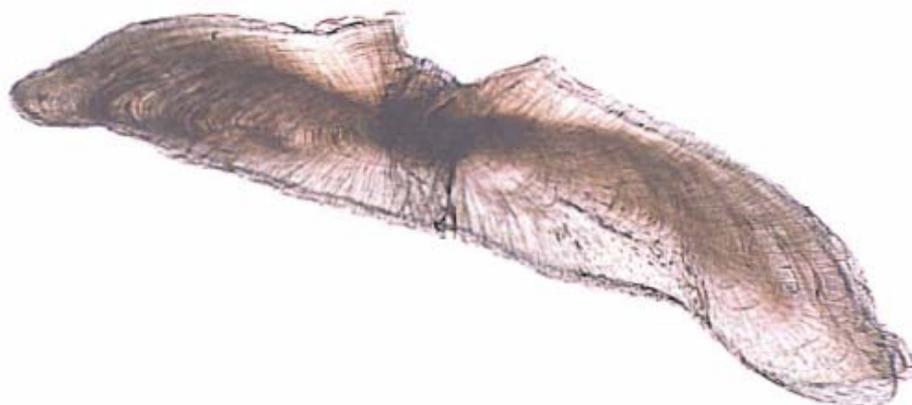


Découvrez un ensemble de documents, scientifiques ou techniques,
dans la base Archimer : <http://www.ifremer.fr/docelec/>

ifremer

Direction des Ressources Vivantes
Département des Ressources Halieutiques
Rapport scientifique et technique
Avril 2000 - **RST 2000-05** - DRV/RH/LASAA Brest
Anaïck ED EYER

Caractérisation du comportement chimique du complexe otosac-otolithe et réaction à des perturbations induites.



THESE de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale
soutenue le 28 septembre 1999 devant le jury composé de :

P. TREGUER	Président
F. LAGARDERE,	
J.P. CUIF	Rapporteurs
P. PAYAN,	
H. de PONTUAL,	
G. BOEUF,	
S. BLAIN	Examineurs

FICHE DOCUMENTAIRE

<p>Numéro d'identification du rapport : DRV/RH/RST/2000-05</p> <p>Diffusion : libre</p> <p>Validé par : DRV/RH-D</p> <p>Version du document : 1</p>	<p>date de publication : avril 2000</p> <p>nombre de pages : 222</p> <p>bibliographie : Oui</p> <p>illustration(s) : Oui</p> <p>langue du rapport : français</p>				
<p>Titre et sous-titre du rapport : Caractérisation du comportement chimique du complexe otosac-otolithe et réaction à des perturbations induites.</p> <p>Titre traduit : Characterisation of the chemical behaviour of the saccule-otolith complex and reaction to induced disturbances.</p>					
<p>Auteur : Edeyer Anaïck</p>	<p>Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER/DRV/RH/LASAA</p>				
<p>Travaux universitaires :</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">diplôme : Thèse de doctorat</td> <td style="width: 50%;">discipline : Chimie marine</td> </tr> <tr> <td>établissement de soutenance : Université de Bretagne Occidentale</td> <td>année de soutenance : 1999</td> </tr> </table>		diplôme : Thèse de doctorat	discipline : Chimie marine	établissement de soutenance : Université de Bretagne Occidentale	année de soutenance : 1999
diplôme : Thèse de doctorat	discipline : Chimie marine				
établissement de soutenance : Université de Bretagne Occidentale	année de soutenance : 1999				

FICHE DOCUMENTAIRE

Résumé :

Les poissons téléostéens ont la capacité d'enregistrer au niveau de leurs otolithes, concrétions calcaires situées dans l'oreille interne, les principaux événements (environnementaux et physiologiques) qui ponctuent leur vie. L'otolithe est constitué par des dépôts de CaCO_3 sur une trame protéique selon un rythme circadien et la quasi irréversibilité de ce processus en fait une véritable archive biologique largement utilisée pour appréhender l'écologie des poissons.

L'otolithe baigne dans l'endolymphe, milieu dans lequel transitent tous les précurseurs de sa formation. La caractérisation chimique de l'endolymphe a révélé une hétérogénéité de ses principaux constituants (protéines, CO_2 total et Ca total) dont l'origine réside dans la distribution spatiale non uniforme des ionocytes dans l'épithélium sacculaire. Ainsi en relation avec la morphologie asymétrique des otolithes, ces gradients chimiques endolympatiques ont permis de proposer un modèle de calcification de l'otolithe. Par ailleurs, l'analyse des variations circadiennes des concentrations des protéines et du CO_2 total contenus dans l'endolymphe a souligné la prépondérance de la composition de l'endolymphe dans le processus de biominéralisation de l'otolithe.

Les études des répercussions de perturbations environnementales (eau chlorée, changement de salinité et de température) sur la composition chimique de l'endolymphe et de l'otolithe ont conforté l'hypothèse d'un lien étroit entre ces deux compartiments. Ces changements environnementaux provoquent des modifications de composition chimique et structurales des otolithes reflétant les variations des teneurs des constituants de l'endolymphe.

Abstract :

Teleost fish have the capacity to record in their otoliths, calcareous concretions located in the inner ear, the principal events (environmental and physiological) which punctuate their life. Otolith is made of CaCO_3 deposits on a protein matrix according to a circadian rhythm. Due to the quasi irreversibility of this process, otoliths can be compared to biological archives largely used to apprehend the fish ecology.

The otolith bathes in the endolymph, a medium in which all the precursors of otolith formation forward. The endolymph chemical analysis revealed a heterogeneity of its principal components (proteins, total CO_2 and total Ca) which origin lies in the non uniform spatial distribution of the ionocytes in the saccular epithelium. Thus, in relation to the asymmetrical morphology, these endolymph chemical gradients made it possible to propose a model of otolith calcification. In addition, the analysis of the circadian variations of the endolymph concentrations of proteins and total CO_2 underlined the preponderance of the endolymph composition in the otolith biomineralisation process .

The studies of the repercussions of environmental disturbances (chlorinated water, change of salinity and temperature) on the chemical composition of the endolymph and the otolith consolidated the assumption of a close bond between these two compartments. These environmental changes caused chemical and structural modifications of the otolith reflecting variations of the concentration of the endolymph components.

Mots-clés :

Otolithe, Endolymphe, Calcification, Poisson, *Psetta maxima*, Biominéralisation, Microchimie, Perturbations environnementales.

Keywords :

Otolith, Endolymph, Calcification, Fish, *Psetta maxima*, Biomineralisation, Microchemistry, Environmental disturbances.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Sclérochronologie des Animaux Aquatiques (département des Ressources Halieutiques de l'IFREMER).

Je remercie toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à son aboutissement.

En particulier, Hélène de Pontual et Patrick Payan pour leur soutien permanent durant ces trois ans, Nicole Mayer-Gostan, Gilles Bœuf, Jacques Panfili et Hervé Troadec pour leurs aides et conseils, André Ogor pour son aide technique surtout avec la « rodeuse », Eric Dabas pour ses « découpes » de turbots, Pierre Campana pour son aide informatique, Armelle Sévère et Annick Leroux pour leur aide au niveau des élevages de poissons.

Roger Cottier et Alain Batel (BRGM Orléans) pour l'accès à l'ICPMS.

Toutes les personnes citées ci dessus et l'équipe de la pêche pour leur bonne humeur et leur sympathie.

IFREMER et la région Bretagne pour leur financement pendant 3 ans.

Enfin, que les personnes qui ne sont pas citées ne soient pas froissées, il est toujours difficile d'effectuer des remerciements sans oublier quelqu'un.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	5
PREMIERE PARTIE :	15
FONCTIONNEMENT INTRINSEQUE DU COMPLEXE OTOLITHE - OTOSAC.	15
1. HÉTÉROGÉNÉITÉ DE COMPOSITION DE L'ENDOLYMPHE :	18
2. ORIGINE DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DE COMPOSITION DE L'ENDOLYMPHE : ULTRASTRUCTURE DU SACCULE :	26
3. IMPORTANCE ET RÔLE DES GRADIENTS ENDOLYMPHATIQUES DANS LE PROCESSUS DE CALCIFICATION DE L'OTOLITHE :	32
4. VARIATIONS CIRCADIENNES DE LA COMPOSITION DU PLASMA ET DE L'ENDOLYMPHE SACCULAIRE CHEZ LE TURBOT :	38
5. LES RÉPERCUSSIONS DE LA PRÉSENCE D'UNE HÉTÉROGÉNÉITÉ DE L'ENDOLYMPHE SUR LA COMPOSITION DE L'OTOLITHE :	44
DEUXIEME PARTIE :	77
RÉPERCUSSIONS DE DIVERSES PERTURBATIONS ENVIRONNEMENTALES INDUITES SUR LE COMPLEXE (PLASMA – ENDOLYMPHE – OTOLITHE).	77
1. ETUDE D'UN FACTEUR ABIOTIQUE : LA CHLORATION DE L'EAU :	83
2. ETUDE DE DEUX FACTEURS ABIOTIQUES : SALINITÉ ET TEMPÉRATURE DE L'EAU :	103
2.1. <i>Matériels et méthodes :</i>	103
2.2. <i>Effets d'un changement de la température de l'eau :</i>	107
2.2.1. Résultats :	107
2.2.2. Discussion :	112
2.3. <i>Effets d'un changement de la salinité de l'eau :</i>	118
2.3.1. Résultats :	118
2.3.2. Discussion :	123
2.4. <i>Relations entre les compositions chimiques de l'endolymphe et de l'otolithe :</i>	127
2.4.1. Résultats :	127
2.4.1.1. Effets d'un changement de la température de l'eau :	128
2.4.1.2. Effets d'un changement de la salinité de l'eau :	133
2.4.2. Discussion :	134
3. RECHERCHE D'ÉLÉMENTS TRACES DANS LE COMPLEXE PLASMA – ENDOLYMPHE – OTOLITHE :	141
3.1. <i>Matériels et méthodes :</i>	141
3.1.1. Hétérogénéité de composition de l'endolymphe :	141
3.1.2. Changement de la température du milieu biotique :	142

3.2. Comparaison des techniques :	143
3.2.1. Hétérogénéité de composition de l'endolymphe :	143
3.2.2. Changement de la température du milieu biotique :	145
3.2.3. Discussion :	148
3.3. Analyses des éléments traces :	149
3.3.1. Composition en éléments traces de l'endolymphe distale et proximale :	150
3.3.2. Concentrations des éléments traces dans le plasma, l'endolymphe et l'otolithe lors d'un changement de la température du milieu biotique :	150
3.3.3. Discussion :	153
TROISIÈME PARTIE :	157
DISCUSSION GÉNÉRALE.	157
1. RENOUELEMENT DU COMPARTIMENT ENDOLYMPHATIQUE :	159
2. DEGRÉ DE COUPLAGE ENTRE HOMÉOSTASIE PLASMATIQUE ET CHIMIE DE L'ENDOLYMPHE :	162
3. PRÉCURSEURS ENDOLYMPHATIQUES ET CALCIFICATION DE L'OTOLITHE :	164
4. RELATION ENTRE CHIMIE DE L'ENDOLYMPHE ET MICROCHIMIE DE L'OTOLITHE :	168
CONCLUSION GÉNÉRALE :	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	175
ANNEXE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES	195
1. MATÉRIEL ANIMAL :	195
1.1. Marquage des poissons :	195
1.2. Prélèvement et conservation du plasma, de l'endolymphe et des otolithes :	197
1.3. Préparation des otolithes :	199
1.3.1. Inclusion :	201
1.3.2. Rodage et polissage :	202
2. TECHNIQUES D'ANALYSES MICROCHIMIQUES :	203
2.1. Analyses d'échantillons liquides : endolymphe et plasma	203
2.1.1. Spectrométrie de masse avec plasma inductif (ICPMS) :	203
2.1.1.1. Principe de fonctionnement de l'ICPMS :	203
2.1.1.2. Analyses :	205
2.1.2. Photométrie de flamme :	207
2.1.3. Spectrophotométrie à l'aide de kits sigma :	208
2.2. Analyses d'échantillons solides : otolithes	208
2.2.1. ICPMS à ablation laser :	209
2.2.2. Microsonde à dispersion de longueur d'onde (Wavelength - dispersive X-ray spectroscopy, WDS) :	210
ANNEXE II : TABLEAU DE CONVERSION (PPM EN mM)	215

ANNEXE III : PARTICIPATION AUX COLLOQUES _____ **217**

ANNEXE IV : GLOSSAIRE _____ **219**

INTRODUCTION GENERALE

Un grand nombre d'organismes vivants possèdent la propriété d'enregistrer, dans certains de leurs tissus durs, les principaux événements (environnementaux entraînant des réactions physiologiques) qui ponctuent leur vie. Les otolithes de téléostéens (poissons osseux) en sont un exemple particulièrement intéressant.

Les otolithes sont des concrétions calcifiées situées dans l'oreille interne des poissons. Le labyrinthe membraneux de cette oreille interne (figure 1) est composé de trois canaux semi-circulaires (deux verticaux et un horizontal) et d'un otosac divisé en utricule (*utrículus*) et saccule (*sacculus*), qu'une constriction sépare en saccule proprement dit et *lagena* (Grassé, 1958) (figure 2). Ces trois "sacs" contiennent chacun un otolithe (respectivement le *lapillus*, la *sagitta* et l'*asteriscus*) baignant dans un liquide dont la viscosité varie selon les espèces : l'endolymphe. Les otolithes sont reliés aux parois de l'otosac par des formations ligamenteuses (*marginarium*) qui s'insèrent sur leur pourtour (Grassé, 1958).

La taille et la forme des otolithes sont spécifiques de chaque espèce ; cependant la *sagitta* est généralement la concrétion la plus volumineuse - excepté chez les Ostariophyses chez lesquels l'*asteriscus* est le plus gros (Adams, 1940 dans Pannella 1980). C'est à la *sagitta* et à son enveloppe, le *saccule*, que se rapportent les termes otolithe et otosac dans le texte qui suit. La *sagitta* a une forme variable et très spécifique. Néanmoins, la face proximale (interne) est le plus souvent convexe, et la face distale (externe) concave, avec un axe principal orienté antéro-postérieurement. La face proximale est entaillée longitudinalement par un sillon appelé *sulcus acusticus* (figure 3) qui correspond à la projection de la zone sensorielle de l'épithélium sacculaire appelée *macula* (Pannella, 1980).

Au niveau du *sulcus*, les otolithes sont fonctionnellement reliés à la macula par la membrane otolithique, structure gélatineuse, qui assure le relais mécanique lors du déplacement inertiel (fonctions d'équilibration) ou de la mise en résonance (fonction d'audition) de l'otolithe (Fay, 1984 ; Lowenstein, 1971 ; Gauldie et Radtke, 1990). La transduction mécanique est assurée par des cellules ciliées présentes dans la macula et reliées au système nerveux central par le nerf auditif (Grassé, 1958).

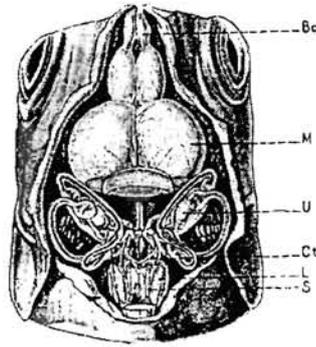


Figure 1 : Labyrinthe membraneux de l'oreille interne en vue dorsale, la voûte crânienne, le cervelet et le bulbe ont été enlevés. *M*, cerveau moyen ; *U*, utricule ; *Ct*, canal transverse ; *L*, lagena ; *S*, saccule. (D'après S. Dijkgraaf dans Grassé, 1958).

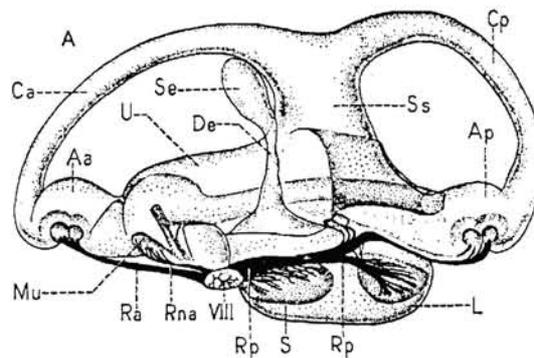


Figure 2 : Labyrinthe de l'esturgeon (*Acipenser sturio*). Vue du côté interne. *Aa*, ampoule antérieure ; *Ap*, ampoule postérieure ; *Ca*, *Cp*, canaux semi-circulaires antérieur, postérieur ; *De*, canal endolymphatique ; *L*, lagena ; *Mu*, macula utriculi ; *Ra*, rameau nerveux de l'ampoule ; *Rp*, rameau de la lagena ; *S*, sacculle ; *Se*, sacculle endolymphatique ; *Ss*, sinus superior (crus commune) ; *U*, utricule ; *VIII*, 8^e nerf crânien. (D'après S. Dijkgraaf dans Grassé, 1958).

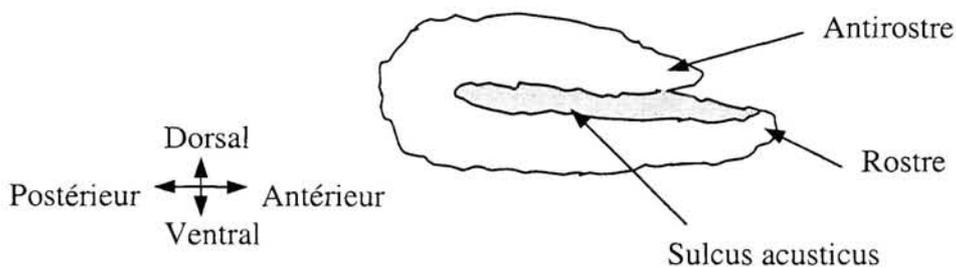


Figure 3 : Face proximale longitudinale d'une sagitta gauche de turbot.

C'est la *pars superior* du labyrinthe (canaux semi-circulaires et utricule) qui est responsable de l'équilibre. En position normale d'équilibre du poisson, les otolithes sont en position horizontale. Lorsque le poisson s'incline par rapport à la verticale, le déplacement de l'otolithe, relayé par la membrane otolithique, est transmis aux cupules sensorielles et provoque une réaction motrice réflexe qui rétablit la position d'équilibre. (Grassé, 1958 ; Schellart et Munck, 1987 ; Schellart et Buwalda, 1990). La *pars inferior* (sacculle et lagena) est réceptrice des sons (Popper et Fay, 1993).

Les otolithes sont composés de carbonate de calcium (CaCO_3), sous la forme minérale d'aragonite dont les cristaux sont disposés radialement par rapport au centre (Carlstrom, 1963) et d'une matrice organique. La fraction organique, formant une trame réticulaire complexe (Watabe et al., 1982 ; Morales-Nin, 1987), est constituée d'une matrice protéique, appelée otoline, riche en acides aspartiques et glutamiques, pauvre en acides aminés basiques et aromatiques (Degens et al., 1969). Cette matrice est relativement uniforme parmi les différentes espèces de poissons mais sa composition en acides aminés peut varier en particulier entre les juvéniles et les adultes (Morales-Nin, 1986).

Le *nucleus* (partie centrale de l'otolithe) se forme par fusion de plusieurs *primordia* (centres de calcification) exocytosés des cellules de l'oreille interne (Campana et Neilson, 1985). L'accroissement des otolithes se fait par dépôt de matériel organique et minéral à sa surface, sous forme de couches concentriques d'épaisseurs variables ; ce dépôt cyclique dépend de rythmes internes du métabolisme du calcium et de la synthèse protéique (Morales-Nin, 1991). La croissance intervient suivant des axes privilégiés : la plus forte selon l'axe postéro-antérieur, la plus faible selon la direction proximo-distale et l'intermédiaire selon l'axe dorso-ventral (Pannella, 1980).

Plusieurs types de structures sont visibles sur les otolithes selon le niveau d'observation : des microstructures, des macrostructures de formation périodique et des discontinuités de formation a périodique.

Les microstructures (<1 μm à quelques μm) :

La croissance des otolithes se fait par accréation journalière de stries (aussi appelées microstructures journalières ou accroissements journaliers). Celles-ci sont composées de deux parties qui correspondent, pour une vision en lumière transmise, à : (1) une zone fortement calcifiée large et claire appelée zone L et (2) une zone discontinue étroite et sombre appelée zone D qui correspond à une matrice protéique faiblement calcifiée (Watabe et al., 1982 ; Morales-Nin, 1987 ; Gaudie et Xhie, 1995). La formation de ces microstructures est régie par un rythme circadien endogène influencé par des facteurs exogènes.

Les microstructures n'apparaissent qu'à fort grossissement (x400 à x1000) et leur comptage permet d'estimer l'âge des larves de poissons et des espèces à faible longévité.

Les macrostructures (dizaines à quelques centaines de μm) :

Sur des otolithes entiers, une alternance de structure est visible : une zone translucide, que l'on a longtemps considérée comme déposée durant les périodes de croissance lente (hiver pour les poissons des eaux tempérées) et une zone *opaque* correspondant aux périodes de croissance rapide (printemps, été) (Pannella, 1980). En fait, les observations publiées dans la littérature montrent que les périodes relatives de déposition des zones opaques et hyalines sont variables, ce qui suggère l'existence de mécanismes de contrôle complexes, fonctions de facteurs endogènes et environnementaux (Beckman et Wilson, 1995).

