous nous sommes particulièrement intéressés au niveau hypophysaire en étudiant l'activité biologique de ces peptides en relation avec leur dégradation à ce niveau.

\* Le test utilisé pour déterminer l'activité biologique des peptides consiste en l'étude de la sécrétion d'hormone gonadotrope (GtH) par des cultures primaires de cellules hypophysaires de mâles spermiantes et de femelles en fin de vitellogénèse, en réponse à des doses croissantes ( $10^{-12}$  à  $10^{-6}$  M) des peptides.

La hiérarchie d'activité trouvée est la suivante :

- la molécule native mammalienne est moins active que la molécule native pisciaire.
- tous les analogues pisciaires sont plus actifs que la molécule native excepté un.
- les analogues de la molécule mammalienne sont plus actifs que la molécule pisciaire native.



\* La résistance à la dégradation des différents GnRH a été étudiée en mettant en présence 20 nanomoles de chacun avec  $1.25 \times 10^6$  cellules hypophysaires provenant de mâles spermiantes et en analysant dans les milieux de culture les produits de dégradation par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Une étude de la cinétique de la dégradation a été effectuée et l'origine (intra ou extra cellulaire) des enzymes responsables de cette dégradation a été recherchée.

Aucune dégradation n'a pu être observée pour les différents analogues utilisés, seul le GnRH pisciaire natif présente une très faible dégradation (détectée par la présence de fragments peptidiques dans le milieu).



Ces résultats indiquent que, chez la truite, l'activité biologique variable des GnRH *in vitro* serait due pour une faible part à une résistance différente à la dégradation mais laissent supposer qu'elle serait due à une affinité différente pour les récepteurs hypophysaires au GnRH.

## INDUCTION ET SYNCHRONISATION DES PONTES PAR DES ANALOGUES DE LA GONADOTROPE RELEASING HORMONE :EFFETS DE LA NATURE DE L'ANALOGUE ET DE SA FORME D'INJECTION

Bernard BRETON, Claudine WEIL, Elisabeth SAMBRONI, Tomasz MIKOLAJCZYK.

Laboratoire de Physiologie des Poissons ,INRA Campus de Beaulieu 35042 Rennes Cedex

En raison de la faible spécificité zoologique des peptides hypothalamiques leur utilisation est de plus en plus fréquente pour moduler les sécrétions hormonales endogènes dans de nombreuses espèces. C'est en particulier le cas pour la gonadotrope releasing hormone (GNRH) qui en stimulant la sécrétion gonadotrope (GTH) est utilisé pour induire et synchroniser les pontes et tend à supplanter les préparations d'origine hypophysaire. En fonction des espèces ce traitement nécessite une ou plusieurs injections (cas des salmonidés) et les résultats restent toujours liés à l'état de maturité des animaux avant traitement. Pour tenter de remédier à ces problèmes nous avons comparé *In vivo* les effets de différents analogues de GNRH injectés sous forme normale (aiguë), et sous forme retard sur la stimulation de la sécrétion gonadotrope et l'induction de l'ovulation chez la truite arc en ciel. Le travail a été réalisé sur une cohorte de 2 ans en première reproduction sans sélection préalable des animaux traités. 10% de la population avait naturellement ovulé au début de l'expérience.

L'utilisation d'une forme commerciale retard du LHRH (Triptoréline = DTrp<sup>6</sup>LHRH) entraîne une stimulation progressive des niveaux de sécrétion gonadotrope qui passent de 6 à 30-60 ng/ml de plasma en fonction de la dose utilisée (50 -12,5 µg/kg). Ils sont maximum entre 5 et 8 jours après l'injection, et restent significativement plus élevés jusqu'à 3 semaines après le début du traitement même avec la dose la plus faible. Il existe une relation dose/effet entre les quantités injectées et les niveaux de GTH plasmatique atteints. Les traitements par des formes aiguës n'induisent au contraire que des stimulations de courte durée qui atteignent leurs maximum entre 3 et 6 heures après injection, le retour aux niveaux de base s'effectuant entre 24 et 48 heures en fonction des produits utilisés. Sur ce type d'activité la hiérarchie peut s'établir comme suit pour les différents analogues testés:

DArg<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>Net-sGNRH > DA1a<sup>6</sup>DesGly<sup>10</sup>Pro<sup>9</sup>Net-LHRH > DTrp<sup>6</sup>-LHRH > DTrp<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>Net-sGNRH > témoin

Dans le groupe témoin les ovulations se produisent progressivement pour atteindre 50% de la population à J<sub>12</sub> et 70% à J<sub>26</sub> en fin d'expérience. Chez les animaux traités par le LHRH forme retard, quelle soit la dose utilisée 60% au moins des animaux ont ovulé à J<sub>5</sub> et 100% entre J<sub>5</sub> et J<sub>8</sub>. Après traitement aigu, le début des ovulations apparaît aussi rapidement qu'après traitement retard, mais quel que soit l'analogue utilisé, après une dynamique d'ovulations cumulées similaire à celle obtenue avec la forme retard (72 à 85% à J<sub>8</sub>), on assiste à un blocage des ovulations qui n'atteignent jamais les 100% de la population. L'un des analogues, le DTrp<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>Net-sGNRH, le moins actif sur la stimulation de la sécrétion gonadotrope, s'est montré totalement inefficace sur l'induction de

l'ovulation. Les différences de réponses entre forme retard et forme aiguë pourraient être partiellement dues à la forme des signaux gonadotropes induits par les 2 types de traitement.

Les pourcentages de fécondation, mesurés par les taux d'embryonnement au stade oeillé, ne sont pas significativement différents entre animaux ayant ovulés naturellement et animaux induits.

En conclusion la forme retard de GNRH s'avère être plus efficace que la forme aiguë. Elle a permis d'induire et grouper les ovulations à 100% sans sélection préalable des animaux à traiter, elle permet donc apparemment de résoudre les problèmes posés au début de ce texte. Cependant la forme commerciale utilisée (Triptoréline Beaufour), destinée à un usage thérapeutique humain présente des caractéristiques qui en font un produit coûteux pour usage vétérinaire surtout pour des animaux à faible fertilité comme les salmonidés; c'est pourquoi nous cherchons à développer une forme plus spécifiquement adaptée à cet usage à partir d'un support éthylène vinyl acétate "EVAC" et du DA1a<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>Net-sGNRH pour lequel la péréquation coût de synthèse/ activité sur la fonction gonadotrope paraît la meilleure. Un coût de traitement plus faible pourrait être aussi recherché en diminuant les doses utilisées.

## REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DE LA GTH-II CHEZ L'ANGUILLE.

B. Quérat, M. Jutisz, Y.A. Fontaine et R. Counis.

Chez l'anguille au stade argenté, l'oestradiol (E2) stimule la synthèse de l'hormone gonadotrope GTH-II. Afin d'étudier les mécanismes de cette stimulation, nous avons constitué une banque de cDNA à partir d'ARNm issus d'hypophyses d'anguilles et clone les cDNA des deux sous-unités de la GTH-II. Nous les avons utilisés comme sondes, ainsi que celui du récepteur de E2 de truite, pour mesurer les taux des mRNA correspondant après divers traitements stéroïdiens.

L'E2 augmente très fortement et de façon dose dépendante le taux des mRNA pour les sous-unités alpha et beta de la GTH-II. Cet effet est observable dès 2 jours après l'implantation et atteint son maximum après 2 semaines. Une évolution similaire est observée pour le mRNA du récepteur de l'E2. La testostérone qui semble ne pas avoir d'effet propre, potentialise l'effet de E2, probablement en stimulant la synthèse du récepteur de l'E2.

**Liaison de vitellogénines de poissons et oiseau avec des récepteurs ovocytaires spécifiques homologues et hétérologues.**

F. LE MENN et J. NUNEZ RODRIGUEZ

Groupe Reproduction Poissons, Laboratoire de Biologie Marine, Université de Bordeaux I, 33405 Talence Cedex.

Des liaisons spécifiques de vitellogénine (VTG) de truite (*Salmo gairdneri*), d'esturgeon (*Acipenser baeri*), de carpe (*Cyprinus carpio*), de poisson rouge (*Carassius auratus*) et de poule (*Gallus domesticus*) avec des récepteurs solubilisés ou non d'ovocytes de poule et de saumon (*Onchorhynchus kisutch*) ont été mis en évidence.

Une approche qualitative a été réalisée en incubant des électrotransferts sur nitrate de cellulose d'électrophorogrammes de récepteurs solubilisés de poule ou de saumon, avec de la VTG iodinée de truite. Une liaison spécifique identifie un récepteur ovocytaire de poule migrant à 96 kDa et un récepteur ovocytaire de saumon migrant à 100 kDa, la liaison avec la VTG iodinée de truite étant totalement éteinte par compétition avec une quantité 50 fois plus élevée de la même VTG froide.

Une approche quantitative a été faite par incubation *in vitro* de préparations membranaires de poule ou de saumon, non solubilisées, avec de la VTG iodinée de truite.

Les tests de saturation de préparations ovocytaires de saumon avec de la VTG iodinée de truite (Fig. 1) révèlent chez ce poisson la présence de récepteurs de la VTG d'un kd apparent de  $1,8 \times 10^{-7}$  M.

Des tests de compétition de différentes VTG de poissons ont été effectués dans le système récepteurs ovocytaires de poule-VTG iodinée de truite (Fig. 2)

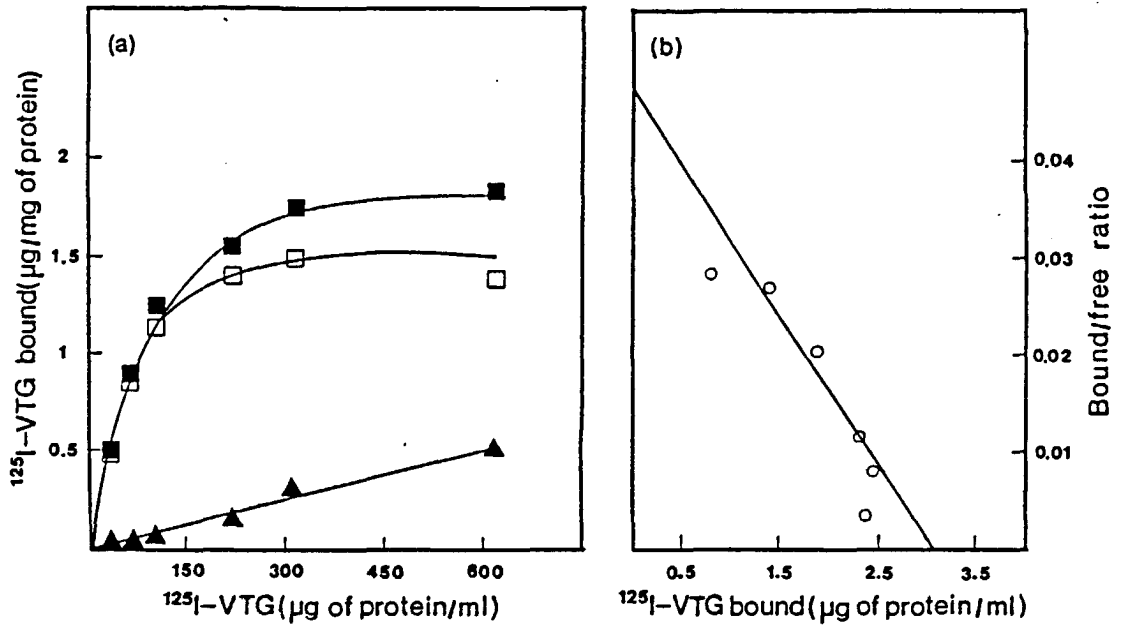


Fig. 1 - Liaison de VTG iodinée de truite à des préparations ovocytaires non solubilisées de saumon.

a) le milieu d'incubation contient 165  $\mu\text{g}$  de protéines membranaires ovocytaires de saumon pour un volume total de 100  $\mu\text{l}$ . Chaque tube contient 43 cpm/ $\mu\text{g}$  de VTG en absence (■) ou en présence (▲) de 5 mM de suramine. Liaison spécifique (□).

b) Transformation de Scatchard des données précédentes.

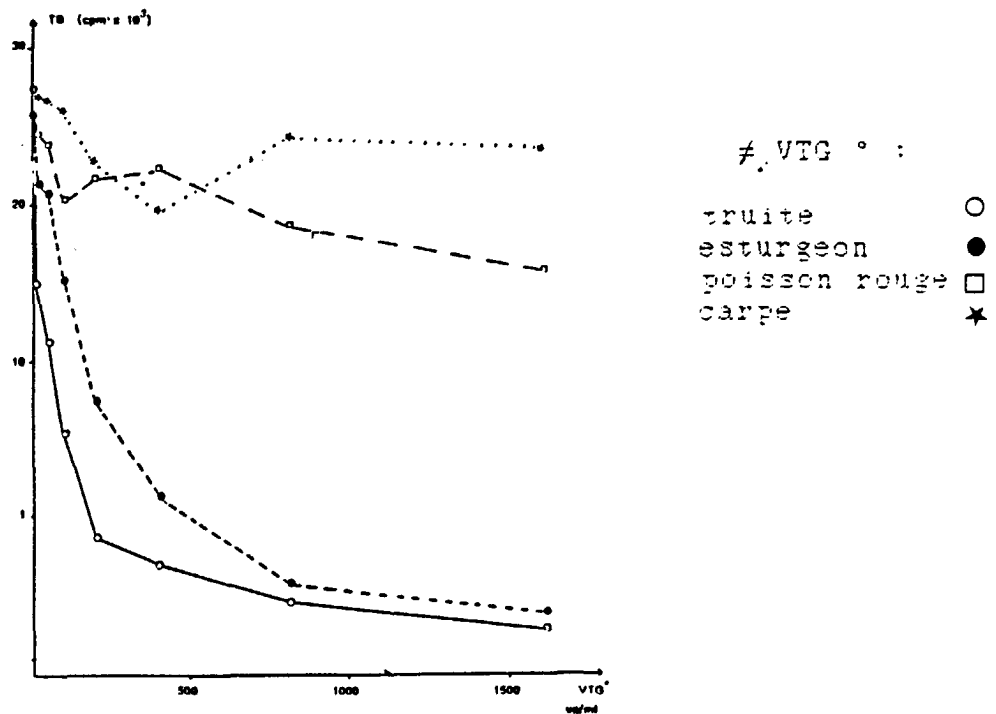


Fig. 2 - Compétition de différentes VTG de poissons avec la VTG iodinée de truite liée à des préparations membranaires ovocytaires non solubilisées de poule.

Les doses des compétiteurs froids sont 45 fois supérieures à celle de la VTG iodinée.

# ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UN ADNc COMPLET DU RECEPTEUR DES ŒSTROGENES (RE) CHEZ LA TRUITE. ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARNm RE DANS LE FOIE ET MISE EN EVIDENCE DANS D'AUTRES ORGANES.

F. PAKDEL<sup>1</sup>, S. FEON<sup>1</sup>, F. LE GAC<sup>2</sup>, F. LE MENN<sup>3</sup> et Y. VALOTAIRE<sup>1</sup>.

1. Laboratoire de Biologie Moléculaire. U.R.A. 256 C.N.R.S.

2. Laboratoire des Physiologie des Poissons  
Université de RENNES I. Campus de Beaulieu - 35042 RENNES Cédex.

3. Laboratoire de Biologie Marine  
Institut de Biologie Animale des Facultés  
33405 Talence Cédex.

## I - Isolement et caractérisation.

L'ADNc complet RE chez la truite a été isolé à partir d'une banque hépatique de truite femelle réalisée dans  $\lambda$ gt<sub>10</sub> criblée avec l'extrémité 5' d'un premier ADNc incomplet précédemment isolé.

La séquence en acides aminés correspondant à l'ADNc complet a été comparée à celle des récepteurs des œstrogènes du Xénope, du poulet et de l'homme. Cette séquence varie de 574 acides aminés chez la truite à 595 chez l'homme. Suivant la nomenclature de Krust *et al.*, les séquences protéiques sont divisées en six régions A, B, C, D, E et F.

. La région C (liaison à l'ADN) montre une homologie de 92 à 93 % ; dans ce domaine, les neuf cystéines et tous les acides aminés basiques, à l'exception du résidu arginine (193), sont remarquablement conservés. Ces résidus, susceptibles de lier les ions Zn<sup>++</sup> et de former des boucles (doigts de zinc), sont indispensables à l'interaction des récepteurs avec l'ADN.

. La région E (liaison de l'hormone) est moins bien conservée chez la truite (58-62 %). Cependant, cette longue région (> 250 acides aminés) montre deux séquences (329-450) et (486-546) qui présentent une homologie plus importante (71 et 83 % respectivement).

. Au niveau des régions B, D et F, où la conservation est moins bonne chez les autres espèces, on observe une homologie encore plus faible chez la truite. On note également l'absence de région A chez la truite (37 acides aminés). Cette région de fonction non déterminée est bien conservée chez les autres espèces.

L'ADNc complet a été transcrit en ARN par l'intermédiaire du promoteur T<sub>7</sub> du plasmide Bluescript et traduit en lysat de réticulocytes de lapin. L'analyse des produits de traduction, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, met en évidence une protéine majoritaire de 63-65 KD,

ce qui correspond à une masse moléculaire en accord avec les 574 acides aminés. Les propriétés de liaison aux œstrogènes ont également pu être déterminées. La liaison avec l'œstradiol tritié est spécifique et déplaçable par E<sub>2</sub> et le diéthylstilbestrol. Par contre, la testostérone et le cortisol ne sont pas compétitifs.

La constante de dissociation K<sub>d</sub> = 5 nM a été déterminée par la méthode de Scatchard et est compatible avec les valeurs trouvées *in vivo*.

## **II - Expression du gène rtER *in vivo* et corrélation avec l'expression du gène vitellogénine dans le foie.**

La sonde spécifique nous a permis de détecter la présence de deux messagers dans le foie de truite (3,5 et 4,5 kb), tous les deux sous le contrôle des œstrogènes (leur niveau est multiplié par un facteur 8, 24 h après l'injection d'œstradiol). Ces deux ARNm sont présents dans le foie des truitelles dès l'éclosion et leur induction est parallèle à celle de l'ARNm vitellogénine.

La détermination du taux des ARNm rtER, après injection d'œstradiol chez des mâles adultes, montre que l'induction du récepteur nucléaire et de son ARNm est transitoire et les animaux retrouvent leur niveau de base après deux semaines. Ce résultat est différent de ceux obtenus chez le xénope et le poulet qui conservent un taux élevé de récepteurs plusieurs mois après l'induction. Cependant, chez la truite, un effet mémoire relatif à l'expression du gène vitellogénine au cours d'une seconde stimulation est pourtant observé. Cet effet n'apparaît donc pas lié directement à un taux élevé de récepteur au moment de la seconde stimulation.

## **III - Expression du gène rtER dans d'autres organes.**

Nous avons également commencé à rechercher la présence du messenger rtER dans différents organes cibles potentiels des œstrogènes. Les résultats d'hybridation par la technique de Northern blot mettent en évidence un messenger de 3,5 Kb dans l'hypophyse, l'hypothalamus et les gonades mâles immatures. Un deuxième messenger, assez abondant, de 1,4 Kb est également mis en évidence avec la sonde entière. Par contre, l'hybridation préférentielle avec l'extrémité 5' contenant le domaine de liaison à l'ADN et l'absence de signal avec l'extrémité 3' contenant le domaine de fixation de l'hormone montre que ce messenger code pour une protéine incapable de lier l'œstradiol.



ETUDE DE L'ARN MESSAGER DU RECEPTEUR AUX OESTROGENES DANS L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL (ONCORHYNCHUS MYKISS).

G. SALBERT\*, P. LE GOFF\*\*, P. JEGO\*, Y. VALOTAIRE\*\*.

Laboratoires de Physiologie des Régulations\* et de Biologie Moléculaire\*\*, URA CNRS 256; Campus de Beaulieu; 35042 RENNES CEDEX.

INTRODUCTION

Grâce à l'ADNc du récepteur aux oestrogènes (rtER), nous avons pu étudier l'expression du gène dans différents tissus-cibles. Deux approches ont été utilisées: une approche par Northern ou slot blots, permettant la caractérisation du ou des messagers ainsi que leur quantification; et une approche par hybridation "in situ", permettant la localisation précise des cellules exprimant le gène du récepteur dans ces tissus-cibles hétérogènes que sont l'hypophyse et l'hypothalamus.

RESULTATS

Par la technique de Northern blot, nous avons mis en évidence, dans l'hypophyse et l'hypothalamus, un messenger de 3.5 kb analogue à celui détecté dans le foie, ainsi qu'un messenger de 1.4 kb, abondant dans l'hypophyse mais absent de l'hypothalamus. Grâce à des hybridations contre différents fragments de l'ADNc récepteur, nous pouvons avancer l'hypothèse d'un ARNm rtER tronqué de 1.4 kb, et comprenant les domaines B, C et D du récepteur (figure 1).

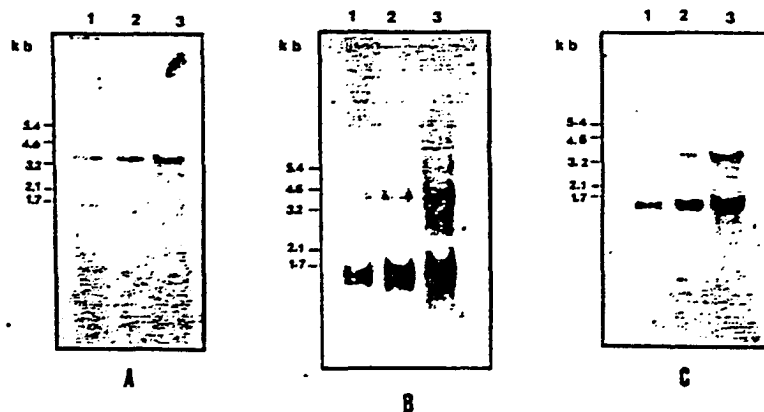


Figure 1: Hybridation de quantités croissantes d'ARN polyA+ d'hypophyse (1,2,3), contre différents fragments de l'ADNcrtER (A: Domaine E, B: Domaine B, C: Domaines C et D).

Des résultats préliminaires (en Northern blot) laissent penser que ce messenger tronqué serait absent de la RPD, et présent en plus grande quantité dans la PI que dans la PPD; l'ARNm 3.5 kb serait lui aussi absent de la RPD et en quantités voisines dans la PPD et la PI. Afin de confirmer et visualiser ces résultats, nous avons utilisé, en hybridation "in situ", une sonde ARN complémentaire de l'ARNm et couvrant 350 bases du domaine E. Les résultats obtenus montrent (figure 2) que les taux de messenger rtER sont indétectables dans les follicules à Prolactine de la RPD, et identiques entre la PI et la PPD.



## INTERACTION ENTRE STEROIDOGENESE ET SPERMATOGENESE DANS LE TESTICULE DE SALMONIDE.

F. Le Gac, Y. Valotaire, A. Fostier avec la collaboration technique de M. Ollitrault, C. Cauty, et M. Hedorff

Chez les poissons, on ignore comment les cellules somatiques (et en particulier les cellules stéroïdogènes) interviennent dans la régulation du déroulement de la spermatogenèse et dans la qualité des gamètes qui en résultent.

Le but de cette étude était d'apporter des données de base sur la stéroïdogenèse testiculaire au cours du cycle reproducteur chez les salmonidés et sur l'intervention possible de certains stéroïdes sur le développement de la spermatogenèse et/ou de la spermiation.

I° Analyse des concentrations de stéroïdes intratesticulaires aux différents stades de la spermatogenèse : Elle a été effectuée sur des saumons atlantiques élevés en mer - 5 à 10 animaux/ stade - détermination histologique des stades - extraction des gonades ; séparation par chromatographie LH20 et dosage radioimmunologique des stéroïdes.

RESULTATS: Chez 5 animaux "immatures" (lobules plus ou moins structurés, gonies A présentes), les concentrations intragonadiques de testostérone (T), Oestradiol (E2), 17 $\alpha$ -hydroxy, 20 $\beta$ -dihydroprogesterone (17 $\alpha$  20 $\beta$ ) libres étaient relativement élevées. Seule la 11-kétotestostérone (11 KT) était basse.

Au cours de la gamétogenèse : la testostérone, basse au début de la méiose (st 3), atteint ses niveaux maximum pendant la spermiogénèse (st 6) ; puis baisse jusqu'à la spermiation. La 11-kétotestostérone, présente pendant toute la gamétogenèse, s'élève nettement pendant la spermiogénèse (st 6) ; puis reste stable jusqu'à la spermiation (mais continue de s'élever dans le plasma sanguin jusqu'au stade 8).

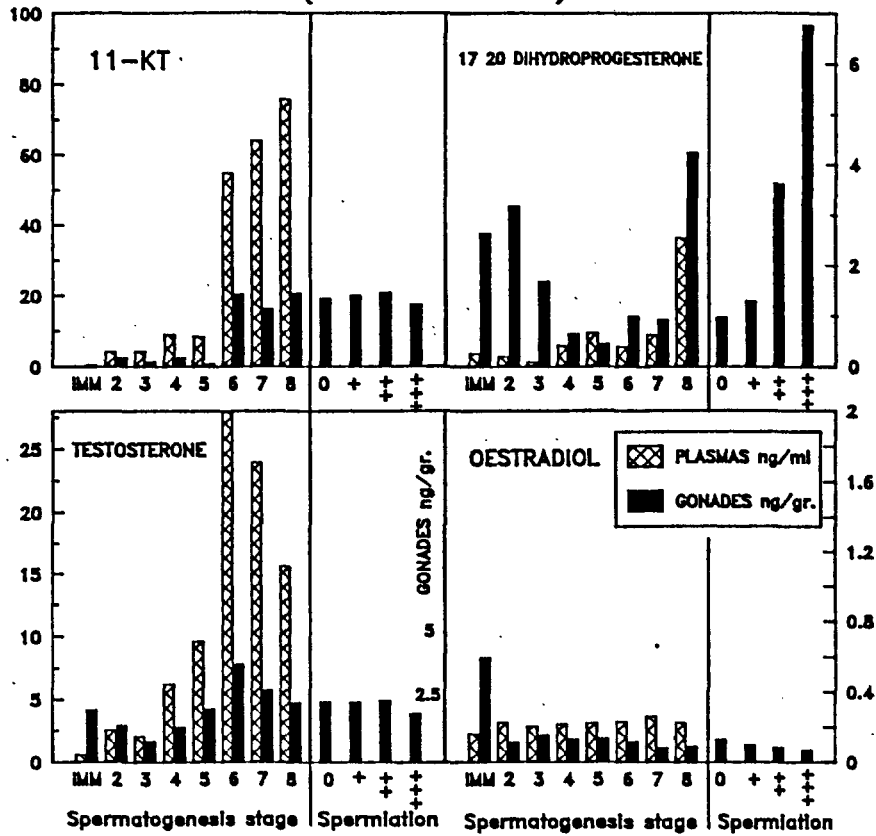
L'Oestradiol est présent en concentrations basses et stables pendant toute cette période. La 17 $\alpha$ -hydroxy, 20 $\beta$ -dihydroprogesterone, présente en concentrations assez élevées au tout début de la gamétogenèse (multiplication des gonies B, début de méiose, st1, 2 et 3), puis basses pendant les stades 4 à 7 (fin méiose et spermiogénèse) s'élève à nouveau brutalement quand il n'y a plus que des spermatozoïdes dans les gonades (st 8). Pendant le début de la spermiation, les concentrations intragonadiques et plasmatiques de 17 $\alpha$ -hydroxy, 20 $\beta$ -dihydroprogesterone s'élèvent simultanément et corrélativement aux volumes de sperme émis.

