

3rd Meeting of the I.C.E.S. Working Group on Mariculture, Brest, France, May 10-13, 1977.  
Actes de Colloques du C.N.E.X.O., 4 : 85-91.

EVOLUTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LE TUBE DIGESTIF  
AU COURS DE LA VIE LARVAIRE DU BAR (*DICENTRARCHUS LABRAX*)  
VARIATIONS DES PROTEINOGRAMMES ET DES ZYMOGRAMMES.

par

E. ALLIOT, A. PASTOUREAUD et J. TRELLU

avec la collaboration technique de J. NEDELEC

Station Marine d'Endoume, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France.

ABSTRACT.

*The development of the digestive system of larvae of Dicentrarchus labrax has been studied. The changes in activities of digestive enzymes from hatching to 30 days have been investigated. 8 activities have been recorded : esterases,  $\alpha$ -glucosidase, trypsin, chymotrypsin, leucinaminopeptidase, alkalin and acid phosphatase, using polyacrylamid gel electrophoresis. All the activities are very weak at hatching ; the activities of trypsin,  $\alpha$ -glucosidase, alkalin phosphatase increase between 0 and 5 days, decrease slowly and are quite stable from 15 to 30 days. The other activities increase steadily from 0 to 20 days. Relationships between the developmental process of the digestive system and changes in activities are investigated.*

RESUME.

*Quelques activités enzymatiques digestives de larves de loups ou bars (Dicentrarchus labrax) ont été étudiées, en utilisant les techniques d'électrophorèse. Les larves ont été prélevées de cinq jours en cinq jours à partir de l'éclosion jusqu'à trente jours. Des variations dans le nombre des isozymes actifs vis-à-vis des substrats testés sont enregistrées. Toutes les activités semblent être présentes, mais très faibles, dès l'éclosion ; les principales variations sont décelées dans les quinze premiers jours. Les relations avec le développement fonctionnel du tractus digestif des larves sont discutées.*

## INTRODUCTION.

Avec le développement des recherches sur la production contrôlée de larves de téléostéens, se pose le problème de leur alimentation dès la résorption de la vésicule vitelline. Le choix des aliments, de leur composition, est lié à la connaissance de la physiologie de la digestion chez les très jeunes poissons. L'évolution de la morphologie du tractus digestif au cours de la croissance et de son équipement enzymatique a été étudiée chez quelques poissons (IWAI, 1967 ; TANAKA *et al.*, 1972 ; KAWAI et IKEDA, 1972, 1973 ; SINHA, 1976). Un certain nombre de données sur le développement du bar et l'équipement enzymatique du tube digestif chez l'adulte existent également (GIRIN *et al.*, 1975 ; BARNABE, 1976 ; ALESSIO *et al.*, 1976 ; ALLIOT *et al.*, 1974), et il nous a paru utile, étant donné les possibilités d'intérêt économique que paraît présenter l'élevage du bar, d'étudier, spécifiquement pour ce poisson, l'évolution de l'équipement enzymatique du tractus digestif. Les premiers résultats obtenus pour les 30 premiers jours de vie larvaire après l'éclosion sont rapportés ici.

## MATERIEL ET METHODES.

### Matériel.

Les animaux proviennent, d'une part, de l'élevage du service d'aquaculture du Centre Océanologique de Bretagne (Brest), d'autre part de la Station de Biologie Marine et Lagunaire de Sète. Dès l'éclosion, ils sont alimentés avec des proies vivantes selon les méthodes testées dans ces deux laboratoires (GIRIN *et al.*, 1976 ; BARNABE *et al.*, 1976). Les larves de Brest sont élevées à 19° C, celles de Sète à 14° C. Des prélèvements sont effectués de 5 jours en 5 jours à partir de l'éclosion. Les larves sont isolées et mises au jeûne 6 à 12 heures avant, suivant leur âge. Les larves sont ensuite prélevées, essorées rapidement, comptées et pesées. Elles ont été soit congelées (larves de Sète), soit lyophilisées, et conservées à -30° C jusqu'à l'extraction.