Selon Pannella (1980), la bande translucide est constituée de cristaux d'aragonite courts et fins enrobés par une trame organique dominante alors que la zone opaque est composée de cristaux longs et épais agencés dans des couches successives de matière organique. Les variations structurales et chimiques de ces zones résultent de changements physiologiques de l'organisme, eux-mêmes dûs à des fluctuations saisonnières de facteurs endogènes et environnementaux. Parmi les facteurs externes influençant ces changements, un des plus effectifs est la température du biotope, laquelle agit directement sur le métabolisme de base du poisson.

Ces macrostructures sont visibles sous une loupe binoculaire (grossissement x10 à x100).

Les discontinuités (quelques μm à 10 – 20 μm) :

Les discontinuités (*checks*) se présentent sous la forme de zones opaques (en lumière transmise) riches en protéines. Elles correspondent à une discontinuité de structure dans

l'arrangement des marques de croissance et constituent parfois une rupture nette de la continuité d'une zone. Ces discontinuités sont induites par les stress que peuvent subir les poissons dans leur biotope (Pannella, 1980). Elles sont visibles sous une loupe binoculaire ou au microscope (grossissement x20 à x400).

L'otolithe, contrairement à d'autres pièces calcifiées, est peu affecté par les phénomènes de résorption. Cette caractéristique entraîne une excellente conservation de l'information enregistrée tout au long de la vie du poisson (Campana et Neilson, 1985) et fait de l'otolithe une véritable archive biologique.

Technique désormais classique, l'estimation de l'âge des poissons par comptage des structures saisonnières de l'otolithe est à la base des procédures de gestion des stocks mondiaux de poissons de pêche commerciale. De plus, depuis le début des années 1980, la composition chimique des otolithes est utilisée pour appréhender l'écologie des poissons. En effet, la chimie de l'otolithe est régie par des facteurs exogènes (chimie de l'eau, disponibilité trophique, facteurs de stress, pollutions chroniques ou accidentelles...) et endogènes (ontogénie, métabolisme, reproduction...) (Radtke et Shafer, 1992). Cependant, à ces facteurs s'ajoutent des facteurs indépendants de nature analytique (préparation des échantillons, outil d'analyse, conditions opératoires, standards analytiques...) susceptibles d'introduire des biais dans l'analyse quantitative (de Pontual et al., 1998). La microchimie de l'otolithe est une discipline émergente dont le potentiel nécessite d'être mieux précisé par une optimisation des techniques analytiques et une amélioration des connaissances relatives aux mécanismes physico-chimiques régulant l'incorporation des éléments chimiques.

Par opposition avec d'autres systèmes biominéralisateurs (os, coquilles de mollusques, coraux...), le processus de calcification de l'otolithe est acellulaire. En effet, l'otolithe baigne dans l'endolymphe qui l'isole complètement des cellules constitutives de l'épithélium sacculaire.

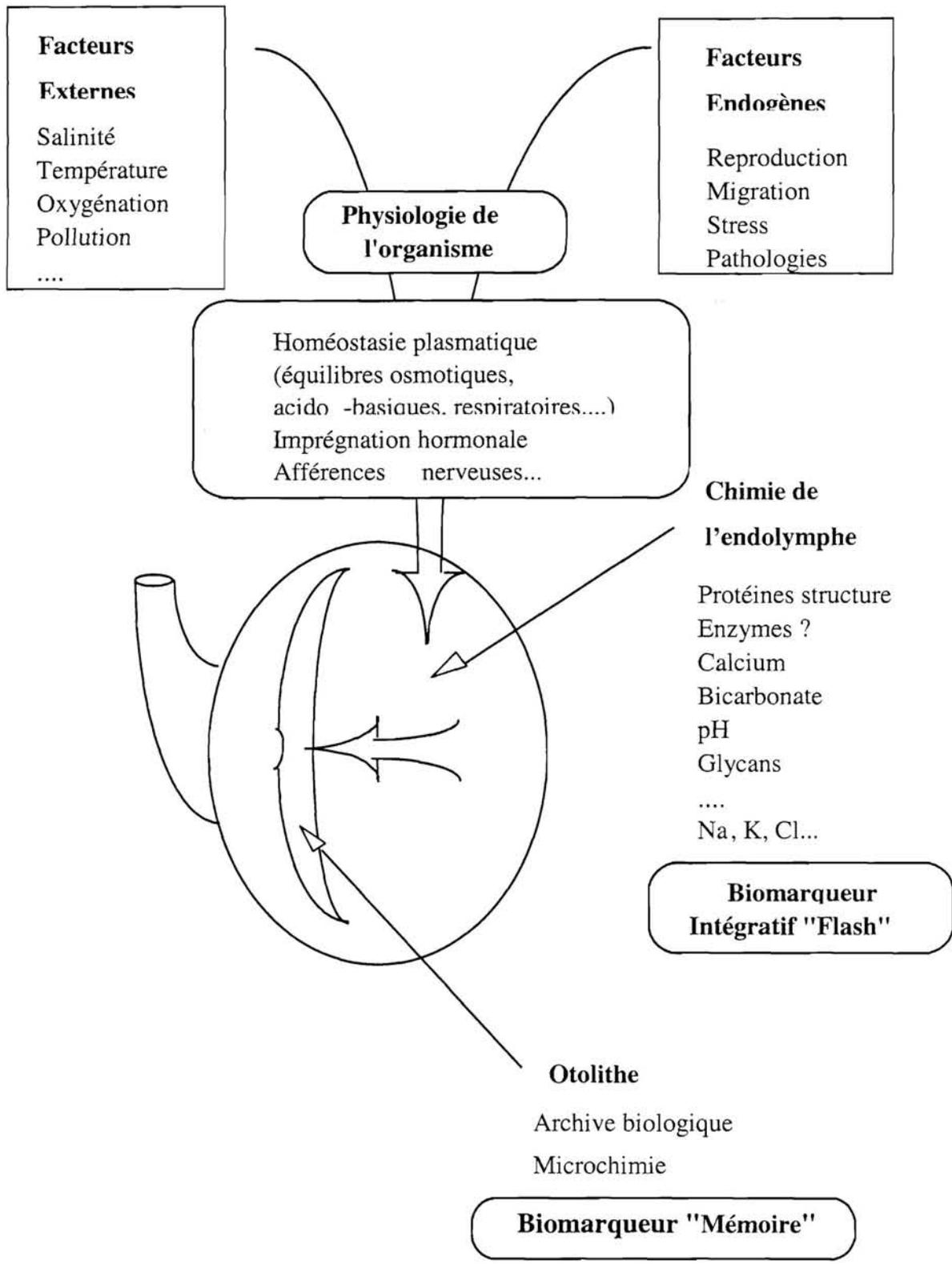


Figure 4 : Schéma illustratif des relations liant les trois compartiments : le plasma, l'endolymphe et l'otolithe.

Ainsi, ce modèle offre la possibilité d'analyser (après prélèvement) l'interface liquide (endolymphe) située entre les cellules « calcificatrices » et l'otolithe. Dans les autres modèles biominéralisateurs, cet espace ne présente qu'un volume très réduit de quelques microns d'épaisseur, ce qui le rend difficilement accessible au prélèvement. Par sa position intermédiaire, l'endolymphe constitue un lieu incontournable dans lequel transitent tous les précurseurs de la construction de l'otolithe (protéines, Ca^{2+} , HCO_3^- , éléments mineurs et traces). La composition chimique de l'otolithe reflète donc probablement celle de l'endolymphe à un instant t. Elle est elle-même le reflet direct ou modifié de la composition du plasma, composition qui est sous influences endogènes et exogènes. (Figure 4).

Curieusement, malgré un nombre croissant d'études sur la microchimie de l'otolithe, les travaux d'ordre physiologique sur le fonctionnement du complexe otolithe – épithélium sacculaire et la composition chimique de l'endolymphe sont peu nombreux. Les raisons résident probablement dans la difficulté du prélèvement de l'endolymphe ce qui passe par des techniques délicates et nécessite d'avoir un bon environnement de laboratoire.

Le but du présent travail est d'étudier, en situations expérimentales, les relations entre les différents compartiments (milieu extérieur – plasma – endolymphe – otolithe) et les mécanismes d'incorporation des divers éléments dans l'otolithe. Cette stratégie devrait permettre de clarifier les interprétations des analyses de poissons prélevés dans le milieu.

La première partie présente le fonctionnement du complexe otolithe – otosac i.e., les relations entre le plasma, l'endolymphe et l'otolithe dans un environnement stable (paramètres abiotiques tels la température, la salinité, la photopériode constants) qui serviront de références.

La deuxième partie concerne les effets de perturbations environnementales induites (chloration de l'eau, changement de salinité et de température) sur le fonctionnement de ce complexe par l'analyse des principaux paramètres impliqués dans le processus de calcification de l'otolithe. Cela a également impliqué de rechercher les éléments traces contenus dans ces trois compartiments et d'étudier les effets d'un changement de température de l'eau sur leur composition.

Enfin la dernière partie resitue le fonctionnement du complexe otolithe – otosac par rapport aux autres systèmes calcificateurs et propose une vue synthétique de la chaîne de réactions qui lie ces différents compartiments (milieu extérieur – plasma – endolymphe – otolithe) lors de perturbations environnementales.

PREMIERE PARTIE :

**FONCTIONNEMENT INTRINSEQUE DU COMPLEXE
OTOLITHE - OTOSAC.**

Les mécanismes de calcification de l'otolithe ne sont pas encore élucidés mais il est fort probable qu'une des clés de la compréhension de ces processus réside dans l'étude du compartiment endolymphatique. En effet l'endolymphe est «le lieu de passage obligé» des éléments constituant l'otolithe, en particulier des éléments précurseurs de la calcification (Ca^{2+} , HCO_3^- et composés organiques). Pourtant, les recherches portant sur les relations entre la chimie de l'endolymphe et celle de l'otolithe sont très peu nombreuses dans la littérature. Dans la présente partie de ce manuscrit, nous nous sommes attachés à mieux comprendre les mécanismes régissant la biominéralisation de l'otolithe dans les conditions standards (paramètres environnementaux et organismes stabilisés) en abordant successivement l'étude de :

- (1) la composition chimique de l'endolymphe à travers laquelle nous avons mis en évidence une hétérogénéité spatiale, caractérisée par la présence de gradients protéiques et ioniques,
- (2) l'origine de cette hétérogénéité par une approche ultrastructurale de l'épithélium sacculaire,
- (3) l'importance des gradients intra-endolymphatiques dans le processus de calcification des otolithes, ce qui nous a permis de proposer un modèle original de calcification tenant compte des contraintes inhérentes à la formation des tissus calcifiés,
- (4) l'évolution de ces gradients intra-endolymphatiques au cours du cycle nyctéméral, résultats qui ont conforté notre hypothèse du rôle des gradients dans le processus de calcification et qui ont permis d'expliquer le phasage de la formation des Zone L et Zone D de l'accroissement journalier otolithique,
- (5) les répercussions de l'hétérogénéité de l'endolymphe sur la composition chimique de l'otolithe.

1. Hétérogénéité de composition de l'endolymphe :

Chez les mammifères, l'endolymphe est caractérisée par une forte concentration en potassium (K^+) et faible en sodium (Na^+), rappelant la composition d'un liquide physiologique particulier ni intracellulaire ni extracellulaire. (Tableau 1).

	Mammifères		Poissons
	<i>Cochlée</i>	<i>Vestibule</i>	
Na^+ (mM)	3 à 25	15 à 40	110 à 140
K^+ (mM)	140 à 180	120 à 160	40 à 70
Cl^- (mM)	130 à 170	110 à 160	140 à 170
Mg^{2+} (mM)	0,9		0,1 à 0,6
Ca tot (mM)	0,3 à 0,6	3	1 à 1,5
Protéines (g/l)	0,0061 à 0,0164	0,0015 à 0,0065	2 à 10
CO ₂ tot (mM)			20 à 30
pH	7,4		8,0 à 8,1

Tableau 1 : Comparaison de la composition chimique de l'endolymphe chez les vertébrés supérieurs et les poissons. (D'après Sterkers et al., 1990 pour les vertébrés supérieurs et Payan et al., 1997 et 1998 pour les poissons).

Chez les poissons téléostéens, un nombre limité d'études a examiné la composition de l'endolymphe, principalement celle du saccule qui correspond à la chambre la plus volumineuse du labyrinthe chez la plupart des espèces. Par comparaison aux vertébrés supérieurs, l'endolymphe des poissons possède une forte teneur en Na^+ (110 à 140 mM : Enger, 1964 ; Fange et al., 1972 ; Kalish, 1991 ; Mugiya et Takahashi, 1985 ; Watanabe et Miyamoto, 1973 ; contre 3 à 40 mM chez les mammifères Sterkers et al., 1988 ; Sterkers et al., 1990). Une autre différence remarquable, décrite par Mugiya et Takahashi (1985), réside dans l'alcalinité plus importante de l'endolymphe des poissons par rapport au plasma (pH plasmatique : 7,2 - 7,4 ; pH endolymphatique : 8,0 - 8,1), tandis que chez les mammifères le plasma et l'endolymphe possèdent la même valeur de pH de 7,4 (Sterkers et al., 1990). Cette forte alcalinité de l'endolymphe correspond à une concentration élevée du dioxyde de carbone total (tot CO₂ :

30mM contre 15mM dans le plasma ; Mugiya et Takahashi, 1985 ; Payan et al., 1997) et est probablement liée au dépôt de CaCO_3 sur l'otolithe (Gauldie et Nelson, 1990).

Plusieurs raisons ont dirigé nos travaux vers la recherche d'une hétérogénéité de composition de l'endolymphe :

(1) En considérant la composition ionique de l'endolymphe chez la truite et le turbot (Payan et al., 1997) et en tenant compte de la différence de potentiel électrique de +10mV de l'endolymphe par rapport au plasma (Enger, 1964), deux ions apparaissent très nettement en déséquilibre électrochimique : K^+ et H^+ . La concentration de K^+ est beaucoup plus élevée dans l'endolymphe que dans le plasma (potentiel d'équilibre de -75mV selon l'équation de Nernst) tandis, qu'inversement, $[\text{H}^+]$ est plus faible par rapport au plasma (potentiel d'équilibre de +50mV). Ces valeurs de potentiel calculées étant très différentes de celles déterminées expérimentalement à travers l'épithélium sacculaire, la différence de concentration de ces deux ions entre le plasma et l'endolymphe est très probablement maintenue par des processus actifs de transports transépithéliaux. Cela a été démontré pour H^+ par Payan et al. (1997) par l'étude *in vitro* des caractéristiques pharmacologiques de la sécrétion de protons par des saccules excisés.

(2) Parallèlement, Mayer-Gostan et al. (1997) ont recherché la présence de ionocytes (cellules spécialisées dans le transport actif des ions) dans l'épithélium sacculaire par une technique au ZIO (Zinc Iode Osmium) spécifique de ce type cellulaire. Ces auteurs ont montré que les ionocytes ne sont pas distribués de façon homogène sur l'épithélium sacculaire et que deux zones distinctes peuvent être définies. La première située autour de la macula, est caractérisée par des ionocytes volumineux (20 à 30 μm de diamètre) qui assurent un contact direct entre le plasma et l'endolymphe proximale. La deuxième zone est positionnée du côté opposé à la macula et contient des ionocytes de taille plus petite (7 à 10 μm de diamètre) regroupés en plages circulaires et baignés par l'endolymphe distale. Le schéma présenté dans la figure 5 correspond à une coupe transversale d'un saccule où sont situés ces deux types de ionocytes. Ainsi, cette distribution spatiale non homogène des ionocytes sur l'épithélium sacculaire suggère la présence d'une hétérogénéité de composition ionique de l'endolymphe.

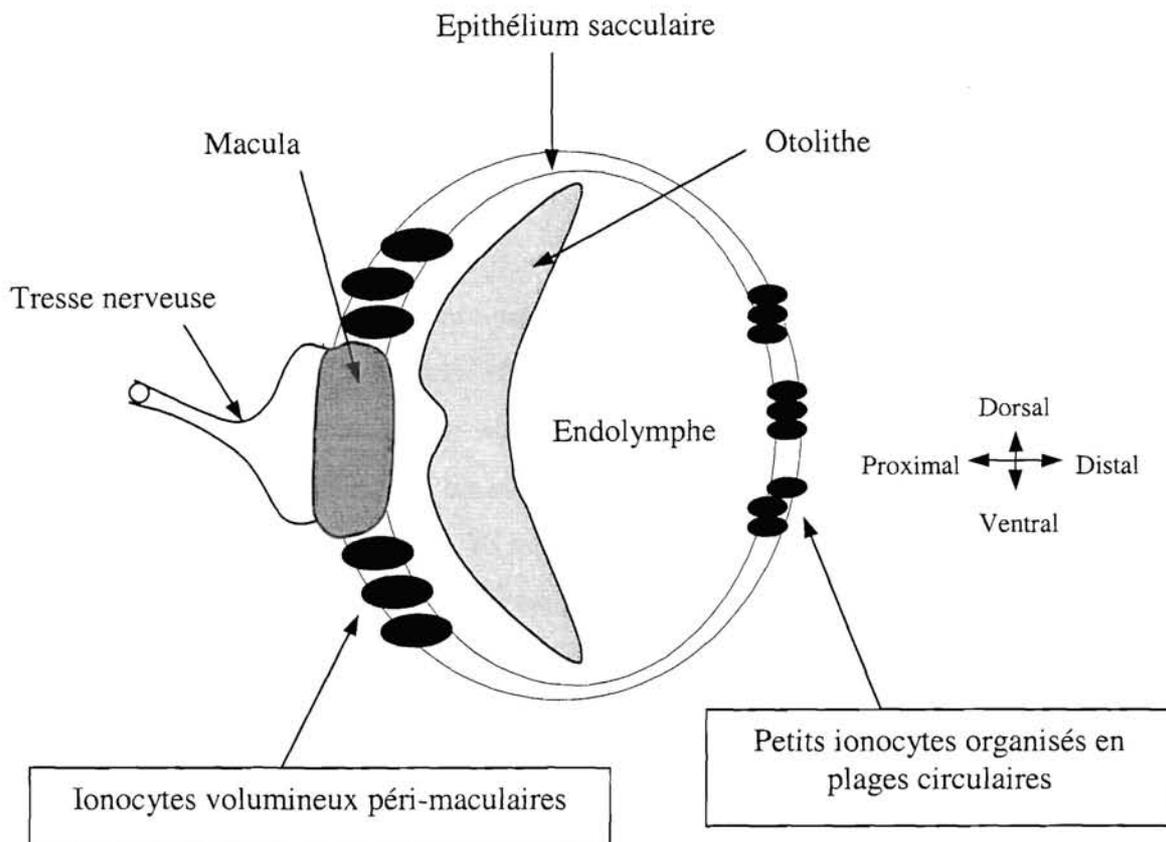


Figure 5 : Distribution des deux types de ionocytes mis en évidence dans l'épithélium sacculaire chez la truite et le turbot par Mayer-Gostan et al. (1997).

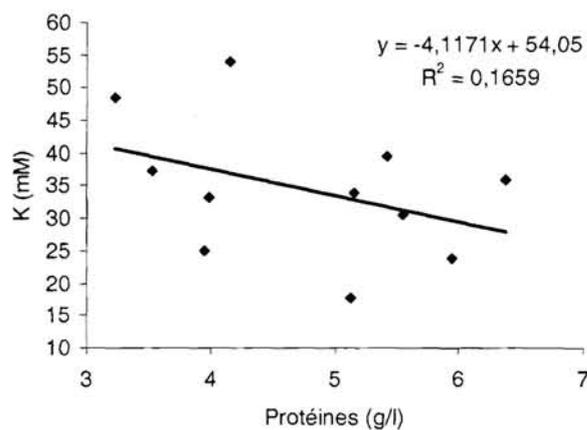


Figure 6 : Relation entre les concentrations de protéines et de K^+ dans l'endolymphe chez le turbot, lors d'une série de prélèvements préliminaires aux expériences d'hétérogénéité de composition de l'endolymphe.

(3) Lors des premières expériences d'analyses de la composition de l'endolymphe sur des échantillons prélevés sans précision spatiale particulière, nous avons observé systématiquement une variabilité très importante des concentrations de certains composants (principalement protéines, K^+ et CO_2 total), tandis que les teneurs d'autres composants (tels que Na^+ , Cl^- et Ca tot) étaient beaucoup moins dispersées. Les concentrations de protéines et de K^+ étant déterminées sur le même échantillon (5 μ l environ), nous avons pu mettre en évidence une relation entre ces deux paramètres en utilisant une série d'échantillons d'endolymphe prélevés en différents endroits du saccule. La figure 6 est une illustration de cette relation entre les concentrations protéiques et potassiques de l'endolymphe. Cette relation inverse permet de visualiser clairement deux groupes de points : le premier où $[K^+]$ est compris entre 25 et 55 mM et $[Prot]$ 3 à 4 g/l et le second où $[K^+]$ est compris entre 15 et 40 mM et $[prot]$ 5 à 6 g/l. Ainsi ces résultats suggèrent la présence de deux zones distinctes de l'endolymphe caractérisées par des compositions chimiques différentes.