II° Expression du gène du récepteur à l'Estradiol (RE2) dans le testicule de truite :

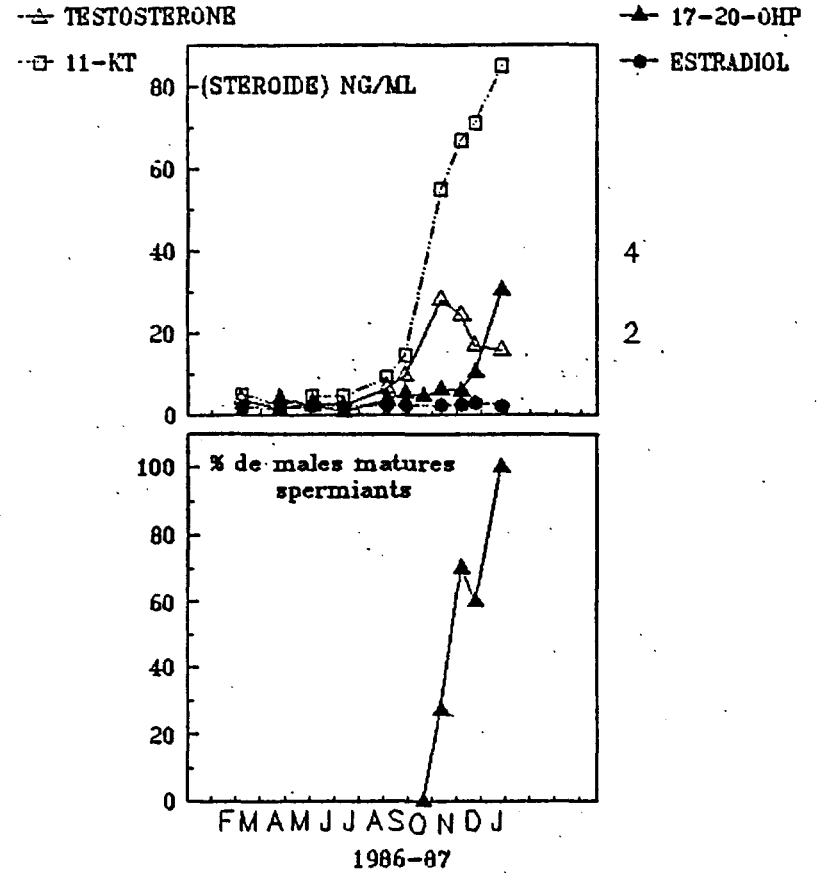
Afin de vérifier le rôle intragonadique potentiel de l'E2 nous avons recherché le RNA messager du RE2 dans des gonades à différents stades. A l'aide d'une sonde moléculaire homologue spécifique (rtRE2 cDNA, Pakdel et al.1990) et de techniques de "Northern blot", nous avons mis en évidence l'expression du gène RE2 à un stade précoce du développement testiculaire (stade qui présente les plus fortes concentrations d'E2 et où nous avons mis en évidence une activité aromatasase (Fostier et Le Gac, 1987)). A l'aide des techniques habituelles d'extraction des mRNA, ce messager n'a pas été retrouvé à des stades avancés de la spermatogenèse.

Conclusion Le rôle et le mécanisme d'action des stéroïdes étudiés devrait donc être particulièrement envisagés pendant l'organisation précoce du testicule (E2?) ; ou à des périodes précises de la gamétogenèse : multiplication goniales, début de méiose (T, 17 $\alpha$ -20 $\beta$  OHP?) ; spermiogénèse et initiation de la spermiation (T et 11KT) ; amplification de la spermiation (17 $\alpha$ -20 $\beta$  OHP).

STEROIDS CONCENTRATION DURING VARIOUS SPERMATOGENIC STAGES  
( F. Le Gac et al.)



VARIATION DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE STEROIDES EN FONCTION DE LA DATE



# RELATIONS ENTRE CELLULES STEROIDOGENES ET CELLULES GERMINALES DANS LE TESTICULE DE ROUSSETTE (*SCYLIORHINIUS CANICULA*).

D. H. GARNIER et P. SOURDAINE

Groupe d'Etude de la Reproduction chez le Mâle, URA CNRS 256, Université de Rennes I

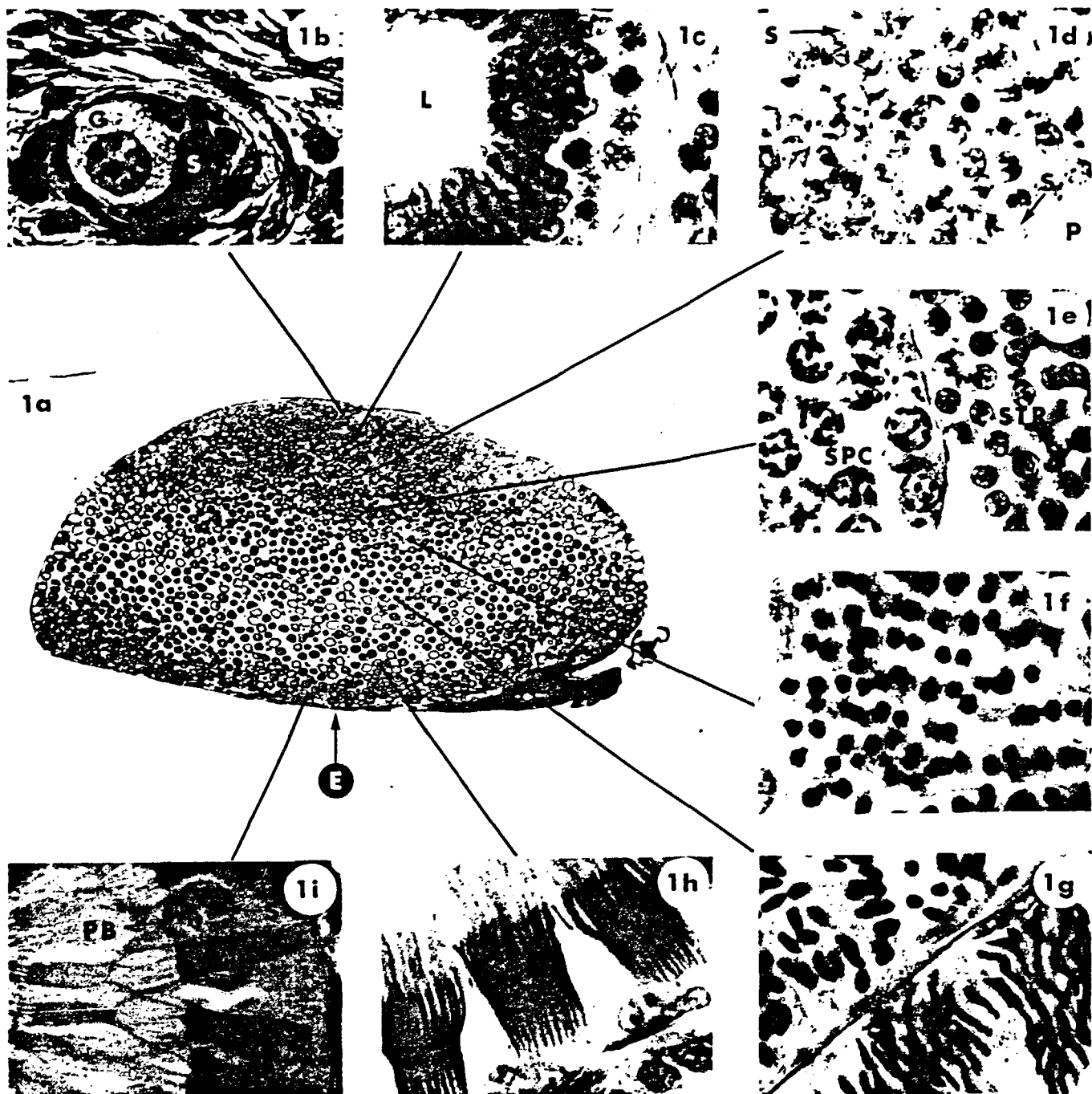
Parmi les mécanismes régulant l'activité testiculaire, un élément important intervient dans le contrôle de la gamétogenèse : les interactions entre les différents types de cellules dans la gonade. Cet aspect est souvent très difficile à aborder étant donné la grande complexité de structure du testicule dans la plupart des espèces.

En effet, cet organe est composé de populations de cellules très variées : cellules germinales aux différents stades de leur différenciation et cellules de soutien (de type cellules de Sertoli) dans les tubules séminifères, cellules peritubulaires, et enfin cellules stéroïdogenes (type cellules de Leydig) dans le tissu interstitiel.

Nous avons choisi de travailler sur la roussette (*Scyliorhinus canicula*) car chez les Sélaciens l'organisation des testicules présente des caractères originaux qui peuvent faciliter l'étude de ces interactions *in vivo* et *in vitro*. En effet, comme l'ont montré plusieurs études (Mellinger, 1965; Collenot, 1969), le testicule de roussette est composé de lobules séminifères clos, eux-mêmes formés d'une cellule de Sertoli associée à des cellules germinales à un stade donné de la spermatogenèse qui s'y déroule de façon synchrone. Le mouvement des lobules, de la partie germinative dorsale vers la partie ventrale du testicule au cours de la spermatogenèse, provoque une zonation (Fig.1) de cet organe permettant de séparer des fragments (ou "zones") où des cellules germinales à un stade donné du développement spermatogénétique sont associées aux cellules somatiques.

Dans un premier temps et dans le cadre du contrat accordé par le GCS/BBA 1987, nous avons entrepris d'étudier l'évolution saisonnière des taux de stéroïdes plasmatiques et testiculaires chez des roussettes mâles. La testostérone (T), est le stéroïde le plus abondant dans le plasma comme dans le tissu testiculaire. Ses concentrations varient fortement au cours de l'année : de 5-6 ng/ml à plus de 20 ng/ml dans le plasma (Fig. 2); de 50 à 300 ng dans le testicule (Fig.3). La D.H.T., présente en quantités très inférieures dans le testicule (de 1 à 10 ng), fluctue de la même façon que la T. Les niveaux d'androstènedione ( $\Delta$ ) sont également supérieurs en février ( $\approx$  45 ng/testicule) par rapport à ceux de janvier et avril ( $\approx$  20 ng/testicule) De plus, et à la différence de T, cette hormone présente un pic très important ( $\approx$  100 ng/testicule) en septembre. Les niveaux de progestérone (P) sont significativement élevés en novembre ( $\approx$  100 ng/testicule), ils redescendent en décembre simultanément à l'augmentation de ceux de T. Les taux plasmatiques de  $\Delta$  et de P sont relativement faibles (0,1 à 0,9 ng/ml). L'oestradiol 17  $\beta$  est présente dans le testicule en quantités supérieures de novembre à février ( $\approx$  3 ng) à celles observées de mars à octobre ( $\approx$  1,5ng). Ses taux plasmatiques ( $\ll$  0,1 ng/ml) ne semblent pas varier au cours du cycle. D'autres stéroïdes : 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ diol, 17 $\alpha$ -hydroxy,20 $\beta$ -dihydroprogesterone, 11-cétotestostérone et oestrone sont présents dans le testicule et dans le plasma à des taux très faibles. Le contenu des ampoules séminales en spermatozoïdes est significativement plus élevé de mars à mai ( $1278 \pm 94,2 \cdot 10^6$  spz) et en août ( $1180 \pm 149 \cdot 10^6$  spz) qu'aux autres périodes (700 à  $900 \cdot 10^6$  spz).

Cependant de telles données ne reflètent pas la répartition précise des concentrations de ces hormones à l'intérieur de la gonade. Plusieurs études effectuées chez *S. canicula* (Collenot et Ozon, 1964) et chez une espèce voisine, *Squalus acanthias* (Holstein, 1969; Callard et al, 1985) ont montré que des activités



**Fig. 1 : Architecture du testicule chez la Roussette adulte (*S. canicula*)**

**A** : Section transversale de testicule (X6). Noter la zonation de l'organe correspondant aux divers stades de la spermatogenèse du haut de la section à l'organe épigonal et la structure lobulaire. **B** : unité constituée d'une spermatogonie (G) et de cellules de Sertoli (S) entourée par des fibroblastes (X800). **C** : lobules à spermatogonies. Noter la localisation adluminaire (L) des noyaux de cellules de Sertoli (S) (X700). **D** : Lobule à spermatogonies montrant des noyaux de cellules de Sertoli en position à la fois adluminale et périphérique (X700). **E** : lobules contenant des spermatocytes primaires (SPC) à gauche et des spermatides rondes (STR) à droite. Au stade pachytène tous les noyaux de cellules de Sertoli ont migré à la périphérie de lobules (X700). **F à I** : lobules contenant des spermatides à différents stades de la spermiogenèse. Noter, dans le stade le plus avancé, la présence d'un grand corps protéique (CP) adjacent aux noyaux sertoliens (X700). (D'après Sourdain & Jégou, Cell Tiss. Res., 1998, 255, 199-207.

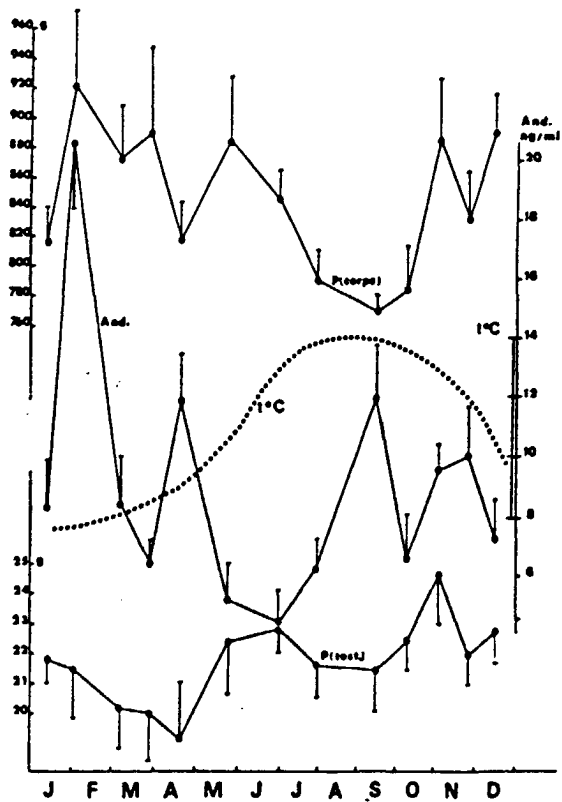


Figure 2 : Evolution des taux d'androgènes plasmatiques et des poids corporels et testiculaires chez la roussette mâle au cours du cycle annuel.

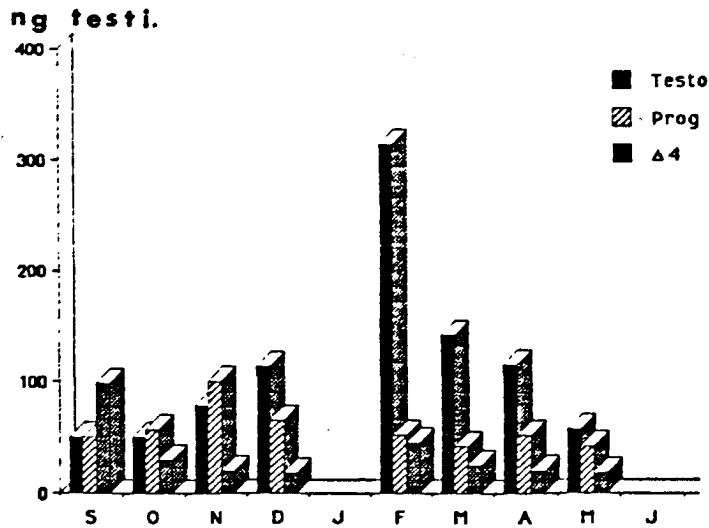


Figure 3 : Evolution des contenus testiculaires en Testostérone, Progesterone et Androstenedione chez la roussette mâle au cours du cycle annuel.

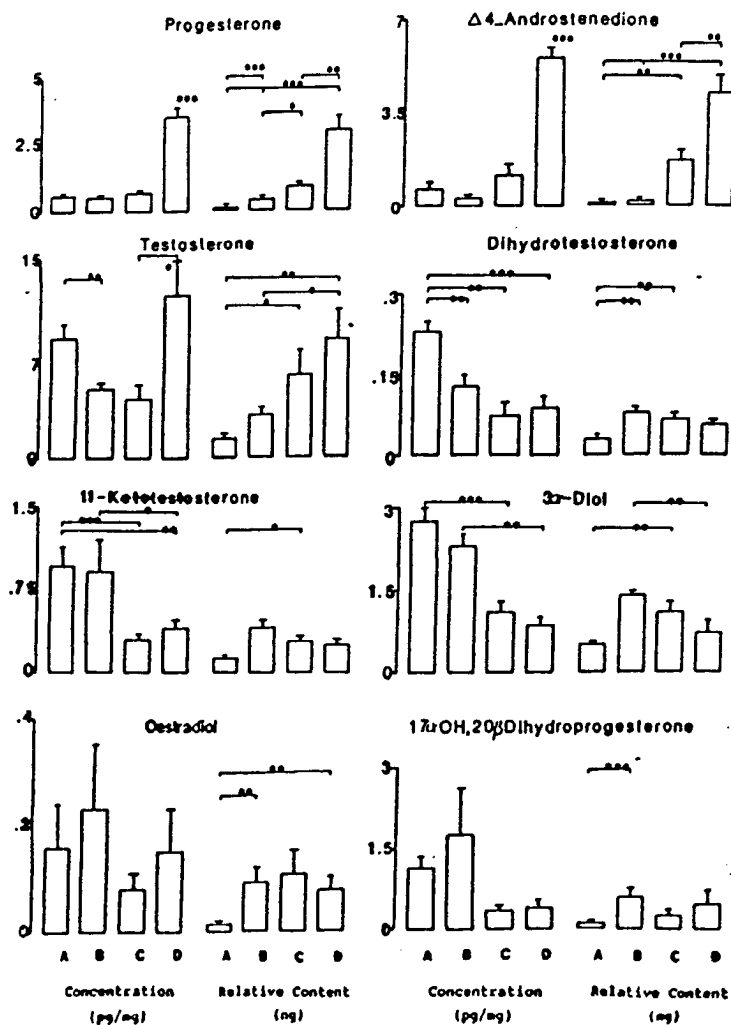


Figure 4 : Variations des stéroïdes en fonction de la "zone" testiculaire

enzymatiques liées à la stéroïdogénèse ( $17\alpha$ -hydroxylase, aromatasé, ...) varient en fonction des différentes zones du testicule. De plus, dans le testicule des adultes de ces espèces, les stéroïdes sont essentiellement produits par les cellules de Sertoli (Collenot, 1969; Pudney et Callard, 1984) ce qui fait de ce matériel un modèle particulièrement intéressant pour étudier les interactions cellules germinales - cellules de Sertoli et stéroïdogénèse. Notre analyse hormonale a donc été effectuée en fonction de la structure particulière du testicule de roussette afin de voir si le voisinage de cellules germinales à divers stades influe sur la stéroïdogénèse. Divers stéroïdes sexuels ont été dosés dans 4 zones particulières du testicule : zone A (lobules contenant des spermatogonies); zone B (spermatocytes); zone C (jeunes spermatides); zone D (spermatides âgées). Nos résultats indiquent que les stéroïdes sont présents dans toutes ces zones mais que les quantités d'un même stéroïde sont très variables selon la zone considérée (Fig.4).

La concentration en stéroïdes des diverses "zones" est intéressante à analyser. Cependant, étant donné que la structure de base du testicule de roussette est le lobule séminifère et que le nombre de lobules est très différent suivant les zones, il nous a semblé nécessaire de rapporter nos résultats de dosage à une unité arbitraire intégrant ce paramètre. Nous avons donc affecté un coefficient à chaque zone en vue d'obtenir le "contenu relatif" de chaque zone en stéroïde. Le coefficient 1 a été attribué à la zone B qui possède le plus petit nombre de lobules par unité de surface; le coefficient des autres zones correspond au rapport du nombre de lobules comptés dans cette zone à celui de la zone B. Ce mode d'expression revient, en fait, à estimer les quantités de stéroïdes testiculaires présents par cellule de Sertoli. Les résultats de cette étude (Fig.4) indiquent que les concentrations et surtout les contenus relatifs de P,  $\Delta$ , et T sont supérieurs dans les zones en fin de spermiogénèse. Au contraire, les concentrations de DHT, de 11-KT et de  $3\alpha$ -diol sont plus élevées dans les zones de mitose et de méiose.  $E_2$  et  $17\alpha,20\beta$ -P ne varient pas en fonction des zones.

En conclusion l'analyse de l'ensemble de nos résultats chez la roussette laisse supposer que les cellules germinales influent sur la stéroïdogénèse des cellules de Sertoli.

Depuis la fin de ce contrat, nous nous sommes attachés à réaliser cette étude au niveau des lobules eux-mêmes. Pour cela nous avons entrepris la mise au point d'isolement de façon routinière des divers catégories de lobules à partir des zones A, B, C et D. L'étude du contenu en stéroïdes de ces lobules et leur comportement en incubation *in vitro* est d'ores et déjà commencée et devrait nous permettre de mieux comprendre les interactions entre cellules germinales et cellules somatiques (en particulier cellules stéroïdogènes) et leur influences réciproques.

## Bibliographie

- CALLARD G.V., PUDNEY J.F., MACK P., CANNICK J.A., (1985). Stage-dependant changes in steroïdogenic enzymes and estrogen receptors during spermatogenesis in the testis of the dogfish, *Squalus acanthias*. Endocrinology, **117**, 1328-1335.
- COLLENOT G., (1969). Apparition et évolution de l'activité endocrine du testicule de *Scyliorhinus canicula* L. (Elasmobranch). Ann. Embryol. Morph., **2**, 461-477.
- COLLENOT G., OZON R., (1964). Mise en évidence biochimique et histochimique d'une  $\Delta^5-3\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase dans le testicule de *Scyliorhinus canicula*. Bull. Soc. Zool. France, **89**, 577-587.
- HOLSTEIN A.F., (1969). Zur Frage der lokalen steuerung der spermatogenese beim dornhai (*Squalus acanthias*). Z. Zellforsch., **93**, 265-281.
- MELLINGER J., (1965). Stades de la spermatogénèse chez *Scyliorhinus canicula* (L.) ; Description, données histochimiques, variations normales et expérimentales. Z. Zellforsch., **67**, 653-673.
- PUDNEY J., CALLARD G.V. (1984). Identification of Leydig-like cells in the testis of the Dogfish *Squalus acanthias*. Anat. Rec., **209**, 323-330.



DEVENIR METABOLIQUE DE LA 17 $\alpha$ -METHYLTESTOTERONE  
CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL

J.P. CRAVEDI

Laboratoire des Xénobiotiques, INRA - Toulouse.

---

La production de populations monosexes femelles présente de nombreux avantages en truiticulture. Elle permet d'éviter les retards de croissance, le mauvais indice de consommation et l'importante mortalité qui caractérise les mâles. La masculinisation d'une première génération de truites femelles, obtenue grâce à l'administration de 17 $\alpha$ -méthyltestostérone (17 MT) au cours des trois premiers mois d'alimentation, conduit à une population phénotypiquement mâle mais génotypiquement femelle. L'utilisation du sperme de néomâles pour la fécondation conduit ensuite à des populations exclusivement femelles.

Avant de pouvoir utiliser la 17 MT en pisciculture, il importe de connaître le métabolisme de cette hormone et plus particulièrement la durée de vie et la nature des résidus susceptibles de persister dans les tissus. La littérature ne fournit que peu d'informations sur le devenir de la 17 MT chez le poisson, et en particulier aucune donnée concernant les biotransformations de cette hormone chez la truite. Compte tenu du délai entre la fin du traitement hormonal et le moment où ces animaux sont consommés, il semble peu probable que des résidus quantifiables d'hormones ou de substance active en dérivant puissent être détectés. Néanmoins l'analyse de ces résidus n'a jamais été abordée. D'autre part, la 17 MT administrée dans l'aliment à faible dose durant la phase de croissance, et au moins jusqu'au poids classique d'abattage (180 g), présente des propriétés anabolisantes importantes (+ 20 à 40 %) qui font craindre une utilisation clandestine de cette substance.

Nous avons donc entrepris l'étude du métabolisme de la 17 MT chez la TAC en administrant une dose unique de [<sup>14</sup>C]-17 MT (40  $\mu$ g, 126.8 KBq) à des animaux de 140 g environ.

L'étude du bilan métabolique a permis d'établir que 24 h. après le traitement, 26,3 % de la radioactivité ingérée se trouvait encore dans l'animal, cette valeur passant à 23,1 % au bout de 72 h. Respectivement 22 et 0,5 % de la radioactivité excrétée est retrouvée dans les matières fécales et l'urine. La plus grande partie est éliminée dans l'eau de l'aquarium via les branchies.

Aucune trace de 17 MT inchangée n'a été retrouvée dans les tissus après 48 h. (tableau I). Les concentrations maximales de  $^{14}\text{C}$  dans la bile sont 200 à 2000 fois supérieures à celle des autres tissus (tableau II). Cette radio-activité est totalement associée à des glucuronides dont la partie aglycone serait pour l'essentiel des triols dérivés de la méthyltestotérone. Dans l'eau de l'aquarium, ce sont surtout des métabolites libres, probablement des androstane-diols, que l'on trouve. Pour ce qui concerne les tissus, les métabolites hépatiques correspondent principalement à des glucuronides alors que le muscle est bien plus riche en métabolites libres.

Ces résultats montrent l'étendue de la biotransformation de la 17 MT et permettent de penser que chez la truite les voies de métabolisation de ce stéroïde sont multiples.

Tableau I - Résidus de 17 MT inchangée (ppb) dans les tissus de truites traitées avec la [ $^{14}\text{C}$ ]-17 MT \*

| Echantillons      | 8 h         | 16 h       | 24 h      | 48 h |
|-------------------|-------------|------------|-----------|------|
| Foie              | 9,8 ± 9,4   | 2,7 ± 1,3  | < 1       | < 1  |
| Muscle            | 5,5 ± 1,3   | 2,1 ± 1,4  | < 1       | < 1  |
| Carcasse restante | 52,3 ± 40,5 | 28,0 ± 9,6 | 1,5 ± 0,2 | < 1  |

\* Les valeurs correspondent à la moyenne ± écart-type calculés sur 3 animaux.