### Méthodes.

Les résultats sont établis à partir d'un extrait obtenu par broyage des larves à 0° C dans un homogénéiseur de type Potter, à raison de 0,1 g de poids frais par ml de milieu d'extraction, selon la technique décrite par TRELLU et CECCALDI (1976). Le broyat est centrifugé à 4° C pendant 30 minutes à 35 000 g. L'électrophorèse des protéines solubles est menée sur gel à gradient de polyacrylamide (Pharmacia PAA 4/30), durant 15 heures à 125 V stabilisés.

Les gels sont ensuite trempés dans différents milieux tamponnés comprenant de façon générale un colorant diazoté (Fast Blue BB), et un substrat spécifique de l'activité enzymatique recherchée (BREWER et SING, 1970 ; SHAW et PRASAD, 1970). Les activités enzymatiques se trouvent révélées directement sur le gel, intégrées au photolorimètre enregistreur type Vernon, et ramenées au mg de protéines solubles. L'activité vis-à-vis du substrat spécifique de la trypsine (Benzoylarginine-p-nitranilide) a été testée directement sur les extraits bruts.

Le poids moléculaire des enzymes est apprécié sur l'électrophoregramme par comparaison avec une électrophorèse de sérum humain. Les protéines solubles sont dosées par la méthode de LOWRY.

.../...

## RESULTATS ET DISCUSSION.

Huit activités enzymatiques ont été testées : les activités estérasiques,  $\alpha$ -glucosidasique, leucine aminopeptidasique, trypsique, chymotrypsique et des phosphatases alcaline et acide. Les résultats montrent qu'il existe dès le cinquième jour 10 isozymes de poids moléculaires compris entre 130 000 et 55 000, actifs vis-à-vis de l' $\alpha$ - et  $\beta$ -naphtyl acétate (pH : 6,5), 8 compris dans le même intervalle, qui dégradent l' $\alpha$ - et  $\beta$ -naphtyl butyrate (pH : 6,5), 2 isozymes ayant une activité analogue à celle de la chymotrypsine (pH : 6,8), un seul pour les phosphatases alcaline (pH : 8,3), et acide (pH : 5,0) et la leucine aminopeptidase (pH : 6,8). L'activité des extraits vis-à-vis du naphtyl myristate n'a pu être mise en évidence. La quantité de protéines solubles du surnageant varie peu : elle augmente de 0 à 5 jours, passe par un minimum à 10 jours, pour se stabiliser ensuite. L'électrophorèse montre qu'à l'éclosion, il existe une protéine de poids moléculaire d'environ 345 000 qui disparaît progressivement et n'existe plus à 10 jours.