L'ensemble de ces résultats précite ceux de Gaudie et Nelson (1988). Ces auteurs avaient suggéré, à l'aide de marquage cellulaire de l'épithélium sacculaire à l'hématoxyline, que le site de sécrétion des protéines dans l'endolymphe correspondait à la zone de la macula. Cela nous a permis d'émettre l'hypothèse d'une hétérogénéité de composition chimique de l'endolymphe. Dès lors, afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé une analyse spatiale de la composition chimique de l'endolymphe avec des prélèvements localisés de chaque côté de l'otolithe (distal et proximal) chez des truites (*Oncorhynchus mykiss*) et des turbots (*Psetta maxima*). Cette étude a permis de montrer l'existence de gradients de concentrations, chez les deux espèces, gradient proximo-distal croissant pour K^+ et CO_2 total, et gradient proximo-distal décroissant pour les protéines, Mg^{2+} et PO_4^{3-} , ainsi que pour Na^+ chez la truite, tandis que les concentrations de Ca total et de Cl^- ne sont pas significativement différentes. L'existence de ces gradients endolympatiques est illustrée schématiquement par la figure 7. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans l'*American Journal of Physiology* (Payan et al., 1999).

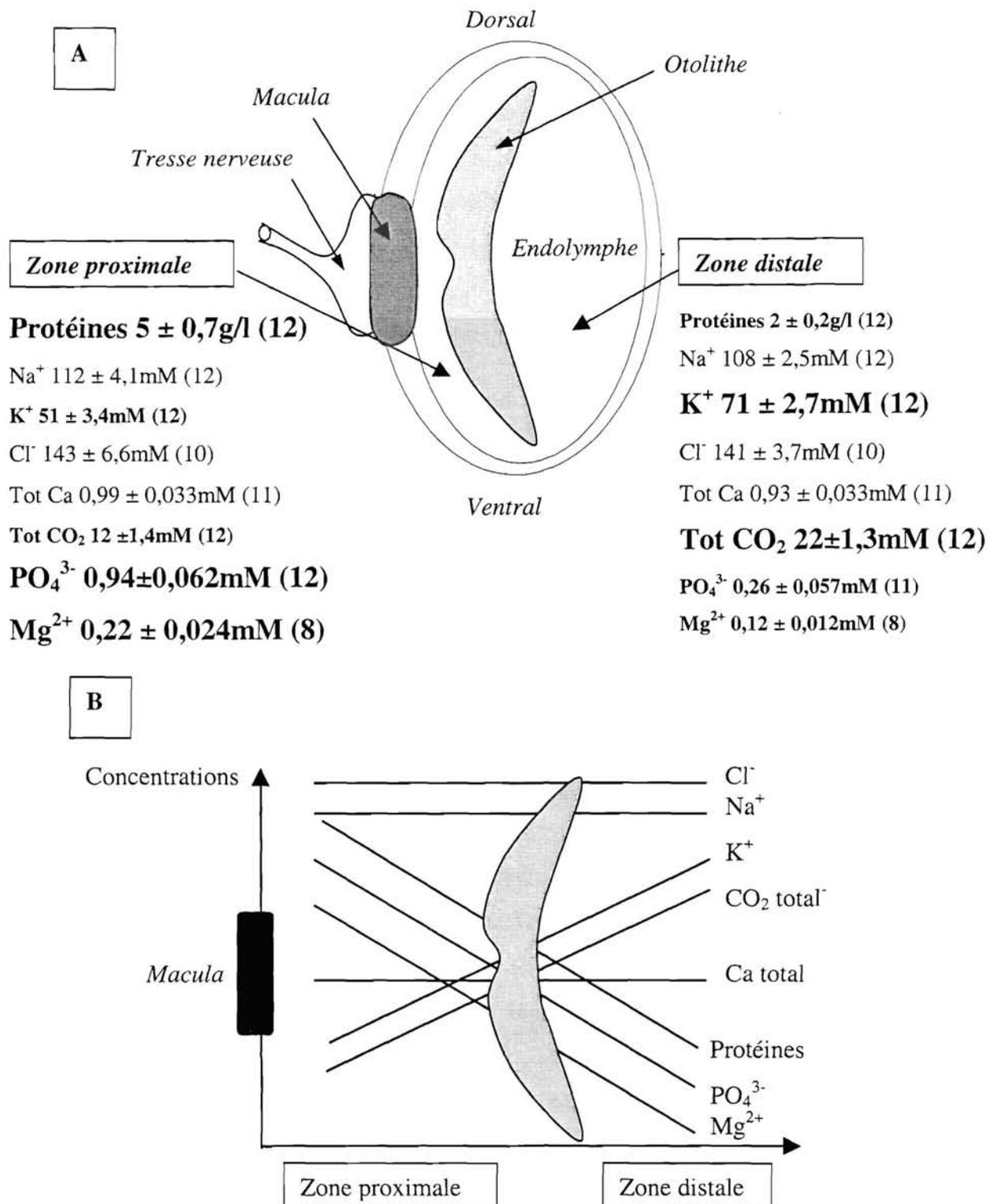


Figure 7 : Composition chimique de l'endolymphe dans les zones distales et proximales chez le turbot. Présence d'une hétérogénéité des concentrations de Protéines, K^+ , CO_2 total, PO_4^{3-} et Mg^{2+} représentée par des tailles de police différentes. A : Vue transversale d'un saccule gauche. B : Représentation schématique.

Dans le même cadre, des prélèvements d'endolymphe (4 à 5 μ l) en six points autour de l'otolithe nous ont permis d'affiner ces résultats. Cette expérience, qui nécessite une certaine précision et surtout une quantité suffisante d'endolymphe, n'a pu être réalisée que sur des gros turbots (2 kg). Les analyses de CO₂ total ont permis de montrer l'existence d'un gradient continu caractérisé par des valeurs minimales dans la zone proximo-antérieure de l'otolithe et des valeurs maximales dans la zone disto-postérieure. Ainsi, plus qu'un simple gradient proximo-distal, ce gradient des concentrations semble croître du bord proximo-antérieur au bord disto-postérieur. Corrélativement, nous avons tenté de localiser plus finement la zone de la macula et les ionocytes organisés en plages circulaires *in situ* (en laissant le saccule dans sa cavité et sans déplacer l'otolithe) à l'aide d'un marquage par du ZIO (Zinc Iode Osmium). Cette expérience n'a pas permis de conclure en raison de la non - diffusion du ZIO dans l'endolymphe lorsque l'otosac est dans sa cavité labyrinthique.

Cela nous a conduit à miniaturiser les dosages de protéines afin de les analyser simultanément à d'autres paramètres tels que le CO₂ total et le Ca total, à partir d'un même prélèvement. En effet, outre la localisation du prélèvement (distal ou proximal), sa précision réside dans l'inclinaison du capillaire de prélèvement, la profondeur de l'extrémité du capillaire au début de l'aspiration de l'endolymphe et le volume prélevé. Un prélèvement de 5 μ l correspond à environ 20% du volume total d'endolymphe disponible dans un saccule de poisson de 200 à 300 g. Il représente donc obligatoirement un mélange plus ou moins important des zones avoisinantes. Ainsi, pour caractériser le lieu de prélèvement de l'échantillon, le critère le plus fiable nous a paru être la concentration des protéines : les concentrations élevées correspondant à un prélèvement proximal i.e. proche de la zone de sécrétion des protéines et vice versa. Cela nous a permis de mettre en évidence la présence d'un gradient proximo-distal décroissant de Ca total de faible importance (environ 5%) mais significatif comme le montre la figure 8.

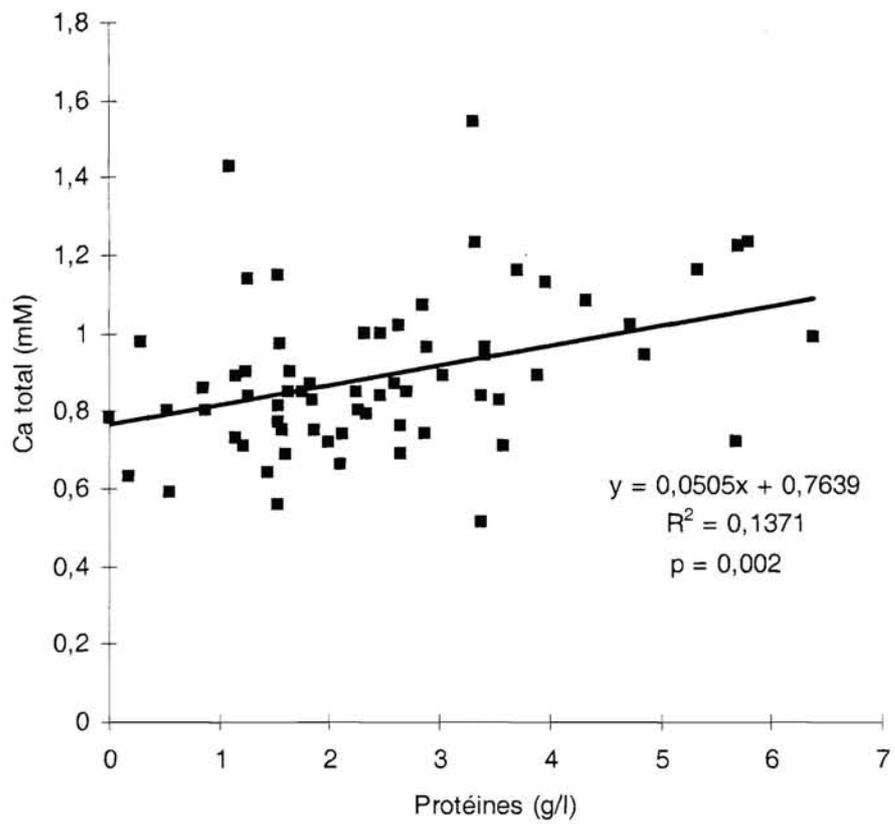


Figure 8 : Régression linéaire entre les concentrations de Ca total et de protéines dans l'endolymphe d'un saccule gauche de turbot. Significativité $p < 0,05$.

A ce stade, il peut être conclu que nos résultats modifient totalement la vision classique de l'endolymphe qui était considérée comme un liquide homogène, alcalin et riche en K^+ . En fait, il s'agit d'un compartiment complexe caractérisé par des gradients de concentrations protéiques et ioniques et dont la signification soulève de nombreuses questions qui seront posées dans les paragraphes suivants.

2. Origine de l'hétérogénéité de composition de l'endolymphe : ultrastructure du saccule :

Chez les poissons, les études menées sur la morphologie de l'oreille interne traitent pour la plupart des structures sensorielles (Popper, 1977 et 1979) ou de la membrane otolithique (Dunkelberger et al., 1980 ; Saitoh et Yamada, 1989). A notre connaissance, seules quatre études chez la truite sont consacrées à la présence et/ou la caractérisation des ionocytes dans le labyrinthe : Saitoh (1990) et Takagi (1997), décrivent les ionocytes autour de la macula dans l'épithélium sacculaire, Becerra et Anadon (1993) n'en observent que sur les parois de l'utricule, de la *crus commune* et dans les ampoules des canaux semi-circulaires et Mayer-Gostan et al (1997) sont les seuls à mentionner deux types de ionocytes localisés en opposition dans l'épithélium sacculaire (voir ci-dessus). Il faut noter que ces dernières observations de Mayer-Gostan et al. (1997) sont également valables chez le turbot, qui est un poisson téléostéen très évolué par rapport à la truite, ce qui donne à ce paramètre structural un caractère général pour les téléostéens.

Dans l'oreille interne des vertébrés supérieurs, il est bien établi que la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ joue un rôle primordial dans la genèse du potentiel endolymphatique et le maintien de la composition chimique de l'endolymphe, principalement la forte concentration en K^+ . Cette enzyme a été localisée dans les structures considérées comme sécrétrices (la strie vasculaire de la cochlée et les cellules sombres du vestibule) qui possèdent une répartition différente dans les cavités de l'oreille interne, ce qui a permis d'expliquer les faibles gradients de potentiels et de K^+ (de l'ordre de 10%) décrit dans l'endolymphe des mammifères (Sterkers et al., 1990).

En nous basant sur l'existence d'une analogie morpho-fonctionnelle entre les vertébrés supérieurs et les poissons, nous avons fait l'hypothèse d'une distribution non uniforme des ionocytes (zones de sécrétions ioniques) dans l'épithélium labyrinthique, associée à la présence des gradients ioniques dans l'endolymphe. Cela nous a conduit à développer une étude ultrastructurale de l'épithélium sacculaire chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) et le turbot (*Psetta maxima*). Ces travaux ont été consignés dans une publication éditée dans Cellular Tissue Research (Pisam et al., 1998). L'épithélium sacculaire a été divisé en quatre zones, choisies en

accord avec la répartition des ionocytes décrite par Mayer-Gostan et al. (1997) : la macula, la zone contenant les ionocytes volumineux organisés en réseau maillé ("*Meshwork area*"), celle contenant les petits ionocytes regroupés en plages circulaires ("*Patches area*") et la zone intermédiaire ("*Intermediate area*"). La figure 9 illustre les différents types de cellules observés dans l'épithélium sacculaire. Globalement, les deux espèces de téléostéens étudiées présentent la même cartographie cellulaire. Dans la zone de la macula, 3 types de cellules ont été décrits : deux déjà connus (les cellules ciliées et les cellules de soutien) et un nouveau type, les cellules granuleuses.

En tenant compte de différents travaux réalisés chez les vertébrés et de ceux présentés dans notre travail, nous avons essayé d'assigner, de façon spéculative parfois, une fonction à chaque type de cellules présent dans l'épithélium sacculaire des téléostéens, en relation avec la composition de l'endolymphe. Ces propositions sont illustrées dans la figure 10.

(1) Les cellules ciliées sont impliquées dans les mécanismes de mécano-transduction par l'intermédiaire de stéréocils (Popper, 1979 ; Popper et al., 1993).

(2) Les cellules de soutien, associées aux cellules ciliées, ont une fonction de support et probablement de sécrétion (Dohlman, 1971).

(3) Les cellules granuleuses, situées à la périphérie de la macula, possèdent un appareil de Golgi fortement développé et une accumulation de granules au niveau apical ce qui leur confère un phénotype sécréteur. Le rôle sécréteur de matière organique de la zone de la macula a déjà été proposé par Gauldie et Nelson (1988) et par Davis et al. (1995). Ces derniers ont caractérisé une protéine structurale de type collagénique, spécifique de la zone maculaire et localisé celle-ci dans les cellules situées dans le périmètre extérieur de la surface sensorielle i.e. à l'endroit où nous avons observé les cellules granuleuses. L'ensemble de ces observations concorde avec nos résultats qui montrent dans l'endolymphe la présence d'un gradient protéique proximo-distal décroissant, ce qui désigne la zone de la macula comme lieu de sécrétion majeur des protéines. La sécrétion localisée des protéines qui se répartissent ensuite dans tout le saccule est probablement à l'origine de ce gradient protéique proximo-distal décroissant. Notons que cette interprétation implique également un renouvellement des protéines endolymphatiques, probablement après protéolyse comme dans d'autres systèmes biominéralisateurs.

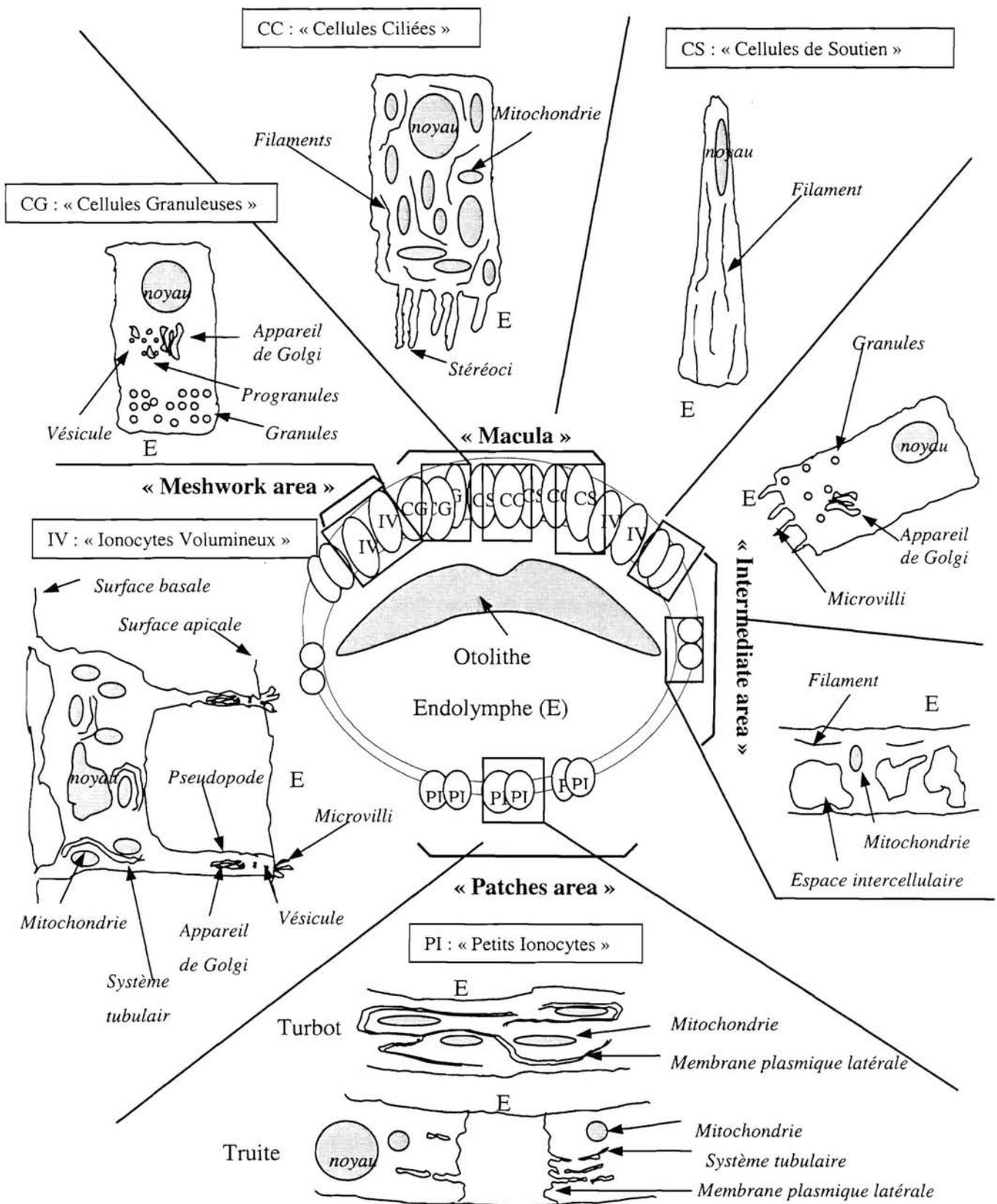


Figure 9 : Distribution des divers types de cellules de l'épithélium sacculaire chez la truite et le turbot.

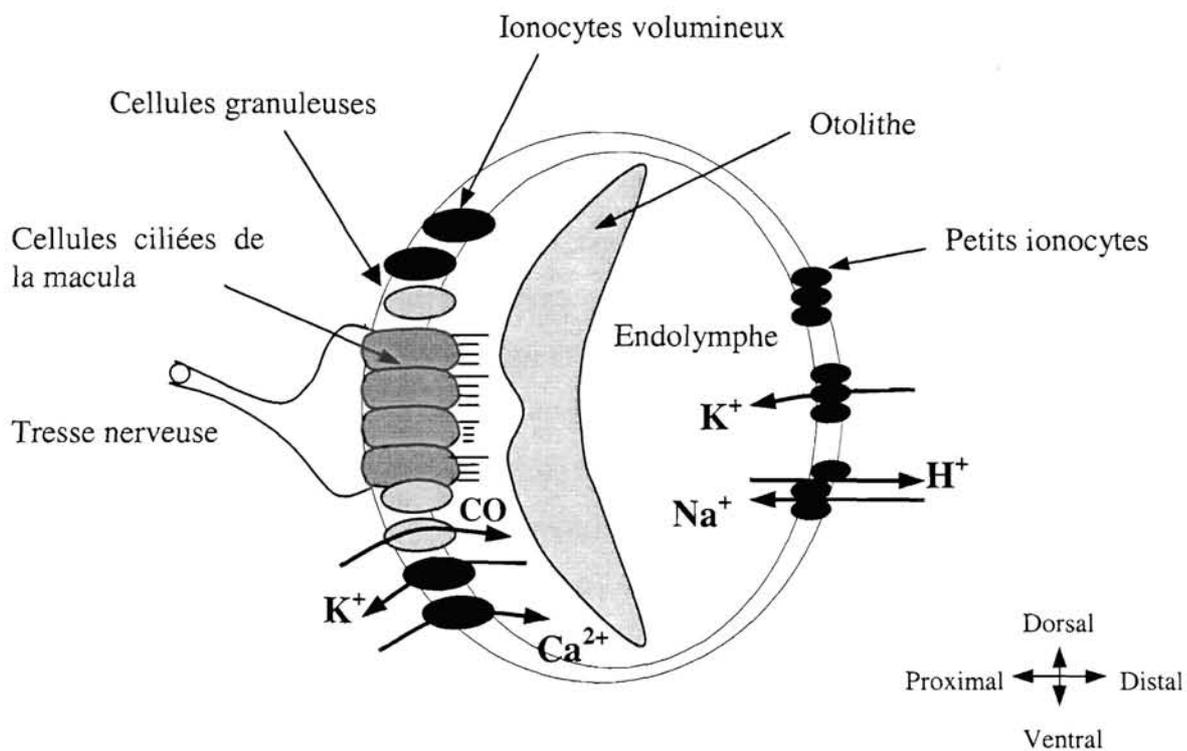


Figure 10 : Fonctions hypothétiques des types de cellules de l'épithélium sacculaire, mis en évidence chez la truite et le turbot, dans la régulation de la composition chimique de l'endolymphe. Vue transversale d'un saccule gauche. CO : composés organiques.