Tableau II - Résidus totaux (17 MT + métabolites) dans les tissus de truites traitées avec la [ $^{14}\text{C}$ ]-17 MT. (ppb) \*

| Echantillons      | 8 h        | 16 h        | 24 h        | 48 h         | 72 h         |
|-------------------|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| Bile              | 4660 ± 722 | 8426 ± 2041 | 8854 ± 1937 | 11121 ± 3275 | 11779 ± 1487 |
| Foie              | 367 ± 194  | 80 ± 24     | 97 ± 43     | 32 ± 7       | 63 ± 12      |
| Sang              | 104 ± 32   | 77 ± 42     | 36 ± 5      | 34 ± 2       | 39 ± 3       |
| Muscle            | 27 ± 2     | 26 ± 1      | 11 ± 2      | 5 ± 2        | 6 ± 1        |
| Carcasse restante | 166 ± 32   | 144 ± 3     | 42 ± 6      | 33 ± 24      | 70 ± 16      |

\* Les valeurs correspondent à la moyenne ± écart-type calculés sur 3 animaux.

ALGUES

# **Perspectives d'applications des biotechnologies végétales à la micropropagation et à l'amélioration génétique des algues marines d'intérêt économique**

**B. KLOAREG et X.W. LIU**

Centre d'Etudes Océanologiques et de Biologie Marine, CNRS UPR 4601  
Place Georges Teissier, 29680 Roscoff

La régénération de plantes à partir de suspensions cellulaires ou de cals a ouvert de nouvelles possibilités de multiplication végétative des espèces d'intérêt agronomique. De même, les progrès du génie cellulaire et génétique sur les plantes (fusion de protoplastes, transformation) permettent de mieux tirer parti de la variabilité génétique naturelle.

L'introduction de biotechnologies végétales devrait avoir un impact important sur la culture des algues. D'une part, les pratiques culturales pourraient être considérablement modifiées par l'utilisation de techniques de micropropagation (multiplication végétative à partir d'éléments microscopiques) ; la production de semences artificielles est en effet particulièrement intéressante dans le cas des algues marines, soit pour les espèces pour lesquelles on maîtrise mal à grande échelle la reproduction sexuée, soit parce que ces techniques entraînent des gains de temps ou de place significatifs. D'autre part, le développement de biotechnologies cellulaires appliquées aux algues marines devrait permettre à terme des manipulations génétiques pour l'amélioration des espèces cultivées. Cette communication fait le point sur les progrès récents de la culture *in vitro* de cellules et de tissus chez les algues et s'efforce de dégager l'intérêt de ces techniques pour l'aquaculture et l'amélioration génétique des espèces d'intérêt économique.

Objet des recherches. 1. Influence des procédés de stérilisation et de culture sur l'évolution morphologique des explants. 2. Analyse microscopique des transformations et/ou des néoformations observées, pour en préciser les caractères histo-cytologiques ainsi que la signification biologique.

Origine des explants. Zone méristématique stipo-frondale de sporophytes âgés de 2 ans et récoltés à l'automne ou au printemps.

Stérilisation des explants. Réalisée selon deux procédés: a) excision, puis stérilisation de l'explant par  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  à saturation pendant 30 sec, suivie d'un séjour de 24 h dans un mélange antibiotique; b) stérilisation de la zone méristématique par  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  sat. (30 sec), puis excision aseptique des explants. L'usage a permis de privilégier cette deuxième pratique.

Culture des explants. En boîtes de Pétri, sur milieu gélosé ASP6 F2 (Fries 1977)\* enrichi en saccharose (l'addition d'auxines et/ou de cytokinines a été tentée sans effets significatifs). Explants disposés à plat, éventuellement après redécoupage selon le plan médullaire moyen (en ce cas, chaque demi-explant est appliqué par sa partie médullaire sur la gélose nutritive).

Conditions de culture. Température:  $12^\circ \text{C}$ ; énergie lumineuse: ca.  $4 \text{ W.m}^{-2}$ , photopériode: 14 h/ 10 h (obscurité).

Evolution morphologique des explants. Dans les conditions indiquées, jusqu'à 70% des explants d'une même série manifestent une évolution marquée, dans les cas les plus complets, par la production de trois types de formations.

1. Des bourrelets et/ou des coussins, d'aspect incolore, plus ou moins continus et localisés sur les marges et/ou sur la face supérieure de l'explant, sauf quand celui-ci a été redivisé selon son plan médullaire, ce dernier développant généralement un important coussin au contact de la gélose; dans tous les cas, le tissu de ces formations est fait de cellules allongées, fermement unies dans la partie proximale du massif mais se résolvant distalement en filles indépendantes. Les cellules présentent une importante vacuole et, dans la mince couche de cytoplasme pariétal, de petits plastes chlorophylliens et un noyau (apical dans chaque cellule terminale de filament). L'origine de ces formations est très largement médullaire, mais elle peut être corticale (plus ponctuellement, il est vrai).

2. Des systèmes filamenteux rayonnants, de couleur brune, formant parfois des rosettes à la surface supérieure de l'explant, mais se développant très souvent dans la gélose à partir d'un foyer intramédullaire et après invasion de la région corticale inférieure (dans le cas d'explants complets). Ces filaments sont ramifiés, formés de cellules rectangulaires à noyau central accompagné de physodes et à phéoplastes dépourvus de pyrénolide. Ils portent fréquemment des cystes ayant les caractères de spermatocystes. Ces formations paraissent correspondre à des gamétophytes (aposporiques ?); mais ni leur origine, ni leur degré de ploïdie n'ont pu encore être précisés. Transférées en milieu liquide ES-Tris, elles conduisent, par multiplication végétative, à la production d'oursins hétéotriches susceptibles d'engendrer de jeunes sporophytes (apogamiques ?).

3. Des lames ou des masses de couleur brune, généralement développées à la surface de l'explant et à l'emplacement des systèmes de type précédent, mais parfois d'origine médullaire. Ces formations ont des cellules polygonales d'assez grande taille, à volumineux noyau et à nombreux phéoplastes pariétaux. L'évaluation comparative par cytofluorimétrie des teneurs en ADN nucléaire de ces cellules et des précédentes (cf. 2.) est en cours, mais se heurte dans l'immédiat à des difficultés d'ordre technique. En tout état de cause, ces formations présentent tous les caractères de sporophytes (apogamiques ?),

tératologiques à des degrés divers et, dans cette mesure-même, limités dans leur développement.

\* FRIES, L., 1977. *Phycologia*, 16 (4) : 451-455.

Illustration.

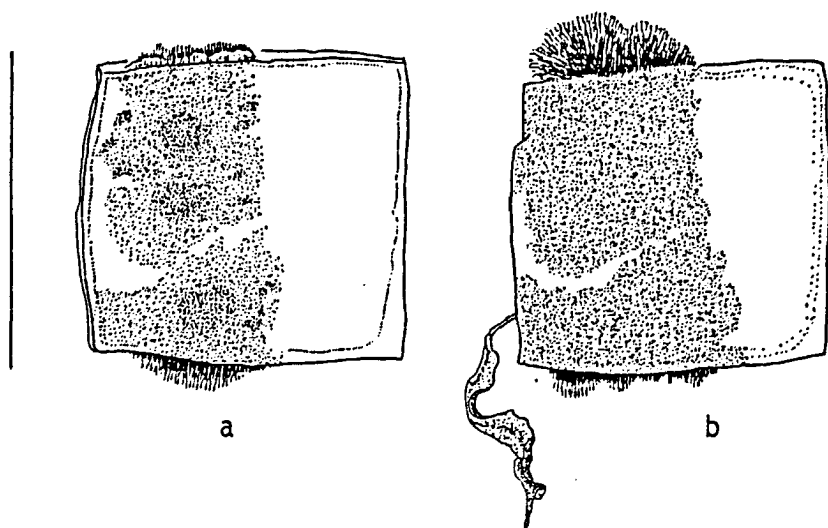


Fig. 1. a) Etat d'un explant après 2 ans sur milieu ASP6 F2 gélifié, portant des formations de type 2. b) Etat du même explant 2 mois plus tard, après transfert en milieu liquide ES-Tris et développement d'un sporophyte (celui-ci atteignait 5 cm, 9 mois plus tard). Le trait d'échelle vaut 5 mm.

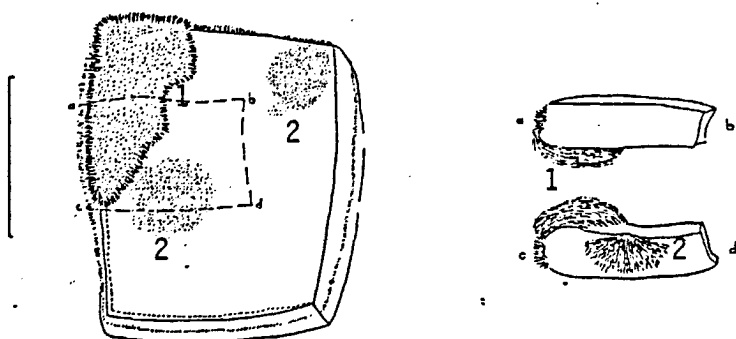


Fig. 2. Explant sur ASP6 F2 gélifié depuis 1,5 an, portant des formations de type 1 et des formations de type 2. Aspect de ces deux types de formations sur des C.T. du même explant, suivant a-b et c-d. Le trait d'échelle vaut 3 mm.

100µm

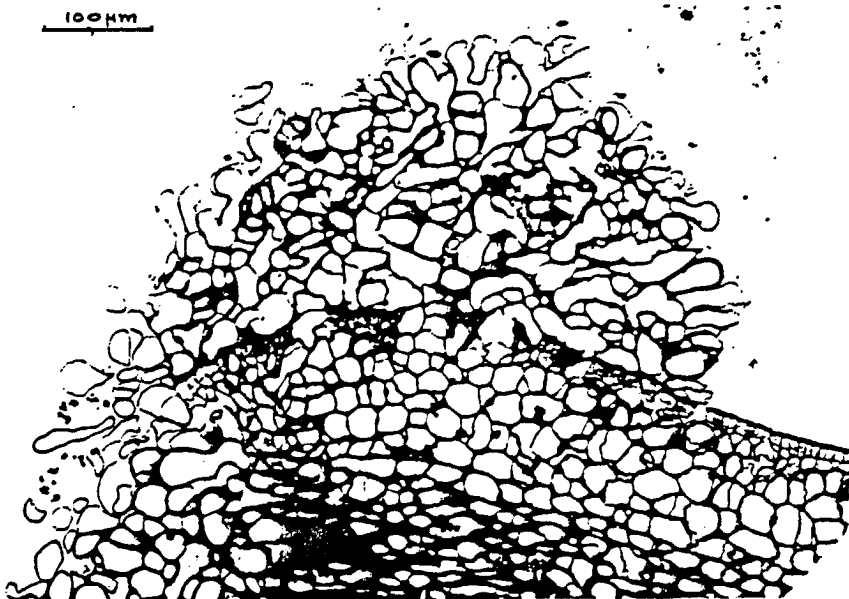


Fig. 3. Coupe microscopique du précédent explant, montrant les relations entre formations de type 1, d'une part, médulle et cortex, d'autre part.

*Rem.* Le chiffre désignant chaque type de formation dans l'illustration reprend celui placé en tête du § correspondant dans le texte à la formation considérée.

POSSIBILITES OUVERTES PAR LA REGENERATION DE PLANTES A PARTIR DE  
PROTOPLASTES OU DE SPORES CHEZ LES PHEOPHYCEES : L'EXEMPLE DE  
*PILAYELLA LITTORALIS*

Par M. MEJJAD, B. WOLFERSBERGER et G. DUCREUX

Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale - URA 115 CNRS  
Université PARIS-SUD - Bat. 360 - ORSAY Cedex.

---

Les thalles de *Pilayella littoralis* sont constitués de filaments ramifiés à croissance intercalaire dont la culture axénique peut être maintenue par bouturage. Trois souches, d'origine géographiquement différente, ont été utilisées et comparées pour leur aptitude à l'isolement et à la régénération de protoplastes.

L'une des souches fructifiant régulièrement en culture, est utilisée pour des analyses comparatives de développement à partir d'une spore et de protoplastes, soit de cellule somatique soit de spore, identifiables après isolement.

Compte tenu de ces informations et de la possibilité de disposer de ces différentes souches à l'état haploïde les perspectives d'élargissement de la variabilité génétique par mutagenèse ou par transfert d'information sont envisagées.

## Mise au point de techniques de production et de régénération de protoplastes chez les Phéophycées et les Rhodophycées.

**H. Benet, C. Boyen, Y. Le Gall, E. Zablackis and B. Kloareg.**

Centre d'Etudes Océanologiques et de Biologie Marine. CNRS UPR 4601 29211 Roscoff France.

Les travaux concernant la production et la culture de protoplastes ont porté principalement sur quatre espèces: deux Phéophycées (*Laminaria saccharina* et *Undaria pinnatifida*) et deux Rhodophycées (*Chondrus crispus* et *Kappaphycus alvarezii*). L'isolement de protoplastes permet d'une part d'envisager l'amélioration génétique de ces espèces par fusion cellulaire ou introduction de nouveaux gènes, d'autre part il favorise l'accessibilité aux organites et constituants cellulaires, et enfin, il facilite les études de physiologie cellulaire.

La production de protoplastes a été rendue possible grâce aux travaux portant sur la production et la purification d'enzymes de dégradation, spécifiques des polysaccharides de la paroi algale. Ces travaux ont permis d'extraire des alginates lyases à partir de bactéries et de mollusques marins (aplysies et ormeaux), ainsi que diverses carragénanes et agarases issues de cultures bactériennes dont les souches avaient préalablement été sélectionnées au laboratoire.

### Production et culture de protoplastes chez les Laminariales.

Les matériels utilisés sont le sporophyte de *Laminaria saccharina* récolté à Roscoff et le gamétophyte d'*Undaria pinnatifida* cultivé par voie végétative au laboratoire.

La production fait intervenir une première phase dite de prétraitement qui consiste à chélater les ions calcium en milieu hyperosmotique pour destabiliser la paroi cellulaire. Vient ensuite la phase de digestion enzymatique pour laquelle il a été nécessaire de tester de nombreux paramètres: doses et pureté des enzymes utilisées (une cellulase du commerce et une alginate lyase d'ormeau), le pH, la température, l'osmolarité et la composition du milieu d'incubation. Dans les conditions optimales, les rendements sont de l'ordre de  $10^6$  cellules par gramme de tissu frais pour *Undaria* et de  $10^9$  pour *Laminaria*.

Mises en culture dans un milieu approprié et à une température de 4° C, ces cellules régénèrent presque systématiquement une paroi en moins de 20 heures. On a pu observer des germinations après 24 heures de culture et, chez *Undaria*, des gamétophytes d'apparence normale ont été régénérés en une dizaine de jours.

### Production et culture de protoplastes chez les Rhodophycées.

Chez *Chondrus crispus*, les protoplastes sont fabriqués à partir des extrémités apicales du gamétophyte femelle. Deux souches sont utilisées: l'une, sauvage, récoltée à Roscoff et l'autre, issue d'une sélection massale, est



cultivée en bacs sous conditions contrôlées.

Après la phase de chélation qui fait intervenir ici les ions potassium et non les ions calcium, les algues sont incubées en présence d'une carragénase et d'une cellulase, ceci en condition hyperosmotique. Les rendements sont de  $4.10^8$  cellules par gramme de tissu frais et peuvent atteindre  $7.10^8$  si l'on ajoute un autre type de carragénase et une agarase.

Un protocole similaire est utilisé pour *Kappaphycus*. Cette algue est multipliée par bouturages successifs et seules les extrémités des tiges sont utilisées pour la production de protoplastes. Ici, la phase de chélation n'est pas nécessaire mais la présence d'une iota carragénane est indispensable. Les rendements obtenus sont plus faibles que pour *Chondrus*: ils varient de  $6.10^6$  à  $8.10^6$ .

Dans les deux cas, on obtient deux types de protoplastes: des petites cellules (4 à 10  $\mu\text{m}$ ) issues de l'épiderme et des grosses cellules (20 à 200  $\mu\text{m}$ ) provenant du cortex. En culture, les cellules de *Chondrus* régénèrent une paroi après 4 jours. On peut observer des divisions cellulaires à partir du sixième jour puis des germinations à compter du neuvième.

Dans le cas de *Kappaphycus*, les protoplastes vivent une semaine à condition d'être cultivés entre 12 et 17° C, en présence de calcium. Cependant, aucune régénération de paroi n'a pu être observée.

ANALYSE DE QUELQUES FACTEURS CONTROLANT LE DÉVELOPPEMENT DU  
THALLE ET DES PROTOPLASTES DE *SPHACELARIA* (PHEOPHYCEE).

Par G. ABDELMOUMENAOUI, J. AITBARHOUCHE et G. DUCREUX

Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale - URA 115 CNRS  
Université PARIS-SUD - Bat. 360 - ORSAY Cedex.

---

Le thalle de *Sphacelaria* ( Phéophycée ) présente une organisation cellulaire caractéristique permettant de disposer de repères précis pour des études de biologie du développement et de morphogenèse cellulaire.

L'utilisation de cultures axéniques a permis d'analyser le rôle des facteurs externes ( lumière, support ) et internes ( activateurs de croissance ) dans le contrôle du programme de développement des filaments et la préparation du matériel pour l'isolement des protoplastes.

Les protoplastes sont isolés en utilisant des cellulases et des pectinases du commerce en association avec des alginates-lyases extraites de mollusques marins. L'amélioration des conditions de digestion a permis d'augmenter significativement les rendements et d'obtenir des protoplastes des différentes catégories cellulaires constitutives du thalle.

La comparaison et l'identification des programmes de développement à partir de ces différents protoplastes sont en cours. La régénération a été maîtrisée à partir de protoplastes issus de la cellule apicale et obtenue pour d'autres catégories cellulaires.

L'exploitation de ces techniques paraît donc raisonnablement envisageable chez les algues marines.

# Etude du génome plastidial de quelques macrophytes marins

S. DE GOER, C. BOYEN et T. BARBEYRON

Centre d'Etudes Océanologiques et de Biologie Marine, CNRS UPR 4601  
29680 Roscoff

Les plastes rouges et les plastes bruns sont très différents des plastes des végétaux verts au niveau de leur biogénèse, leur ultrastructure, leurs pigments et leur fonctionnement photosynthétiques. Ces différences et leur histoire sont inscrites dans leur génôme. Nous avons entrepris l'analyse des génômes chloroplastiques de quelques Chromophytes et Rhodophytes.

Chez *Pylaiella littoralis*, le génôme plastidial est composé de deux molécules circulaires de taille différente, de 133 et 58 kbp, ce qui, jusqu'à présent, n'a jamais été décrit chez d'autres plantes. La carte physique de ces molécules a été établie et 86 % de la petite et 69 % de la grande molécule ont été clonés. Deux opérons ribosomiques en orientation inverse ont été placés sur la grande molécule par hybridations hétérologues. Un pseudogène codant pour l'ARN 16S et un gène ou pseudogène codant pour l'ARN 23S comportant un grand intron central ont été identifiés sur la petite molécule.

Plusieurs gènes ont été séquencés, le gène codant pour l'ARN plastidial 16S, l'espaceur de l'opéron ribosomique ainsi que les gènes codant pour la grande et la petite sous-unité de la rubisco, *rbc L* et *rbc S*, qui dans cette espèce, se trouvent tous deux sur le génome chloroplastique. Ces travaux remettent en cause la conception actuelle de la théorie de l'endosymbiose, selon laquelle les plastes de toutes les plantes proviendraient d'un ancêtre cyanobactérien. Ils montrent non seulement que l'origine endosymbiotique des plastes bruns est différente de celle des plastes verts mais aussi que les plastes des Chromophytes ont eu une histoire complexe. Dans ce phylum, l'endosymbiose a probablement été multiple, c'est à dire, a fait intervenir au minimum deux endosymbiontes procaryotes, l'un proche des cyanobactéries actuelles et l'autre des bactéries  $\beta$ -pourpres.

Nous avons entrepris d'étendre ces recherches au cas de deux algues pluricellulaires d'intérêt économique, *Laminaria saccharina* (Phéophycées) et *Chondrus crispus* (Rhodophycées). Au plan fondamental, ces travaux devraient nous permettre de préciser l'origine et l'évolution des plastes chez les Chromophytes et les Rhodophytes. Les connaissances acquises sur l'organisation des génomes chloroplastiques dans ces deux phylums pourront également être appliquées au suivi du devenir des plastes dans le cas de cultures *in vitro* ou de fusions somatiques ainsi qu'au diagnostic de différences variétales ou spécifiques.

**La photosynthèse des algues brunes:**  
**originalité des complexes pigments-protéines**  
C. BERKALOFF, C. PASSAQUET, J.-C. DUVAL et L. CARON  
Laboratoire des biomembranes et surfaces cellulaires végétales, UA CNRS D0311  
Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris cedex 05

L'appareil photosynthétique des algues brunes diffère notablement de celui des végétaux verts tant par sa structure et sa composition pigmentaire que par ses systèmes de régulation. Malgré l'importance écologique et aussi économique de ces organismes, il a été beaucoup moins étudié, et est à ce jour beaucoup moins bien connu, que celui des végétaux verts, en particulier en raison de la difficulté d'extraire de ces algues des fractions cellulaires actives et de la fragilité de la liaison pigment-protéine de ses complexes.

Dès 1983, nous avons été les premiers à isoler de chloroplastes d'une algue brune (*Fucus serratus*) des fractions membranaires présentant une activité PSII. Cette méthode de séparation (sur gradient de densité après action d'un détergent doux) nous a permis également de séparer des fractions enrichies en PSI et des complexes collecteurs d'énergie. Les compositions pigmentaires et polypeptidiques de ces fractions ont été établies.

Les fractions PSI sont enrichies en chlorophylle a et  $\beta$ -carotène, et très appauvries en chlorophylle c et xanthophylles. Leur composition polypeptidique est relativement complexe [ 1 ] : si l'on y retrouve des polypeptides de PM voisin de 65 kDa, correspondant probablement aux polypeptides des centres PSI de végétaux verts, l'homologation des autres sous-unités s'avère plus difficile et une étude immunologique va être entreprise dans ce but.

Les fractions les plus originales sont celles constituées par le système collecteur d'énergie lumineuse (LH). Ces fractions, très enrichies en chlorophylle c et xanthophylles, ont une constitution polypeptidique très simple. Dans le cas de *Fucus serratus*, le complexe natif, d'environ 240 kDa, est constitué de sous-unités polypeptidiques toutes semblables de 21kDa. Pour les différentes espèces étudiées, ce PM varie entre 19 et 22 kDa (Fig.1) et on observe dans certains cas deux à trois polypeptides distincts dans cette zone [2]. Ce PM est nettement inférieur à celui, 24 à 29 kDa, connu pour les complexes collecteurs (LHCP) des végétaux verts, qui jouent un rôle, on le sait, dans les accolements granaires.

Un anticorps polyclonal anti-protéine LH de *F. serratus* a été préparé et testé contre les fractions LH de diverses espèces: une forte réaction positive a été obtenue avec toutes les algues à fucoxanthine testées (Phéophycées, Chrysophycées), une réaction plus faible et irrégulière suivant les espèces chez les Bacillariophycées, aucune réponse dans le cas des Cryptophycées. La réaction avec le LHCP des végétaux verts est très faible. Toutefois le LH de *Fucus* est reconnu par un anticorps anti-LHCP de maïs, ce qui pose le problème de la plus ou moins grande homologie de séquences entre le LH des algues brunes et celui des végétaux verts[3].

Dans le but de séquencer la protéine du LH de *Fucus*, de façon à savoir en particulier s'il est susceptible de jouer le même rôle structural et régulateur que le LHCP, nous avons alors entrepris d'isoler des ARN messagers à partir de thalles de *Fucus*. Cette opération s'est révélée beaucoup plus difficile que prévu, en raison, entre autres, de l'abondance des polysaccharides pariétaux qui interfèrent avec la préparation. C'est alors que nous avons entrepris une collaboration avec B. Kloreg, les protoplastes de *Laminaria* qu'il prépare apparaissant comme une solution séduisante à ce problème.

Ces protoplastes sont actifs photosynthétiquement comme le prouvent des mesures de dégagement d'oxygène ou de cinétique de fluorescence. De plus, nous avons pu démontrer par marquage au  $^{35}\text{S}$  qu'ils présentent une activité de protéosynthèse 'in vivo' (Fig. 2). A partir de ces protoplastes, des ARN messagers ont pu être isolés, leur activité traductionnelle 'in vitro' vérifiée (Fig. 3), et une banque de cDNA constituée.

Malheureusement, nous n'avons pas pu pour l'instant mettre en évidence la protéine recherchée dans les produits d'expression de cette banque dans le vecteur GT11, parmi les  $10^6$  recombinants dénombrés.

Chez les végétaux supérieurs, on sait que les gènes *cab* codant pour les complexes collecteurs sont des 'photogènes' dont l'expression est régulée par un effet phytochrome ou peut-être dans certains cas cryptochrome. Les réponses physiologiques à ce type de signaux lumineux sont très mal connues chez les algues macrophytes, mais ici encore les protoplastes apparaissent comme un matériel de choix pour étudier à l'échelle cellulaire ces régulations. Nous espérons donc grâce à leur utilisation pouvoir d'une part cloner le gène de la protéine du LH de *Laminaria* et de plus élucider en partie l'effet de signaux colorés sur les cellules d'algues brunes.

[1] CARON L., REMY R. et BERKALOFF C. (1988).. FEBS Letters, 229, p.11-15.

[2] BERKALOFF C., CARON L. et ROUSSEAU B. (1990). Photosynthesis Res., 23, 181-193

[3] PASSAQUET C., THOMAS J.-C., LEMOINE Y., CARON L. et BERKALOFF C., en préparation

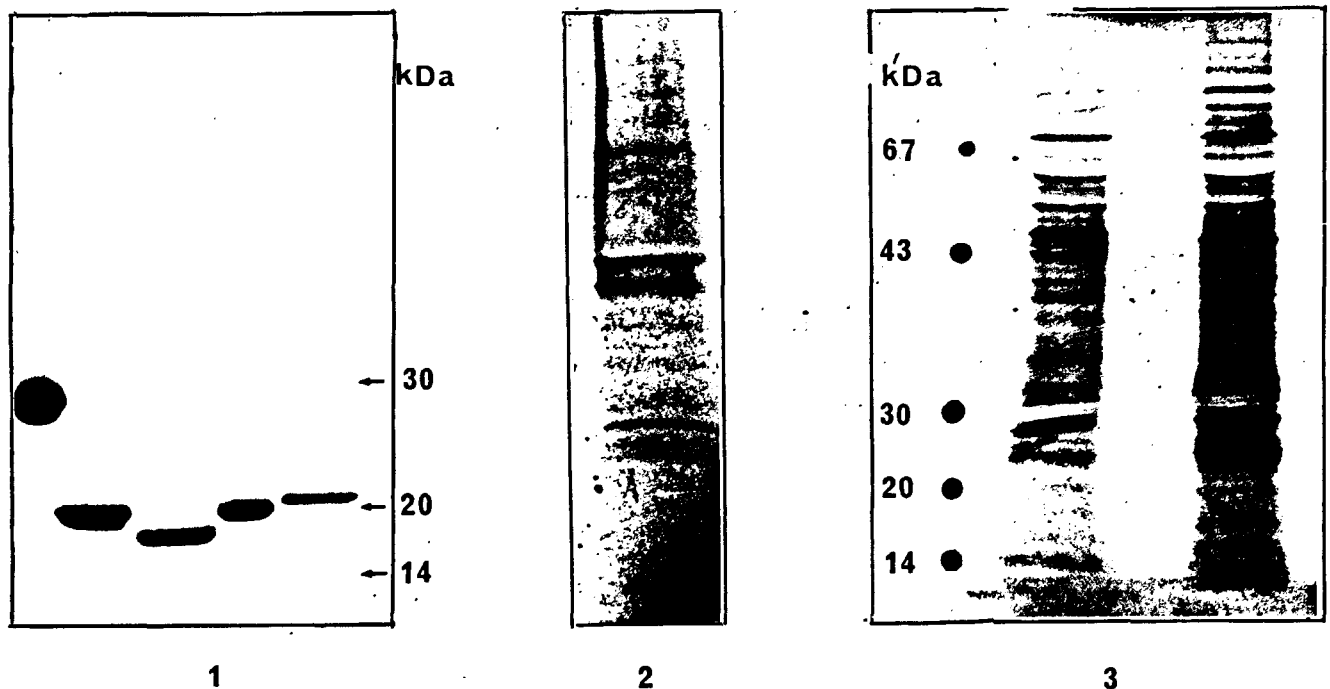


Fig.1 - Séparation sur SDS-PAGE des polypeptides du complexe collecteur principal, LH, de trois algues brunes: *Dictyota dichotoma* (2) *Laminaria saccharina* (4) et *Fucus serratus* (5), d'une diatomée: *Phaeodactylum tricornutum* (3) et du LHCP d'un végétal vert: *Zea mays* (1).