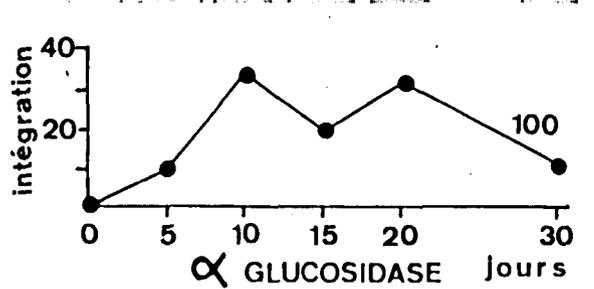
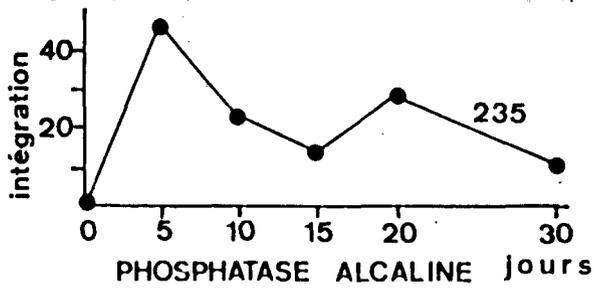
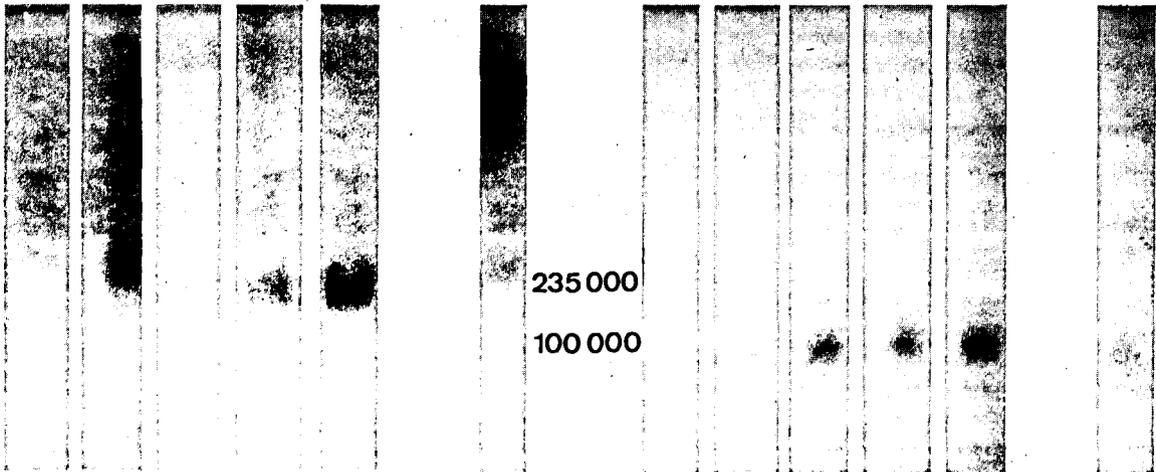
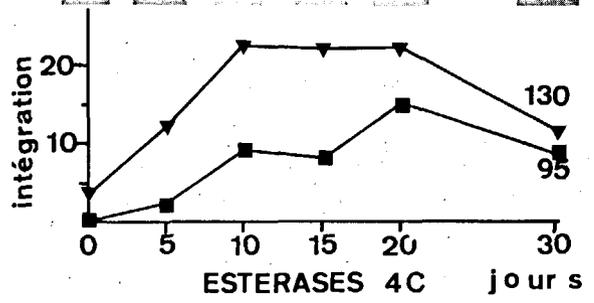
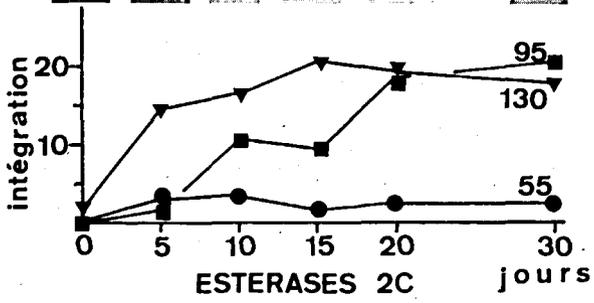
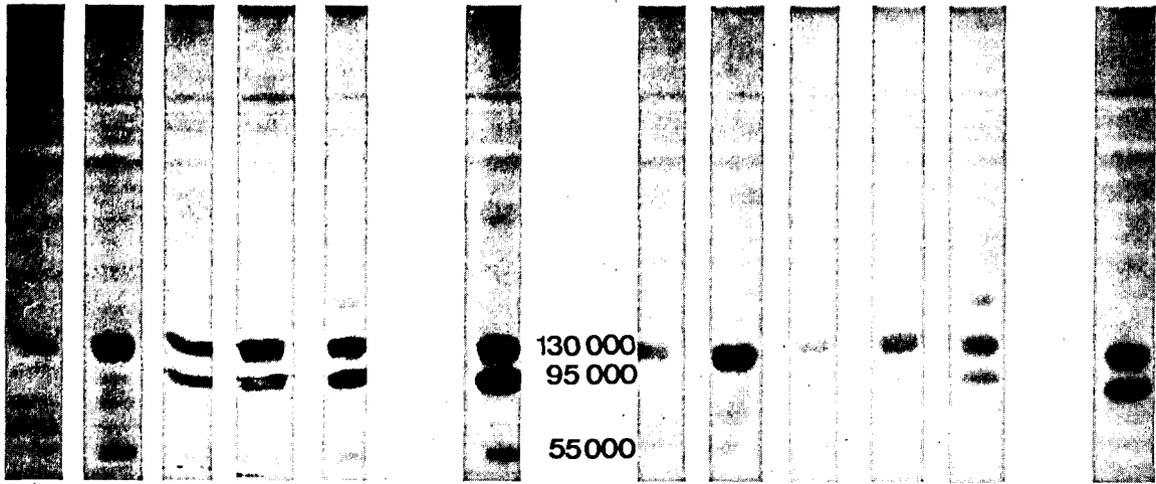
De façon générale, les activités décelées à l'éclosion sont très faibles : certaines isozymes à activité estérasique sont absentes, de même que celles ayant des activités analogues à celles de la chymotrypsine et de l' $\alpha$ -glucosidase (figures 1 et 2). On peut observer une augmentation des activités entre 0 et 5 jours vis-à-vis des substrats de la trypsine, de la phosphatase alcaline et de l' $\alpha$ -glucosidase, activités qui diminuent ensuite jusqu'au quinzième jour, où elles paraissent atteindre un palier. Par contre, les autres activités semblent augmenter régulièrement jusqu'au vingtième jour et se stabiliser ensuite. La phosphatase acide n'a pu être décelée que dans les extraits des larves prélevées à l'éclosion. La faible activité vis-à-vis du substrat de la leucine aminopeptidase n'a pas permis de mettre de variation en évidence. Il est à noter également que l'activité vis-à-vis du substrat spécifique de la chymotrypsine n'a pu être mise en évidence par dosage direct sur les extraits bruts.