(4) Les ionocytes volumineux autour de la macula sont très riches en mitochondries, possèdent un appareil de Golgi développé, de nombreuses vésicules et contiennent de fortes activités Na^+/K^+ ATPasiques. Ainsi, ils ont toutes les caractéristiques des cellules impliquées dans le transport actif d'ions. Les concentrations de K^+ dans l'endolymphe étant plus faibles dans la zone proximale (zone maculaire) que dans la zone distale, nous proposons que les ionocytes péri-maculaires participent au gradient potassique en expulsant les K^+ de l'endolymphe vers le plasma. Les mécanismes de ce processus sont totalement inconnus. D'une manière similaire, nous suggérons que l'existence du gradient proximo-distal décroissant de Ca total endolymphatique implique un rôle de sécrétion de Ca à ces gros ionocytes péri-maculaires. Ces hypothèses sont corroborées par l'utilisation de traceurs radioactifs (respectivement le $^{86}\text{Rb}^+$ analogue au K^+ et le $^{45}\text{Ca}^{2+}$) lors d'expériences de rétro-perfusion de l'oreille interne de truite avec prélèvements localisés d'endolymphe (P. Payan, communication personnelle).

(5) Dans la zone intermédiaire, près des ionocytes péri-maculaires, nous avons observé des cellules possédant des *microvilli* et des granules du côté apical. Ce sont probablement des cellules sécrétrices dont la nature de la sécrétion est encore inconnue.

(6) La zone opposée à la macula est caractérisée par la présence de petits ionocytes organisés en plages circulaires. Ces cellules possèdent des repliements des membranes latérales et une disposition des mitochondries qui rappellent les caractéristiques de cellules des glandes anales des insectes connues pour créer un gradient de KCl (Berridge, 1970), ainsi que celles des glandes nasales de lézards connues pour sécréter plus de K^+ que de Na^+ (Shoemaker et al., 1972). Par analogie aux données publiées et en considérant que le pool de K^+ endolymphatique est probablement en équilibre (globalement égalité des entrées et des sorties, la quantité déposée sur l'otolithe étant relativement faible), nous proposons que les petits ionocytes situés face à la macula sont le site d'une sécrétion de K^+ dans l'endolymphe (ce qui se traduit par une concentration plus élevée de cet ion dans la zone distale) qui compense la sortie par les ionocytes péri-maculaires. Dans ce cas également, le support membranaire des flux de K^+ est inconnu.

Le cas du Ca^{2+} est plus complexe car cet ion est utilisé pour le dépôt de CaCO_3 sur l'otolithe. Ainsi cet élément n'est pas en équilibre et il n'est pas possible pour l'instant d'assigner aux petits ionocytes de la face distale un rôle d'excrétion du Ca^{2+} de l'endolymphe vers le plasma.

Le proton H^+ dans l'endolymphe est également en déséquilibre puisque l'otosac *in vitro* est capable d'une excrétion nette d'acidité titrable dépendant du métabolisme énergétique de l'épithélium sacculaire (Payan et al. 1997), processus qui maintient l'endolymphe à un pH plus alcalin que le milieu externe. Ces auteurs ont mis en évidence l'existence d'un échangeur Na^+/H^+ responsable de l'excrétion d'acidité par l'épithélium sacculaire. Or nos travaux ont permis de montrer la présence dans l'endolymphe d'un gradient croissant proximo-distal de CO_2 total (donc probablement d'un gradient croissant proximo-distal de pH qui sera explicité dans le paragraphe suivant). Ainsi, il est fort probable que les petits ionocytes distaux soient le site de l'échangeur Na^+/H^+ qui a pour effet, en expulsant les H^+ de l'endolymphe distale, de la maintenir à un pH alcalin.

Cette étude morpho-fonctionnelle a permis de proposer une vue dynamique du compartiment endolymphatique qui semble être l'objet de nombreuses régulations ayant pour origine les différents types cellulaires répertoriés au niveau de l'épithélium sacculaire.

3. Importance et rôle des gradients endolymphatiques dans le processus de calcification de l'otolithe :

Dans tous les systèmes calcificateurs, l'apparition d'un biominéral fait intervenir la formation d'une matrice organique qui initie (centres de nucléation) le début de la cristallisation ionique et dont la structuration spatiale impose la taille et l'organisation de la partie minérale. La matrice organique des biominéraux est une partie assez complexe en raison des concentrations et de la nature de nombreuses macromolécules solubles et insolubles, collagènes, glycoaminoglycans, enzymes..., tandis que la précipitation de la phase minérale est relativement simple dans son fonctionnement de base.

Brièvement, la formation d'un biominéral implique successivement :

(1) le transport transépithélial des substrats ioniques (Ca^{2+} , PO_4^{3-} et HCO_3^-),

(2) la synthèse, la sécrétion et la maturation de la matrice organique,

(3) la formation du cristal sur cette matrice selon les réactions (simplifiées) :

$\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}^+$ (chez de nombreux invertébrés : coquilles de bivalves, cuticules d'arthropodes, squelettes de corail, mais également chez les vertébrés : otoconies, otolithes...) et
 $3\text{Ca}^{2+} + 2\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 6\text{H}^+$ (os et dents des vertébrés),

(4) le retrait du lieu de réaction par l'épithélium calcificateur des protons (H^+) produits afin de pérenniser le processus.

Par rapport aux autres systèmes calcificateurs, le complexe otolithe - saccule présente trois particularités : la première réside dans la croissance différentielle de l'otolithe. En effet, la croissance s'effectue selon des axes privilégiés, la plus forte croissance étant selon l'axe postéro-antérieur et la plus faible selon la direction proximo-distale (Pannella, 1980). Il en résulte ainsi une caractéristique quasi générale des otolithes : la face proximale convexe et la face distale concave, la croissance de l'otolithe étant plus forte du côté proximal que du côté distal (figure 11). La seconde particularité, mentionnée dans l'introduction, a trait au processus acellulaire de calcification de l'otolithe, caractéristique commune avec la coquille de l'œuf des espèces aviaires (Nys et al., 1999). Nos résultats ont permis de mettre en évidence une nouvelle particularité :

l'existence de gradients de concentrations pour la plupart des composés de l'endolymphe (seul le Cl^- parmi les éléments étudiés chez la truite et le Cl^- et le Na^+ chez le turbot présentent une homogénéité). Ainsi, il est naturel de poser la question : quel est le rôle et l'importance des gradients protéiques et ioniques de l'endolymphe dans le processus de calcification de l'otolithe ; sont-ils responsables de sa structure asymétrique?

L'analyse parallèle des gradients de concentrations endolympatiques et de la croissance différentielle de l'otolithe permet de faire apparaître deux points importants (figure 12).

Le premier correspond au gradient de protéines qui reflète l'un des axes de croissance de l'otolithe. Bien que l'on ne mesure que les concentrations totales de protéines solubles dans l'endolymphe, ce qui est probablement une vue très partielle de la situation vu la complexité de la matrice organique, la concordance entre gradient protéique et croissance de l'otolithe est en accord avec le rôle prépondérant attribué à la matrice organique pour la structuration globale du minéral.

Le deuxième point réside dans l'évolution inverse des gradients ioniques, impliqués dans la calcification, par rapport à la croissance otolithique, ce qui pose un problème d'interprétation. En effet, dans la zone distale de l'endolymphe qui correspond à la zone de faible croissance de l'otolithe, on observe :

(1) une concentration plus élevée de CO_2 total, ce qui se traduit par une plus forte concentration d'ions HCO_3^- , substrat de la calcification et un pH relativement plus alcalin à pCO_2 constant dans le saccule (hypothèse plausible au vu de la grande diffusibilité de ce gaz), ce qui est favorable au dépôt de CaCO_3 ,

(2) $[\text{Ca}^{2+}]$ plus élevée, ceci résulte du fait que les protéines sont de forts chélateurs de Ca^{2+} et malgré le faible gradient décroissant proximo-distal de Ca total (5%), le gradient protéique d'un facteur 2 observé entre ces deux zones doit induire un gradient proximo-distal croissant de Ca ionisé,

(3) $[\text{PO}_4^{3-}]$ plus faible, cet ion est considéré comme un inhibiteur de la calcification (Simkiss, 1964 ; Bernhardt et al., 1985), sa concentration devrait ainsi favoriser la calcification sur la face distale.

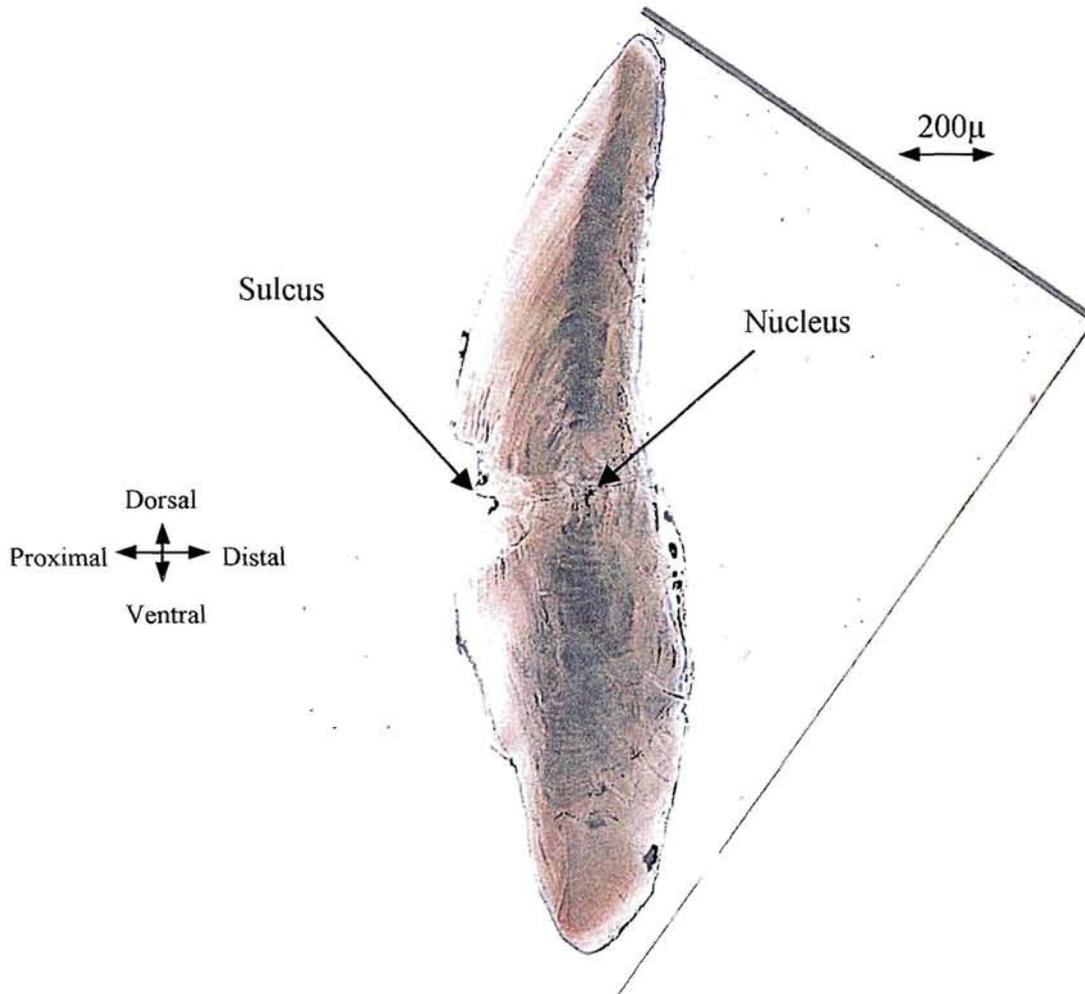


Figure 11 : Coupe transversale d'un otolithe gauche de truite. Visualisation de la face proximale convexe, de la face distale concave, du centre de l'otolithe (*nucleus*) qui permet d'observer une croissance plus forte du côté proximal que du distal.

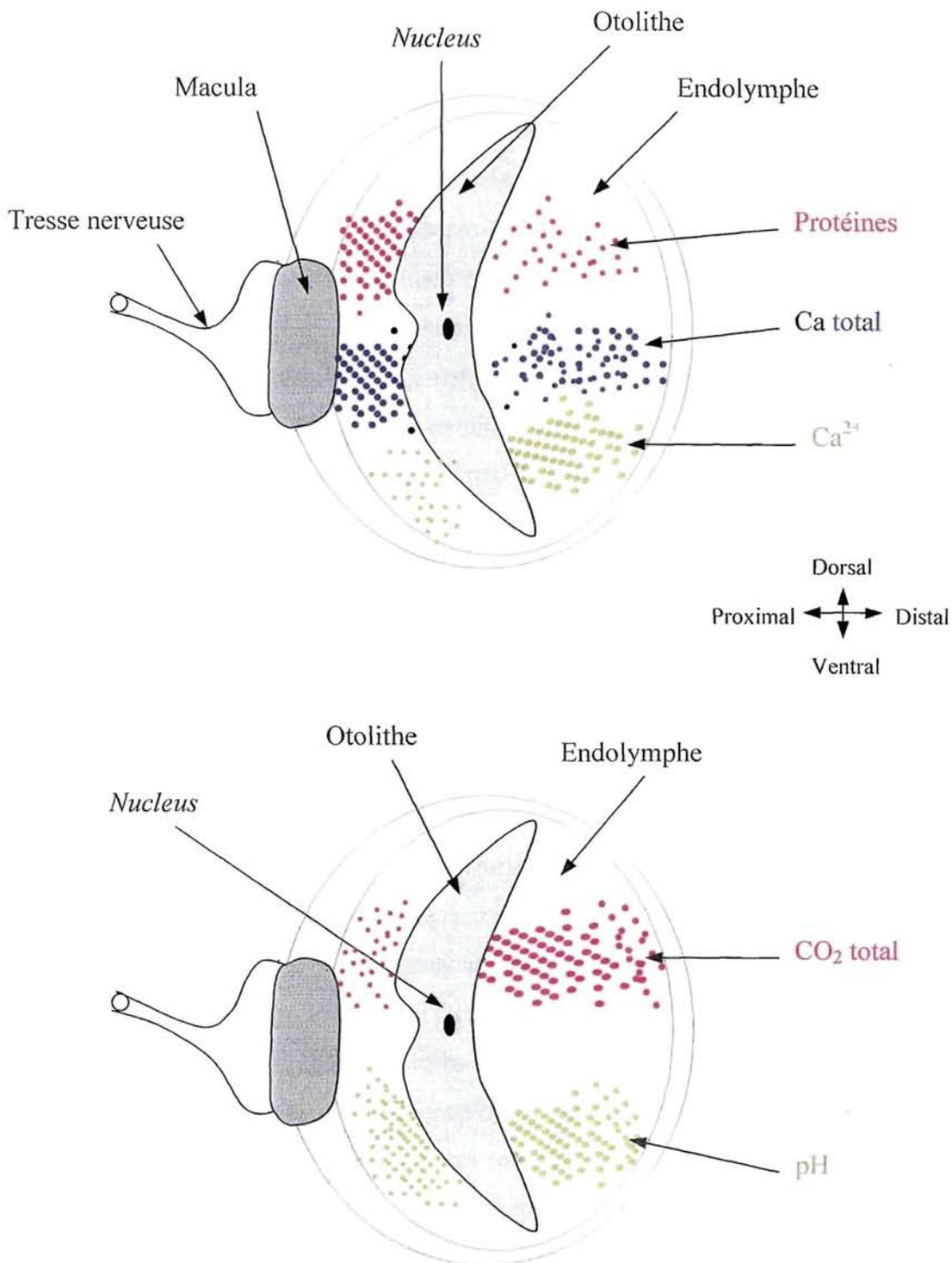


Figure 12 : Schématisation des gradients intra-endolymphatiques protéiques et ioniques en parallèle à la morphologie de l'otolithe. Le gradient protéique est le reflet de la croissance de l'otolithe (plus importante du côté proximal), tandis que les gradients ioniques sont contraires.

Nous proposons donc que les gradients croissants proximo-distaux de HCO_3^- , Ca^{2+} et pH et décroissant de PO_4^{3-} interviennent dans la dynamique du dépôt spatial de CaCO_3 tout autour de l'otolithe, pour pallier l'absence de cellules généralement très proches du site de minéralisation et impliquées dans le retrait des protons produits localement lors de la formation de CaCO_3 . En effet, les H^+ , résultant de la formation de CaCO_3 (cf. réaction ci-dessus), doivent être retirés du microenvironnement pour permettre à la précipitation de continuer. Ainsi, nous suggérons que les ions H^+ sont localement tamponnés, le long de l'axe proximo-distal, par les ions HCO_3^- pour former du CO_2 gaz, selon l'équation : $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Ces résultats et hypothèses sont rassemblés dans la figure 13. En bref, les gradients ioniques peuvent être assimilés à des vecteurs de force permettant de développer spatialement le dépôt calcaïque autour de l'otolithe dans un processus acellulaire caractéristique de ce modèle.

Le cas de K^+ est particulier. Chez les vertébrés supérieurs, la transduction mécanique des mouvements des otoconies s'effectue grâce à l'ouverture de canaux K^+ situés au sommet des stéréocils des cellules ciliées (Sterkers et al., 1988). Lorsque les stéréocils se courbent sous l'effet d'un déplacement de l'otoconie, les canaux s'ouvrent, le K^+ entre dans la cellule ciliée du fait que sa concentration est très élevée dans l'endolymphe. La cellule, naturellement polarisée négativement à l'intérieur, se dépolarise (car envahie par les charges positives du K^+), d'où naissance d'un potentiel d'action qui part, via la tresse nerveuse, vers le système nerveux central. Il s'agit d'un phénomène de transduction d'un signal mécanique en un signal nerveux. Pour les poissons, le processus est probablement le même mis à part la concentration beaucoup plus faible de K^+ dans l'endolymphe, notamment à proximité de la macula (zone proximale). Il est difficile d'évaluer le potentiel électrochimique du K^+ dans cette zone, ne connaissant son activité ni dans l'endolymphe ni dans les cellules ciliées. De plus, les canaux ioniques assurant la transduction mécanique sont relativement peu spécifiques (Hudspeth 1989). Ainsi, il est possible que chez les poissons, le Na^+ qui est présent en forte concentration dans l'endolymphe proximale assure cette fonction dans le mécanisme de transduction.