Fig. 2 - Mise en évidence des polypeptides néosynthétisés par des protoplastes de *Laminaria saccharina* en présence de méthionine marquée au  $^{35}\text{S}$ . Autoradiogramme d'une électrophorèse SDS-PAGE.

Fig. 3 - Autoradiogramme d'une électrophorèse SDS-PAGE des produits de traduction d'ARN polyA<sup>+</sup> purifiés à partir de protoplastes de *Laminaria saccharina*. Marquage au  $^{35}\text{S}$ .

# ETUDE DES SITES DE SYNTHÈSE DES PROTÉINES DU PHYCOBILISOME CHEZ UNE ALGUE ROUGE

C. BERNARD, J.C. THOMAS

- Laboratoire des biomembranes et surfaces cellulaires végétales -  
- Ecole Normale Supérieure. - 75005 PARIS -

L'analyse de l'ADN du chloroplaste est un outil utilisable pour la compréhension de l'évolution des végétaux et pour la taxonomie. Le chloroplaste des Rhodophytes est unique lorsqu'on le compare aux plastes des autres phylums avec lesquels il diffère en plusieurs points : il possède des thylakoïdes non accolés et a une composition pigmentaire particulière. En effet, les rhodoplastes ont des complexes pigmentaires intrinsèques à chlorophylle a et à caroténoïdes, alors que l'antenne extrinsèque collectrice d'énergie est constituée de phycobiliprotéines. Ces phycobiliprotéines sont organisées en structures macromoléculaires - les phycobilisomes - disposés à la surface externe des thylakoïdes. L'énergie lumineuse captée par ces structures est transmise avec une efficacité voisine de 100% aux centres photochimiques.

Certains auteurs ont proposé que les algues rouges dériveraient d'un hôte eucaryote contenant comme symbiote une cyanobactérie. La présence des antennes extrinsèques - les phycobilisomes - semblables dans leur composition et dans leur structure à celles des cyanobactéries est un bon argument pour appuyer cette hypothèse endosymbiotique de l'origine du chloroplaste.

L'arrangement fonctionnel des constituants du phycobilisome des Rhodophytes est connu. En revanche on dispose de peu d'informations sur les sites de synthèse de ces constituants. Des travaux préliminaires semblent indiquer que les sous-unités des phycobiliprotéines sont spécifiées par le génôme plastidial.

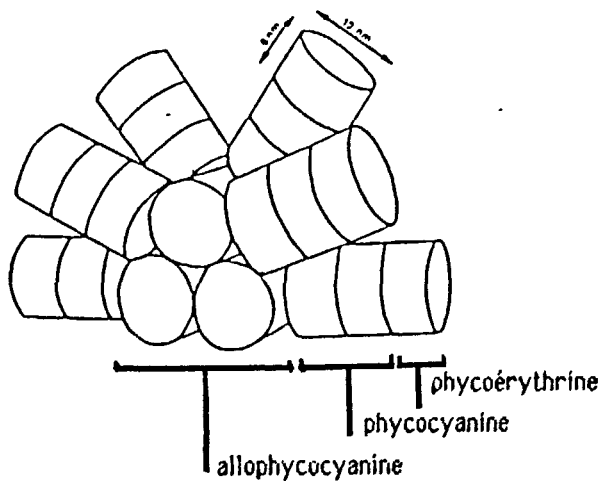
Dans l'étude présentée nous avons marqué *in vivo* les constituants protéiques de phycobilisomes d'une algue eucaryote Rhodella violacea. Lorsque l'on utilise des inhibiteurs bloquant la traduction des ribosomes 70S ( ribosomes plastidiaux ) ou les ribosomes 80S ( ribosomes cytoplasmiques ) on peut démontrer l'origine des constituants du phycobilisome. Ainsi, nous avons constaté que la synthèse de tous les constituants est inhibée par le chloramphénicol ( inhibiteur des 70S ). Les constituants majeurs de la partie centrale du phycobilisome ( allophycocyanine et polypeptide lourd associé ) ainsi que la partie proximale des projections radiales ( phycocyanine et polypeptide associé ) sont spécifiés par le génôme plastidial.

Par contre la phycoerythrine et les deux polypeptides associés qui forment la partie distale des projections radiales sont également inhibés par la cycloheximide ( inhibiteur des 80S ). Cette étude ne permet pas de donner une conclusion définitive sur le site de synthèse ( nucléaire ou plastidial ) de la phycoérythrine et des polypeptides associés à ce pigment. Si ces éléments sont spécifiés par le plaste, il doit exister un contrôle nucléaire sur leur synthèse.

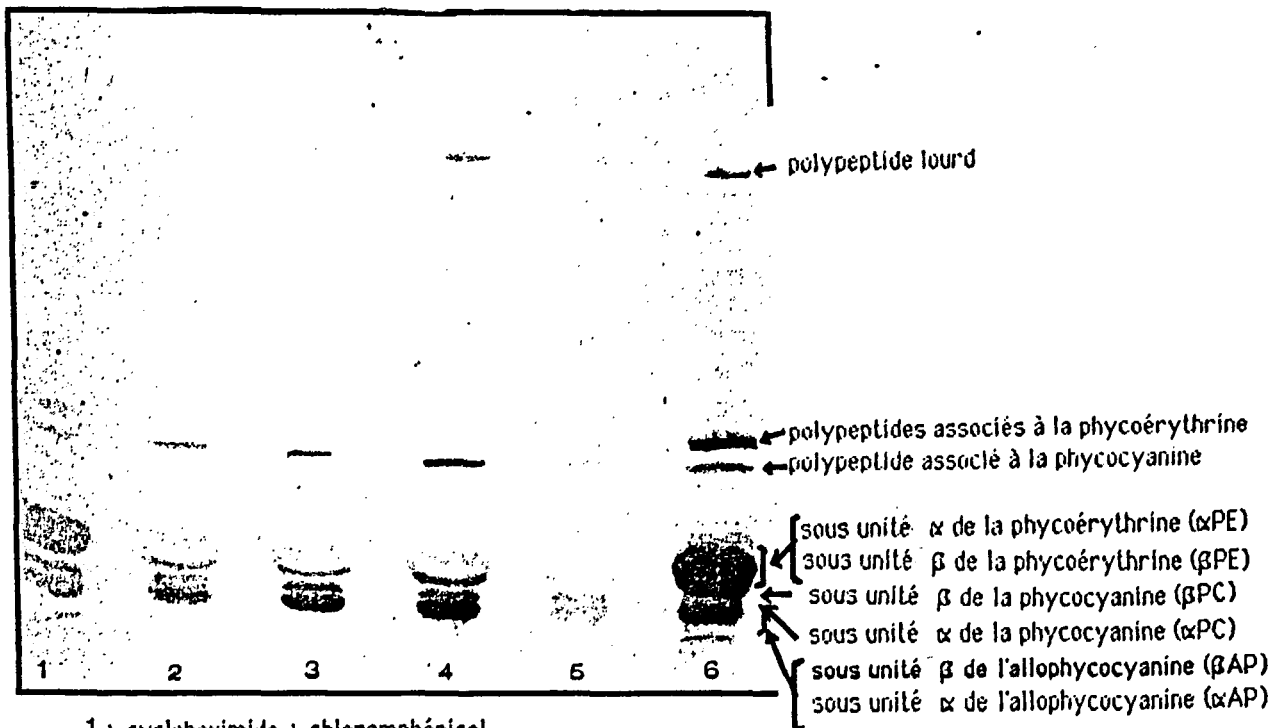
Actuellement une autre approche est en cours en utilisant l'ADN chloroplastique de Rhodella violacea cloné dans un vecteur. L'utilisation des gènes spécifiant les protéines du phycobilisome chez une cyanobactérie ( Calothrix PCC7601 ) doit nous permettre par des hybridations hétérologues de déterminer plus spécifiquement le site de codage de ces protéines et de séquencer les gènes correspondants.

L'arrangement de ces gènes sur le génôme plastidial, les séquences nucléotidiques et la régulation de leur synthèse par le génôme nucléaire pourrait nous aider dans l'élucidation de l'évolution de ces gènes, leur régulation et les événements moléculaires impliqués dans la biosynthèse des phycobilisomes.

**Représentation schématique de la structure des phycobilisomes de Rhodella violacea :**



**Synthèse des polypeptides du phycobilisome de Rhodella violacea, marqués *in vivo* avec et sans inhibiteurs de la traduction :**



- 1+ cycloheximide + chloramphénicol
- 2+ cycloheximide 1h d'incubation
- 3+ cycloheximide 2h d'incubation
- 4+ cycloheximide 6h d'incubation
- 5+ chloramphénicol
- 6Témoin : - cycloheximide - chloramphénicol

**ADAPTATION**



COLLOQUE GCS des 5-6-7 septembre 1990

Groupe "Adaptation chez les poissons"

Rôle de l'hormone de croissance et des hormones thyroïdiennes dans la smoltification du saumon atlantique.  
G. BOEUF, A. Le ROUX, P. PRUNET et P. Y. Le BAIL

\* IFREMER, SRV BP 70, 29280 PLOUZANE  
\*\* INRA, Campus de Beaulieu, 35042 RENNES cedex

Sur des saumons atlantiques en élevage à la pisciculture du Conquet (Finistère) entre octobre et juillet nous avons prélevé régulièrement des arcs branchiaux (pour le dosage de l'activité Na-K-ATPase de la fraction microsomale) et du plasma sanguin (pour le dosage des niveaux circulants des deux hormones thyroïdiennes,  $T_3$  et  $T_4$ , ainsi que de l'hormone de croissance, GH). A trois dates de l'année, avant, durant et après la phase terminale de la smoltification, des animaux ont été directement transférés de l'eau douce à l'eau de mer (35 ‰ de salinité) et nous avons ensuite mesuré à intervalles réguliers les niveaux de pression osmotique et de chlorémie, ainsi que de  $T_3$ ,  $T_4$  et GH.

L'activité enzymatique branchiale augmente régulièrement chez les pré-smolts en eau douce entre les mois de février et avril puis décroît par la suite si les saumons sont maintenus en eau douce. La  $T_3$  circulante marque deux augmentations en février-mars et mai alors que la  $T_4$  passe par un niveau très élevé en avril. La GH augmente très fortement en fin de smoltification et le smolt terminal est toujours un poisson à niveau circulant élevé d'hormone de croissance.

Le transfert en eau salée déclenche bien sûr une augmentation de la pression osmotique plasmatique ainsi que de la chlorémie, mais très différemment selon l'état de smoltification de l'animal:

- le poisson à 6 ou 3 mois de l'époque de la migration se déséquilibre profondément, les mortalités sont fortes, la croissance inexistante pour les survivants,
- en pré- et post-smoltification proches ( $\pm 1$  mois), le déséquilibre hydrominéral est faible mais sensible et ne permet pas une reprise de croissance immédiate,
- en phase terminale de smoltification (entre maximums de  $T_4$  plasmatique et d'activité ATPase branchiale), les saumons s'adaptent à l'eau de mer sans déséquilibre et sans stopper la croissance.

Les hormones thyroïdiennes circulantes sont soit non-affectées par le contact avec l'eau salée, soit diminuées. alors que la GH augmente systématiquement durant une dizaine de jours pour ensuite revenir au niveau de base.

L'activité ATPase branchiale demeure un bon indicateur de la smoltification au travers de son rôle direct dans l'osmorégulation. Les traitements à la  $T_3$  réalisés par ailleurs ne nous ont pas permis d'activer cette fonction. Les hormones thyroïdiennes n'apparaissent pas directement impliquées dans ces mécanismes mais interviennent dans d'autres fonctions à ce moment. La GH semble jouer un rôle décisif autant dans la smoltification que dans l'adaptation à l'eau de mer.

Fonction thyroïdienne au cours de la smoltification et de l'adaptation  
à l'eau de mer chez des Salmonidés (*Salmo trutta*, *Salmo salar*)  
par J.M. LEBEL et J. LELOUP  
(Laboratoire de Physiologie générale et comparée du Muséum,  
URA CNRS 90, Paris)

Afin de préciser les modalités d'intervention des hormones thyroïdiennes dans ces processus, nous avons d'abord recherché la présence, dans divers tissus, notamment la branchie, de l'enzyme de conversion, 5' désiodase (5'D) de la thyroxine (T4) en triiodothyronine (T3) et celle de récepteurs nucléaires de la T3, hormone biologiquement active. La branchie des salmonidés possède des récepteurs de la T3. Leur concentration est importante, et représente chez la truite fario, environ la moitié de celle du foie, un des tissus les plus riches. En revanche, aucune activité 5'D n'a pu être caractérisée dans la branchie, contrairement au foie ou au rein. La branchie est donc un organe cible de la T3, celle-ci ne provenant pas d'une production in situ mais de la T3 circulante.

1) Smoltification du *S. salar* :

Des études cinétiques du métabolisme de la T4\* et de la T3\* (marquées au <sup>125</sup>I) ont permis la mesure des taux de production hormonaux, avant (mars) et aux environs (avril) du pic de T4 circulante caractéristique de la smoltification. En dépit d'un doublement de la T4 circulante, le métabolisme de la T4\* est accéléré en avril, en corrélation avec une augmentation de la conversion de T4 en T3 qui est plus que doublée. Il en résulte que la sécrétion de T4 est triplée et celle de T3 sextuplée. Les pools extracellulaire et cellulaire de T4 sont environ doublés. Il en est de même du pool extracellulaire de T3, mais le pool cellulaire de T3 est quintuplé traduisant une "imprégnation" tissulaire de T3 augmentée et vraisemblablement une augmentation de l'occupation des sites récepteurs nucléaires de T3.

Ces données représentent la première démonstration que la smoltification implique, non seulement une augmentation de la sécrétion thyroïdienne de T4, comme le suggérait le pic de T4, mais également une augmentation plus importante de la production de T3, par suite de la stimulation de la conversion de T4 en T3.

La mesure des récepteurs T3 dans les hépatocytes, réalisée peu après le pic de T4, montre une concentration élevée qui décroît de façon importante 2 et 4 semaines plus tard, de même que la T4 et la T3 plasmatiques. Il y aurait donc une concomitance entre la stimulation de la production hormonale et le nombre de récepteurs.

Un traitement par la T3 dans la nourriture (25ug/g) initié à la mi-mars (étude en collaboration avec C. Peyraud, G. Boeuf, V. Maxime), qui détermine un triplement de la T3 circulante, diminue le taux de T4 plasmatique suggérant une mise au repos de la thyroïde par rétroaction négative. L'évolution des récepteurs hépatiques est analogue à celle des témoins mais leur nombre est diminué d'environ 35% suggérant une régulation par sensibilité diminuée (down regulation). Enfin, chez les poissons témoins et traités, alors que le rapport T3 tissu / T3 plasma et le rapport T3/T4 sont sensiblement constants dans le foie, pendant les six semaines d'expérimentation, ils augmentent considérablement dans la branchie à 4 et 6 semaines, traduisant une stimulation du transport branchial de la T3 circulante. Cette activation intervient, en même temps que l'augmentation de l'activité  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPasique branchiale, et peut suggérer une corrélation entre les deux phénomènes.

## 2) Adaptation à l'eau de mer .

Le transfert direct de truites fario d'eau douce en eau de mer détermine une chute rapide (dès 24h) et importante (plus de 50%) de la T4 et de la T3 qui peut s'accroître les jours suivants. Cette chute, qui est suivie d'une remontée 6 jours après le transfert, n'apparaît pas résulter d'une inhibition de l'activité thyroïdienne, la fixation thyroïdienne de radioiode n'est en effet pas modifiée. Elle semble due à une consommation hormonale accrue, comme l'indique le métabolisme accéléré de la T4 et de la T3 marquées, associée à une stimulation de la conversion de T4 en T3. La remontée ultérieure des taux plasmatiques d'hormone correspondrait à une activation de la thyroïde par intervention du rétrocontrôle hypophyso-thyroïdien.

Chez la truite acclimatée en eau de mer depuis 3 semaines, la T4 plasmatique est diminuée et la T3 augmente significativement (rapport T3/T4 doublé) par rapport à la truite en eau douce, ce qui suggère là encore une stimulation de la 5'D.

Le transfert direct de smolts après la smoltification, d'eau douce en eau de mer, détermine une semaine plus tard une élévation de la T4 circulante qui s'accroît après trois semaines et apparaît traduire une stimulation thyroïdienne. Le transfert de smolts, préalablement traités à la T3 en eau douce, entraîne les mêmes modifications, mais plus accentuées, puisque le niveau de T4, au moment du transfert, était plus faible. La T3 plasmatique diminue, chez les poissons témoins, au cours de la première semaine, puis se stabilise, mais ne diminue pas dans les tissus. Le rapport T3tissu / T3plasma est considérablement augmenté pour le foie et la branchie, traduisant un transport accru de T3 et (ou) une désiodation tissulaire accrue de T4.

Bien que le nombre des récepteurs T3 ne soit pas augmenté en eau de mer, dans le foie ou la branchie, l'augmentation de la T3 circulante (farlo) ou du rapport T3tissu / T3plasma (saumon) peut entraîner une plus grande occupation des récepteurs par la T3 et donc une plus grande activité puisque la réponse physiologique à l'hormone est proportionnelle à l'occupation des récepteurs.

En conclusion, l'évolution des paramètres de la fonction thyroïdienne au cours de la smoltification n'est pas sans rappeler celle observée au cours du climax de la métamorphose des amphibiens, et plaide en faveur d'un rôle actif de la T3 dans la smoltification. La T3 paraît également impliquée dans l'adaptation à la salinité.

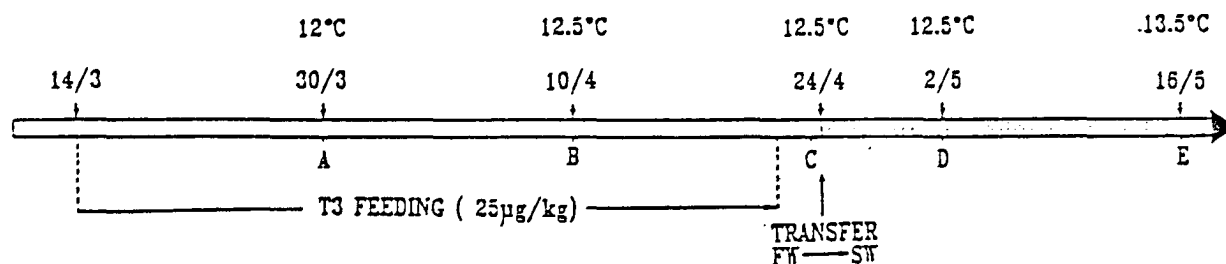
EFFETS D'UN TRAITEMENT A LA TRIODOTHYRONINE SUR LE METABOLISME  
ENERGETIQUE ET LES CAPACITES D'ADAPTATION AU MILIEU MARIN  
DES SMOLTS DE SAUMON ATLANTIQUE

par Valérie MAXIME\*, Gilles BOEUF\*\* et Claude PEYRAUD\*

\*U.R.A. CNRS 648 - Physiologie de l'adaptation chez le poisson ((U.B.O. Brest)

\*\*IFREMER - Centre de Brest

L'apport de Triiodothyronine par voie orale a été réalisé en continu pendant six semaines au cours de la phase ultime de la période de smoltification. L'hormone était incorporée à un aliment composé élaboré par IFREMER (25 µg/kg d'aliment). La quantité d'aliment distribué quotidiennement était établie sur une base approximative de 2 % du poids corporel des smolts. Les caractéristiques essentielles du protocole d'expérimentation : conditions expérimentales et succession chronologique des étapes de mesure des grandeurs étudiées sont indiquées dans le schéma suivant :



## RESULTATS

### A) En condition dulcicole (étapes A, B, C)

L'apport permanent de  $T_3$  a provoqué des modifications limitées du métabolisme énergétique se développant progressivement au cours du traitement :

- augmentation du métabolisme standard ( $MO_2S$ ) (de l'ordre de 6 %),
- diminution du niveau moyen du métabolisme de routine ( $MO_2R$ ) (de l'ordre de 5 %) résultant essentiellement d'une réduction de l'activité motrice spontanée.

Ces effets métaboliques étaient associés à une faible amélioration des performances de croissance (+ 5 %) et à une diminution importante (- 18 %) de l'activité ( $Na^+$ ,  $K^+$ ) ATPasique branchiale.

### B) En milieu marin (étapes D, E)

Le transfert en eau de mer a eu pour effet majeur une amplification du métabolisme énergétique standard (+ 26 % lot témoin et + 23 % lot traité) associée à une stimulation de la croissance.

L'activité ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ATPasique branchiale du lot traité retrouve le niveau du lot témoin. Les valeurs de chlorémie observées dans la phase initiale du séjour en milieu marin montrent que le traitement  $\text{T}_3$  a induit une diminution des capacités d'osmorégulation.

## ELEMENTS D'INTERPRETATION

### Modifications du métabolisme énergétique

#### *.a) Métabolisme Standard ( $\text{MO}_2\text{S}$ )*

1°) En condition dulcicole : Deux hypothèses, non exclusives, peuvent être proposées pour tenter d'expliquer les faibles amplitudes des augmentations de  $\text{MO}_2\text{S}$  en dépit d'un important accroissement des taux plasmatiques de  $\text{T}_3$  (x 4) :

-  $\text{T}_3$  a pour rôle essentiel de potentialiser les effets anabolisants de l'hormone de croissance (GH) qui peut alors être considérée lors de la smoltification comme un facteur limitant de l'activité métabolique.

- Intervention d'un processus de rétrocontrôle assurant une compensation de l'augmentation excessive des taux plasmatiques de  $\text{T}_3$  (cf. acquisitions du Groupe Coopérant du Muséum).

D'un point de vue plus général, la relative indépendance de l'activité métabolique à l'égard d'un accroissement expérimental élevé du taux sanguin de  $\text{T}_3$  montre que le smolt (du moins au cours de la période de smoltification) constitue un modèle physiologique original par rapport à d'autres espèces piscicoles.

2°) En milieu marin : L'augmentation de  $\text{MO}_2\text{S}$ , identique dans les deux lots (témoin et traité  $\text{T}_3$ ) peut être interprétée comme la conséquence essentielle d'une stimulation du métabolisme intermédiaire induite par le transfert en mer et, pour une part plus réduite, d'un accroissement du coût énergétique de l'osmorégulation.

#### *.b) Métabolisme de Routine ( $\text{MO}_2\text{R}$ )*

La diminution du rapport  $\text{MO}_2\text{R}/\text{MO}_2\text{S}$ , observée successivement d'une part, en condition dulcicole, chez les smolts traités par  $\text{T}_3$ , et d'autre part, en milieu marin, identiquement chez les deux lots de smolts (contrôle et antérieurement traités par  $\text{T}_3$ ), peut être interprétée comme la traduction d'un phénomène comportemental adaptatif. En effet, une réduction relative de l'activité motrice spontanée peut être considérée comme un moyen d'assurer une utilisation préférentielle des disponibilités énergétiques au profit des processus de synthèse.

## PURIFICATION DE L'HORMONE THYREOTROPE HYPOPHYSIAIRE DE SAUMON *ONCORHYNCHUS TSHAWYTSCHA*

CHEN S.L., LE BAIL P.Y., Mac KENZIE D.S., BRETON B. Laboratoire de Physiologie des Poissons INRA Campus de Beaulieu, 35042 Rennes

Chez les poissons les hormones thyroïdiennes paraissent impliquées dans de nombreuses régulations liées: à des mécanismes adaptatifs (osmorégulation, poïkilothermie...), à la reproduction et au développement. La mesure des niveaux circulants de ces hormones bien qu'ayant valeur explicative est souvent insuffisante pour étudier le déterminisme des phénomènes et plus particulièrement leur contrôle central en relation avec les modifications des facteurs du milieu. C'est pourquoi nous avons purifié, à partir d'hypophyses de saumon l'hormone thyroïdienne (TSH) qui régule la sécrétion des hormones thyroïdiennes.

La détermination de l'activité biologique TSH en cours de préparation a été faite par mesure de la stimulation de la sécrétion de T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> après injection des préparations à tester chez la truitelle de 20 à 60g gardée à jeûn à une température constante de 15°C sous photopériode naturelle. L'activité gonadotrope a été mesurée par étude *In vitro* de la stimulation de la maturation intrafolliculaire d'ovocytes de truite ou de la sécrétion de 17 $\alpha$  hydroxy 20 $\beta$  dihydroprogestérone par ces mêmes ovocytes.

Après extraction saline à pH 9 et séparation des glycoprotéines hypophysaires par chromatographie d'affinité sur concanavaleine A Sépharose, le pool des glycoprotéines est fractionné par gel filtration sur une colonne d'Ultrogel ACA 54. Une première séparation des activités TSH et gonadotrope est faite par chromatographie d'échange d'ions sur carboxy methyl cellulose. Après équilibrage de la colonne par un tampon acétate d'ammonium 5mM pH 5,95 l'activité gonadotrope n'est pas retenue. L'activité TSH est éluée par un tampon acétate d'ammonium 100mM pH 6,1. A ce stade la préparation contient encore 8 à 10% de contamination par de la gonadotropine du fait des analogies structurales et physico-chimiques entre les deux hormones. Cette contamination a été éliminée par chromatographie d'immuno affinité. Sur la base des connaissances acquises sur ces deux hormones chez les mammifères ( identité des sous unités  $\alpha$ , différences des sous unités  $\beta$  ), nous avons préparé des  $\tau$  globulines de lapin dirigées contre la sous unité de gonadotropine de saumon, qui ont été liées par covalence à une matrice de sépharose activée par du cyanure de bromogène. Après passage de la préparation de TSH sur cette colonne la contamination gonadotrope mesurée par dosage biologique et par radioimmunologie tombe à moins de 1%. Les contaminations par l'hormone de croissance et par la prolactine mesurées par radioimmunologie sont inférieures à 1%.