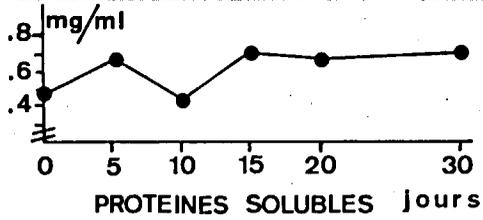
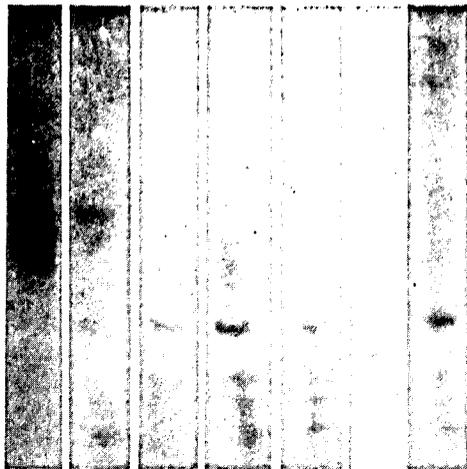
Quelques différences sont à noter entre les résultats obtenus et ceux trouvés avec les plaquettes APIZYM, en particulier au niveau de la phosphatase acide, dont on décèle une activité à tous les stades par cette dernière méthode. Ceci est sans doute dû à l'extraction en milieu très alcalin (pH : 8,35) et expliquerait également que l'on n'ait pu doser que l'activité estérasique analogue à celle de la chymotrypsine. Cette étude devrait donc être complétée par des dosages d'activité à d'autres pH.

Les figures obtenues pour les larves provenant de Sète et de Brest sont analogues, avec un léger retard dans l'évolution des activités pour les larves de Sète ; ceci est sans doute lié à la température inférieure des élevages de Sète.