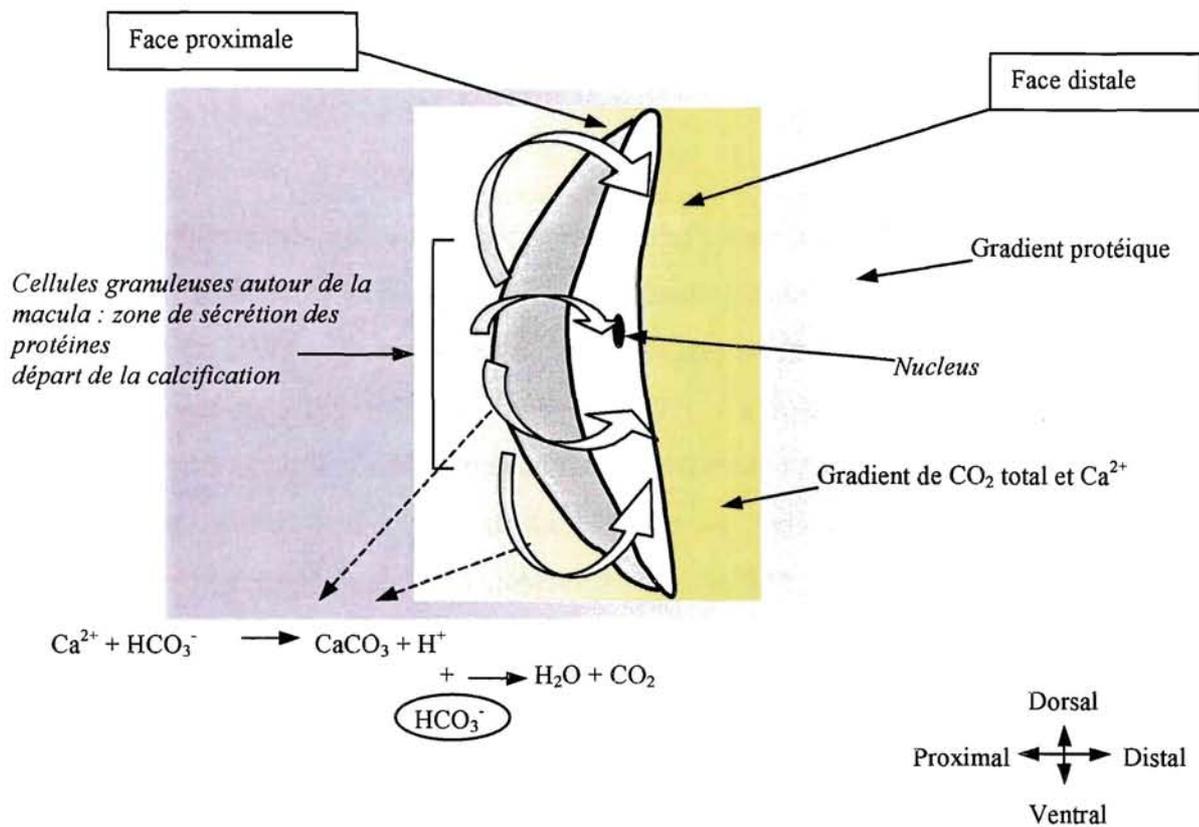


Figure 13 : Modèle hypothétique du processus de formation de l'otolithe : initiation de la calcification dans la zone proximale au niveau des cellules granuleuses situées à la périphérie de la macula par la sécrétion de protéines, dépôt de CaCO₃ sur l'otolithe engendrant un proton aussitôt tamponné par HCO₃⁻ (issu du gradient endolympatique croissant proximo-distal de CO₂ total) permettant ainsi la poursuite du dépôt tout autour de l'otolithe.

4. Variations circadiennes de la composition du plasma et de l'endolymphe sacculaire chez le turbot :

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'accroissement des otolithes s'effectue par dépôt journalier d'une structure bipartite composée d'une zone large et très minéralisée (zone L) et d'une zone étroite, riche en matière organique (zone D) (Pannella, 1971). De nombreuses recherches ont été menées pour étudier si le rythme de formation successive de ces deux zones, constituant l'accroissement journalier, était dépendant de la photopériode. Tanaka et al. (1981) ont démontré cette dépendance chez *Tilapia nilotica* (L.) en obtenant une inversion de l'ordre de formation des zones L et D lors de photopériodes inversées. De même, Mugiya et al. (1981) et Wright et al. (1992) ont montré que le cycle circadien de calcification de l'otolithe était lié à la photopériode. Cependant, d'autres études ont mis en évidence que la formation des accroissements selon un rythme journalier continue chez des poissons juvéniles élevés sous lumière constante (Campana, 1984) ou dans l'obscurité permanente (Radtke et Dean, 1982). Mugiya (1987) et Wright et al. (1992) ont suggéré que la rythmicité journalière de la calcification des otolithes dépendait des variations de la composition du plasma. Il est probable que ces modifications se répercutent partiellement ou complètement sur la composition de l'endolymphe. Les études menées sur la composition de l'endolymphe sont relativement rares et seuls Mugiya et Takahashi (1985) ont corrélié les variations du CO₂ endolympatique et plasmatique sur une période de 24h.

L'ensemble des résultats et conclusions présentés dans le présent travail concerne des prélèvements d'endolymphe réalisés systématiquement entre 10h et 16h. Deux questions se posent alors : des variations de composition de l'endolymphe sont-elles responsables de la formation des zones L et D de l'accroissement journalier otolithique et les gradients endolympatiques caractérisés pendant la période diurne évoluent-ils au cours du cycle nycthémeral ? Pour aborder ces questions, nous avons développé une étude des variations circadiennes des compositions chimiques du plasma et de l'endolymphe chez le turbot (*Psetta maxima*). Ces travaux font l'objet d'une publication dans Marine Ecology Progress Series (Edeyer et al., sous presse).

La figure 14 résume de façon synthétique l'évolution des paramètres impliqués dans la calcification dans les deux compartiments endolympatique et plasmatique au cours du cycle nyctéméral. Dans le compartiment endolympatique, la concentration des protéines et du CO₂ total évoluent de façon cyclique mais en anti-phase : un maximum de [Prot] durant la nuit correspond à un minimum de [CO₂tot] et vice versa. Ces variations des protéines et du CO₂ total sont visibles aussi bien sur les prélèvements proximaux que distaux avec maintien constant des gradients proximo-distaux. Dans le plasma, l'évolution des profils des protéines et du CO₂ total suit celle observée dans l'endolymphe. De plus, le Ca total plasmatique varie en anti-phase avec les protéines du plasma. A noter que les concentrations de Ca total dans l'endolymphe n'ont pu être déterminées en raison des trop faibles quantités d'endolymphe prélevée. Ces résultats apportent plusieurs enseignements concernant le processus intrinsèque de calcification, le phasage des dépôts des zones L et D durant le cycle nyctéméral et le rôle du compartiment plasmatique dans cette rythmicité.

Relations entre précurseurs ioniques et protéiques de l'endolymphe et calcification de l'otolithe : phasage des dépôts des zones L et D :

Il est possible d'estimer l'évolution circadienne du Ca²⁺ de l'endolymphe (bien que ce paramètre n'ait pas été directement mesuré) à partir de l'évolution plasmatique de ce facteur. Dans le plasma, [Ca tot] et [Protéines] évoluent en sens inverse avec, durant la nuit, un minimum protéique et une calcémie maximale. Les protéines étant des chélateurs du Ca²⁺, nous pouvons en déduire que la [Ca²⁺] plasmatique présente un maximum nocturne. Sachant que toute variation de [Ca²⁺] plasmatique se répercute très rapidement sur la [Ca²⁺] de l'endolymphe (le taux de renouvellement du pool de Ca²⁺ de l'endolymphe est de 100%.h⁻¹, Payan, communication personnelle), au maximum de [Ca²⁺] plasmatique nocturne doit correspondre un maximum de [Ca²⁺] dans l'endolymphe. En résumé, pendant la phase nocturne, l'environnement péri-otolithique présente une relative richesse en ions minéraux précurseurs de la calcification (HCO₃⁻ et Ca²⁺) et une [Protéine] relativement plus faible (voir figure 14).

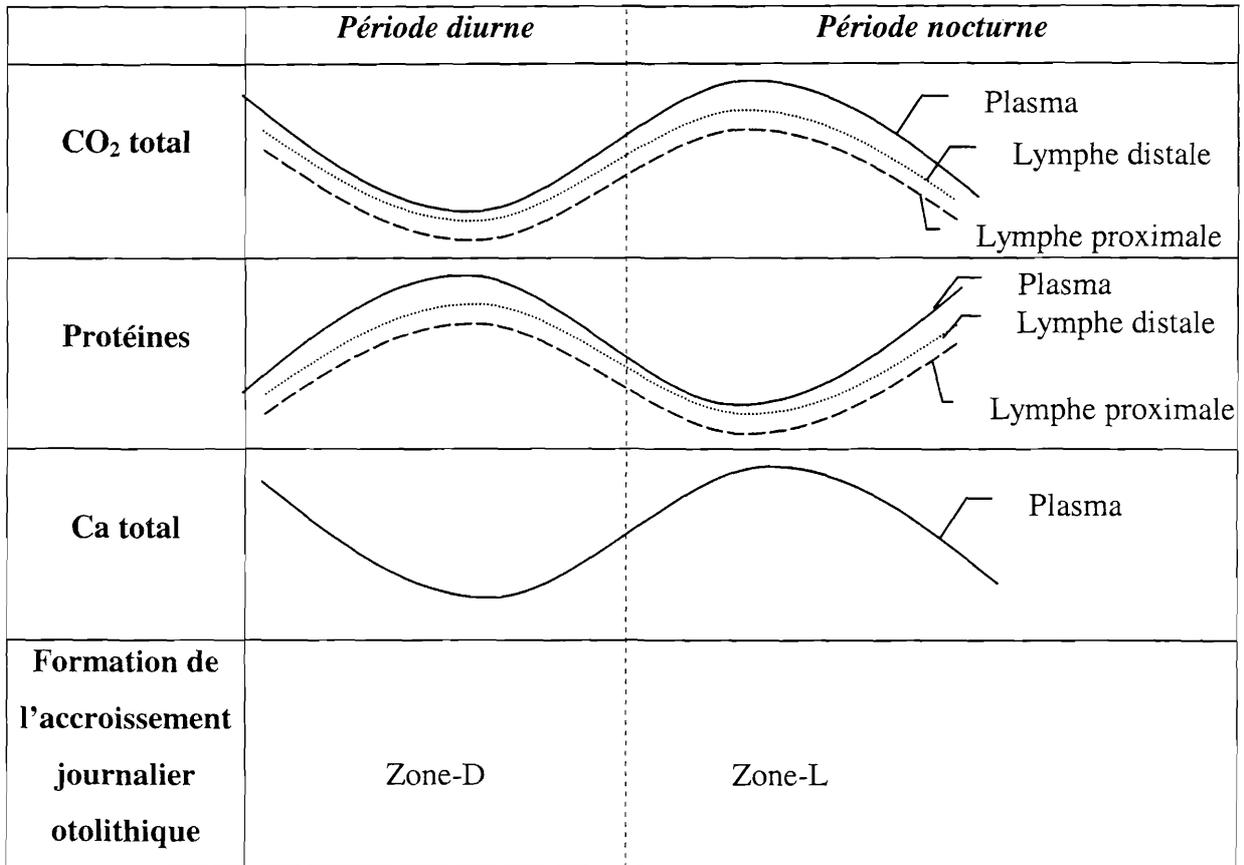


Figure 14 : Variations circadiennes des concentrations de CO₂ total et protéines dans le plasma et l'endolymphe (côté distal et proximal) et des teneurs en Ca total dans le plasma, chez le turbot, en automne. Relation avec la formation des deux zones constituant l'accroissement journalier otolithique.

Une question se pose alors : les variations de concentrations de ces paramètres sont-elles la conséquence des dépôts par disparition des substrats ou favorisent -t- elles au contraire les dépôts par augmentation de leur concentration? Un rapide calcul évaluatif à partir du poids d'un otolithe (8-10mg) d'une truite âgée d'un an et de la composition de son otolithe (99,9% de CaCO_3 et 0,1% de matrice organique) permet de préciser que le dépôt quotidien de l'accroissement journalier consomme moins de 1‰ du pool total des composés organiques présents dans l'endolymphe, 1 fois le pool de CO_2 total et 5 fois celui de Ca total. Concernant les composés organiques, en aucun cas le minimum nocturne observé dans l'endolymphe ne peut donc résulter du dépôt sur l'otolithe. Par contre, la question reste posée pour le Ca total et le CO_2 total. Plusieurs arguments militent en faveur de l'hypothèse d'un dépôt nocturne de CaCO_3 initié par l'augmentation de leurs concentrations. La vitesse de renouvellement aussi bien du CO_2 total (Payan et al. 1997) que du Ca total (P. Payan, communication personnelle) avoisine les $100\% \cdot \text{h}^{-1}$, et il est peu probable qu'une consommation de ces substrats lors de la formation de CaCO_3 diminue leur concentration. Parallèlement, de récents travaux ont montré que lors de période de jeûne, la réduction de calcification de l'otolithe (Molony et Choat, 1990) est associée à une diminution de $[\text{CO}_2 \text{ tot}]$ et une stabilité de [protéines] dans l'endolymphe (Payan et al., 1998). Ces arguments favorisent l'hypothèse que l'augmentation dans l'endolymphe des $[\text{Ca}^{2+}]$ et de $[\text{HCO}_3^-]$ est en phase avec le dépôt de CaCO_3 sur l'otolithe, hypothèse qui est en accord avec les travaux de Mugiya (1981, 1984) et de Wright et al., (1992) qui montrent une diminution parallèle entre le Ca^{2+} et Ca total dans le plasma et la calcification de l'otolithe. De plus, il est probable que pendant la phase nocturne, la baisse de [Protéine] associée à l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]$ dans la zone proximale du compartiment endolymphatique favorise le dépôt de CaCO_3 pendant cette période.

En conclusion, nous proposons que dans nos conditions expérimentales (chez le turbot et en automne), la phase de formation de la zone L de l'otolithe se déroule durant la période nocturne et la formation de la zone D durant la période diurne. Nos résultats semblent en contradiction avec d'autres travaux qui proposent que la partie minéralisée des otolithes se forme le jour (Mugiya, 1987 ; Tanaka et al., 1981 ; Zhang et Runham, 1992). Cependant, Mugiya (1984) a mis en évidence une inversion saisonnière du rythme de calcification des otolithes associée à une inversion du cycle du calcium plasmatique, ce qui pourrait expliquer nos différences.

Mécanismes intrinsèques de la calcification :

Le maintien des gradients protéiques et ioniques, malgré les variations de leurs niveaux respectifs, dans l'endolymphe durant tout le cycle de 24h corrobore nos hypothèses précédentes à savoir que les gradients ioniques sont nécessaires pour le processus de calcification de l'otolithe et que l'intensité du gradient protéique reflète la structure asymétrique de l'otolithe.

Origine des variations endolympatiques : relations plasma - endolymphe ?

Comme explicité précédemment, la $[Ca^{2+}]$ dans l'endolymphe, bien qu'elle soit la résultante de nombreuses variables, reflète probablement la $[Ca^{2+}]$ plasmatique. Qu'en est-il des deux autres variables protéines et CO_2 total ? Au cours de cette expérience qui a duré 24h, le pH plasmatique n'a pu être suivi. Cependant, l'évolution parallèle du CO_2 total dans les deux compartiments laisse supposer une origine plasmatique des variations dans l'endolymphe, par l'intermédiaire de la diffusion du CO_2 , ainsi que cela a déjà été proposé par Mugiya (1986). Il faut rappeler que le niveau de CO_2 plasmatique est le reflet de l'état d'activité de l'organisme.

En dépit d'une évolution comparable des protéines dans les deux compartiments plasmatique et endolympatique avec un minimum nocturne, il est peu probable que ces deux paramètres soient directement corrélés. Les protéines de l'endolymphe sont de nature différente de celles du plasma et synthétisées *de novo* par l'épithélium sacculaire. Il est probable que l'évolution des protéines plasmatiques reflètent en général le métabolisme global de l'organisme (alimentation, période d'activité...), alors que les protéines endolympatiques, dont les variations nyctémérales sont beaucoup plus intenses (diminution la nuit de 65% dans la zone proximale contre 24% pour les protéines plasmatiques) sont sous contrôle d'autres facteurs en relation avec l'horloge biologique interne (systèmes nerveux et endocriniens) qui restent à préciser.

En conclusion, à partir des résultats de l'expérience « cycle nyctéméral », deux niveaux de contrôle de la composition de l'endolymphe peuvent être envisagés : le premier, indirect, via la composition plasmatiche, elle-même assujettie aux perturbations environnementales et le second, se situant probablement à un niveau d'intégration plus élevé qui agirait par l'intermédiaire d'un facteur organique. Ce dernier reste la grande interrogation de notre étude. Il peut agir par l'intermédiaire de la variable concentration et également par la nature des protéines sécrétées dans l'endolymphe. En effet, Wright (1991 a) a observé la présence, dans la matrice soluble de l'otolithe, d'une fraction protéique inhibitrice de la calcification *in vitro*, principe actif que l'on retrouve également dans l'endolymphe (G. Borelli, communication personnelle). Il est clair que des variations circadiennes de la teneur de ce paramètre dans l'endolymphe pourraient participer, à côté des variations ioniques, à la rythmicité de formation des accroissements journaliers de l'otolithe.

5. Les répercussions de la présence d'une hétérogénéité de l'endolymphe sur la composition de l'otolithe :

Durant la dernière décennie, des recherches se sont développées sur l'analyse de la composition chimique des otolithes dans le but de caractériser des populations de poissons par des signatures environnementales spécifiques (Edmonds et al., 1994 ; Thresher et al., 1994 ; Campana et al., 1995 ; Severin et al., 1995 ; Bronte et al., 1996 ; Dove et al., 1996 ; Edmonds et Fletcher, 1997) ou d'extraire des informations sur l'histoire individuelle des poissons (Arai et al., 1995 ; Secor et al., 1995 ; Farrell et Campana, 1996 ; Thorrold et al., 1997 ; Arai et al., 1997 ; Dove et Kingsford, 1998). Une revue détaillée des méthodes et applications est proposée dans de Pontual et al. (1998) et de Pontual (1999a). Brièvement, deux types d'approches méthodologiques sont utilisés : l'analyse de surface, permettant l'obtention, sur des otolithes montés en lame mince, d'informations locales (correspondant à des informations temporelles) et l'analyse globale de l'otolithe après mise en solution. Les analyses de surface sont généralement menées avec quatre principaux appareils permettant la détermination de la composition élémentaire des otolithes : la microsonde électronique à dispersion de longueur d'onde (WD-EM), la microsonde électronique à dispersion d'énergie (ED-EM), l'émission X induite par proton (PIXE) et la spectrométrie de masse avec plasma induit par haute fréquence couplé à une ablation par laser (LA-ICPMS). Les analyses en solution requièrent l'utilisation de la spectroscopie d'absorption atomique (AAS), d'émission atomique (AES), de la spectrométrie de masse (MS) ou de l'ICPMS.

Le choix de la technique d'analyse dépend notamment de l'information recherchée (locale ou globale), et de la sensibilité requise (fonction de la concentration des éléments que l'on veut doser). Concernant les analyses de surface particulièrement adaptées à l'analyse des otolithes dans notre travail, une récente étude (Campana et al., 1997) a montré que pour l'analyse de Na et K, les microsondes (WDS, EDS) sont les plus adaptées (l'EDS étant la moins performante de ces deux techniques en terme de précision et de limites de détection), tandis que l'analyse des éléments traces nécessite l'utilisation de PIXE ou d'ICPMS à ablation laser. Pour un outil donné, le choix des conditions opératoires est lui-même déterminant et peut influencer sur la qualité des données (Gunn et al., 1992) et entraîner des différences lors de comparaison de résultats d'études similaires réalisées par des laboratoires différents, nécessitant ainsi des procédures

d'intercalibration lors de collaboration entre divers laboratoires (Campana et al., 1997). La préparation des échantillons doit par ailleurs répondre à des contraintes générales (nécessité d'éviter toute contamination des échantillons), ou propres à l'outil utilisé. A titre d'exemple, les préparations réalisées en vue d'analyse à la microsonde doivent présenter un parfait état de surface (planéité, absence de rayures qui impose un polissage de l'échantillon particulièrement soigné, ces contraintes étant moins importantes pour les analyses par ICPMS à ablation laser).

Enfin, bien que le nombre et la variété de ces études ne cessent de croître, certaines difficultés subsistent tant au niveau technique (i.e. absence de standards analytiques adaptés due au fait que ce type d'analyse sur des carbonates biogéniques est récent) qu'au niveau de l'interprétation des résultats (méconnaissance des mécanismes régissant la biominéralisation de l'otolithe).

Suite à nos travaux menés sur l'endolymphe et du fait de l'observation préalable de l'existence d'une forte variabilité dans la distribution spatiale de certains éléments dont K notamment (de Pontual, communication personnelle), deux questions ont émergé : l'hétérogénéité de composition de l'endolymphe se répercute-t-elle sur la composition de l'otolithe ? Si tel est le cas, quels sont les implications sur l'interprétation des résultats microchimiques de l'otolithe ? Nous avons ainsi développé une étude sur la composition en éléments mineurs (Na, K et Sr) de l'otolithe sur les faces distales et proximales, chez le turbot. Les résultats de ces analyses sont présentés et discutés dans l'article sur l'hétérogénéité de l'endolymphe (Payan et al., 1999).

Les résultats ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité de composition de Na et K dans l'otolithe. Les concentrations de K présentent des valeurs plus élevées sur la face distale que sur la proximale, ce qui est en accord avec le gradient potassique (proximo-distal croissant) observé dans l'endolymphe (figure 15). Les [Na] possèdent également des valeurs plus fortes dans la zone distale de l'otolithe bien qu'aucun gradient de Na n'ait été mis en évidence dans l'endolymphe. Par contre, les [Sr] sont homogènes sur l'otolithe. Cet élément n'ayant pas été mesuré dans l'endolymphe, sa distribution dans le fluide péri-otolithique est inconnue.