Le poids moléculaire apparent de la sTSH est de 27,5kd. En conditions dénaturantes l'électrophorèse révèle une structure sous unitaire de l'hormone, correspondant à des sous unités de poids moléculaire de 17 et 13,6kd. L'hormone présente un polymorphisme entre pHi 4,6 et 6,7 alors que ce polymorphisme est compris entre pHi 3,5 et 5,2 pour la gonadotropine. La zone de recouvrement des pHi des deux hormones explique la difficulté qu'il y a à séparer ces molécules sur la bases de leurs pHi par chromatographie d'échange d'ions.

Des anticorps polyclonaux ont été produits contre la sTSH. Ils montrent un croisement important avec la GTH malgré la faible contamination de la TSH par la GTH. Ceci laisse supposer l'existence de communautés antigéniques entre les deux hormones. La séparation des sous unités de TSH est en cours pour tenter d'obtenir un système de dosage spécifique.

Groupe : "Adaptation chez les poissons"

Réceptivité du saumon atlantique à un traitement à l'hormone de croissance (GH) durant son cycle de développement.  
G.BOEUF\*, A.SEVERE\*, P.PRUNET\*\* et P.Y. Le BAIL\*\*

\* IFREMER, BP 70, 29280 Plouzané

\*\* INRA, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex

L'hormone de croissance circulante augmente fortement en fin de smoltification chez le saumon atlantique et le transfert en eau de mer augmente également transitoirement le niveau plasmatique. Des traitements à la  $T_3$  ne nous ont pas permis de stimuler l'adaptabilité à l'eau salée et nous voulions savoir si la GH serait plus à même d'avoir une activité dans ce domaine. Nous avons donc traité (par implantation de GH ovine du NIH dans de la poudre de cholestérol compactée) des jeunes poissons en eau douce à différents moments de l'année puis les avons transféré directement en eau de mer (35 ‰ de salinité) en utilisant à chaque fois concomitamment des animaux témoins non implantés ou implantés "sham".

En octobre et novembre sur des pré-smolts (mode "haut" de la population en classes de taille) à plus de 6 à 5 mois de l'époque de la migration, les saumons témoins et "sham" se révèlent incapables de s'adapter à l'eau de mer (mortalités fortes, pas de reprise de croissance pour les survivants, très fort déséquilibre hydrominéral) alors que l'activité ATPasique branchiale des poissons traités à la GH est fortement stimulée, la survie quasi-totale (94 à 100 %) en eau de mer, la croissance importante et le déséquilibre hydrominéral inexistant. Chez des parrs (mode "bas" de la distribution de la population en classes de taille) la mortalité est totale en 48 h chez les témoins et les "sham" alors que 46 % des implantés à la GH survivent et grandissent après 54 jours en mer.

En février, les différences sont moins spectaculaires car les animaux témoins sont déjà plus près de l'époque de la migration et donc de la fin de la smoltification. Les mortalités sont faibles après transfert en mer (5 à 8 %) mais il n'y a pas reprise de croissance. Chez les implantés à la GH, survie (100 %) et croissance sont excellentes. Les parrs survivent à 45 % après 56 jours en eau salée.

En avril, à l'époque naturelle de la fin de la smoltification, les différences sont quasi-inexistantes entre les animaux témoins et les implantés, les smolts terminaux étant parfaitement capables de s'adapter à l'eau de mer et d'y grandir. Après 21 jours en eau salée 88 à 92 % des parrs sont morts chez les témoins et les "sham" alors que 92 % des traités à la GH survivent.

En juin, en période de post-smoltification, les différences sont toujours peu marquées pour les post-smolts. Les parrs implantés survivent.

La GH mammalienne en implants est donc très active sur la smoltification et la capacité à répondre à un transfert direct en eau salée chez le juvénile de saumon atlantique. Le temps minimal à attendre entre l'implantation et le passage en mer est de 10 à 12 jours et la dose idéale de  $250 \mu\text{g}$  pour un animal de moins de 50 g. Le saumon répond très différemment au traitement selon le moment de l'année et son "degré de smoltification". Des comparaisons d'effets hormonaux ( $T_3$ , PRL, cortisol et GH) en octobre ont été tentées et la GH se révèle à chaque fois la molécule active (également dans les effets synergiques).

Hormone de croissance (GH) et adaptation à l'eau de mer des Salmonidés :  
mise en évidence d'un effet branchial de la GH.

P. PRUNET, M. PISAM\*, G. BOEUF\*\*, M. AVELLA†, J.P. CLAIREAU

INRA, Campus de Beaulieu, 35042 RENNES Cedex

\* CEN Saclay, 91 GIF-SUR-YVETTE

\*\* IFREMER, BP 70, 29280 PLOUZANE

† Faculté des Sciences, Parc Vabrose, 06034 NICE Cedex.

La mise en évidence d'une stimulation de l'adaptation à l'eau de mer du pré-smolt ou du parr de saumon atlantique après traitement à la GH mammalienne (Boeuf *et al.*, 1990) nous a amené à rechercher les effets de ce traitement sur les propriétés osmorégulatrices des branchies. Des saumons juvéniles (pré-smolt ou parr) ont été traités selon un protocole identique à celui de Boeuf *et al.* (1990) et l'analyse des caractéristiques physiologiques de la branchies a été réalisée. Les résultats suivants ont été obtenus :

- le traitement à la GH stimule l'activité  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  de la branchie ; l'étude de l'ultrastructure des cellules branchiales montré de plus une stimulation des cellules à chlorure (taille, système tubulaire, nombre de mitochondries...) qui présentent alors les caractéristiques observés chez un saumon pré-adapté à l'eau de mer (Pisam *et al.*, 1988).

- l'étude du flux sortant totaux de  $\text{Na}^+$  (dont plus de 90 % est d'origine branchial) mesurée 3 heures après un transfert en mer nous montre un effet stimulateur significatif du traitement à la GH. Ces résultats indiquent que chez le saumon atlantique un traitement à la GH appliqué en eau douce stimule les capacités d'excrétion ionique des cellules à chlorure mis en place donc à une réduction du déséquilibre de la balance hydrominérale observé lors de ce transfert.

Chez la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*), l'application d'un tel traitement hormonal induit aussi une augmentation significative de l'activité  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  branchiale ainsi que du flux sortant branchial de  $\text{Na}^+$  mesuré



### Références

CLARKE, W.C. et BERN, H.A. (1990). In C.H. Li (ed). Hormonal proteins and peptides. vol. 8, pp. 105-197.

FOSKETT, J.K., BERN, H.A., MACHEN, T.E. et CONNER M. (1983). J. Exp. Biol. 106, 255-281.

## Effets de la prolactine sur l'adaptation à l'eau de mer des Salmonidés.

P. PRUNET et G. BOEUF\*

INRA, Campus de Beaulieu, 35042 RENNES Cedex  
IFREMER, BP 70, 29280 PLOUZANE

Un certain nombre de travaux réalisés chez *Fundulus heteroclitus* ou chez le tilapia (*O. mossambicus*) suggère que la prolactine (PRL) aurait un effet inhibiteur de l'adaptation à l'eau de mer de ces poissons (voir revue Clarke et Bern, 1980 ; Foskett *et al.*, 1983). Nous avons donc cherché à mettre en évidence un tel effet de la PRL chez les salmonidés au cours de la smoltification ou pendant le transfert en mer. Les résultats suivants ont été obtenus :

- l'étude des niveaux plasmatiques de PRL au cours de la smoltification du saumon atlantique met en évidence une baisse significative chez les smolts ; une telle chute de prolactinémie n'est pas observée chez les parrs. Cependant cette chute a lieu tardivement dans la période de smoltification (mai-juin) alors que les niveaux de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase sont déjà à leur valeur maximum. Ainsi il ne semble pas y avoir de coïncidence entre cette chute de PRL et la mise en place de mécanismes osmorégulateurs de pré-adaptation au niveau de la branchie chez le smolt.

- l'application d'un traitement à la PRL ovine (implant) chez un smolt de saumon atlantique avant transfert en mer ne modifie ni l'activité de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase branchiale ni les capacités d'adaptation du smolt à un milieu hyperosmotique. Chez la truite arc-en-ciel adaptée à l'eau de mer depuis 3 semaines, un traitement à la PRL induit un déséquilibre significatif mais limité de la balance hydrominérale (7 jours après la pose des implants : [Na<sup>+</sup>] plasmatique chez les témoins : 157 ± 16 mEq/l [Na<sup>+</sup>] plasmatique chez les poissons traités : 165 ± 9 mEq/l). Par contre aucun effet de la PRL sur l'activité Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase branchiale n'a été observée.

Ces résultats suggèrent donc que la PRL ne serait pas un facteur inhibiteur de l'excrétion branchiale active de Na<sup>+</sup> mis en place lors du transfert en mer des Salmonidés.

après passage en mer à l'aide de la technique de la tête isolée et perfusée de truite. Cependant l'effet d'un tel traitement sur le déséquilibre de la balance hydrominérale après transfert direct en eau de mer est moins net que chez le saumon atlantique.

#### Références

Boeuf, G., Prunet, P. et Le Bail, P.Y. (1990) C.R. Acad. Sci., 310, 75-80.

Pisam, M., Prunet, P., Boeuf, G. et Rambourg, A. (1988). Am. J. Anat., 183, 235-244.

# ADAPTATION OSMOTIQUE CHEZ LES POISSONS EURYHALINS: INFLUENCE DE LA SALINITE SUR L'EQUILIBRE ACIDO-BASIQUE EXTRA ET INTRACELLULAIRE.

Nonnotte Guy & Truchot Jean-Paul

Laboratoire de Neurobiologie et Physiologie Comparées, URA 1126 CNRS/Université Bordeaux I, Place Peyneau, 33120 Arcachon

Les poissons euryhalins, lors de transferts d'eau de mer en eau douce ou *vice-versa* sont confrontés à une brusque variation de la pression osmotique du plasma sanguin. Les cellules sont alors soumises à un stress osmotique de grande amplitude et doivent régler leur volume.

Nos recherches sont consacrées à un aspect peu ou pas étudié de ces régulations, à savoir leurs conséquences acide-base. Echanges ioniques membranaires aussi bien que métabolisme des acides aminés libres ou autres substances organiques intervenant dans la régulation du volume cellulaire, peuvent influencer l'état acide-base des liquides extra- et intracellulaires.

Le flet, *Platichthys flesus*, a été choisi comme modèle expérimental pour nous permettre de vérifier cette hypothèse. Cet animal euryhalin des zones côtières est réputé être le poisson dont la concentration osmotique plasmatique subit, au moins transitoirement, les plus larges fluctuations au passage d'eau de mer en eau douce; de plus, il est peu sensible au stress (par comparaison avec les Salmonidés) et peut donc être maintenu pour de longues durées en conditions d'expérience *in vivo*.

Les poissons sont obtenus par chalutages dans les zones estuariennes du sud-ouest de la France (Campagne de pêche N/O Côte d'Aquitaine INSU).

Les expériences ont été menées (i) *in vivo* afin de caractériser les cinétiques des ajustements ioniques et acide-base extracellulaires en conditions hypo- et hyperosmotiques, (ii) *in vitro* sur une préparation de globules rouges isolés afin d'élucider les interactions existant entre les mécanismes assurant la régulation du volume, et ceux impliqués, dans le contrôle du pH cellulaire en conditions hypoosmotiques.

## ***a. Equilibre acido-basique, régulation ionique et changements de salinité chez le flet.***

Le transfert direct d'eau de mer (EM) en eau douce (ED) provoque une diminution transitoire de la pression osmotique plasmatique, ainsi qu'une alcalose métabolique concomitante et transitoire (pH sang: 7.8 en EM et 8.04 cinq jours après transfert en ED), associée à une hypercapnie notoire et persistante. Après trente trois jours en ED, la pression osmotique et le pH du sang ont recouvré les valeurs de référence (EM), mais la pression partielle de dioxyde de carbone du sang, et la concentration en bicarbonate du plasma, sont toujours plus élevées qu'en EM.

Des fluctuations transitoires opposées, i.e. une acidose métabolique doublée d'une alcalose respiratoire, apparaissent chez le flet adapté en ED, retransféré brutalement en EM.

Les mécanismes impliqués dans ces variations acide-base sont très complexes et n'ont pas encore pu être entièrement élucidés. Cependant, ces observations attestent de l'importance des changements de l'état acide-base extracellulaire lors de chocs osmotiques importants qui

peuvent être (i) soit compensés partiellement par des régulations ventilatoires, (ii) soit en relation avec les phénomènes de régulation extracellulaire anisosmotique et/ou des réajustements métaboliques cellulaires impliqués dans la régulation intracellulaire isosmotique.

***b. Etude in vitro de la régulation du volume de l'érythrocyte de flet en conditions hypotoniques.***

L'érythrocyte de flet soumis *in vitro* à un choc hypotonique d'amplitude comparable à celle apparaissant dans le plasma *in vivo* lors du transfert du poisson de EM en ED présente, après un gonflement rapide initial, une régulation du volume cellulaire qui est pratiquement complète après deux heures. Cette régulation est accompagnée d'une sortie d'ions  $K^+$  et  $Cl^-$  alors que le contenu en  $Na^+$  reste constant. La sortie de  $KCl$  ne rend cependant compte que de la moitié du changement de volume, le reste devant être attribué à un efflux (ou à des modifications métaboliques) des osmolytes organiques cellulaires. La régulation du volume et du contenu cellulaire en  $KCl$  est insensible à la bumétanide 0.1 mM (inhibiteur des co-transports cations/chlore), à de nombreux inhibiteurs des conductances potassiques ( $Ba^{2+}$ ,  $Cs^+$ , apamine, quinine), ainsi qu'à un antagoniste de la calmoduline, la chlorpromazine. Par contre, elle est bloquée partiellement (50%) par la bumétanide 1 mM, et totalement par une augmentation du  $K^+$  extracellulaire 100 mM, par la substitution des ions  $Cl^-$  par  $NO_3^-$ , et par des inhibiteurs tels que furosémide, DIDS et DPC, ce qui plaide en faveur de l'intervention d'une conductance  $Cl^-$  et/ou d'un échangeur d'anions restant à définir. Lors de la régulation du volume, le pH extracellulaire augmente significativement, alors que le pH intracellulaire semble maintenu constant, ce qui suggère que les mouvements ioniques et/ou les remaniements des osmolytes organiques s'accompagnent d'un transfert membranaire d'équivalents acide-base.

En conclusion, l'alcalose extracellulaire observée chez le flet transféré d'EM en ED semble être le reflet de mécanismes très efficaces de régulation du pH intracellulaire, qui paraissent requis pour l'adaptation osmotique des tissus chez les poissons euryhalins et qui ont déjà été mis en évidence chez les Invertébrés euryhalins étudiés au laboratoire (\*Truchot et Subramanyan, 1987).

Les résultats obtenus ont une importance tant fondamentale que pratique. Ils peuvent en effet apporter non seulement une contribution à la connaissance des fondements de l'euryhalinité, mais également des éléments susceptibles d'améliorer les protocoles de transfert d'eau douce en eau de mer, lesquels constituent un point de blocage reconnu dans l'aquaculture des Salmonidés.

\* *J. Physiol. (Paris)* 1, 33A.

## EVOLUTION DES FLUX BRANCHIAUX SORTANTS DE SODIUM AU COURS DE LA SMOLTIFICATION DE *Salmo salar*

SOLA François, BORNANCIN Michel, BOEUF Gilles

Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Comparée, U.A. CNRS 651, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06034 NICE Cedex, France.

### INTRODUCTION

De nombreux travaux, en particulier ceux de Boeuf (1987), ont montré que la smoltification, véritable "métamorphose", affecte l'ensemble de la physiologie du saumon et en particulier sa physiologie branchiale. Il était donc intéressant de suivre l'évolution des capacités osmorégulatrices des pré-smolts lors d'un transfert instantané d'eau douce (ED) en eau de mer (EM) ou après 7 heures d'adaptation en eau de mer au cours de la période de smoltification habituelle de *Salmo salar*.

Nous avons étudié d'une part, l'activation des mécanismes branchiaux d'excrétion du sodium lors du transfert direct en eau de mer des pré-smolts de saumon atlantique au cours de la smoltification. D'autre part, chez le smolt en eau douce, nous avons constaté la capacité d'excrétion la plus importante, les structures cellulaires et les dispositifs biochimiques (Na,K-ATPase) étant déjà en place au niveau de l'épithélium branchial.

### EVOLUTION COMPAREE DE LA NATREMIE

Chez les saumons ED la natrémie fluctue entre 176 et 140 mEq/l de Décembre 1988 à Mai 1989. Les animaux passés en EM pendant 7 h montrent une augmentation relative de la concentration de sodium plasmatique qui suit la même fluctuation saisonnière avec un maximum de 214 mEq/l en Décembre 1988 et un minimum de 165 mEq/l en Mars 1989. Les écarts entre les natrémies sont nettement décroissantes et tendent vers zéro à l'époque de la smoltification. Les pré-smolts immergés 7 h en EM se laissent envahir par le sodium, mais ils régulent bien mieux leur natrémie lorsqu'ils sont smolts en Avril-Mai.

### EVOLUTION DES FLUX SORTANTS DE SODIUM

#### Résultats obtenus au cours de la smoltification :

Au cours de la saison de smoltification la perméabilité branchiale croît progressivement. La perméabilité passive en eau douce montre une forte augmentation en avril. Cela pourrait être la traduction au plan physiologique de la réorganisation branchiale liée à la smoltification. Il est à remarquer que le passage en eau de mer dans chacun des lots étudiés se traduit par une tendance à l'augmentation des flux sortants; cependant cet effet est limité. Cela montre bien que les saumons étudiés, même en début de saison ont des potentialités d'osmorégulation importantes que le transfert en mer révèle de façon significative. La préadaptation à l'eau de mer (7 hr) se manifeste aussi de façon très claire par la forte augmentation des flux d'excrétion mesurés en eau de mer.

#### Résultats obtenus chez les smolts (du 11 au 18 Mai 1989) :

Dans ces expériences le temps de transfert en EM a varié de 1 à 24 heures. Dans ces conditions la natrémie croît de 172 à 185 mEq/l. Malgré une légère augmentation dans les deux premières heures, elle se stabilise au delà de 4 hr de séjour en eau de mer. Cela est vérifié après 2 hr en eau de mer où la perméabilité passive passe par un maximum pour s'équilibrer au delà de 4 hr (flux mesurés en ED). Le flux mesuré en EM traduit une excrétion ayant tendance à augmenter légèrement.

# ETUDE DE L'ECHANGE TRANSBRANCHIAL DE Na<sup>+</sup> CHEZ LES SMOLTS ET POST-SMOLTS DE *Salmo salar* TRANSFERES DIRECTEMENT EN EAU DE MER

JEAN-MICHEL NANCE, MICHEL BORNANCIN, FRANÇOIS SOLA,  
GILLES BOEUF et JEAN-DENIS DUTIL

Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Comparée, U.A. CNRS 651, Université de Nice-Sophia Antipolis, Parc Valrose, 06034 NICE Cedex, France.

## INTRODUCTION

Au cours de la smoltification les capacités hypo-osmorégulatrices se développent, particulièrement dans les branchies, transformant le parr d'eau douce à peine euryhalin en smolt, préadapté à l'environnement marin. Cette étude a examinée les flux branchiaux ioniques chez les smolts au cours de la smoltification et chez les smolts maintenus en eau douce au delà de la période de smoltification (post-smolts). Les flux ioniques ont été mesurés sur la tête isolée perfusée pour réaliser des mesures instantanées de l'échange transbranchial de Na<sup>+</sup> au cours du transfert direct en eau de mer

## RESULTATS

I- Distribution du perfusé dans les branchies de smolts ou post-smolts modifiée au moment du transfert en eau de mer: La vitesse du débit total (artériel + veineux) maintenue constante par une pompe pulsative n'a pas changée au moment du transfert en eau de mer. Cependant, une réduction de 30% (0.6 ml) de la vitesse du débit artériel a été observée, et le débit veineux a été augmenté de 0.6 ml. Cette variation a été réversible puisque la perfusion artérielle a retrouvé son débit entier lorsque la préparation a été à nouveau replacée en eau douce.

II- Flux entrants et sortants transbranchiaux de Na<sup>+</sup> mesurés en eau douce et en eau de mer sur une tête perfusée de smolt ou post-smolt.

Les smolts ont eu une capacité d'excrétion instantanée dès qu'ils ont été placés en eau salée. Les mesures effectuées en eau douce ont montré qu'ils perdent du sodium au travers de l'épithélium branchial entier. En eau de mer, l'épithélium des lamelles respiratoires a été très perméable et laisse le sodium pénétrer; autrement dit, l'épithélium filamenteux, excrète le sodium et, au total, il y a une excrétion nette de sodium.

Chez les post-smolts en eau douce en juillet, nous avons noté que:  
1) Le sodium a été prélevé à travers l'épithélium respiratoire en eau douce.  
2) au moment du transfert en eau de mer, de grandes quantités de sodium ont pénétré à travers la lamelle respiratoire aussi bien que primaire. Les branchies ont perdu leur aptitude à excréter le sodium et lorsqu'elles ont été directement transféré en eau de mer elles ont montré un important flux net entrant.

III- Evolution des flux nets de Na<sup>+</sup> en fonction du temps en eau de mer :

- Le flux net artériel à travers la lamelle respiratoire a diminué en fonction du temps et a atteint un minimum stable en 10 min, à la fois chez les smolts et post-smolts.

- Le smolt ne souffre pas de perte de sodium plasmatique à travers les branchies. Au niveau de la zone branchiale irriguée par le sang veineux l'excrétion de Na<sup>+</sup> d'abord instantanée a augmenté très rapidement. Elle a atteint a maximum stable après 10 min environ. A la différence des smolts, les flux branchiaux chez les post-smolts n'ont pas été équilibrés au cours du transfert. Le flux net entrant via la circulation veineuse, encore que moins prononcé, a été ajouté au flux artériel et a contribué ainsi à une perte possible de Na<sup>+</sup> plasmatique au niveau des branchies.

IV- Les flux artériels varient par rapport au poids et selon l'état physiologique du poisson étudié. Des discontinuités en relation avec la taille et les flux de sodium dans les lamelles respiratoires suggèrent des flux entrants et des flux sortants qui varient en fonction du poids du poisson étudié. Les flux mesurés dans les filaments varient aussi avec le poids, mais leur tendance n'est pas aussi claire.

EFFETS DE TRANSFERTS DIRECTS D'EAU DOUCE EN EAU DE MER  
SUR LE MÉTABOLISME ÉNERGETIQUE DES SMOLTS DE SAUMON ATLANTIQUE

par Valérie MAXIME\*, Gilles BOEUF\*\* et Claude PEYRAUD\*

\*U.R.A. CNRS 648 - Physiologie de l'adaptation chez le poisson ((U.B.O. Brest)

\*\*IFREMER - Centre de Brest

La consommation d'oxygène en conditions de métabolisme standard ( $MO_2S$ ) et de métabolisme de routine ( $MO_2R$ ), ainsi que l'ionogramme plasmatique, ont été étudiés chez les smolts pendant cinq jours consécutifs à la suite de trois transferts ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ) effectués respectivement avant, pendant et après le terme de la smoltification (apprécié par la valeur maximale de l'activité ( $Na^+$ ,  $K^+$ ) ATPasique branchiale).

**MODIFICATIONS DE L'IONOGRAMME PLASMATIQUE :**

Les concentrations de  $Na^+$ ,  $K^+$  et  $Cl^-$  augmentent de manière similaire dans les trois situations de transfert. Toutefois l'augmentation de  $[Cl^-]$  est supérieure à celle de  $[Na^+]$ . Les concentrations de lactate demeurent inchangées. La diminution de SID (Strong Ion Difference) résultant des modifications de l'ionogramme plasmatique permet de prévoir le développement d'une composante d'acidose métabolique.

**MODIFICATIONS DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE :**

a) Métabolisme énergétique standard ( $MO_2S$ )

$MO_2S$  est diminué lors de  $T_1$  (- 15 %) et, au contraire, augmenté lors de  $T_2$  (+ 6 %) et de  $T_3$  (+ 14 %).

Les données de l'ionogramme plasmatique conduisent à estimer que l'éventuel surcoût énergétique de l'osmorégulation est similaire dans les trois situations de transfert. Dans ces conditions, les variations de  $MO_2S$  peuvent être interprétées comme résultant essentiellement de modifications du métabolisme intermédiaire (turn-over des protéines).

b) Métabolisme énergétique de routine ( $MO_2R$ )

1°) *Biorythmicité*

Les fluctuations circadiennes de  $MO_2R$  (activité diurne, hypo-activité nocturne), observées en condition de référence (eau douce), sont altérées par  $T_1$  et  $T_2$ . Par contre, les caractéristiques typiques de ce



biorythme sont restaurées par T<sub>3</sub>. En effet, dans ce dernier cas, le maintien en eau douce de smolts en état de post-smoltification a pour conséquence une désorganisation du rythme circadien.

### *2°) Valeurs moyennes*

Le transfert en mer entraîne une diminution de MO<sub>2</sub>R lors de T<sub>1</sub> (- 14 %) et T<sub>2</sub> (- 6 %) mais au contraire une augmentation lors de T<sub>3</sub> (+ 5 %).

Les diminutions de MO<sub>2</sub>R, observées à la suite des transferts T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>, intervenant essentiellement au cours de la phase d'activité diurne, peuvent être considérées comme la conséquence d'une réduction de l'activité motrice spontanée. Cette réaction comportementale constituerait alors un processus d'adaptation à une limitation possible de l'approvisionnement tissulaire en O<sub>2</sub> pouvant résulter, à la fois, d'une réduction de la capacité de diffusion gazeuse des branchies et d'une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour O<sub>2</sub>, prévisible à partir des modifications de l'ionogramme plasmatique.

L'augmentation, apparemment paradoxale, de MO<sub>2</sub>R lors du transfert T<sub>3</sub> peut être interprétée comme la levée d'un état d'inhibition comportementale induite par le maintien en eau douce de poissons (post-smolts) devenus typiquement adaptés au milieu marin.

ETUDE CHEZ LE SAUMON ATLANTIQUE DES EFFETS RESPIRATOIRES  
ET DES MODIFICATIONS DE L'ETAT ACIDO-BASIQUE  
DU COMPARTIMENT EXTRACELLULAIRE PROVOQUES  
PAR UN TRANSFERT DIRECT D'EAU DE MER EN EAU DOUCE

*par Valérie MAXIME, Serge THOMAS et Claude PEYRAUD*

*U.R.A. CNRS 648 - Physiologie de l'adaptation chez le poisson (U.B.O. - Brest)*

La consommation standard d'oxygène ( $MO_2S$ ), l'activité ventilatoire, les caractéristiques acido-basiques du plasma et l'affinité de l'hémoglobine pour  $O_2$ , ont été suivis chez le saumon acclimaté à l'eau de mer durant une période de cinq semaines consécutive au transfert en eau douce.