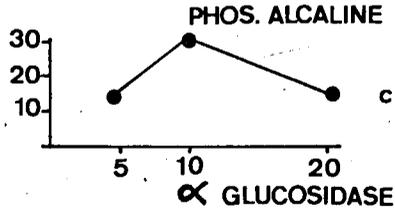
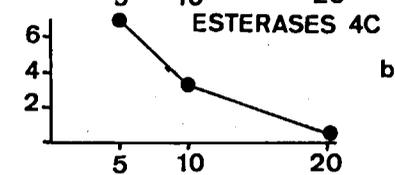
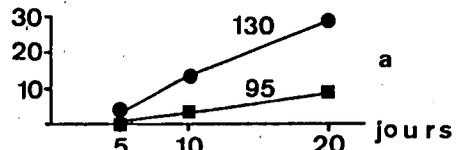
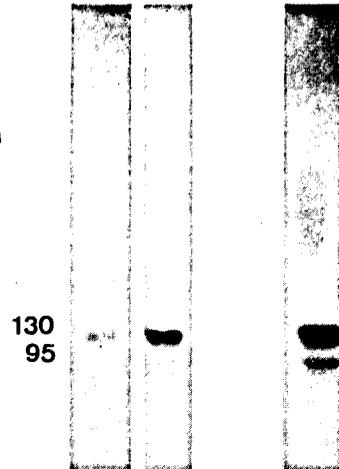
Il est à remarquer que les variations enregistrées se produisent principalement entre 0 et 10 jours, puis entre 15 et 30 jours, ce qui correspond aux périodes critiques I et II déterminées par BARNABE sur les élevages de larves. Ceci est sans doute à relier aux principales étapes des changements fonctionnels des organes. Divers auteurs ont tenté de relier les variations des activités enzymatiques aux changements histologiques et morphologiques observés au cours du développement (PRAKASH, 1961 ; TANAKA, 1972 ; KAWAI et IKEDA, 1972). Pour le bar, il y a peu de données sur l'histologie et l'histochimie du tractus digestif chez les larves,

.../...

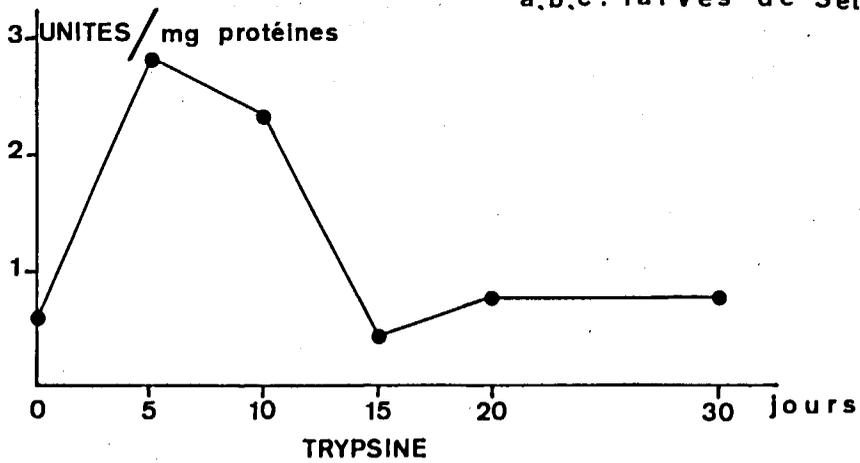
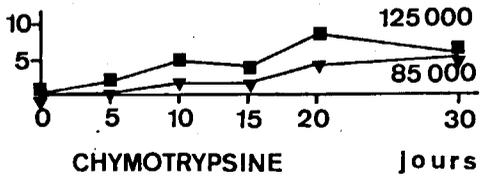




PM<sub>x</sub>10<sup>-3</sup>



a,b,c: larves de Sète



d'aliments composés, si elles sont localisées dans le tube digestif, ce qui reste à vérifier. Toutefois, la période ultérieure de la vie larvaire (de 30 à 50 jours), qui voit s'effectuer la différenciation de l'estomac et des caecums pyloriques, entraîne probablement de profonds changements dans les mécanismes de la digestion. Les prélèvements séquentiels effectués devraient contribuer à une meilleure connaissance de ces phénomènes, et de là, favoriser une meilleure formulation, selon les stades, pour les aliments composés.