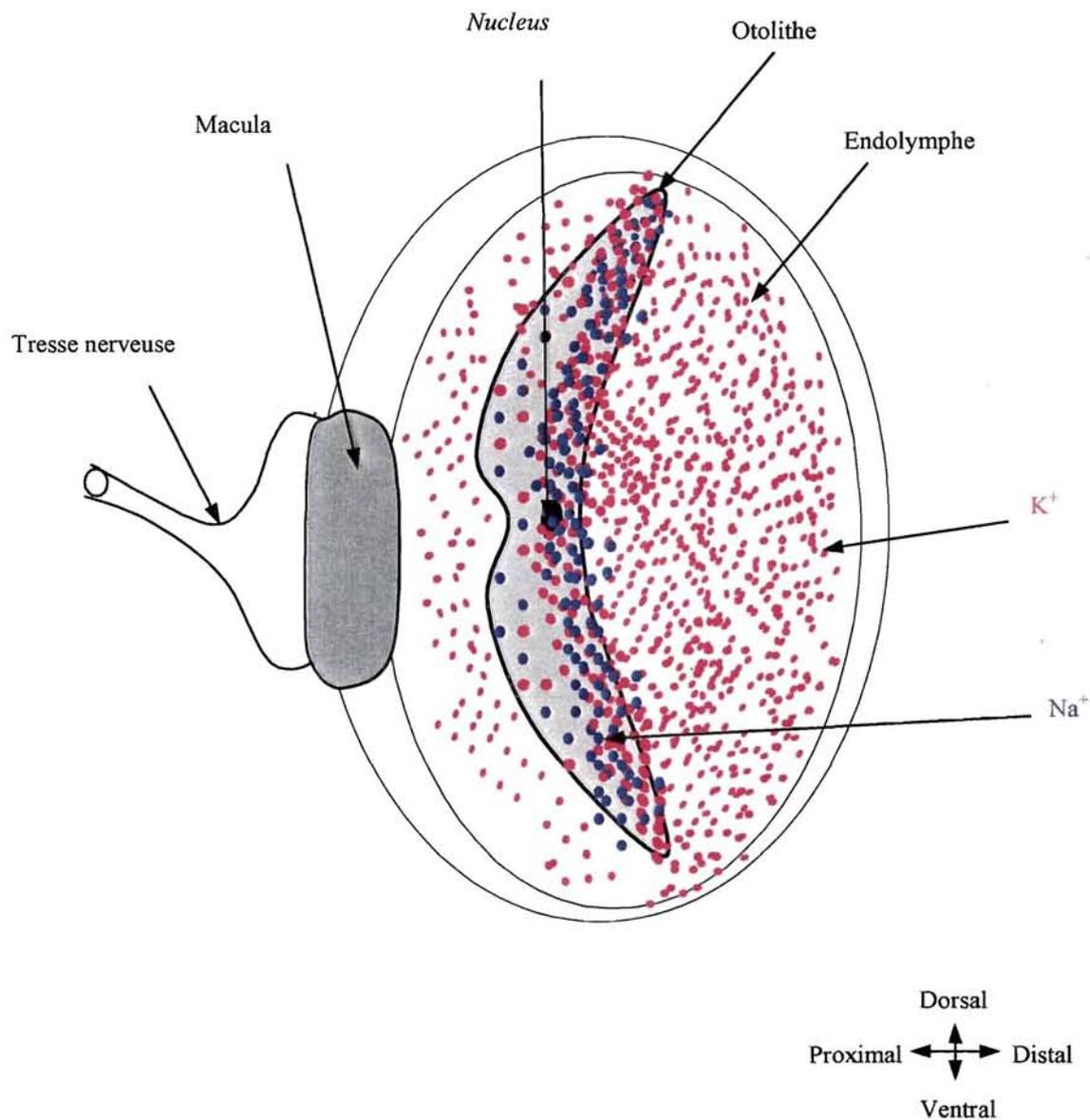


Figure 15 : Schématisation de la relation existant entre l'hétérogénéité potassique de l'endolymphe et celle de l'otolithe (concentration plus forte dans la zone distale pour les deux compartiments) chez le turbot. Représentation du gradient de sodium présent dans l'otolithe ; les teneurs en Na^+ dans l'endolymphe étant homogènes, elles ne sont pas représentées dans ce schéma.

Cependant, il est bien établi que Sr est un compétiteur du Ca en raison de son rayon ionique proche de celui de Ca et de sa valence similaire. L'analyse des rapports K/Ca et Na/Ca a permis de montrer que l'hétérogénéité spatiale observée pour K et Na était due à des variations des [K] et [Na] et non pas des [Ca]. Ainsi, le Ca étant homogène sur l'otolithe, il apparaît normal qu'il en soit de même pour Sr.

Cette expérience, tout à fait originale, souligne l'étroite relation existant entre les compartiments endolymphatique et otolithique. Des travaux supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour éclairer cette relation au niveau de Na qui, dans l'endolymphe, présente peut être un gradient de concentration mais qui reste pour l'instant masqué en raison d'une chélation par les protéines. En effet, actuellement les techniques utilisées analysent les concentrations totales des éléments (libres et liés aux protéines), or ce sont probablement les teneurs en ions libres qui se répercutent sur la composition chimique des otolithes.

Nos analyses d'otolithe ayant été menées à l'aide de la WDS, la distribution des éléments traces sur l'otolithe n'a pas pu être étudiée. Toutefois, une étude récente sur des otolithes de sole réalisée par ICPMS à ablation laser (de Pontual et al., 1999b), a montré une hétérogénéité spatiale des concentrations d'arsenic, caractérisée par des valeurs plus importantes dans la zone postéro-ventrale que antéro-dorsale, ainsi que des éléments tels Mg, Fe et Rb dont l'hétérogénéité apparaissait plus faible. Ces résultats suggèrent ainsi une distribution non uniforme des éléments traces dans l'endolymphe. Leur analyse nécessitant l'utilisation de l'ICPMS en solution, aucun travail publié n'a déterminé la composition de l'endolymphe en éléments traces chez les poissons. Nous avons donc réalisé des études préliminaires qui sont développées et discutées dans la deuxième partie.

Une conséquence directe de ces travaux consiste en la nécessité de standardiser les sites d'analyse sur les otolithes lors d'études menées par des techniques de surface, pour éviter d'introduire un niveau de variabilité interindividuelle résultant de la variabilité spatiale des prélèvements qui pourrait induire des erreurs d'interprétation des résultats d'analyse. Le fait que la composition de l'otolithe semble être le reflet de celle de l'endolymphe est un résultat très

intéressant pour des simulations expérimentales. Cette voie de recherche, objet de la deuxième partie, pourrait déboucher vers une meilleure connaissance des mécanismes régulateurs de la composition chimique de l'otolithe et aider, du moins partiellement, à surmonter certaines difficultés d'interprétation concernant les influences environnementales sur la composition des otolithes.

Chemical composition of saccular endolymph and otolith in fish inner ear: lack of spatial uniformity

PATRICK PAYAN, ANAICK EDEYER, HÉLÈNE DE PONTUAL, GIL BORELLI, GILLES BOEUF, AND NICOLE MAYER-GOSTAN

Laboratoire de Physiologie et Toxicologie Environnementales, EA 2138; Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6548; Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, 06108 Nice Cedex; and Laboratoire de Sclérochronologie des Animaux Aquatiques et Laboratoire de Physiologie des Poissons, IFREMER, DRH, 29280 Plouzané, France

Payan, Patrick, Anaick Edeyer, Hélène De Pontual, Gil Borelli, Gilles Boeuf, and Nicole Mayer-Gostan.

Chemical composition of saccular endolymph and otolith in fish inner ear: lack of spatial uniformity. *Am. J. Physiol.* 277 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 46): R123-R131, 1999.—Fish otoliths provide a record of age, growth, and environmental influences. In both trout and turbot, spatial chemical investigation of the endolymph surrounding the otolith (sagitta) showed a lack of uniformity. Proteins, PO_4^{3-} , and Mg^{2+} were significantly more concentrated in the proximal (facing the macula) than distal zone, whereas the opposite was observed for K^+ and total CO_2 (tot CO_2). Na^+ concentration ($[\text{Na}^+]$) was 20% higher in the proximal zone in trout but not in turbot. Total Ca and Cl^- contents were uniformly distributed in both species. We propose that the endolymphatic gradients of protein and tot CO_2 concentration within the endolymph are involved in the otolithic biocalcification process. Microchemical analyses of otolith sections by wavelength dispersive spectrometry showed a lack of spatial uniformity in the K/Ca and Na/Ca ratios, whereas the Sr/Ca ratio was uniform. There is a clear relationship between endolymph and otolith $[\text{K}^+]$, but the interpretation of the results for $[\text{Na}^+]$ needs further investigation. Thus the lack of uniformity in the otolith composition must be taken into account when investigating otolith microchemistry.

endolymph chemistry; otolith mineralization; otolith microchemistry

IT IS THE CONCERN of all countries with fishery industries that their fishing practices should be efficient within the limits imposed by the maintenance of an ecological equilibrium in the exploited waters. Estimation of age and growth of fish is essential for fisheries management. The standard method of obtaining such information for teleosts (which are the predominant marketed fish) is by reading and interpreting calcified structures and most often otoliths. Otoliths are calcareous structures located in the inner ear and bathed in endolymph. They are involved in mechanoreception (6). Fish have three pairs of otoliths, the largest one being called sagittae. Otoliths grow throughout the life of the fish, without resorption (4), in a series of concentric layers of alternating high and low optical density zones that are assumed to record temporal events of seasonal

(macroscopic) and daily (microscopic) periodicities (22) (Fig. 1A). In addition to age estimation, recent research has indicated that the chemical composition of otoliths could also provide information concerning fish movement and population dynamics (2, 14, 29, 33), because it is influenced by environmental parameters (temperature, salinity, pollution, etc.) and metabolic events in the life cycle (1, 15, 17, 27, 34, 35).

Considerable progress has been made in improving the accuracy of age estimation, but the mechanisms of otolith formation are still poorly understood. During ontogenesis, variously directed growth gradients result in an elliptical, laterally compressed, distally concave otolith. Unlike most calcifying systems (vertebrate bones, enamel, mollusc shells, corals, etc.; Ref. 31), mineralization takes place in an acellular medium, the endolymph, which contains all the precursors of otolith formation. By comparison with plasma, the composition of fish endolymph is characterized by high K^+ , relatively low Na^+ , a total Ca^{2+} (tot Ca^{2+}) content of ~1–2 mM, and a low protein concentration (2 g/l) (20, 23, 24). Unlike that of higher vertebrates, fish endolymph is more alkaline (pH 8) than plasma (pH 7.20–7.40), mainly due to a high total CO_2 (tot CO_2) concentration (20, 23, 24). The ionic composition probably depends on the activity of ion-transporting cells called ionocytes or mitochondrial rich cells (18, 25, 32). In both trout and turbot, the distribution of ionocytes in the saccular epithelium is in two zones (18): the first consists of a ring of large ionocytes around the macula and the second is of smaller cubital ionocytes unevenly grouped at the opposite side of the macula. We thus hypothesized that the location of these two types of cell in relation to the orientation of the sagitta could result in a nonuniform composition of the endolymph. The microtechnique recently developed in trout and turbot (24) permitted the various chemical concentrations to be determined on single 4- to 5- μl samples of endolymph. We therefore selected two sampling sites (Fig. 1B): one distal, facing the smaller ionocytes (sites 1 and 2), and the other proximal, near the ionocytes around the macula (sites 4 and 5). In the present study we improved the technique to enable endolymph samples to be taken at various sites around the otolith and found a lack of uniformity in its composition. Therefore, we carried out microchemical analyses of otolith sections by wavelength dispersive spectrometry (WD-EM) to study whether the lack of uniformity of the endolymph

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

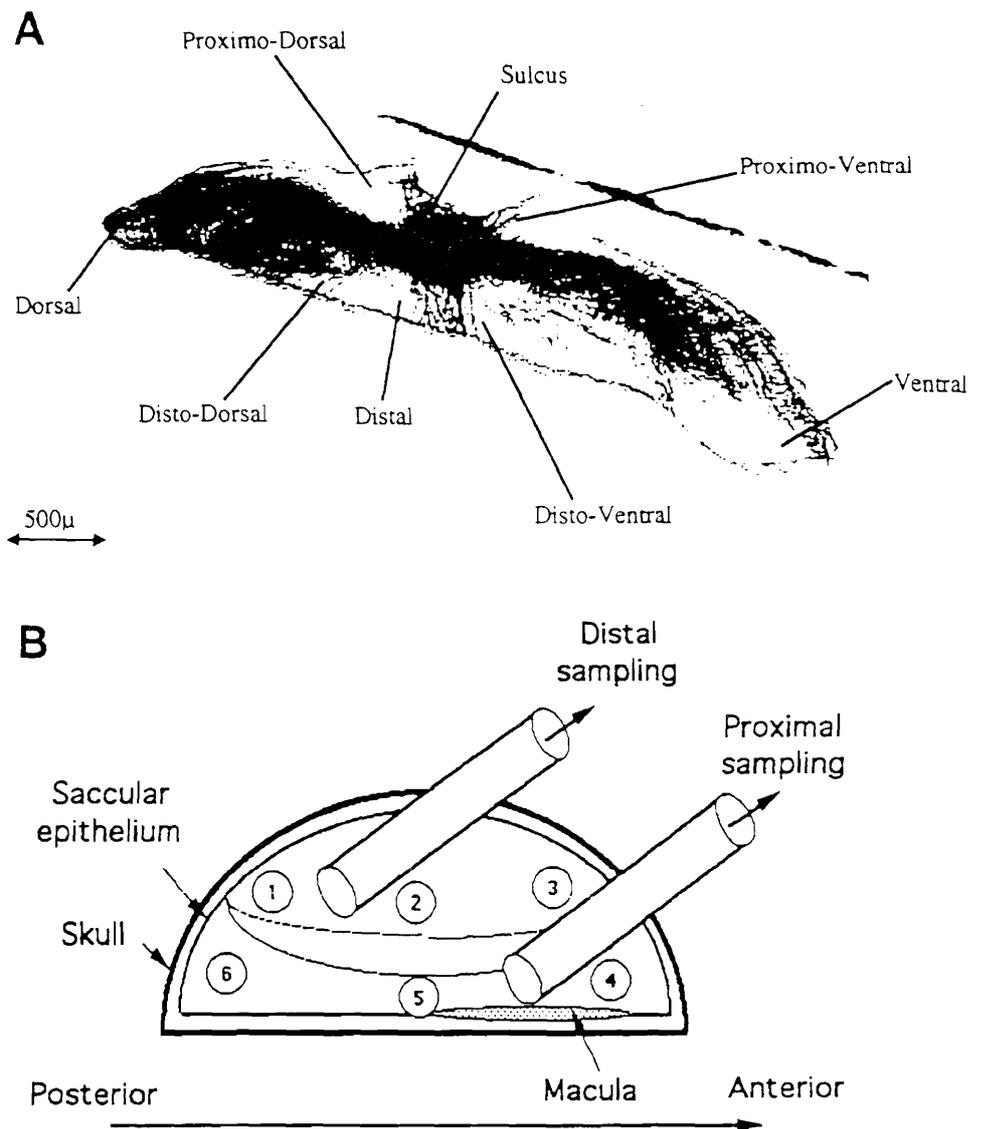


Fig. 1. A: photograph of transverse section of turbot otolith. Arrows, sites of analysis by wavelength dispersive spectrometry (WD-EM) (results in Fig. 5). B: dorsal view of left saccule, showing disposition for endolymph sampling (sites 1-6).

induced a similar nonuniformity in the composition of the otolith.

MATERIAL AND METHODS

Fish handling. Trout (*Oncorhynchus mykiss*) of ~200 or 600 g body wt (depending on the experiment) were supplied by a local fish farmer near Nice, maintained in running tap water at ~14°C in circular tanks, and used for experiments at least 3 wk after transfer from the fish farm. Turbot (*Psetta maxima*) of 150 g or 2 kg body wt were reared at IFREMER Brest and kept in a running seawater temperature-controlled circuit (14°C). Both groups were fed every morning.

Collection and analysis of blood and endolymph samples. After blood sampling by puncturing the caudal artery, the sample was centrifuged and the separated plasma was kept on ice until analysis. Then endolymph was sampled as already described by Payan et al. (24). Briefly, after the fish were decapitated, the operative field was washed and dried, the saccular wall was incised, and the endolymph was sampled under a stereomicroscope with a capillary tube connected to a micromanipulator and withdrawal pump. In fish (trout or turbot) weighing ~150–200 g, distal samples were withdrawn from sites 1 and 2 and proximal samples

from 4 and 5 (see Fig. 1B). In turbot of ~2 kg, six sampling sites (1-6) could be exploited per saccule.

The volume of sampled endolymph was calculated from the length of the fluid in the calibrated capillary as measured with a slide caliper. Protein, Na^+ , Cl^- , and K^+ concentrations were determined on individual samples diluted in 0.5 ml of distilled water. totCa , totCO_2 , PO_4^{3-} , and Mg^{2+} content measurements required the whole sample to be directly introduced into the measurement vial containing the reagent.

For both plasma and endolymph, Na^+ and K^+ were determined by flame photometry (Eppendorf); totCa , totCO_2 , Cl^- , PO_4^{3-} , and Mg^{2+} were measured by spectrophotometry using Sigma kits; and protein content was determined using Coomassie blue with BSA as a standard.

Preparation and analysis of section of otolith turbot for microchemistry assay. After extraction, the otolith was cleaned in millipore deionized water (MilliQ). Otoliths were then dried at 40°C. After drying, the entire otoliths (sagittae) were embedded in Araldite epoxy resin and polymerized at 25°C for 24 h. Transverse and frontal sections (200 μm thickness), containing the nucleus, were obtained from the otolith with a low-speed saw. Sections were then embedded on glass slides with epoxy resin. After polymerization, they were ground

down to the nucleus with successive grades of carborundum paper (800–1200 grade) and polished with successive diamond sprays (9, 3, 1, 0.25 μm) and the sections were cleaned in an ultrasonic bath in deionized water (MilliQ) (13). The usual precautions were taken to avoid chemical contamination of the otoliths and to obtain perfect surface conditions as required in microprobe analyses. These analyses were carried out on a Camebax SX 50 WD-EM microprobe fitted out with five spectrometers used to assay calcium (Ca), potassium (K), sodium (Na), strontium (Sr), and phosphorus (P). Operating conditions were as follows: spot size 5 μm , voltage 10 kV, beam current 15 nA, and peak counting time 40 s for Ca and P and 120 s for Na, K, and Sr.

Five transverse sections from five different otoliths (left sagittae sampled from 5 different turbot) were prepared, and eight sampling sites of analysis zones by WD-EM were defined on each section as indicated in Fig. 1A: proximodorsal, dorsal, distodorsal, distal, distoventral, ventral, proximoventral, and sulcus. Three analyses were carried out at each otolith site. The limits of detection (LD) were 158 parts/million (ppm) for K, 109 ppm for Na, 328 ppm for Sr, and 520 ppm for Ca. The LD of K/Ca, Na/Ca, and Sr/Ca ratios were estimated using the ratio between the K, Na, and Sr LD and the mean Ca concentration.

In the same way, 5 frontal sections from five different otoliths (left sagittae sampled from 5 different turbot) were prepared, and eight sampling sites of analysis zones by WD-EM were defined on each section: proximoposterior, posterior, distoposterior, distal, distoanterior, anterior, proximoposterior, and sulcus. LD were 153 ppm for K, 103 ppm for Na, 312 ppm for Sr, and 546 ppm for Ca. The LD of ratios were estimated as mentioned above.

Phosphorus was undetected in all the analyses and thus rejected from the subsequent data analysis. Data analysis was performed using the mean value of the three assays of each otolith site.

RESULTS

Ionic, totCO₂, and protein concentrations of plasma and saccular endolymph in trout and turbot are given in Table 1.

Lack of spatial uniformity of ion and protein in endolymph. In both trout and turbot, proteins, PO₄³⁻, and Mg²⁺ were significantly more concentrated in the proximal than in the distal zone, whereas the opposite was the case for K⁺ and totCO₂. [Na⁺] was 20% higher in the proximal zone than in distal in trout, but in the turbot there was no difference. Total Ca²⁺ and Cl⁻ contents were similar whatever the sampling zone in the two species. These results clearly demonstrate that the composition of the endolymph surrounding the otolith is not uniform.