De la diminution relativement plus importante du débit d'eau ventilée ( $V_w$ ), que de  $MO_2S$  au cours des dix premiers jours du séjour en eau douce, résulte une décroissance de la ventilation spécifique. L'augmentation du coefficient d'extraction branchial de l'oxygène et la stabilité, voire la diminution paradoxale de la pression partielle de  $CO_2$  du sang artériel ( $PaCO_2$ ), en dépit de la décroissance de  $V_w$  et de la capacitance de l'eau pour  $CO_2$ , constituent des arguments en faveur d'une amélioration de la capacité de diffusion gazeuse des branchies, induite par la diminution de salinité ambiante.

Les variations des concentrations ioniques et de l'état acido-basique du plasma présentent un aspect biphasique. Au cours d'une première phase (10 jours), la perte passive plus importante de  $Cl^-$  que du  $Na^+$  entraîne une augmentation de la différence des concentrations plasmatiques des ions forts (SID).  $PaCO_2$  étant très peu modifiée, l'alcalose observée ( $\Delta pHa = + 0,5$  au jour 10) peut alors être considérée comme essentiellement métabolique. La deuxième phase (du 10ème au 34ème jour) consiste en la compensation de cette alcalose par des processus de réabsorption ionique aboutissant à une réduction de l'augmentation initiale de SID. L'alcalose du compartiment extracellulaire et la diminution de la concentration intra-érythrocytaire de  $Cl^-$  induisent une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (diminution maximale de 35 % de  $P_{50}$ ).

Ce dernier effet, ainsi que l'augmentation de la capacité de diffusion gazeuse des branchies, peuvent être interprétés comme des processus adaptatifs facilitant l'approvisionnement tissulaire en  $O_2$  lors de l'importante dépense énergétique concomitante de la migration anadrome.

résultante, à la fois, d'une libération de médiateurs vasoactifs (Arginine-vasotocine, Rénine) directement provoquée par PGE<sub>2</sub> et d'un effet inotrope positif de cette prostaglandine au niveau des fibres myocardiques.

.Effets respiratoires :

Au niveau de la ventilation, la réponse à l'apport de PGE<sub>2</sub> est également biphasique. A une phase initiale apnéique succède une phase prolongée au cours de laquelle les deux paramètres de l'activité ventilatoire varient en sens opposés : augmentation de la fréquence, concomitante d'une diminution de l'amplitude des mouvements operculaires. La résultante de ces effets est une diminution du débit ventilé et de PaO<sub>2</sub>.

L'augmentation de fréquence ventilatoire peut être interprétée comme le résultat à la fois d'un stimulus hypoxique (diminution de PaO<sub>2</sub>) et d'une activation de structures adrénergiques centrales puisque cet effet est notablement atténué après traitement par un antagoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.

La diminution de l'amplitude ventilatoire peut être interprétée comme la manifestation d'une action inhibitrice directe de PGE<sub>2</sub> sur les structures centrales assurant la modulation de cette grandeur ; cet effet était partiellement atténué par le stimulus hypoxique.

EFFETS RESPIRATOIRES ET CIRCULATOIRES DE LA PROSTAGLANDINE PGE<sub>2</sub>  
CHEZ L'ANGUILLE EUROPEENNE

par Marguerite PEYRAUD-WAITZENEGGER et Valérie BOLLIET

U.R.A. CNRS 648 - Physiologie de l'adaptation chez le poisson (U.B.O. - Brest)

L'expérimentation avait pour objectifs :

1°) La mise en évidence des effets de la prostaglandine PGE<sub>2</sub> simultanément sur un ensemble de grandeurs :

- respiratoires : Ventilation (amplitude et fréquence des mouvements operculaires). Pression partielle d'oxygène du sang artériel (PaO<sub>2</sub>).

- circulatoires : Electrocardiogramme. Pression artérielle (aorte dorsale).

2°) Etude des modalités d'action de cette prostaglandine sur la base de l'interactivité des processus de régulation. Cette étude basée sur l'utilisation d'antagonistes spécifiques des neuromédiateurs avait pour but de caractériser à la fois les effets directs et indirects de PGE<sub>2</sub>.

PGE<sub>2</sub> a été administrée par injection intraveineuse à la dose de 10 µg/kg. Cette démarche se justifiait par le fait que des taux plasmatiques de prostaglandines, très élevés comparativement aux mammifères, ont été observés chez les poissons.

#### RESULTATS ET INTERPRETATION

.Effets circulatoires : Ils présentent un caractère biphasique.

*1ère phase* : Importante bradycardie (diminution supérieure à 50 % de la fréquence cardiaque) concomitante d'un effet hypotensif très marqué.

*2ème phase* : Atténuation progressive de l'effet bradycardique et développement d'un effet hypertensif.

La réponse bradycardique étant totalement éliminée par un blocage préalable des récepteurs cholinergiques muscariniques constitue un effet typiquement vagal qui peut être interprété comme la conséquence d'une action directe de PGE<sub>2</sub> sur les centres cardio-modérateurs bulbaires.

La réponse hypertensive faisant suite à l'hypotension transitoire n'est pas imputable à un effet catécholaminergique, puisqu'elle subsiste après traitement préalable par un antagoniste spécifique des récepteurs α-adrénergiques. Cet effet pourrait alors être interprété comme la

**PATHOLOGIE**

Approche à promouvoir chez les  
différentes races

**RESISTANCE GENETIQUE AUX BACTERIOSES ET VIROSES DES SALMONIDES :  
APPROCHE DES FACTEURS EN CAUSE.**

Production comparée d'interféron après infection par la SHV chez des  
truites Arc-en-ciel et des hybrides résistant à la maladie

M. DORSON - Unité Virus des Poissons  
Laboratoire de Virologie et d'Immunologie Moléculaires, INRA, Domaine de  
Vilvert, 78352 JOUY-EN-JOSAS CEDEX

Des hybrides triploïdes ont été obtenus avec un rendement atteignant 60 % entre la Truite Arc-en-ciel Oncorhynchus mykiss et le Saumon Coho O. kisutch, ainsi que trois espèces d'ombles : Omble chevalier, Salvelinus alpinus, Cristivomer, S. namaycush, et Omble de fontaine, S. fontinalis. C'est ce dernier hybride qui a montré la meilleure résistance à la Septicémie hémorragique virale, à égalité avec l'hybride Saumon Coho/Truite Arc-en-ciel, et a été choisi pour établir des cinétiques de production d'interféron suite à l'infection virale en comparaison avec des truites Arc-en-ciel sensibles. Cette infection a été pratiquée suivant deux voies : par bain sur des poissons de 3 à 4 g et par injection sur des animaux de 500 à 600 g. Les hybrides ont bien résisté aux deux types d'épreuve, et se caractérisent par une virémie faible accompagnée d'une production d'interféron qui reste à un niveau très inférieur à celui qui peut être atteint chez les truites Arc-en-ciel. Ces dernières meurent malgré cette production d'interféron importante, corrélée il est vrai à une virémie intense. L'interféron observé dans ces conditions se confirme donc comme le reflet fidèle de la multiplication virale, et ne rend donc pas compte de la résistance à la maladie.

**YERSINIOSE DES SALMONIDES**  
**ETUDE COMPAREE DE DIFFERENTS MODES DE VACCINATION**

**M. VIGNEULLE**

**CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES (CNEVA)**  
 Laboratoire de Pathologie des Animaux Aquatiques (LPAA)  
 B.P. 70 - 29280 Plouzané (France)

Des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss* Richardson) ont été vaccinées contre la yersiniose à *Yersinia ruckeri* selon trois modes : l'inoculation (VI), la voie orale (VO) (distribution pendant 3 jours de l'aliment vaccinal contenant le vaccin incorporé aux doses D1 ou D2) et la voie anale (VA) (intubation unique au niveau de l'intestin postérieur d'une suspension gélosée du vaccin dilué aux doses D1 ou D2).

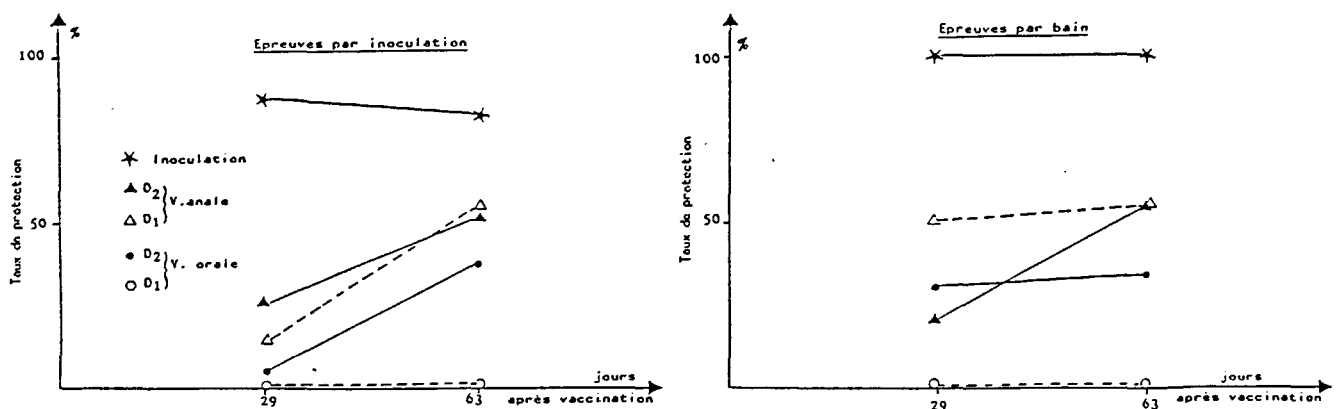
Deux épreuves virulentes ont été effectuées. 29 et 63 jours après la vaccination des poissons sont contaminés avec une suspension de *Y. ruckeri* selon deux modes : l'inoculation et le bain. Trois semaines après le début de chaque épreuve, les poissons survivants sont sacrifiés et la bactérie est recherchée au niveau du rein antérieur et de l'intestin postérieur, permettant de définir le nombre de poissons porteurs.

La nature de la protection induite par la vaccination est recherchée par immunisation passive : injection de sérums de poissons vaccinés, prélevés 73, 85 ou 102 jours après la vaccination suivie d'une épreuve virulente 24 h plus tard.

Les anticorps agglutinants sériques sont titrés avant et après les épreuves.

La vaccination par inoculation confère une excellente protection (TP = 87 %) dès la première épreuve. Les deux autres modes de vaccination confèrent une protection inférieure, la plus faible efficacité étant obtenue par VO (Figure 1).

**Figure 1 - Vaccination : taux de protection après les épreuves par bain et par inoculation**



L'immunisation par VA entraîne une protection supérieure (TP = 50 % à J63) à celle conférée par la VO (TP = 38 %, obtenu seulement avec la dose la plus forte D2), et se met en place plus vite, dès J29 pour VA D2 et à J63 pour VO D2.

A la fin des épreuves virulentes, le nombre de poissons porteurs sains asymptomatiques est inférieur chez les vaccinés par rapport aux témoins.

L'injection parentérale de sérum de poissons vaccinés (Figure 2) par VA, comme celui de poissons vaccinés par VI, confère une certaine protection, variable selon l'origine du sérum, bien que le taux des anticorps agglutinants reste faible. Sans préjuger d'une protection locale, il y a mise en place d'une réaction générale consécutive à la vaccination par voie digestive.

Figure 2 - Immunisation passive : Mortalité après l'épreuve virulente

|                 | NATURE DU SERUM | TEMOINS   |                          | VACCINES         |                 |         |                 |
|-----------------|-----------------|-----------|--------------------------|------------------|-----------------|---------|-----------------|
|                 |                 | Eau ♀ (T) | Truite non vaccinée (TS) | Inoculation (VI) | Voie anale (VA) |         | Voie orale (VO) |
|                 |                 |           |                          |                  | Dose D1         | Dose D2 | Dose D2         |
| Sérum prélevé à | Effectif        | 40        | 40                       | 40               | 40              | 40      | 40              |
| J73             | Mortalité (%)   | 27,5      | 32,5                     | 17,5             | 30              | 22,5    | 32,5            |
|                 | T.P.* (%)       |           |                          | 36               | 0               | 18      | 0               |
| J85             | Mortalité (%)   | 40        | 37,5                     | 12,5             | 17,5            | 20      | 42,5            |
|                 | T.P. (%)        | a         | a                        | b                | b               | b       | a               |
|                 |                 |           | 6                        | 69               | 56              | 50      | 0               |
| J102            | Mortalité (%)   | 35        | 30                       | 10               | 30              | 10      | 35              |
|                 | T.P. (%)        | a         | a                        | a                | a               | a       | a               |
|                 |                 |           | 14                       | 71               | 14              | 71      | 0               |

\* T.P. : Taux de protection : 
$$\frac{(\% \text{ Mortalité/Témoins} - \% \text{ Mortalité/Vaccinés})}{\% \text{ Mortalité/Témoins}}$$

Pour chaque lot, les moyennes accompagnées d'au moins une lettre commune ne sont pas significativement différentes (ANOVA, Newman-Keuls ; p < 5 %)



**ETUDE DE L'ABSORPTION DU VACCIN ANTI-VIBRIO  
DISTRIBUE PAR VOIE DIGESTIVE CHEZ TROIS ESPECES DE POISSONS,  
LA TRUITE ONCORHYNCHUS MYKISS (RICHARDSON),  
LE BAR DICENTRARCHUS LABRAX L. ET LE TURBOT SCOPHTALMUS MAXIMUS L.**

**M. VIGNEULLE, F. BAUDIN LAURENCIN**

**CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES (CNEVA)  
Laboratoire de Pathologie des Animaux Aquatiques (LPAA)  
B.P. 70 - 29280 Plouzané (France)**

Une étude comparative de l'absorption intestinale du vaccin anti-Vibrio anguillarum a été effectuée chez trois espèces de poissons, la truite, le bar et le turbot, vaccinés selon deux modes : distribution pendant 5 jours d'un aliment vaccinal (voie orale (VO)), et intubation unique au niveau de l'intestin postérieur (IP) d'une suspension vaccinale gélosée (voie anale (VA)).

A intervalles de temps réguliers après la vaccination (de J1 à J21), des poissons sont sacrifiés. La présence de l'antigène bactérien est recherchée sur des coupes d'IP, de rate (R) et de rein antérieur (RA) après coloration par immunofluorescence indirecte. Pour l'appréciation semi quantitative de la pénétration de l'antigène dans la Lamina epithelialis, une note (0 à 4) est donnée à chaque coupe d'intestin en fonction de l'intensité de la fluorescence observée. Une note moyenne est calculée pour chaque prélèvement, chaque espèce et chaque mode de vaccination. L'éventuelle modification de la population leucocytaire est également recherchée sur les coupes d'IP après coloration au Giemsa.

L'antigène, mis en évidence par une fluorescence spécifique, est présent uniquement au niveau de l'IP des poissons vaccinés tout au long de la période étudiée (Fig. 1 et 2). Aucune fluorescence n'est observée au niveau du RA et de la R.

|    |        | LUMIERE<br>INTESTINALE | EPITHELIUM         |                       |                        | TISSU<br>CONJONCTIF<br>SOUS EPITHELIAL<br>(CELLULES) |
|----|--------|------------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|--|
|    |        |                        | SURFACE<br>EXTERNE | BORDURE<br>EN BROUSSE | LAMINA<br>EPITHELIALIS |  |
| VO | TRUITE | J1 --> J7              | J3 --> J4          | J4 --> J7             | J7 --> J18             | 0  |
|    | BAR    | J1 --> J4              | J3                 | 0                     | J1 --> J14             | 0  |
|    | TURBOT | J1 --> J7              | J1 --> J21         | 0                     | J1 --> J21             | 0  |
| VA | TRUITE | J1 --> J4              | J1 --> J4          | J1 --> J4             | J1 --> J18             | 0  |
|    | BAR    | 0                      | 0                  | 0                     | J1 --> J18             | (J1 --> J21)   |
|    | TURBOT | 0                      | J1 --> J21         | 0                     | J1 --> J21             | (J9 --> J21)   |

( ) quelques poissons seulement

**Figure 1 - Distribution de la fluorescence dans les coupes d'IP**

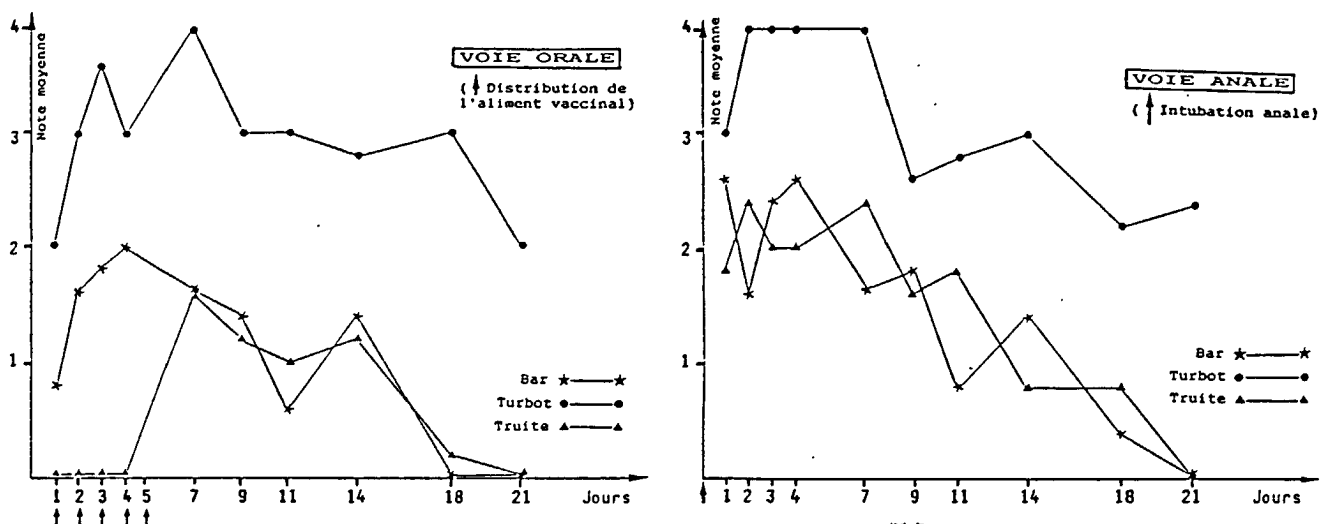


Figure 2 - Evolution semi quantitative de la fluorescence dans la Lamina epithelialis

L'absorption intestinale de l'antigène est rapide (dès J1). Après vaccination par VA, la fluorescence disparaît rapidement de la lumière intestinale et est immédiatement importante dans la Lamina epithelialis. Après vaccination par VO, l'absorption est plus progressive et la quantité d'antigène présente dans la Lamina epithelialis plus faible qu'après vaccination par VA.

Chez la truite, l'absorption semble plus lente que chez les deux autres espèces et limitée à une petite partie des villosités intestinales. Chez le bar et le turbot, le transit de l'antigène vers l'épithélium intestinal est rapide. La fluorescence est localisée à l'ensemble des villosités intestinales chez le bar et à la partie supérieure de celles-ci chez le turbot, espèce pour laquelle elle présente la plus forte intensité.

L'absorption intestinale de l'antigène ne s'accompagne pas de l'augmentation du nombre des leucocytes intraépithéliaux.

**AQUACULTURE TROPICALE**



**Etude du cycle reproducteur du Loup Tropical *Lates calcarifer* introduit en Polynésie Française.  
GUIGUEN Y\*. FUCHS J\*\*. JALABERT B\*.**

\* :INRA ; Laboratoire de Physiologie des Poissons.

\*\* :IFREMER ; Centre Océanologique du Pacifique (COP).

Ces travaux visent à préciser le cycle reproducteur naturel et les phénomènes de sexualité chez le loup tropical *Lates calcarifer*, espèce hermaphrodite protandre (MOORE, 1979), originaire du sud-est Asiatique, et introduite dans des conditions d'élevage en Polynésie Française.

Une vingtaine d'animaux, appartenant à la même cohorte, âgés de trois ans et stabulés dans des cages flottantes au Centre Océanologique du Pacifique (Tahiti, Polynésie Française), ont été sacrifiés mensuellement durant quatorze mois. Après collecte des données biométriques (Longueur standard, Poids corporel, Périmètre corporel, Distance Museau-opercule et Dorsale-pelvienne), le foie, les gonades et les viscères ont été pesés et un échantillon de gonade est fixé pour histologie.

L'analyse de ces données morphométriques et histologiques met en évidence les résultats préliminaires suivants:

La période de reproduction à Tahiti est centrée sur le mois de Décembre et s'étale entre Octobre et Mars-Avril suivant les animaux. Elle coïncide donc avec la saison chaude (t'eau=28-29°C) caractérisée aussi par une photophase élevée (12-13h) et une pluviométrie importante (200 à 300 mm d'eau / mois). La période de repos sexuel est très nettement marquée et coïncide avec la saison sèche (t'eau=27-28°C, 11-12h de jour, 100 à 200 mm d'eau / mois).

L'inversion sexuelle intervient après la saison de reproduction chez des animaux mâles en début de phase de repos sexuel, et a concerné 45% de la population mâle de la cohorte étudiée. D'autre part il semble exister un dimorphisme sexuel pour un âge donné au sein de la même cohorte, les femelles apparaissant de poids toujours plus élevé que les mâles en moyenne.

Au niveau histologique nous avons observé que l'inversion sexuelle passe par une dégénérescence complète du testicule et semble nécessiter une réorganisation morphologique importante de la structure de la gonade.

Dès à présent, ces résultats ont permis de décaler la période de reproduction saisonnière de cette espèce par manipulation des facteurs thermiques et photopériodiques. D'autres travaux en cours visent à mieux comprendre le déterminisme de l'inversion sexuelle de façon à pouvoir la contrôler ultérieurement (contrôle hormonal et/ou social).

---

MOORE R., 1979.

Natural sex inversion in the giant perch (*Lates calcarifer*).

Aust. J. Mar. Freshwater Res. 30, 803-813.

**INVERSION SEXUELLE CHEZ LE MEROU, EPINEPHELUS MICRODON,  
HERMAPHRODITE PROTÉROGYNE: ANALYSE DE LA STEROIDOGENESE  
GONADIQUE.**

**DEBAS, L.; JALABERT, B.; FUCHS, J.\*; NEDELEC, G.\* ; BENNETT, A.\* ;  
FOSTIER, A.**

Laboratoire de Physiologie des Poissons, INRA, Rennes.

\* Centre Océanologique du Pacifique, IFREMER, Tahiti.

**Introduction et objectifs:**

Grâce, en particulier, aux travaux de l'IFREMER en Polynésie Française, les conditions techniques sont réunies pour envisager le développement de l'élevage du mérou. Une de ses difficultés tient à la gestion du cheptel de géniteurs, actuellement capturés dans le milieu naturel, dont la sexualité de type hermaphrodite protérogyne, rend difficile l'estimation et le contrôle du sex-ratio.

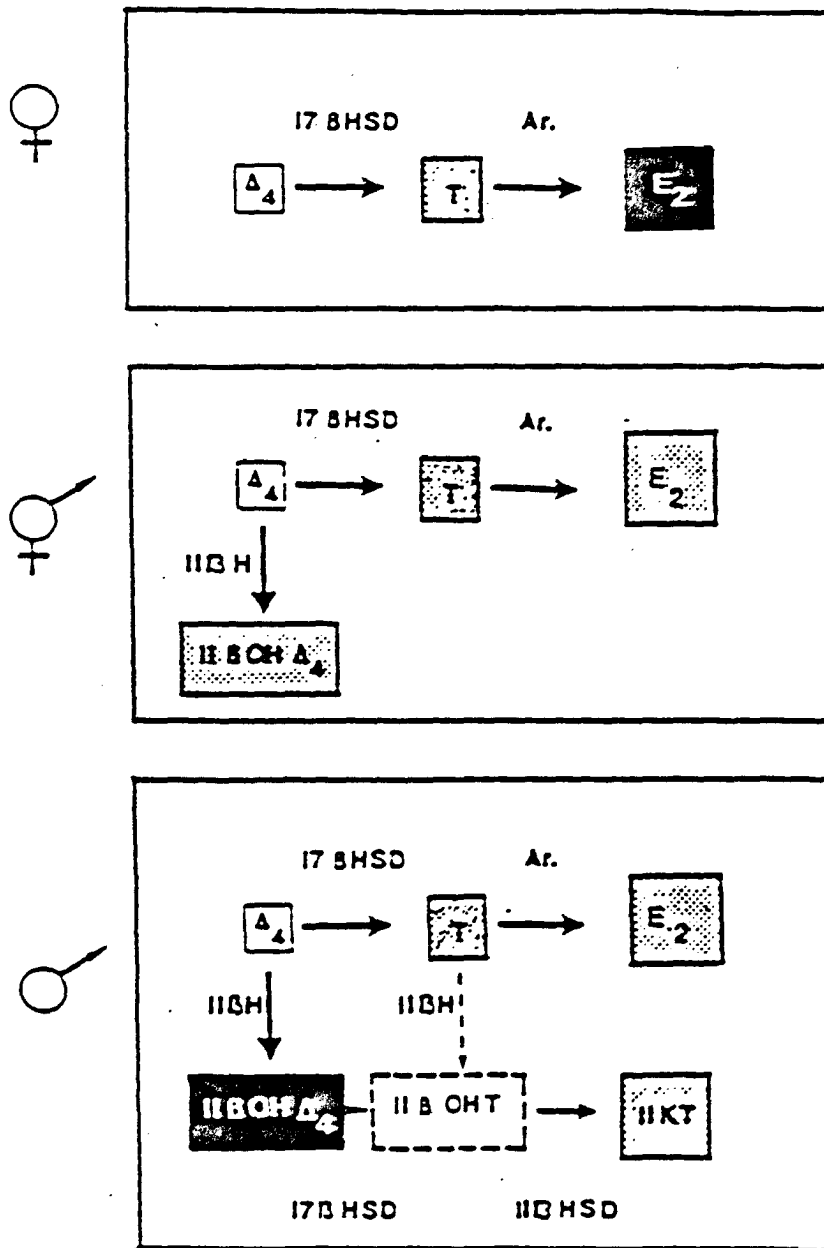
Le contrôle du sexe chez les hermaphrodites peut être envisagé, par analogie avec les techniques utilisées chez les gonochoriques, au moyen d'administration de stéroïdes sexuels, possible sur des géniteurs non destinés à la consommation. Les essais, essentiellement empiriques, réalisés chez les hermaphrodites sont peu efficaces (Reinboth, 1987). La présente étude avait pour objectif d'explorer l'endocrinologie stéroïdienne d'animaux, capturés dans le milieu naturel ou maintenus en élevage, afin de proposer un traitement rationnel. Le mérou, *Epinephelus microdon*, du fait d'une taille à l'inversion relativement modeste, représente un modèle de choix pour ce travail.

**Principaux résultats**

Une étude antérieure de la population naturelle de l'archipel des Tuamotu (Debas *et al.*, 1988) a permis de montrer que la reproduction de cette espèce est saisonnière, au début de l'hiver austral pour l'année 1986, et s'accompagne d'un phénomène migratoire. *Epinephelus microdon* est hermaphrodite protérogyne, mode de sexualité caractérisé par l'analyse de la répartition des poids selon le sexe et l'observation histologique des gonades d'individus en cours d'inversion sexuelle (capturés à toutes les saisons) décrite par l'étude histologique de leur gonade. A partir d'individus maintenus en captivité, des phénomènes d'inversion mais aussi de réversion, jamais décrits chez d'autres espèces d'hermaphrodites, ont pu être suivis.