#### BIBLIOGRAPHIE.

- ALESSIO, G.L., P. BRONZI, G. GANDOLFI et B. SCHREIBER, 1973. Primi risultati sulla riproduzione artificiale di branzini *Morone labrax* (L.), allevati in acque salmastre. Istituto Lombardo (Rend. Sc.), B 107 : 93-106.
- ALLIOT, E., A. FEBVRE et R. METAILLER, 1974. Les protéases digestives chez un téléostéen carnivore, *Dicentrarchus labrax*. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 14 (2) : 229-237.
- BARNABE, G., 1976. Contribution à la connaissance de la biologie du loup *Dicentrarchus labrax* (L.) (Poisson, Serranidae). Thèse de Doctorat d'Etat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc. 228 pp.
- BARNABE, G., F. BOULINEAU-COATANEA et F. RENE, 1976. Chronologie de la morphogenèse chez le loup ou bar, *Dicentrarchus labrax*, obtenu par reproduction artificielle. Aquaculture, 8 : 351-363.
- BREWER, G.J. and C.F. SING, 1970. An introduction to isozyme technique. Acad. Press. Inc. (London) Ltd., 175 pp.
- GIRIN, M., M.H. BARAHONA-FERNANDES and A. LE ROUX, 1975. Larval rearing of sea bass (*Dicentrarchus labrax*), with a high survival. ICES Doc. C.M. 1975/G:14, 8 pp.
- IWAI, T., 1967. The comparative study of the digestive tract of teleost larvae. Bull. Jap. Soc. sci. Fish., 33 : 480-496.
- KAWAI, S. and S. IKEDA, 1972. Studies on digestive enzymes of fishes IV. Development of the digestive enzymes of carp and black sea bream after hatching. Bull. Jap. Soc. sci. Fish., 39 (8) : 877-881.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBOUGH, A. FARK and R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265-275.
- PRAKASH, A., 1961. Distribution and differentiation of alkaline phosphatase in the gastrointestinal tract of steelhead trout. J. Exp. Zool., 146 (3) : 237-252.
- SHAW, C.R. and R. PRASAD, 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes, a compilation of recipes. Biochem. Gen., 4 : 297-320.

- SINHA, G.H., 1976. Comparative morphology, anatomy and histology of the alimentary canal of indian freshwater major carp, *Labeo calbasu* (Hamilton), during the different life-history stages in relation to food and feeding habits. Anat. Am. Dtsch., 139 (4) : 348-811.
- TANAKA, M., 1972. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae. IV. Changes in the epithelium related to fat absorption in the anteromedian part of the intestine after feeding. Jap. J. Ichtyol., 19 (1) : 15 pp.
- TANAKA, M., S. KAWAI and T. YAMAMOTO, 1972. On the development of digestive system and changes in activities of digestive enzymes during larval and juvenile stages in Ayu. Bull. Jap. Soc. sci. Fish., 38 (10) : 1143-1152.
- TRELLU, J. et H.J. CECCALDI, 1976. Caractérisation de quelques activités enzymatiques digestives de *Palaemon serratus* Pennant (Crustacé Décapode) après électrophorèse sur gel en gradient de polyacrylamide. C.R. Soc. Biol., 170 (3) : 634-638.
- VU, T.T., 1976. Etude du développement du tube digestif des larves de bar, *Dicentrarchus labrax* (L.). Arch. Zool. expl. gén., 117 (4) : 498-509.