Thanks to our microtechnique, Na⁺, K⁺, Cl⁻, and protein concentrations were measured in each sample and thus their interrelationships could be studied. In one series of experiments, different samples of endolymph were withdrawn at different sites inside the sacculus. Results are presented in Fig. 2, A (trout) and B (turbot), in which ionic concentrations are plotted as functions of protein concentrations. In both species, similar significant negative relationships exist between the concentrations of K⁺ and protein: a high protein content (proximal zone) corresponds to a low K⁺ content. In some high K⁺ samples, proteins were not even

Table 1. Ionic, totCO₂, and protein concentrations of plasma and saccular endolymph in trout and turbot

	Plasma	Endolymph	
		Proximal	Distal
		<i>Trout</i>	
Protein, g/l	32.1 ± 2.45 (12)	8.4 ± 1.60 (8)	3.6 ± 1.16 (8)*
Na, mM	168.9 ± 1.84 (12)	118.4 ± 9.27 (8)	94.4 ± 4.42 (8)*
Cl, mM	151.5 ± 2.56 (12)	153.4 ± 4.48 (8)	158.2 ± 5.69 (8)
K, mM	2.8 ± 0.17 (12)	19.7 ± 6.11 (8)	78.6 ± 9.73 (8)‡
totCa, mM	2.1 ± 0.06 (12)	1.3 ± 0.09 (12)	1.2 ± 0.08 (12)
PO ₄ , mM	3.7 ± 0.29 (10)	1.8 ± 0.21 (19)	0.47 ± 0.16 (17)*
Mg, mM	0.58 ± 0.081 (7)	0.50 ± 0.037 (14)	0.17 ± 0.035 (14)‡
totCO ₂ , mM	13.4 ± 0.53 (6)	10.7 ± 1.05 (13)	19.8 ± 1.37 (11)‡
		<i>Turbot</i>	
Protein, g/l	32.9 ± 0.99 (12)	4.6 ± 0.66 (12)	1.9 ± 0.19 (12)‡
Na, mM	158.3 ± 1.12 (12)	112.3 ± 4.09 (12)	107.8 ± 2.46 (12)
Cl, mM	132.2 ± 1.26 (12)	142.8 ± 6.58 (10)	141.3 ± 3.69 (10)
K, mM	3.5 ± 0.08 (12)	51.0 ± 3.38 (12)	71.2 ± 2.75 (12)‡
totCa, mM	2.7 ± 0.07 (6)	0.99 ± 0.033 (11)	0.93 ± 0.033 (11)
PO ₄ , mM	2.9 ± 0.10 (6)	0.94 ± 0.062 (12)	0.26 ± 0.057 (11)‡
Mg, mM	1.56 ± 0.046 (6)	0.22 ± 0.024 (8)	0.12 ± 0.012 (8)‡
totCO ₂ , mM	8.7 ± 0.28 (6)	12.1 ± 1.36 (12)	21.7 ± 1.34 (12)‡

Values are means ± SE, with no. of measurements in parentheses. Comparisons were analyzed using Staview Software (Brain Power). totCa and totCO₂, total Ca and total CO₂, respectively. Significance was accepted for $P < 0.05$. Comparison between proximal and distal samples: * $P < 0.05$; † $P < 0.01$; ‡ $P < 0.001$.

detectable by the Coomassie blue method used. There were certain differences between the trout and turbot values. In the trout, the negative K⁺-to-protein relationship was largely counterbalanced by a positive Na⁺-to-protein one and Cl⁻ showed no correlation. Thus the estimated osmolarity (sum of the 3 main monovalent ions) was constant. In the turbot, the protein range was about half that of trout, there was no relationship between Na⁺ and protein, but there was a negative relationship between Cl⁻ and protein. Consequently the sum of the three monovalent ions was negatively correlated to protein. The origin of these differences between trout and turbot needs further investigation.

Lack of spatial uniformity of totCO₂ in endolymph. Experiments were performed to check the spatial distribution of the totCO₂ content within the endolymph. In three trout, each weighing ~600 g, six endolymph samples (8–10 μl) were taken and each sample was divided into two aliquots for determination of totCO₂ and protein concentrations. Figure 3A shows that there is a significant negative relationship between totCO₂ and protein content: a high protein content (proximal zone) corresponds to a low totCO₂ content.

In 11 turbot, each weighing ~2 kg, six 4- to 5- μl samples were taken from each saccular compartment at the six different sites shown in Fig. 1B. Figure 3B shows that the lowest values of totCO₂ were from proximal sites near the macula (sites 4 and 5) and the highest at the opposite side (site 1). It took ~10 min to remove the six samples from each sacculus, during which time exchanges of CO₂ between endolymph and the atmosphere could have occurred. We thus evaluated the effect of the sampling time on the endolymph

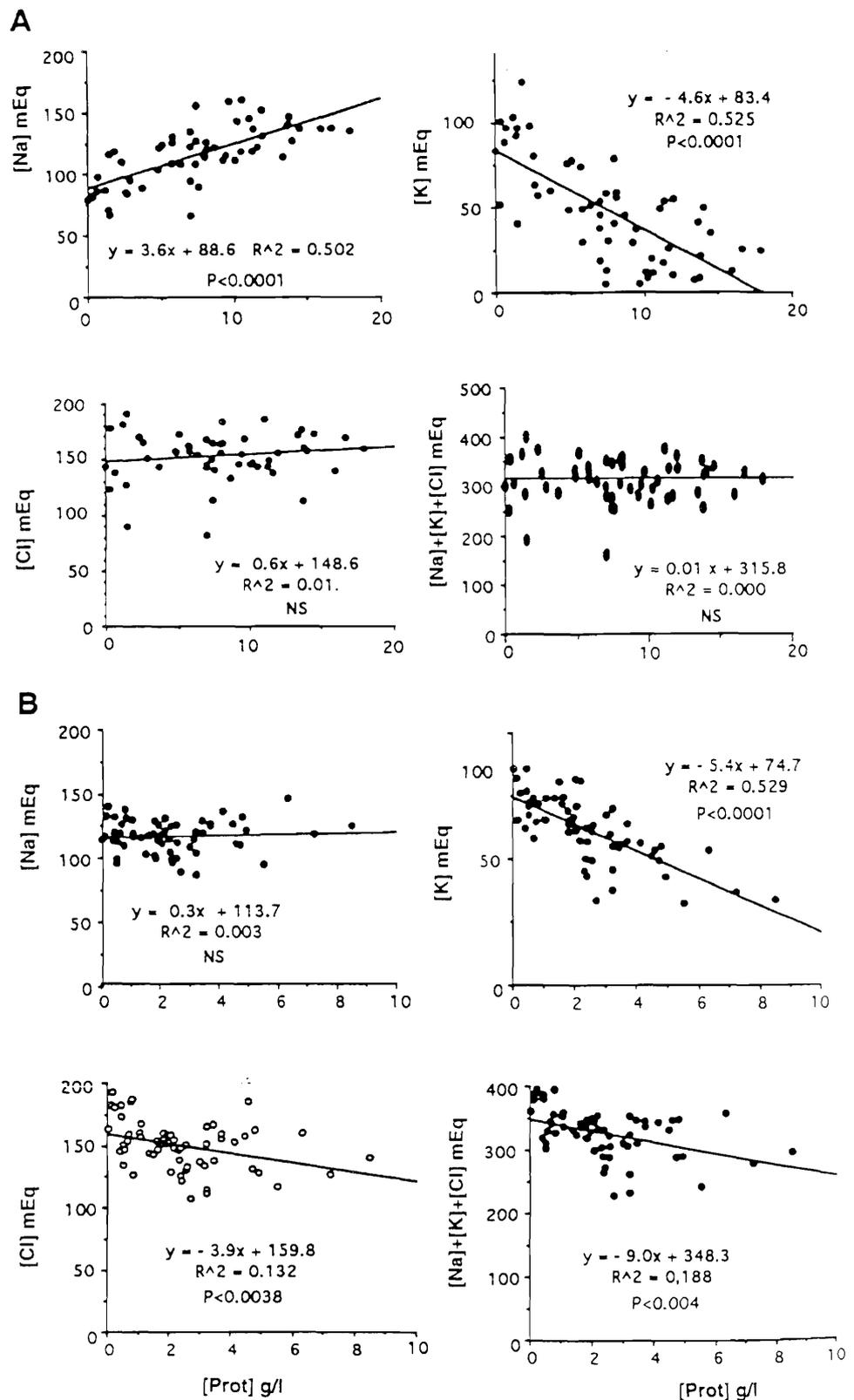


Fig. 2. Relationships between concentrations of monovalent ions (Na^+ , K^+ , and Cl^-) and protein (Prot) concentrations in endolymph of trout (A) and turbot (B). Regression lines are shown together with their equations and significances.

phatic CO_2 concentrations. Two series of samplings were made, alternating the initial sacculus (left or right) to be sampled. In each series, two orders of sampling were used inside the sacculus: 1) a clockwise order in which the first sample was taken in *area 1* and

the last in *area 6* and 2) a counterclockwise order in which the first sample was taken in *area 3* and the last in *area 4* (see Fig. 1B). ANOVA for repeated measurements indicated that totCO_2 concentrations were significantly different with the otolith sites ($P < 0.001$) but

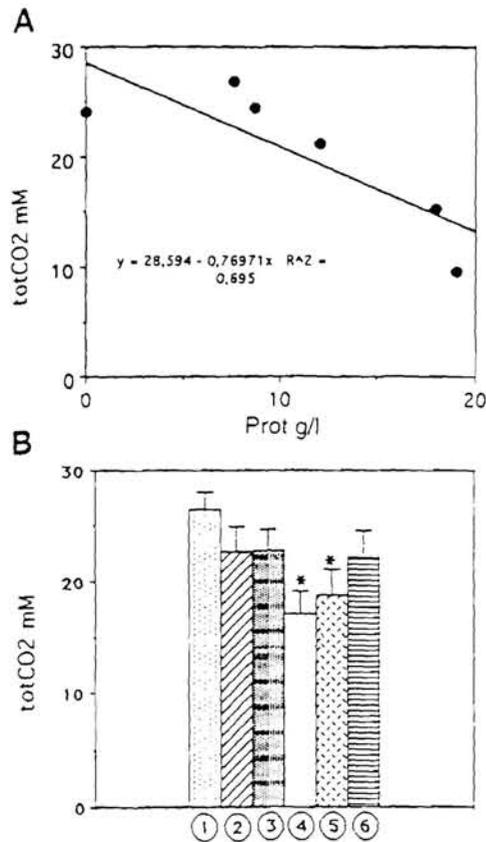


Fig. 3. Total CO₂ (totCO₂) distribution within the endolymph. A: relationship between totCO₂ and protein concentrations in trout endolymph. Equation of line is presented and is significant at $P < 0.05$. B: spatial differences in totCO₂ content within turbot endolymph. Means \pm SE of 11 determinations from 6 turbot. Six samples taken from sites 1-6 (see Fig. 1B) were removed from each sacculus. * $P < 0.001$ by comparison to site 1.

that sampling order and sacculus position (right or left) made no difference.

Chemical composition of otolith sections by WD-EM microprobe. On frontal and transverse sections, a variation in K/Ca and Na/Ca ratios was observed from zone to zone, whereas Sr/Ca ratios remain roughly uniform. Multivariate ANOVA tests for repeated measurements showed significant differences ($P < 0.001$) between otolith sites for both K/Ca and Na/Ca ratios (Fig. 4). On the transverse sections, the average K/Ca ratio of the distal zone was twice that of the proximal, whereas the Na/Ca ratio was only 20% higher. On the frontal sections, the K/Ca and Na/Ca ratio differences between the two zones were less marked, being 27 and 12%, respectively. In fact, data from frontal sections showed greater variability both within and between samples, although the chemical patterns are very similar in the two types of sections. The electron microprobe technique is considered to be one of the best for measuring Na and K ions (5). Actually, in this experiment, all K⁺ concentrations measured in the proximal zone in transverse and frontal sections are below or very close to the K⁺ limit of detection. This makes it difficult to interpret the slight differences between the two types of sections.

DISCUSSION

Lack of uniformity within the endolymph. The present study confirms that the endolymph is a K⁺- and totCO₂-rich fluid (see Table 1) and also brings to light a hitherto unknown and exceptional feature of this fluid in that its main constituents are spatially distributed in a nonuniform way, creating important increasing or decreasing proximodistal (P-D) gradients, a phenomenon that has a physiological relevance to the biomineralization process of the otolith.

In the inner ear of higher vertebrates, Sterkers et al. (30) reported that endolymph was variable in composition. There are small but significant differences in the ionic concentrations between the cochlea and the vestibule and also along the length of the cochlea from base to apex. However, these differences only represented ~8% of the maximum K⁺ and Cl⁻ values, and no associated physiological significance was proposed.

The very high K⁺ concentration of the vertebrate inner ear endolymph is unique among extracellular fluids, and its functional significance in mammals is generally related to electrophysiological events in the macula (21, 30). K⁺ being the ion with the highest concentration in the endolymph around the hair cells, normally carries most of the transduction current (21). However, in the present study, the lowest K⁺ concentration was measured near the macula area of the sacculus, which contains the sensory hair cells. However, transduction channels are relatively nonselective cation-passing pores (16) and, because Na⁺ is present at a higher concentration than K⁺ near the macula in fish, this ion would assume a role in the mechanically sensitive transduction mechanism.

Origin of ionic gradients within the endolymph. The presence of these gradients in the endolymph implies separate zones of secretion and reabsorption, and its maintenance depends on several parameters, including the ratio between transepithelial flux and pool, diffusional characteristics in the endolymph, and the presence of chelating agents that have not as yet been studied. In higher vertebrates, it has been clearly established that the secretion of endolymph depends on Na⁺-K⁺-ATPase activity in several areas of the inner ear (30). These are zones of specialized epithelial cells, called dark cells, concentrated in relatively small areas around the sensory hair cells. These cells are osmophilic and produce various enzymes, such as Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, and carbonic anhydrase generally involved in ionic transport and energy metabolism (30). In teleosts, recent studies (25, 32) have demonstrated that saccular ionocytes are mitochondrial-rich cells (DASPMI probe), exhibiting high Na⁺-K⁺-ATPase (antroylouabain) and carbonic anhydrase II activities. In trout and turbot, Payan and coworkers (24) demonstrated that energy-dependent mechanisms are responsible for the maintenance of the K⁺ and H⁺ levels in endolymph. Therefore, from our results in fish and by analogy with the situation in higher vertebrates, we propose that the presence of chemical gradients of monovalent ions in the endolymph is the result of the

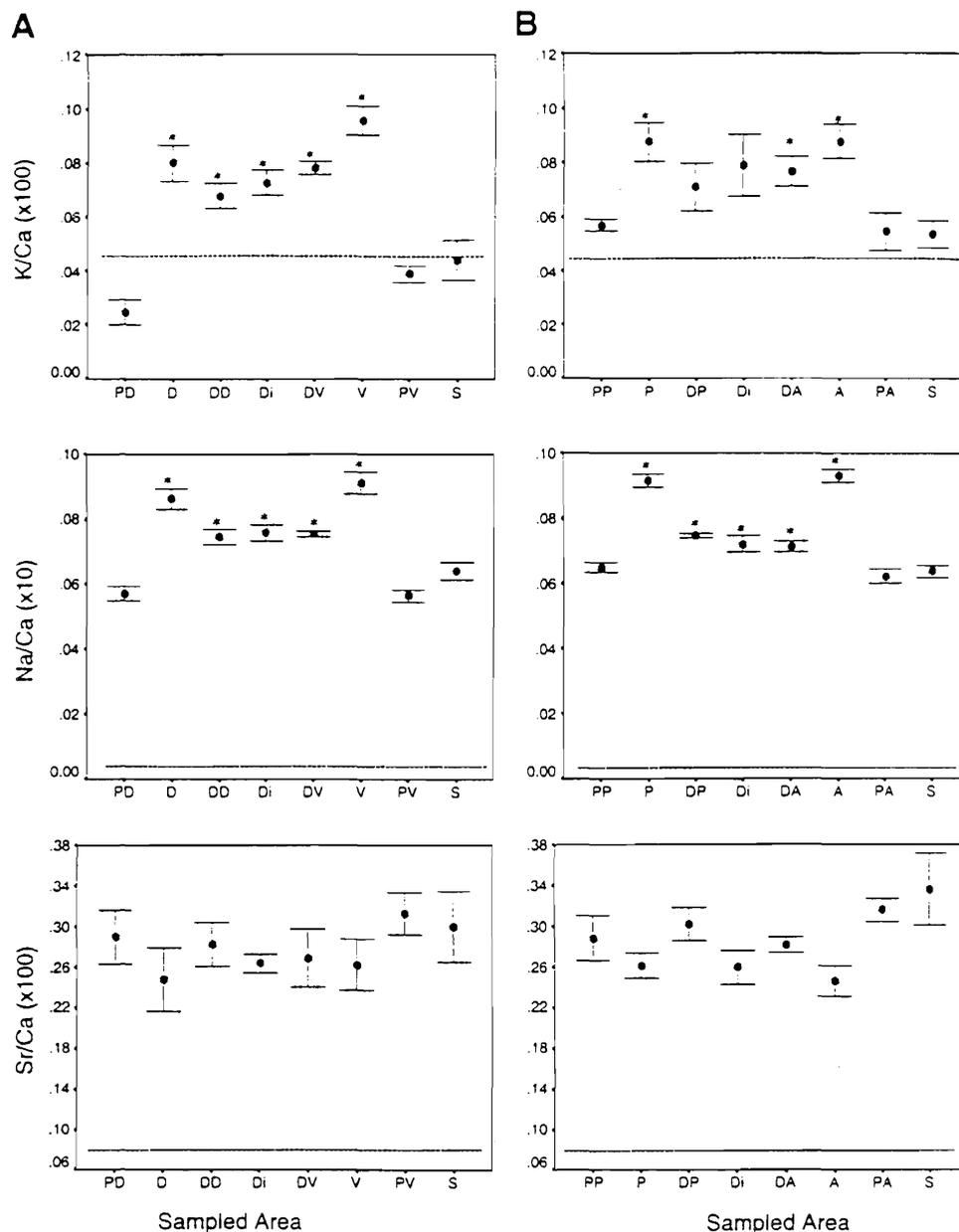


Fig. 4. Chemical composition of turbot otoliths analyzed by WD-EM. Graphs represent distribution of K/Ca, Na/Ca, and Sr/Ca ratios (means and SE) on left sagittae sections. A: transverse sections from 5 turbot. Comparisons between otolith sites were made with a multivariate ANOVA for repeated measurements, and significance was accepted for $P < 0.05$ (*). Mean of measurements of proximodorsal zone was reference in A, and in B, reference was proximoposterior zone. PD, proximodorsal; P, posterior; DP, distoposterior; Di, distal; DA, distoanterior; A, anterior; PA, proximoanterior; S, sulcus.

uneven distribution of ionocytes in the saccular epithelium. The chemical gradients, whether positive or negative, are oriented along a P-D axis related to the distribution of the two ionocyte populations. As yet, it is not possible to assign specific roles to each type of ionocyte present in this epithelium, but we suggest that these specialized cells are the sites of active transfers of K^+ and H^+ (or related HCO_3^-) as illustrated schematically in Fig. 5A.

Origin of protein gradient within the endolymph. The sensory area of the vertebrate inner ear contains supporting cells displaying a secretory phenotype that are thought to be involved in the formation of tectoria associated with the macula (16). In fish, the secretory activity of the macula was demonstrated by Gaudie and Nelson (12) with hemotoxylin and eosin. More recently, Davis et al. (7, 8), using a molecular biology approach, reported that supporting cells located at the

outer perimeter of the saccular macula were the site of collagen secretion. These observations and our results suggest the involvement of the macula as the region of endolymphatic protein production. A limited zone of production followed by dilution within the endolymph could explain the establishment of the protein gradient (Fig. 5, A and B). Furthermore, the shape and location of the sagitta would act as a physical barrier to the diffusion of the locally produced ions and proteins and would thus help to maintain the chemical gradient (see Fig. 5A).

Are the chemical gradients significant to otolith growth? Otolith mineralization consists of the deposition of $CaCO_3$ on a protein matrix (9), thus the principal substances involved in otolith growth are proteins, ionized calcium (Ca^{2+}), and bicarbonate ions (HCO_3^-). Growth is not continuous, because inorganic deposition must necessarily follow the formation of the organic

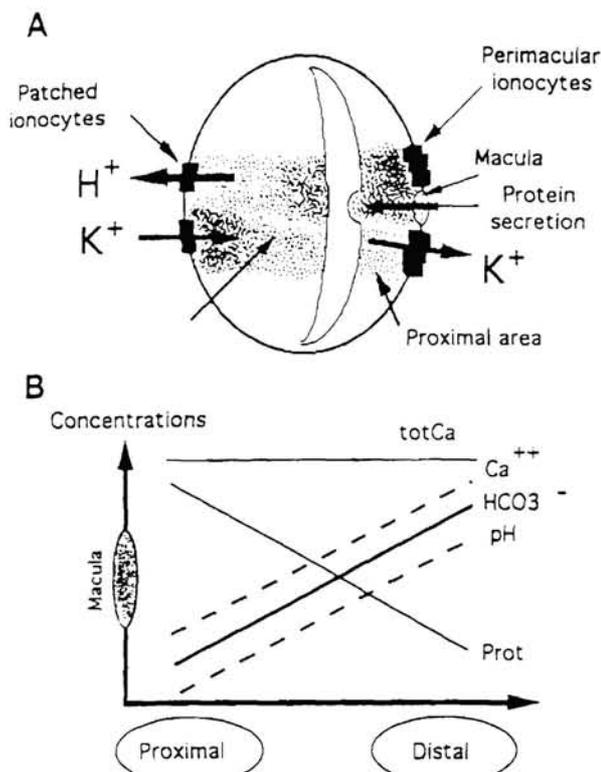


Fig. 5. A: hypothetical model of protein, K^+ , and H^+ transports across saccular epithelium. Representation of a transverse section of a saccule. Note that overall movement of H^+ results in net excretion of H^+ as measured by Payan et al. (24) using a titration technique with isolated saccules mounted as closed sacs. H^+ arrow signifies titratable acidity and corresponds either to efflux of H^+ or influx of HCO_3^- . Influx and efflux of K^+ have to be identical to satisfy ionic equilibrium. Shaded areas represent increasing chemical gradient of H^+ (or decreasing gradient of HCO_3^-) and protein between distal and proximal zones and increasing chemical gradient of K^+ between proximal and distal zones. B: schematic representation of chemical gradients within endolymph. Macula (proximal zone) is on left and distal zone on right of graph with otolith in middle. y-Axis gives concentration of parameters, x-axis shows proximal-distal (P-D) axis. Protein, $totCa^{2+}$, and HCO_3^- concentrations were directly measured, whereas Ca^{2+} and pH concentrations were deduced (see DISCUSSION).

matrix (22) and it is believed that, although proteins typically represent only a few percent of the total otolith weight (0.2–10%, Ref. 9), they determine the structural organization and properties of the overall mineralized structure (22), as in other calcified systems (31).