Les différences entre sexes concernant les stéroïdes circulants ou gonadiques sont quantitatives et non qualitatives. C'est en fait le rapport oestradiol/11-cétotestostérone qui caractérise le mieux les sexes. Les niveaux plasmatiques d'oestradiol sont significativement plus élevés chez les femelles, tandis que la 11-cétotestostérone prédomine chez les mâles. Par contre, la testostérone est trouvée à des niveaux comparables dans les deux sexes. Par ailleurs les profils endocriniens des animaux capturés dans le

SCHEMA DE SYNTHÈSE *IN VITRO* PAR DES GONADES FEMELLE, INTERSEXUEE ET MALE D'EPINEPHELUS MICRODON, INCUBEES EN PRESENCE DE 3H-ANDROSTENEDIONE.



- C.C.M. successives dans différents systèmes.
- C.C.M. successives + C.L.H.P.
- C.C.M. successives + cocristallisation.

Abbreviations.

H.S.D. : Hydroxy-stéroïde-déshydrogénase.

H : Hydroxylase.

Ar : Aromatase.

milieu naturel en période d'inversion sont comparables à ceux des femelles immatures. Enfin, plusieurs animaux, en inversion ou en réversion, ont été suivis en élevage par biopsies successives. Les phases de changement de sexe sont caractérisées par des niveaux de stéroïdes circulants plus faibles que durant les phases de maturité sexuelle de l'un ou l'autre sexe.

Les études de métabolisme montrent une transformation active de l'androsténédione par tous les types de tissus analysés dès 30 minutes d'incubation: ovaire en vitellogénèse, testicule en spermiogénèse, gonade en cours d'inversion contenant encore quelques ovocytes en vitellogénèse. Les principaux métabolites des gonades en cours d'inversion sont comme pour l'ovaire, la testostérone et l'oestradiol. L'oestrone et l'oestradiol, en plus faible quantité, sont par ailleurs détectables dans l'ovaire. Par contre, la 11 $\beta$ -hydroxyandrosténédione est présente pendant l'inversion mais pas dans l'ovaire fonctionnel. Dans le testicule, les productions de testostérone et de 11 $\beta$ -hydroxyandrosténédione dominent.

Après 2 h d'incubation, la 11 $\beta$ -hydroxyandrosténédione et la 11-cétotestostérone apparaissent dans les productions testiculaires. L'oestradiol devient détectable. Il n'y a pas de modifications qualitatives importantes pour l'ovaire et la gonade en cours d'inversion par rapport à une durée d'incubation plus courte.

Après 24 h d'incubation, des métabolites polaires apparaissent, en particulier dans le testicule. Les androgènes 11-oxygénés dominent alors: 11 $\beta$ -hydroxyandrosténédione, 11 $\beta$ -hydroxytestostérone et 11-cétotestostérone. Parmi plus d'une dizaine d'androgènes réduits en position 5 ayant été recherchés, seule la 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ -ol-17-one pourrait être présente.

Enfin une conjugaison active (formation de sulfates et de glucuronides) a été mise en évidence, après hydrolyse, dans l'ovaire et la gonade en cours d'inversion.

### Conclusion,

La synthèse d'oestradiol est prépondérante dans l'ovaire mais persiste en cours d'inversion et dans le testicule. La mise en place de ce dernier s'accompagne d'une synthèse spécifique d'androgènes 11-oxygénés.

Les biosynthèses observées dans la gonade en cours d'inversion sont plus proches de celles de l'ovaire que de celles du testicule, exception faite de la 11 $\beta$ -hydroxyandrosténédione synthétisée par ailleurs activement par le testicule.

L'activité de type phéromonal des stéroïdes conjugués, composés hydrosolubles, produits par l'ovaire et la gonade en cours d'inversion mériterait d'être examinée.

Il s'avère que la synthèse de testostérone n'est pas spécifique d'un sexe. Par contre la 11 $\beta$ -hydroxyandrosténédione, produite par le testicule et la gonade en cours d'inversion, mais non par l'ovaire, peut être proposée pour un essai d'induction d'inversion expérimentale qui devrait être tenté en phase d'immaturité de l'ovaire.



ETUDE DU CYCLE NYCTHEMERAL DE LA PRISE D'ALIMENTS CHEZ  
*HOPLOSTERNUM LITTORALE*

Thierry BOUJARD, Yann MOREAU, Philippe KEITH et  
Pierre LUQUET

INRA Hydrobiologie, BP 709, 97387 Kourou Cedex,  
France.

RESUME:

L'heure de distribution des repas est réputée interférer avec l'utilisation des nutriments chez certaines espèces de poissons. Sont affectés: la vitesse de croissance, l'indice de consommation et la composition corporelle. Cette possibilité d'influencer l'utilisation métabolique des aliments par la prise en compte des cycles nycthémeraux devrait permettre de synchroniser la distribution des aliments avec les cycles biologiques.

L'objet de ce travail est d'étudier le caractère circadien de la prise d'aliment en milieu contrôlé chez *H. littorale*. Le plan adopté est celui suivi dans la plupart des études de chronobiologie:

- 1) description et interprétation du caractère rythmique du paramètre observé. Un rythme alimentaire est une prise régulière de repas dans le temps, il est caractérisé par sa périodicité, son intensité, son mode;
- 2) mise en évidence d'un synchronisateur, signal préalable à la mise en place des mécanismes responsables de la périodicité;
- 3) test sur le caractère endogène ou exogène de ce rythme.

Cette étude a nécessité la réalisation d'un appareil de distribution d'aliments "à la demande" couplé à un ordinateur relevant la date, l'heure et le numéro du bac à chaque demande d'aliments.

Un cycle nycthémera de la prise volontaire d'aliment a pu être mis en évidence sur 6 lots de 30 individus chacun soumis à un éclairage artificiel suivant la photopériode naturelle (10:30J/13:30N). La demande d'aliments commence au "crépuscule", se prolonge durant toute la scotophase avec un maximum de consommation entre 2 et 5 h du matin. Cette période de 3h correspond à 40 % de la consommation

journalière. L'activité des poissons, ainsi que la fréquence de respiration aërienne suivent le même cycle.

Un décalage du cycle d'éclairement de -9h ( $\Phi = -135^\circ$ ) a permis d'obtenir sans délai un décalage du cycle de la prise d'aliments. Cela permet de conclure au rôle de synchronisateur de l'alternance jour-nuit sur le rythme nycthémeral de la prise alimentaire. Le même entraînement a de plus été observé pour l'activité et la respiration aërienne.

Afin de permettre la manipulation et l'observation des poissons en phase nocturne une lumière rouge rayonnant à plus de 600 nm était allumée en permanence au cours des deux premières phases de l'expérimentation. Afin de vérifier à posteriori que cet éclairage n'était pas une gêne pour les poissons, nous avons tenté d'entraîner la prise alimentaire par l'alternance de l'obscurité et d'une lumière rouge ou bleue de faible intensité, après un décalage de -9h ( $\Phi = -135^\circ$ ) par rapport au nycthémeral. Un entraînement de la prise alimentaire a été obtenu dès le décalage et pendant plusieurs jours. La lumière d'appoint est donc perçue par les poissons, mais puisque ces derniers semblent interpréter la période de plus faible intensité lumineuse comme étant la nuit, un éclairage d'appoint peut être utilisé en phase nocturne dans une situation d'étude d'alternance jour-nuit. Il est cependant peu recommandable d'utiliser une quelconque source lumineuse d'appoint dans le cas d'études nécessitant une scotophase prolongée.

Afin de tester le caractère endogène ou non du rythme observé, nous avons soumis les poissons à des cycles d'éclairement de longueur supérieure à 24 h, avec photophase longue (25:30J/10:30N) ou scotophase longue (13:30J/22:30N), et sans éclairage d'appoint en phase nocturne. On a pu constater alors que quelque soit la longueur du nycthémeral, de la scotophase, ou de la photophase, la demande d'aliment débute par un pic "crépusculaire" et prend fin à "l'aube". Dans tous les cas, la quantité d'aliment auto-distribué par 24h est en moyenne de 4 % du poids vif.

Le cycle nycthémeral de la demande d'aliment est donc caractérisé par une acrophase nocturne et un pic crépusculaire. Il ne semble contrôlé par aucune horloge interne, puisque des variations des paramètres de son synchronisateur, l'alternance jour-nuit, ne modifient pas le caractère nocturne de l'auto-distribution d'aliments. Ce rythme circadien peut donc être qualifié d'exogène, c'est à dire qu'il ne se manifeste qu'en réponse à une stimulation externe périodique.

INFLUENCE DE LA FREQUENCE ET DE LA PERIODE DE NOURRISSAGE  
SUR LA CROISSANCE D'UN SILURE AFRICAIN,  
HETEROBRANCHUS LONGIFILIS (CLARIIDAE)

N. KERDCHUEN et M. LEGENDRE  
Centre de Recherches Océanographiques, BP V18  
Abidjan, Côte d'Ivoire

Il est admis que les performances de croissance et l'efficacité alimentaire des poissons dépendent, en plus des caractéristiques nutritives propres à l'aliment utilisé, de la fréquence d'alimentation (Andrews et Page, 1975 ; Luquet et al., 1981) et la période de nourrissage (Sundararaj et al., 1982 ; Noeske et Speiler, 1984). Les modalités optimales de distribution varient selon les espèces ; par conséquent, une méthodologie de nourrissage adaptée à chaque cas doit être établie afin d'optimiser les performances de croissance et la rentabilité économique des élevages.

Les silures, d'environ 74 g de poids initial, ont été répartis en 20 lots de 40 individus dans des cages-enclos de 4 m<sup>3</sup> implantées en milieu lagunaire. Ils ont reçu un aliment granulé, à 45 % de protéines brutes, distribué à raison d'une ration quotidienne de 3 % de la biomasse et ce, 7 jours sur 7 (à l'exception du jour d'échantillonnage). Cette ration (1 replicat/traitement) a été distribuée selon les modalités et les heures suivantes :

- 1 repas par jour : 8h00
- 2 repas par jour : 8h00 et 17h00
- 4 repas par jour : 8h00, 11h00, 14h00 et 17h00
- nourrissage en continu sur 12 heures par jour
- 1 repas par nuit : 20h00
- 2 repas par nuit : 20h00 et 5h00
- 4 repas par nuit : 20h00, 23h00, 2h00 et 5h00
- nourrissage en continu sur 12 heures par nuit
- 4 repas sur 24 heures : 8h00, 14h00, 20h00 et 2h00
- nourrissage en continu sur 24 heures

Tous les 14 jours, tous les poissons de chaque lot ont été pesés individuellement pour le suivi de la croissance et le réajustement de la ration alimentaire. Le jour du dernier échantillonnage, 5 individus de chaque lot ont été prélevés pour la détermination des rapports hepato-somatique et adipo-somatique (dépôts de graisse dans la cavité abdominale). En début et en fin d'expérience, des silures de chaque lot ont été également prélevés pour l'analyse de la composition corporelle.

Après 56 jours d'expérience, la période de nourrissage et le nombre de repas montrent un effet significatif ( $P < 0,05$ ) sur la croissance (Fig.1.A). Les poissons nourris durant la nuit ont une croissance globalement plus élevée que ceux nourris de jour et un nourrissage sur l'ensemble du nyctémère n'apporte pas d'amélioration. Les performances de croissance

tendent à augmenter avec l'accroissement de la fréquence des repas quelle que soit la période de nourrissage (Fig.1.A). Les meilleures croissances, de 2,36 à 2,64 g/j, sont observées avec une alimentation en continu. Les indices de consommation varient entre 1,4 et 2,8, sans qu'une différence significative soit mise en évidence. On note toutefois que les meilleurs indices, de l'ordre de 1,4 à 1,8, sont aussi observés dans les lots nourris en continu.

Le rapport hepato-somatique s'est avéré plus élevé chez les poissons nourris de nuit (Fig.1.B), par contre, les dépôts de graisses dans la cavité abdominale sont plus importants chez les individus nourris de jour et augmentent avec la fréquence de repas (Fig.1.C). Les analyses de carcasses sur les poissons entiers confirment ces observations et montrent également un accroissement de la concentration en lipides lorsque le nombre de repas augmente.

En pratique, il est recommandé de nourrir les poissons en continu durant la nuit, ce mode d'alimentation conduisant aux meilleures performances de croissance.

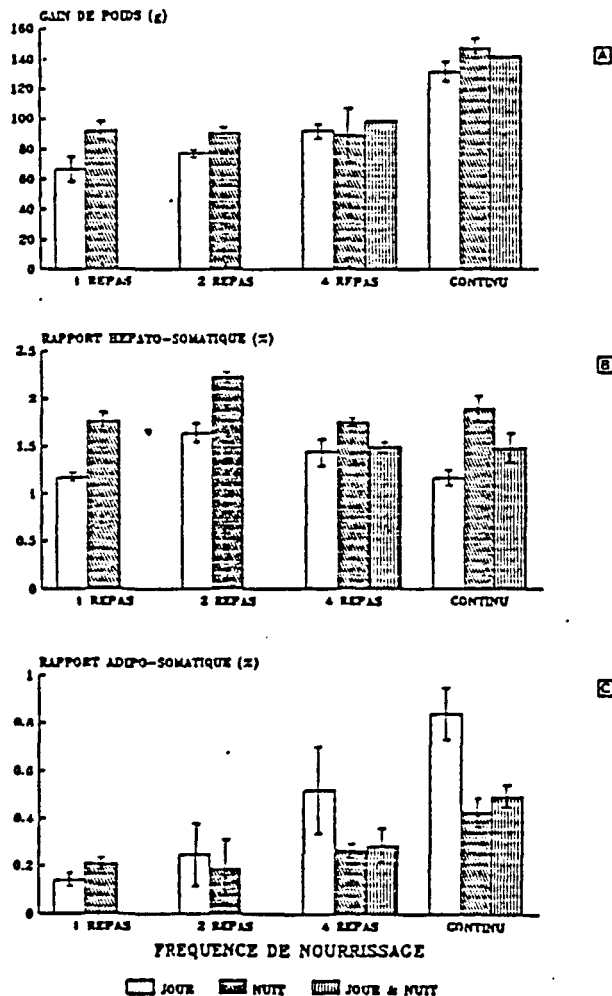


Fig. 1 - Evolution du gain de poids (A), du rapport hepato-somatique (B) et du rapport adipo-somatique (C) en fonction de la fréquence et de la période de nourrissage chez *H. longifilis*.

INFLUENCE DES LIPIDES ALIMENTAIRES SUR LA CROISSANCE ET LA  
COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES LARVES DE SILURE AFRICAINE,  
HETEROBRANCHUS LONGIFILIS (CLARIIDAE).

M. LEGENDRE<sup>(1)</sup>, N. KERDCHUEN<sup>(1)</sup>, G. CORRAZE<sup>(2)</sup> et P. BERGOT<sup>(2)</sup>

(1): Centre de Recherches Océanographiques, BP V18, Abidjan,  
Côte d'Ivoire.

(2): INRA, 64310 Saint Pée-sur-Nivelle, France

Chez H. longifilis, les nauplii d'*Artemia* constituent un excellent aliment de départ durant la phase d'alevinage (Legendre, 1990), mais posent des problèmes pratiques et économiques pour une application dans de nombreux pays africains. Récemment, l'utilisation d'un aliment composé, efficace chez le corégone et la carpe (Bergot et al., 1986; Charlon et al., 1986), a permis d'obtenir chez H. longifilis une survie aussi élevée qu'avec l'*Artemia*, mais avec une croissance plus faible au cours des deux premières semaines d'alevinage (Legendre et Kerdchuen, en prep.). Plusieurs exemples indiquant que les besoins en acides gras essentiels peuvent différer de manière importante chez les poissons continentaux d'eau chaude et d'eau froide (Kanazawa, 1985; Stickney et Hardy, 1989), cette faible croissance pourrait être, au moins en partie, liée à une couverture inadéquate des besoins lipidiques.

Dans cette étude, l'influence de la composition en acides gras des aliments a été testée sur la croissance et la survie des larves et des alevins de H. longifilis entre la fin de la résorption vitelline et l'âge de 17 jours.

12 lots de 400 larves de 2 mg de poids initial ont été maintenus en eau recyclée (28±1°C) en bacs de 40 l et nourris avec 6 aliments différents (1 réplikat/traitement) distribués manuellement, ad libitum, à raison d'un repas toutes les 4 h. Les aliments testés sont, d'une part, les nauplii d'*Artemia* qui servent de référence et, d'autre part, 5 aliments expérimentaux composés d'un même régime de base et ne variant que par la nature de l'huile incorporée. La composition en est la suivante: foie de boeuf (30%), levure "Protibel" (50%), mélange vitaminique (7,5%), minéraux (5%) et huile (7,5%). Les huiles utilisées sont respectivement les huiles de foie de morue, de palme, de coton, de coprah et d'arachide. Dans chaque lot, la croissance a été suivie sur des échantillons d'alevins prélevés tous les 3 jours et la survie déterminée en fin d'expérience après dénombrement de tous les poissons. La composition en acides gras des aliments, des oeufs et des alevins de 17 jours a été déterminée sur les lipides totaux par chromatographie en phase gazeuse.

Les résultats montrent que si la survie est élevée dans tous les cas (71 à 85%), les poids moyens finaux (pmf) sont fortement influencés par la nature de l'aliment utilisé. Les nauplii d'*Artemia* conduisent à une croissance très supérieure (pmf de 289 mg) à celles enregistrées avec les différents aliments expérimentaux (pmf de 79 à 115 mg). Cet écart de croissance s'est avéré particulièrement net au cours de la première semaine d'élevage, période durant laquelle les larves ont aussi montré un comportement de prise alimentaire beaucoup plus actif envers l'*Artemia* qu'envers les aliments secs. En fin d'expérimentation, les taux de croissance spécifiques apparaissent en revanche très voisins dans tous les lots. Parmi les aliments secs, les meilleurs résultats sont obtenus avec les régimes contenant de l'huile de palme ou de coprah, la croissance la plus faible étant observée avec l'huile de foie de morue ( $p < 0,05$ ). Les huiles d'arachide et de coton donnent des résultats intermédiaires.

La composition en acides gras (AG) des alevins reflète celle des aliments.

L'ensemble des résultats suggère qu'il existe un rapport optimum entre les AG n-3 (en particulier le 22:6 n-3) et les AG n-6 pour la couverture en AG essentiels. La croissance des larves paraît diminuée par un excès d'AG n-3 (huile de foie de morue) comme par un excès d'AG n-6 (huile de coton) dans les aliments.

Détermination des différents substrats participant à la couverture des besoins énergétiques chez l'atipa, *Hoplosternum littorale* par analyse des compositions corporelles et par calorimétrie indirecte.

Moreau Y., Médale F., Boujard T. et Luquet P.

Les besoins énergétiques et leur modalité de couverture prennent une dimension particulière chez les poissons tropicaux. Ces derniers, notamment les tilapias, semblent mieux valoriser l'énergie alimentaire d'origine non-protéique. Les travaux réalisés chez l'atipa, et présentés ici, ont pour objet de mieux estimer, chez cette espèce, la partition des ressources énergétiques soit d'origine endogène, soit d'origine alimentaire.

L'utilisation des substrats énergétiques apportés par l'alimentation a été étudiée par calorimétrie indirecte. Cette méthode, fondée sur la quantification des éléments du bilan respiratoire ( $O_2$  et  $CO_2$ ) et azoté, a été appliquée au suivi postprandial du devenir des repas. Elle a également été appliquée à l'étude des substrats endogènes chez le poisson en situation de jeûne, en complément de l'approche, plus classique, de l'étude de l'évolution de la composition corporelle au cours d'un jeûne prolongé.

L'atipa ayant une respiration bimodale, une chambre à métabolisme adaptée a dû être mise en oeuvre. Elle permet d'estimer la consommation d'oxygène aérien par mesure manométrique, l'atipa n'excrétant pas de  $CO_2$  dans l'air.

Les échanges respiratoires et l'excrétion azotée évoluent rapidement dès les premières heures suivant le repas. Entre 3 et 25 heures après le repas, la consommation d'oxygène passe de 8,8 à 6  $mmol.kg^{-1}.h^{-1}$ , l'excrétion de  $CO_2$  de 9,5 à 5,6  $mmol.kg^{-1}.h^{-1}$  et l'excrétion azotée de 2,34 et 0,87  $mmolN-NH_4.kg^{-1}.h^{-1}$ . Ceci est associé à une modification du métabolisme énergétique, les quotients respiratoire (RQ) et azoté (NQ) passant de 1,09 à 0,94 et de 0,268 à 0,147 respectivement. A valeurs énergétiques équivalentes, ces résultats correspondent à une partition 70 % de protéines et 30 % de glucides (70P|30G) de l'ensemble des substrats consommés 3 heures après le repas avec une synthèse de lipides. 25 heures après le repas, la partition devient 55P|34G|11L.

Durant les premières heures suivant le repas, glucides et protéines sont donc les principaux substrats utilisés. Tant que des glucides sont disponibles, ils sont oxydés préférentiellement aux lipides. Au début de la phase post-prandiale observée, les RQ supérieurs à 1 peuvent même correspondre à une constitution de réserves lipidiques. L'apport protéique lié au repas est aussi activement catabolisé. Une fois l'effet repas amorti, le catabolisme énergétique utilise des protéines et des lipides.

Aussi bien par l'étude des compositions corporelles que par calorimétrie indirecte, on observe au cours du jeûne des modifications importantes des substrats métaboliques utilisés pour la fourniture d'énergie. Les lipides contribuent de façon importante à la couverture des besoins durant les dix premiers jours de jeûne (50 à 70 % de l'énergie totale). Au-delà, leur rôle est très faible voire quasiment nul, même si leur teneur corporelle reste élevé après 50 jours de jeûne (20,4 %MS). Cette diminution de la contribution des lipides s'associe à une augmentation graduelle de la participation des protéines, le NQ de 0,216 obtenu après un jeûne prolongé indiquant une participation très élevée des protéines. Simultanément à l'utilisation des protéines et des lipides, le poisson semble avoir recours au cours du jeûne à une synthèse de glucides pour satisfaire une partie de ses besoins métaboliques.

Comme pour la plupart des poissons, les protéines contribuent de façon significative à la fourniture des besoins énergétiques. La participation des lipides active au début du jeûne semble limitée. leur utilisation n'est pas systématiquement liée à la quantité présente dans le corps. Les résultats obtenus indiquent donc l'existence d'un métabolisme glucidique actif chez l'atipa. Ceci peut conférer au glucides un rôle potentiel d'épargne protéique s'il peut être prouvé que l'énergie produit par leur oxydation n'intervient pas en surplus.

Ces conclusions quant à la contribution des protéines et des glucides à une éventuelle lipogénèse, ou celle des protéines et des lipides à une glucogénèse mériteraient d'être confirmées par des études complémentaires du devenir métabolique de précurseurs marqués.



## COLLOQUE BASES BIOLOGIQUES DE L'AQUACULTURE

---

### ACTIVITE DE LA FLORE BACTERIENNE DANS LE TUBE DIGESTIF DES POISSONS D'EAU DOUCE DE GUYANE FRANCAISE

M. Lésel\*, R. Lésel\* et P. Luquet\*\*

\*INRA - Station d'Hydrobiologie - Unité des Microorganismes  
64310 Saint-Pée-sur-Nivelle (France)

\*\*INRA Station d'Hydrobiologie  
B.P. 709 97387 KOUROU (Guyane française)

#### Résumé

L'activité bactérienne chez les poissons dépend de la température du milieu et de l'existence de compartiments digestifs permettant le développement des corps bactériens. L'existence d'espèces de poissons herbivores en eaux tropicales doit permettre de vérifier la validité de ces hypothèses et, en particulier, d'identifier le rôle éventuel des bactéries dans la métabolisation des matériaux alimentaires.

La flore bactérienne de 5 espèces de poissons des eaux tropicales de Guyane française a été analysée en insistant sur la dégradation des glucides complexes : amidon, chitine, cellulose. Les résultats montrent qu'il existe une flore anaérobie aussi importante en nombre que la flore aérobie. La cellulose microcristalline est dégradée par les bactéries. La flore est en quantité suffisante pour exercer une fonction dans le tube digestif du poisson-hôte.

Des espèces bactériennes pathogènes (*Edwardsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloïdes*, *Aeromonas* sp.) ont été identifiées.

Il existe une activité enzymatique diversifiée et d'importance variable selon les espèces en cause et leur régime alimentaire. Les concentrations en osidases sont relativement faibles, mais les résultats paraissent bien être liés au régime alimentaire.

L'ensemble des résultats est analysé en fonction des hypothèses sur l'existence de fonctions de la flore bactérienne dans le tube digestif des poissons.

## ADAPTATION DES TILAPIAS AUX EAUX SAUMATRES

T.DOUDET , Centre Technique Forestier Tropical, Nogent sur Marne.

En Côte d'Ivoire, l'espèce d'eau douce Oreochromis niloticus et les espèces lagunaires, Sarotherodon melanothron et Tilapia guineensis montrent des performances zootechniques incompatibles avec une exploitation commerciale intensive en milieu lagunaire saumâtre. Pour tenter de développer l'élevage des tilapias dans ce type de milieu, un programme expérimental a été mis en place pour sélectionner, parmi un certain nombre d'espèces allochtones et d'hybrides obtenus par croisement entre ces espèces, un tilapia présentant une bonne survie et une bonne croissance en eau saumâtre. Les essais ont été réalisés en eau de lagune jusqu'à une salinité de 15‰ qui correspond à la salinité maximale des zones propices à l'aquaculture.

Parallèlement à cette approche zootechnique effectuée en Côte d'Ivoire, une étude de la physiologie de l'adaptation a été entreprise en laboratoire en France sur deux espèces. Elle montre que le transfert en eau salée entraîne une modification de la morphologie branchiale et que les structures qui apparaissent sont analogues à celles de poisson de mer et capables de maintenir l'équilibre hydrominéral tant que la salinité du milieu extérieur ne dépasse pas un certain seuil. Ce seuil varie suivant les espèces la plus tolérante étant la même que celle qui donne les meilleurs résultats en Côte d'Ivoire.

## TENTATIVE D'AMELIORATION DE PRODUCTIVITE DES ETANGS DE PISCICULTURE PAR DES SUPPORTS DE BAMBOU

HEM S., AVIT J.B., KONAN K., Centre de Recherche Océanographique Abidjan Côte d'Ivoire

L'Acadja, construit à partir des fagots de branchages, est une pêcherie très productive ( 4 à 20 tonnes à l'hectare et par an ). Mais la destruction trop rapide des branchages ( au bout de 6 mois ) est une des principales contraintes de cette pratique. L'idée de l'acadja en bambou vient donc tenter de surmonter ces problèmes. Ayant une durée de vie plus longue dans l'eau ( 5 ans ) et par sa croissance très rapide, le bambou pourrait répondre à ces contraintes. Les premiers résultats ont montré que les acadjas en bambou donnent aussi une forte productivité ( 4 à 8 tonnes l'hectare/an ) en lagune

L'idée d'acadja en bambou en étang d'eau douce est donc inspirée des expériences tentées en milieux lagunaires. Cette étude comparative a été menée dans 4 étangs d'eau douce alimentés par l'eau de source des forêts (forêt de Banco ). Les 4 étangs de superficie ( 320, 392, 227 et 288 M<sup>2</sup> ) et de profondeur moyenne ( 40 cm ) déterminées de façon très précise, sont répartis en deux groupes:

-1<sup>er</sup> groupe de deux étangs ( dont un sert de réplikat ) sans substrat,

-2<sup>eme</sup> groupe avec substrat en bambous à raison de 6 bambous par m<sup>2</sup>.

Les étangs sont empoissonnés avec *Oréochromis niloticus* d'un poids moyen de départ de 5 grammes, à une densité de 275 poissons par m<sup>2</sup>. Les poissons sont nourris en début d'expérience pendant la période d'adaptation. Pour le reste du temps ils sont livrés à eux-mêmes dans les étangs.

Une pêche totale est effectuée après un cycle de 12 mois. Les biomasses respectives sont évaluées. L'abondance relative et l'analyse des compositions des populations ont été examinées.

Il s'est avéré que dans les étangs avec les supports en bambous, les biomasses produites sont deux fois plus importantes ( 3,6 tonnes par hectare contre 1,6 tonnes par hectare et par an ).

La présence des bambous a favorisé la prolifération de *Tilapia zillii* (cyclidé d'eau douce pondéur en substrat ) qui représente 33% de la biomasse contre 2,5% dans les étangs sans bambou. Les réplikats confirment cette dynamique des populations liées à ce biotope.

*Paraophiocephalus obscurus* poisson prédateur, a été involontairement introduit dans les 4 étangs. Nous avons observé ( dans tous les réplikats ) que les individus se trouvant dans les étangs à bambous ont un poids moyen largement supérieur à ceux des étangs sans bambou ( 541 grammes contre 162 grammes ).

Il est évident, comme en milieu lagunaire, que la présence des substrats en bambous dans les étangs d'eau douce aide à enrichir le milieu ce qui se traduit par une nette augmentation de la production tertiaire. Il nous reste donc à trouver un modèle permettant de mieux gérer la biomasse produite soit par prédation soit par pêche sélective.

GENETIQUE DES POPULATIONS ET BIOGEOGRAPHIE  
DE L'ICHTYOFAUNE NEOTROPICALE :  
LE MODELE LEPORINUS DE GUYANE

J.F. RENNO, 1989

Les causes de la diversité spécifique de l'ichtyofaune néotropicale ont été abordées à travers plusieurs niveaux de perception - génétique, morphologie, écologie et zoogéographie- dans l'étude du genre leporinus (Anostomidae).

L'isolement reproductif entre sept espèces de Leporinus a été confirmé en Guyane.

L'étude intraspécifique a été entreprise chez L. friderici, espèce largement distribuée en Amérique du Sud. Cette espèce constitue un groupe monophylétique dans le genre Leporinus de Guyane, mais apparaît comme un groupe paraphylétique à l'échelle de l'Amérique du Sud. La différenciation génétique (électromorphes de protéines et patrons de restriction de l'ADN mitochondrial) a été confrontée à la différenciation morphologique.

En Guyane, la structure génétique intraspécifique de L. friderici est en accord avec la structure zoogéographique de deux grandes familles de poissons néotropicaux, les Serrasalmidés et les Anostomidés et celle de groupes d'organismes autres que les poissons. La faune est structurée en deux ensembles : un ensemble oriental qui est sous l'influence de la faune amazonienne et un ensemble occidental dont l'endémisme est plus prononcé.

Les résultats mis en évidence par les différentes approches sont congruents et renforcent l'hypothèse de l'existence de refuges aquatiques, qui auraient joué un rôle dans la spéciation de l'ichtyofaune néotropicale lors des bouleversements paléoécologiques de l'ère quaternaire.

Un guide dans la construction des souches d'élevage est proposé basé sur l'analyse de la structure génétique de L. friderici espèce d'intérêt aquacole.

**CROISSANCE**

# DESCRIPTEURS MORPHOLOGIQUES ET HISTOLOGIQUES DE LA CROISSANCE VERTEBRALE CHEZ LA TRUITE. PREMIERS RESULTATS

par François J. MEUNIER et Mohamed RAMZU

Pour caractériser des descripteurs morphologiques de la croissance du squelette vertébral chez la truite (*Salmo trutta*), nous avons étudié divers paramètres vertébraux (longueur ou LO, largeur ou LA et hauteur ou HA) sur plusieurs lots d'élevage (diploïdes et triploïdes d'eau douce et de mer) en les comparant à un lot sauvage (rivière de Normandie). Les mesures pratiquées sur les 57 à 58 vertèbres qui constituent l'axe vertébral des animaux sur l'espèce étudiée, permettent d'établir des courbes ou profils vertébraux caractéristiques.

Ainsi, l'étude biométrique nous montre qu'à la classique division anatomique de la colonne vertébrale en régions abdominale et caudale se superpose une régionalisation morpho-fonctionnelle en 3 secteurs:

- 1) une région postcéphalique (abdominale antérieure);
- 2) une région moyenne intégrant des vertèbres abdominales (A<sup>0</sup> à A<sup>29</sup>) et caudales (C<sup>30</sup> à C<sup>48</sup>);
- 3) une région urale (caudale postérieure).

Immédiatement en arrière de la tête, les deux premières vertèbres PC1 et PC2 forment un couple fonctionnel assurant la charnière avec le crâne et qui se traduit par les spécificités de LO et HA. Les trois à cinq vertèbres suivant le couple PC1-PC2 pourraient être considérées comme des vertèbres transitionnelles parce qu'elles montrent soit une décroissance soit un accroissement réguliers de la valeur des paramètres choisis. Ensuite il y a une région moyenne, indépendante des caractéristiques morphologiques macroscopiques puisque la limite région abdominale-région caudale qui correspond à la fermeture des arcs hémiaux n'apparaît pas dans les paramètres vertébraux. Donc nous pouvons déterminer une région centrale ou moyenne constituée de deux entités morphologiques (l'une avec augmentation régulière des valeurs des paramètres, l'autre avec une régression) constituant un ensemble fonctionnel: ces deux entités sont séparées soit à la limite anatomique abdominale-caudale, soit légèrement en arrière.

La région postérieure commence toujours avec la 49ème vertèbre et correspond à la queue: elle est marquée par une chute de toutes les valeurs des paramètres analysés avec une rupture de la pente de LA entre C<sup>48</sup> et C<sup>50</sup> chez les différents lots. Il est possible de caractériser deux zones spécifiques dans la région caudale postérieure, l'une qui montre une remontée ou une descente des valeurs paramétriques, l'autre qui présente une uniformité dans le sens de la croissance de ces valeurs. Ceci nous paraît traduire le rôle majeur des vertèbres caudales dans les processus moteurs de la nage.

Les descripteurs morphologiques que nous avons choisis sont un révélateur du mode de nage particulier de ce poisson, mode dit sub-carangiforme (Lindsey, 1978) dans lequel les ondulations propulsives ont une tendance à se concentrer dans la région caudale. Une étude récente (Desse et al, 1989), sur divers téléostéens, utilisant les mêmes paramètres vertébraux confirme l'intérêt de ces mesures pour une bonne description de l'axe vertébral, d'une part, pour une caractérisation du morphotype de l'espèce, d'autre part. Donc, il est intéressant de mettre en relation le mode de vie des animaux et surtout leur mode de nage avec le profil vertébral des descripteurs choisis.

Les quatre lots de truites qui ont été élevés pour analyser leurs performances de croissance sous conditions expérimentales (triploïdie et milieu marin) présentent des profils vertébraux très proches de ceux de notre lot témoin de truite fario de rivière. En l'absence d'une utilisation de tests statistiques adaptés pour confronter la variabilité dans chacun des quatre lots, nos conclusions ne peuvent être que provisoires. Toutefois, aucun effet majeur n'apparaît sur nos courbes, tout au moins en ce qui concerne les descripteurs morphologiques.

Dans l'immédiat, des effets des traitements zootechniques (méthodes génétiques) sur la texture osseuse, voire sur l'histologie osseuse, ne sont pas à rejeter; mais s'ils existent ils ne se manifestent pas au niveau de la forme des vertèbres. Un premier test effectué en analyse d'images sur des microradiographies de coupes transversales de vertèbres d'une truite montre des différences importantes de la porosité entre vertèbres abdominales et vertèbres caudales. Ce résultat n'est qu'indicatif et reste à confirmer.

## CONCLUSION

L'étude biométrique proposée nous permet de présenter un patron d'organisation de la colonne vertébrale spécifique chez la truite. Ce patron est, semble-t-il, caractéristique de leur mode de nage sub-carangiforme. Cette analyse menée sur des lots de truites en croissance sur une durée de 2 à 3 ans permettra d'étudier les modalités de la mise en place des différentes régions fonctionnelles.

La variation et la régionalisation vertébrale, telle qu'elle nous est déterminée par les paramètres vertébraux choisis, permet de sélectionner les secteurs sensibles présentant un intérêt tout particulier pour l'étude histologique de la porosité du tissu osseux vertébral.

Les descripteurs choisis nous paraissent extrapolables à une étude biométrique comparée de Téléostéens ayant des modes de nage différents. Cela devrait nous permettre d'établir une méthode d'analyse pertinente pour l'identification des grands morphotypes et de leur interprétation fonctionnelle.

"Formations Squelettiques", UA CNRS 1137.

Lab. d'Anatomie Comparée, Univer. Paris 7,

2, place Jussieu, 75251 PARIS, cédex 05

## CROISSANCE DU MUSCLE SQUELETTIQUE DES POISSONS D'ELEVAGE

Benoit FAUCONNEAU, Helene ALAMI-DURANTE, Pierre BERGOT, Anne- Marie ESCAFFRE, Pierre-Yves LEBAIL, Marie-Paule MADY, Dominic F.HOULIHAN.

La caractérisation de la musculature squelettique des poissons (Johnston 1978) et sa mise en place au cours du développement ont fait l'objet de nombreuses études descriptives (Weatherley 1989). L'absence de connaissances suffisantes sur les mécanismes de la croissance quantitative et qualitative de la musculature n'a pas permis d'étudier le déterminisme intrinsèque (hormonal, génétique) et extrinsèque (facteurs environnementaux, alimentation) des phases de développement et de croissance de ce tissu. Les travaux rapportés dans cette communication, travaux menés dans un cadre plus large que le GCS/BBA, visent à mettre au point des critères d'évaluation de la croissance du muscle selon deux approches distinctes:

- \* critères basés sur les caractéristiques métaboliques;
- \* critères basés sur les caractéristiques cellulaires.

### CARACTERISATION DE LA CROISSANCE GLOBALE DU MUSCLE.

La croissance du muscle traduit l'augmentation en masse ou en volume de ses différents constituants chimiques (eau, protéines, lipides, minéraux). Ces constituants tissulaires (protéines, lipides) étant activement renouvelés, leur augmentation en masse dans un tissu peut être estimée indirectement par la mesure des activités métaboliques de synthèse et de dégradation. Dans le cas de l'augmentation en masse des protéines (accrétion), nous avons choisi d'étudier l'activité de synthèse des protéines du muscle au travers des mesures du rapport ARN/Protéines et du taux de synthèse des protéines lui même.

L'étude faite a permis de valider une technique d'estimation du taux de synthèse des protéines (méthode d'injection d'une large dose de [<sup>3</sup>H]-phenylalanine) du muscle. Nous avons pu analyser la contribution de la synthèse de fractions protéiques importantes du muscle (sacroplasmiques, mitochondriales, myofibrillaires) et même de protéines extraites (myosine, actine) à la mesure globale du taux de synthèse des protéines du muscle.

Pour analyser les relations entre les taux de croissance du poisson entier et du muscle et les critères mesurés, nous avons étudié l'effet de la supplémentation en hormone de croissance:

A court terme, la supplémentation en hormone de croissance (6 heures après une simple injection de oGH) se traduit par une stimulation du taux de synthèse des protéines sans modification du rapport ARN/Protéines. Ces effets sont similaires à ceux d'une simple injection d'insuline.

A long terme, l'effet de la supplémentation en GH (injection de hGH chez la truite a.e.c. ou implants cholestérol de oGH chez la truite a.e.c. et le saumon Atlantique) se traduit par des augmentations de la croissance en poids et en longueur du poisson, du rapport ARN/Protéines musculaire et du taux de synthèse des protéines dans le muscle squelettique blanc (rapide). Dans les conditions de ces expériences, les taux de croissance de l'individu et du muscle lui même sont corrélés avec les deux paramètres étudiés: ARN/Protéines et taux de synthèse des protéines dans le muscle. Le même type de réponse est observé lorsque la croissance est déprimée par injection répétée d'anticorps anti-GH de saumon chez la truite arc en ciel.



Le rapport ARN/Protéines est donc un bon indicateur du potentiel de croissance du poisson alors que le taux de synthèse des protéines du muscle exprime plus la croissance instantanée du poisson.

#### CARACTERISATION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE.

La croissance du muscle squelettique des poissons au cours du développement larvaire mais aussi au cours de la croissance post-larvaire est le résultat de deux processus: l'augmentation de la taille des fibres musculaires et l'augmentation du nombre des fibres musculaires (Stickland 1983, Weatherley et al. 1978). Selon les données bibliographiques existantes, l'hyperplasie explique la plus grosse part (plus de 50 %) de la croissance musculaire jusqu'à des stades avancés (première maturation sexuelle chez les salmonidés).

Nous avons pu toutefois observer que cette conclusion devait être nuancée à des stades particuliers du cycle biologique des poissons. Ainsi, au cours des premières semaines d'alimentation des larves de carpes, la croissance du muscle squelettique (volume multiplié par 37 en 2 semaines) résulte plus d'une augmentation de la taille des fibres (volume moyen d'une fibre multiplié par 8) que d'une augmentation du nombre des fibres (nombre multiplié par 4.5). La situation est différente pour le foie et le pancréas dont la croissance, importante au début de l'alimentation externe, peut être attribuée principalement à l'hyperplasie.

L'étude à différents stades post-larvaires de la taille des fibres du muscle squelettique "blanc" chez la truite arc-en-ciel, nous a permis d'évaluer directement l'augmentation de la taille des fibres musculaires et donc indirectement de supposer que la plus grosse part de la croissance du muscle se réalisait par augmentation du nombre de fibres musculaires.

Nous avons recherché à étudier plus directement le phénomène d'augmentation du nombre de fibres musculaires qui peut s'apparenter à un phénomène de myogénèse de novo, à l'aide marqueurs biochimiques. A des *stades précoces* de l'ontogénèse de deux espèces: le saumon Atlantique et l'anguille Européenne (respectivement stade oeilé et stade civelle en estuaire), la musculature squelettique est constituée de myosines d'un type différent de celui des myosines de muscle blanc et rouge "adultes" (myosine de type lentes et rapides). Par la suite, les myosines de type adulte sont les seules présentes y compris dans les stades larvaires. Par contre, un processus de maturation de la musculature squelettique est observé (activité contractile:  $Ca^{++}$ - $Mg^{++}$ -ATPase) qui se traduit par l'apparition et l'augmentation progressive d'une sous unité de la myosine (Chaîne Légère 3 de type rapide) et d'un ensemble de protéines régulatrices: les parvalbumines.

Si les phénomènes rencontrés pour l'ensemble de la musculature lors de l'ontogénèse (transitions qualitatives et maturation) peuvent s'appliquer également aux fibres naissantes dans un muscle en croissance hyperplasique, nous aurions donc identifié un marqueur direct de la synthèse de nouvelles fibres (les myosines de type précoces) et des marqueurs indirects (chaîne légère de type 3 et parvalbumines).

Au cours de l'ontogénèse post-larvaire de l'anguille et du saumon (croissance des juvéniles, smoltification chez les saumons) et au cours de développement larvaires de la carpe (effet du jeun et de l'alimentation) des variations quantitatives sont observées (proportions relatives des isotypes de la myosine ou des chaînes légères de la myosine ou des parvalbumines) dont l'analyse du déterminisme est en cours actuellement.

L'étude des caractéristiques métaboliques, histologiques et biochimiques des muscles de poissons démontre avant tout l'originalité de la croissance du muscle des poissons. La plasticité de la croissance du muscle et celle du poisson lui même est liée à la possibilité de moduler fortement la croissance musculaire par le processus de croissance hyperplasique. Les travaux engagés permettront de décrire les phases de croissance hyperplasique et les facteurs qui contrôlent ce phénomène.

## LES DEPOTS DE LIPIDES CHEZ LES POISSONS D'ELEVAGE

G. CORRAZE

Laboratoire de Nutrition des Poissons - INRA - BP 3  
64310 - Saint Pée sur Nivelle.

Chez les poissons, contrairement aux mammifères, il n'existe pas un tissu bien différencié spécifique du stockage des lipides. Selon les espèces, les lipides sont stockés au niveau du foie, du muscle ou des viscères (tissu adipeux périverceral).

Ces dépôts lipidiques, de par leur localisation et leur composition, sont un facteur important intervenant dans la détermination des qualités organoleptiques et nutritionnelles des poissons (importance des AGP w3 en nutrition humaine). De plus, des dépôts élevés au niveau des viscères ont pour conséquence un rendement de carcasse faible et sont donc préjudiciables pour le producteur ou le transformateur.

Les études entreprises dans ce domaine ont porté sur la mise en place des dépôts lipidiques ainsi que le contrôle de ce processus par l'alimentation ou certains facteurs hormonaux. L'ensemble de ces travaux ont été réalisés chez la truite arc-en-ciel.

Chez des alevins de truite, une alimentation riche en lipides (18%) conduit à une augmentation des dépôts lipidiques au niveau abdominal (muscle et tissu adipeux) et à un accroissement du nombre d'adipocytes. Des résultats inverses sont obtenus avec un régime à faible taux de lipides. Cependant contrairement aux mammifères une alimentation précoce pauvre en lipides (6%) n'empêche pas le développement ultérieur du tissu adipeux en réponse à un régime riche en lipides (18%).

La nutrition joue donc un rôle important dans la régulation des dépôts lipidiques chez le Poisson. La mise au point de méthodes d'évaluation de la teneur en lipides sur le poisson vivant, basées sur la détermination du volume hydrique total soit par mesure d'impédance, soit par utilisation d'un marqueur de l'eau, a permis de suivre l'influence de l'alimentation sur les lipides corporels et de corréler ces résultats avec les analyses biochimiques.

Quel que soit le stade physiologique, les régimes riches en lipides comme les régimes riches en glucides digestibles stimulent les dépôts lipidiques chez les poissons. Dans tous les tissus, les lipides déposés sont essentiellement des lipides neutres (triglycérides) dont la composition en acides gras est étroitement liée à celle des aliments.

Quant aux facteurs hormonaux, les travaux réalisés montrent que seule l'administration d'hormone de croissance (oGH) induit une diminution des teneurs en lipides dans les viscères et la carcasse mais pas dans le muscle de la Truite arc-en-ciel. Cette régression du tissu adipeux périspécéral est également associée à une réduction de la taille des adipocytes. D'autres facteurs hypothalamiques tels que le SRIF, TRH, GRF ne semblent pas avoir d'effets sur les dépôts lipidiques chez la truite.

Ces résultats démontrent qu'il est possible, par le biais du contrôle nutritionnel ou endocrinien, de moduler qualitativement et quantitativement les dépôts lipidiques chez les poissons afin d'améliorer la production en terme de qualité et de rendement.

COLLOQUE GCS "BASES BIOLOGIQUES DE L'AQUACULTURE" (Septembre 1990). Groupe "CROISSANCE"

DEVELOPPEMENT D'UN RADIOIMMUNODOSAGE DE L'HORMONE DE CROISSANCE DE SALMONIDES (sGH) ET VALIDATION DES CONDITIONS DE PRELEVEMENT

Le Bail P.-Y.<sup>1</sup>, Sumpter J.P.<sup>2</sup>, Pickering A.<sup>3</sup>, Mourot P.<sup>1</sup>, Niu P.-D.<sup>1</sup> et Weil C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie des poissons, INRA, Campus de Beaulieu, 35042, Rennes, FRANCE.

<sup>2</sup> Department of Biology and Biochemistry, Brunel University, Uxbridge, Middlesex, UB8 3PH, U.K.

<sup>3</sup> Institute of Freshwater Ecology, Windermere Laboratory, The Ferry House, Far Sawrey, Nr. Ambleside, Cumbria, LA22 OLP, U.K.

Chez les téléostéens, l'hormone de croissance (GH) est pléiotrope: elle agit sur le métabolisme et la croissance, l'adaptabilité à l'eau de mer, l'axe corticotrope et très probablement sur la reproduction. Malgré son intérêt évident, l'étude du contrôle de sa sécrétion débute tout juste car, jusqu'à ces dernières années, des dosages spécifiques manquaient.

Ce travail décrit la mise au point d'un radioimmunos dosage (RIA) spécifique de la GH de salmonidés (sGH). L'anti-sérum dirigé contre la GH<sub>2</sub> de saumon chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) inhibe la croissance de jeunes truitelles lorsqu'il leur est injecté. Il ne présente de réactions croisées ni avec la <sup>125</sup>I-sPRL ni avec la <sup>125</sup>I-sGTH.

La sGH radioiodée (<sup>125</sup>I-sGH) n'est pas reconnue par l'anti-sPRL et l'anti-sGTH. Le dosage résultant, ne présente aucune réaction croisée avec les GH et ACTH mammaliennes et les GTH, TSH et PRL de salmonidés. Les courbes d'inhibition obtenues à partir de plasma et d'extraits hypophysaires de différents salmonidés sont parallèles au standard de référence (sGH), aucun déplacement n'est observé avec les plasma et les extraits hypophysaires de carpe, tilapia et machoiran et seule la GH de daurade présente une certaine activité. 10% et 50% de déplacement sont obtenus respectivement par 0,2 et 1,50 ng/ml de sGH.

Un stress par confinement algu (1h), provoque une inhibition de la sécrétion de GH plasmatique chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). La même tendance est observée après un stress par confinement de 24h ou de plusieurs mois.

Chez des truites en période de reproduction, la sécrétion de GH est pulsatile, avec des concentrations minimales comprises entre 0,5 et 1 ng/ml. L'amplitude des pics de sécrétion varient d'un animal à l'autre et peuvent atteindre 6 ng/ml. La présence d'un pic au début de la phase nocturne semble assez constante.

Après une semaine de mise à jeun, les niveaux plasmatiques de GH augmentent et peuvent atteindre des taux supérieurs à 100 ng/ml. Nous avons trouvé une corrélation négative entre les niveaux de GH plasmatique et le coefficient d'embonpoint (K) des animaux.

ESTIMATION DE LA REPONSE A LA SELECTION MASSALE POUR LA CROISSANCE  
CHEZ LA TRUITE FARIO ( Projet PROSPER)

B.CHEVASSUS et F.KRIEG

Laboratoire de génétique des poissons, INRA 78352 Jouy-en-Josas

Deux populations de truite fario d'origine domestique (H et D) ont été soumises à des troncatures successives à l'âge de 5, 7, 15, et 20 mois. La première troncature a été réalisée au sein de lots ( 6 par population) issus de croisement de femelles de même âge et de tailles d'oeufs voisines (9 à 26 femelles par lot) par un pool de sperme issu de 10 à 24 mâles. Les effectifs génétiques de départ sont respectivement de 110 et 231 pour les séries H et D.

Chaque troncature permet d'isoler trois groupes au sein de chaque lot : les groupes "inférieurs" (environ 60% des individus) sont éliminés, les groupes "moyens" et "supérieurs" sont conservés dans des bassins différents à densité égale . A l'issue des 4 troncatures, le taux de sélection est de l'ordre de 95%, soit une intensité de sélection  $i$  de 2.02 pour  $H_S$  et 1.86 pour  $G_S$ . Parallèlement, deux groupes témoins  $H_T$  et  $G_T$  ont été conservés sans sélection.

La mesure de la réponse a été réalisée en comparant 4 lots extrêmes:  
- deux lots témoins issus du croisement de femelles  $H_T$  par des mâles  $H_T$  et  $G_T$ .

- deux lots sélectionnés issus du croisement de femelles  $H_S$  par des mâles  $H_S$  et  $G_S$

5 réplicats sont réalisés pour chaque lot , 2 d'entre eux recevant un échantillon de truite arc-en-ciel "golden" de même date d'éclosion comme témoins intra-bassins.

Une première mesure de la réponse à la sélection a été réalisée à l'âge de trois mois ( poids moyen 0.75g) et révèle des écarts de +24,1% (sans témoins golden ) et de + 11.8% (corrigé par le témoin golden ) en faveur des lots sélectionnés . A l'issue de cette mesure ,les témoins golden qui présentaient une taille très supérieure aux animaux testés ont été éliminés.

Une seconde mesure a l'âge de 5 mois ( poids moyen d'environ 9g ) confirme la supériorité des lots sélectionnés, l'écart étant de +22,4% pour les lots H et de +26,8% pour les lots G.

La procédure de sélection PROSPER apparaît donc efficace chez la truite fario et sera discutée par rapport à d'autres expériences négatives réalisées dans diverses espèces de poissons.

# AMELIORATION GENETIQUE PAR RECROISEMENT DE LIGNEES CONSANGUINES CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL

E. QUILLET

Laboratoire de génétique des poissons, INRA, Jouy-en-josas

Des individus gynogénétiques homozygotes ont été produits en utilisant les rayons ultra-violet pour inactiver le sperme et un choc thermique pour bloquer la première mitose et restaurer l'état diploïde. Chaque femelle a été fécondée individuellement. Parallèlement au descendants homozygotes obtenus (GE), des individus haploïdes (H), diploïdes (D), et gynogénétiques obtenus par rétention du 2<sup>ème</sup> globule polaire (GP) ont été réalisés.

L'exclusion du génome paternel a été vérifiée par caryologie sur les haploïdes et l'homozygotie des endomitotiques (GE) par électrophorèse.

La survie moyenne au démarrage d'alimentation est faible, environ 15% du témoin diploïde pour les lots GE contre 60% pour les lots GP. On note également une très forte variabilité inter-femelle (survie de 0 à 53% pour GE, et de 17 à 72.5% pour GP). Ultérieurement la survie des différents groupes se stabilise. On observe une corrélation positive entre la survie précoce des lots haploïdes et la survie tardive des lots GE issus de la même femelle. Par contre les lots GP et GE ne semblent pas corrélés.

Une dépression de croissance significative est décelée pour le poids dès la fin de résorption. 20 jours après le début d'alimentation les lots GP présentent une dépression de 10% par rapport au témoin, et les lots GE de 20 à 25%. Un important effet femelle est observé mais aucune corrélation entre les niveaux de dépression des lots GP et GE. Il faut noter également une plus grande variabilité intragroupe dans les lots GE, le coefficient de variation étant de 30.9% à 103 jours contre 23% dans les deux autres groupes.

Passés les premiers stades de développement, les individus homozygotes peuvent être conservés sans difficultés majeures jusqu'au stade reproducteur. L'analyse des caractéristiques de la reproduction, susceptible d'être affectée par l'élévation de consanguinité, est maintenant nécessaire pour envisager la production de clones.