In the present study, the decreasing P-D protein gradient clearly matches the growth axes of the otolith. Actually, the proximal zone facing the macula corresponds to the convex shape of the otolith where the thickness of the increments is greater than on the concave side. Thus the endolymph fraction with the highest protein concentration bathes the side of the otolith characterized by the highest growth. The decreasing P-D gradient of protein has a further significance in relation to the fact that in all biological fluids proteins are strong chelators of Ca^{2+} . Mugiya (19) found 72% of diffusible calcium in the endolymph of trout and flatfish. Because the distal endolymph protein concentration is only half that of the proximal,

whereas the $totCa^{2+}$ remains constant (Table 1), a P-D increase of ionized calcium is created (Fig. 5B). We also recorded a twofold increase of $totCO_2$ from proximal to distal. Inasmuch as CO_2 is a highly diffusible gas, the partial pressure of CO_2 is probably constant throughout the endolymph and, with a pH of ~ 8.0 (20, 23, 24), most of the $totCO_2$ would be as bicarbonate (HCO_3^-). The constants of the Henderson-Hasselbach equation (pK and solubility coefficient) are not known for endolymph, so the absolute pH value cannot be calculated. However, on the assumption that these parameters are constant, a difference of 0.3 U pH between proximal and distal zones can be estimated, and this corresponds to a P-D gradient of ~ 10 mM of $totCO_2$ (Table 1). Gaudie and Nelson (12), on the basis of crystalline deposition analysis, already proposed the presence of a pH gradient between the sulcus and otolith edge. In conclusion, our results suggest that increasing spatial Ca^{2+} , HCO_3^- , and pH gradients occur from the proximal to the distal zones in the endolymph (Fig. 5B). As Ca^{2+} and HCO_3^- combine to form $CaCO_3$, the presence of these gradients would favor the formation of $CaCO_3$ along the P-D axis. These results do not agree with the otolith growth gradients (see above). To explain this apparent contradiction, we propose the following hypothesis. The net reaction of Ca^{2+} with HCO_3^- generates both $CaCO_3$ and the hydrogen ion H^+ according to the equation $HCO_3^- + Ca^{2+} \rightarrow CaCO_3 + H^+$, and this H^+ ion must be removed if calcification is to proceed. In most biocalcifying systems, this removal is carried out by specialized cells in close contact with the mineralized structure. However, as no cells are present on the otolith surface to pump out the H^+ , we propose that the H^+ must diffuse away from its production site toward a zone of lesser concentration along the P-D axis to where it is locally buffered by HCO_3^- to form CO_2 gas and water ($H^+ + HCO_3^- \rightarrow CO_2 + H_2O$). The ionic gradients (Ca^{2+} and HCO_3^-), which are in favor of $CaCO_3$ formation along the P-D axis within the endolymph, should help mineralization to progress all around the otolith. In brief, we propose that the gradient of protein concentration explains the differential growth of the otolith and that the deposition of $CaCO_3$ all around the otolith is brought about by two driving forces: 1) the increasing P-D pH gradient, which allows the proton to move away from the zone of $CaCO_3$ precipitation, and 2) the presence of increasing P-D ionic gradients (Ca^{2+} and HCO_3^-), favoring the availability of the ions necessary for this precipitation. This hypothesis supports the assumption that the otolith biocalcification process is initiated in the macula zone (22, 12).

Relationship between the chemical compositions of endolymph and otolith. The chemical composition of the otolith depends on exogenous factors (chemical constituents of the water, food, pollution, factors causing stress, etc.), and endogenous factors (ontogeny, metabolism) (26). As yet, the mechanisms of incorporation of chemical substances are not well known. A narrow relationship probably exists between the chemical compositions of endolymph and otolith, and it was

therefore important to study whether the lack of uniformity of the endolymph induces a similar nonuniformity in the otolith.

Variations of the Sr/Ca, Na/Ca, and K/Ca ratios were highly correlated to [Sr], [Na⁻], and [K⁻] variations. The 50% difference of the [K⁻] value between the proximal and distal zones of the otolith is reflected by a similar difference in the endolymph, which clearly indicates a close relationship between endolymph [K⁻] and otolith [K⁺]. The relationship between endolymph [Na⁺] and otolith [Na⁺] has still to be investigated. The fact that, in the endolymph samples, the photometric measurements give the total concentration of ions (i.e., both free and protein linked) may explain the apparent lack of correlation between the two media. Actually, it is the concentration of free ions that is more likely to have a significant correlation with the otolith ionic composition. Further studies of the distributions of free and protein-linked ions, including trace elements used in microchemical studies (3, 10, 11), must also be investigated.

Perspectives

Analysis of the microstructure and microchemistry of the otolith presents considerable potential for the study of fish populations. However, the application of these methodologies seems to be restricted by our present limited understanding of the intimate mechanisms involved in otolith formation. Of the various calcifying systems, the otolith can provide an original contribution because the endolymph is accessible for sampling and analysis. Our study demonstrates that substantial spatial heterogeneity in the concentrations of major ions, totCO₂, and protein exists within the endolymph, which lead us to propose a hypothesis involving a role of such gradients in the degree of CaCO₃ deposition. The nature of the otolith mineralization process is complex. A nonuniform incorporation of the chemical elements into the otolith as a result of the endolymph heterogeneity was demonstrated for the first time and must be taken into consideration in studies based on otolith microchemistry to avoid invalid interpretation. The new dynamic view of endolymph chemistry should promote further research on these interdisciplinary fields, particularly to evaluate the wider importance of this phenomenon in other fish species.

We are indebted to B. Maetz for correcting the manuscript.

This study was partly supported by IFREMER, and A. Edeyer is a recipient of a grant from IFREMER and the Britain district.

Address for reprint requests and other correspondence: P. Payan, Laboratoire de Physiologie et Toxicologie Environnementales, EA 2138, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, BP 71, 06108 Nice Cedex, France (E-mail: payan@unice.fr).

Received 20 October 1998; accepted in final form 3 March 1999.

REFERENCES

1. Arai, T., T. Otake, and K. Tsukamoto. Drastic changes in otolith microstructure and microchemistry accompanying the onset of metamorphosis in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecol. Prog. Ser.* 161: 17–22, 1997.
2. Bronte, C. R., R. J. Hesselberg, J. A. Shoemith, and M. H. Hoff. Discrimination among spawning concentrations of Lake Superior lake herring based on trace element profiles in sagittae. *Trans. Am. Fish. Soc.* 125: 852–859, 1996.
3. Campana, S. E., J. A. Gagné, and J. W. McLaren. Elemental fingerprinting of fish otoliths using ID-ICPMS. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122: 115–120, 1995.
4. Campana, S. E., and J. D. Neilson. Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1014–1032, 1985.
5. Campana, S. E., S. R. Thorrold, C. M. Jones, D. Gunther, M. Tubrett, H. Longerich, S. Jackson, N. M. Halden, J. M. Kalish, P. Piccoli, H. de Pontual, H. Troadec, J. Panfili, D. H. Secor, K. P. Severin, S. H. Sie, R. Thresher, W. J. Teesdale, and J. L. Campbell. Comparison of accuracy, precision, and sensitivity in elemental assays of fish otoliths using the electron microprobe, proton-induced X-ray emission, and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 2068–2079, 1997.
6. Dale, T. Surface morphology of the acoustico-lateralis sensory organ in teleosts functional and evolutionary aspects. In: *Environmental Physiology of Fishes*, edited by M. A. Ali. New York: Plenum, 1980, p. 387–402.
7. Davis, J. G., F. R. Burns, D. Navaratnam, A. M. Lee, S. Ichimiya, J. C. Oberholtzer, and M. I. Greene. Identification of a structural constituent and one possible site of postembryonic formation of a teleost otolith membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 707–712, 1997.
8. Davis, J. G., J. C. Oberholtzer, F. R. Burns, and M. I. Greene. Molecular cloning and characterization of an inner ear-specific structural protein. *Science* 267: 1031–1034, 1995.
9. Degens, E. T., W. G. Deuser, and R. L. Haedrich. Molecular structure and composition of fish otoliths. *Int. J. Life Oceans Coastal Waters* 2: 105–113, 1969.
10. Fowler, A. J., S. E. Campana, C. M. Jones, and S. R. Thorrold. Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otoliths using solution-based ICPMS. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 1421–1430, 1995.
11. Fowler, A. J., S. E. Campana, C. M. Jones, and S. R. Thorrold. Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otoliths using laser ablation ICPMS. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 1431–1441, 1995.
12. Gaudie, R. W., and D. G. A. Nelson. Aragonite twinning and neuroprotein secretion are cause of daily growth rings in fish otoliths. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 90A: 501–509, 1988.
13. Gunn, J. S., I. R. Harrowfield, C. H. Proctor, and R. E. Thresher. Electron probe microanalysis of fish otoliths—evaluation of techniques for studying age and stock discrimination. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 158: 1–36, 1992.
14. Halden, N. M., J. A. Babaluk, J. L. Campbell, and W. J. Teesdale. Scanning proton microprobe analysis of Sr in an arctic charr, *Salvelinus alpinus*, otolith: implications for the interpretation of anadromy. *Env. Biol. Fish.* 43: 333–339, 1995.
15. Hoff, G. R., and L. A. Fuiman. Environmentally induced variation in elemental composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*) otoliths. *Bull. Mar. Sci.* 56: 578–591, 1995.
16. Hudspeth, A. J. How the ear's works work. *Science* 341: 397–404, 1989.
17. Kalish, J. M. Formation of a stress-induced chemical check in fish otoliths. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 162: 265–277, 1992.
18. Mayer-Gostan, N., H. Kossmann, A. Watrin, P. Payan, and G. Boeuf. Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*). *Cell Tissue Res.* 289: 53–61, 1997.
19. Mugiya, Y. Calcification in fish and shell fish. XI. Seasonal changes in calcium and magnesium concentration of the otolith fluid in some fish, with special reference to the zone of formation of their otolith. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 32: 549–557, 1966.
20. Mugiya, Y., and K. Takahashi. Chemical properties of the saccular endolymph in the rainbow trout. *Salmo gairdneri*. *Bull. Fac. Hokkaido Univ.* 36: 57–63, 1985.
21. Palmer, L. G. Epithelium Na channel and their kin. *News Physiol. Sci.* 10: 61–67, 1995.
22. Pannella, G. Growth pattern in fish sagittae. In: *Skeletal Growth of Aquatic Organisms: Biological Records of Environmental Change*, edited by D. C. Rhoads and R. A. Lutz. New York: Plenum, 1980, p. 519–560.

23. Payan, P., G. Borelli, G. Boeuf, and N. Mayer-Gostan. Relationship between otolith and somatic growth: consequence of starvation on acid-base balance in plasma and endolymph in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* 19: 35-41, 1998.
24. Payan, P., H. Kossmann, A. Watrin, N. Mayer-Gostan, and G. Boeuf. Ionic composition of endolymph in teleosts: origin and importance of endolymph alkalinity. *J. Exp. Biol.* 200: 1905-1912, 1997.
25. Pisam, M., P. Payan, C. Le Moal, A. Edeyer, G. Boeuf, and N. Mayer-Gostan. Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Psetta maxima*). *Cell. Tissue Res.* 294: 261-270, 1998.
26. Radtke, R. L., and D. J. Shafer. Environmental sensitivity of fish otolith microchemistry. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 43: 935-951, 1992.
27. Radtke, R., M. Svenning, D. Malone, A. Klements, J. Ruzicka, and D. Fey. Migrations in an extreme northern population of Arctic charr *Salvelinus alpinus*: insights from otolith microchemistry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 136: 13-23, 1996.
28. Secor, D. H., A. Henderson-Arzapalo, and P. M. Piccoli. Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 192: 15-33, 1995.
29. Severin, K. P., J. L. Carroll, and B. L. Norcross. Electron microprobe analysis of juvenile walleye pollock, *Theragra chalcogramma*, otoliths from Alaska: a pilot stock separation study. *Env. Biol. Fish.* 43: 269-283, 1995.
30. Sterkers, O., E. Ferrary, and C. Amiel. Production of inner ear fluids. *Physiol. Rev.* 68: 1083-1128, 1988.
31. Suga, S., and H. Nakahara. *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*, edited by S. Suga and H. Nakahara. Berlin: Springer-Verlag, 1991.
32. Takagi, Y. Meshwork arrangement of mitochondria-rich, Na⁺-K⁺-ATPase rich cells in the saccular epithelium of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inner ear. *Anat. Rec.* 248: 483-489, 1997.
33. Thresher, R. E., C. H. Proctor, J. S. Gunn, and I. R. Harrowfield. An evaluation of electron-probe microanalysis of otoliths for stock delineation and identification of nursery areas in a southern temperate groundfish, *Nemadactylus macropterus* (Cheilodactylidae). *Fish. Bull.* 92: 817-840, 1994.
34. Townsend, D. W., R. L. Radtke, D. P. Malone, and J. P. Wallinga. Use of otolith strontium:calcium ratios for hindcasting larval cod *Gadus morhua* distributions relative to water masses on Georges Bank. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 119: 37-44, 1995.
35. Tzeng, W. N. Temperature effects on the incorporation of strontium in otolith of Japanese eel *Anguilla japonica*. *J. Fish Biol.* 45: 1055-1066, 1994.



REGULAR ARTICLE

M. Pisam · P. Payan · C. LeMoal · A. Edeyer · G. Boeuf
N. Mayer-Gostan

Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts, *Oncorhynchus mykiss* and *Psetta maxima*

Received: 19 November 1998 / Accepted: 4 July 1998

Abstract The secretory cells and ionocytes of the saccular epithelium of the inner ear of trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*) have been studied by electron microscopy. In these species, the saccular epithelium may be subdivided into four zones: the “macula”, the “meshwork area”, the “patches area”, and the “intermediate area”. In addition to the sensory “hair cells” and their supporting cells, the macula contains, at its periphery, “granular cells” that have the ultrastructural characteristics of secretory cells. The “meshwork area” around the macula contains large ionocytes endowed with pseudopods, many mitochondria, and three intracytoplasmic membrane systems (endoplasmic reticulum, tubular, and vesicular systems). The patches area, located at some distance from the macula, consists of groups of small mitochondria-rich ionocytes characterized by infoldings of their lateral plasma membrane. In the intermediate area, the size and organelle-content of cells decrease from the meshwork area to the patches area. There is no significant difference in cell composition or structure of the saccular epithelium between the trout and the turbot. The secreting cells might be involved in secretion of endolymph and formation of the otolith,

whereas the ionocytes probably regulate the ionic composition of the endolymph.

Key words Ionocytes · Macula · Granular cells · Trout, *Oncorhynchus mykiss* · Turbot, *Psetta maxima* (Teleostei)

Introduction

The inner ear of fish fulfils functions similar to those of higher vertebrates (Popper and Fay 1993) despite the lack of a cochlea. Fish and higher vertebrates also differ in that, in mammals, numerous small otoconia lie on the cilia of sensory cells whereas, in fish, only a single large otolith is present in each of the three vestibular chambers (utricle, saccule, and lagena). The otolith displays ring-like structures consisting of calcium carbonate crystals in the aragonite form (Dunkelberger et al. 1980; Gauldie and Nelson 1988) resulting from successive deposits within a protein matrix according to daily and seasonal rhythms (Campana and Neilson 1980); the chemical composition of the otolith may be altered by various factors (Jones 1992). Therefore, the endolymph that fills the fish labyrinth should contain all the elements necessary for otolith growth and have, in addition, an ionic composition that allows the transduction of mechanical energy into electrical impulses.

As in higher vertebrates, fish endolymph is characterized by a high K^+ concentration (Mugiya and Takahashi 1985; Payan et al. 1997; Takagi 1997) necessary for transducing mechanisms in the sensory cells of the macula. However, fish endolymph differs from that of higher vertebrates with respect to its relative alkalinity (pH 8) compared with plasma (pH 7.4) because of a high concentration in total CO_2 (for trout: 30 mM in endolymph versus 15 mM in plasma; Mugiya and Takahashi 1985; Payan et al. 1997). Such differences are probably related to calcium carbonate deposition in the inner ear of fish (Gauldie and Nelson 1990).

In teleosts, where a saccular potential of +10 mV has been recorded (Enger 1964), energy-dependent mecha-

This study was partly supported by IFREMER (Programme: Régulation de la croissance chez les poissons). A. Edeyer is a recipient of a grant from IFREMER (PDG/DRH/EP/HF/ADE/no. 97-408).

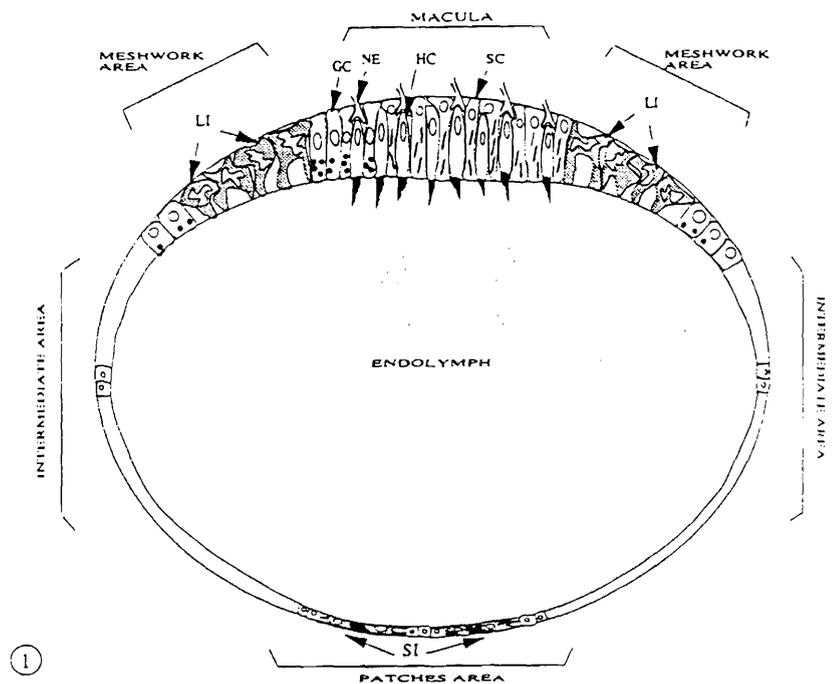
M. Pisam (✉) · C. LeMoal
Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, CEA Saclay,
F-91191 Gif-sur-Yvette cedex, France
Tel.: +33 1 69085363; Fax: +33 1 69088046

P. Payan
Laboratoire de Physiologie et Toxicologie Environnementales,
Université de Nice, Parc Valrose, Faculté des Sciences,
F-06108 Nice cedex 2, France

A. Edeyer · G. Boeuf
IFREMER, Centre de Brest, Station Ressources Vivantes,
BP 70, F-29280 Plouzané, France

N. Mayer-Gostan
Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS,
UMR 6548 Université de Nice, Parc Valrose, Faculté des Sciences,
F-06108 Nice cedex 2, France

Fig. 1 Schematic representation of the saccular epithelium of the inner ear in teleosts. The macula comprises hair cells (*HC*), which are in contact with nerve endings (*NE*), supporting cells (*SC*) and, at its periphery, granular cells (*GC*). It is surrounded by a "meshwork area" containing large ionocytes (*LI*). The "patches area" contains small ionocytes (*SI*)



nisms are necessary to maintain the K^+ and H^+ concentrations of the endolymph. In many epithelia, active ion exchange is the function of specialized ionocytes that are rich in mitochondria and exhibit extensive infoldings of their basolateral plasma membrane, which is particularly rich in Na^+/K^+ ATPases. Numerous studies in higher vertebrates have shown the presence of ionocytes, also called dark cells, in the inner ear (stria vascularis and vestibule); these cells are involved in the maintenance of the ionic composition of the endolymph (Sterkers et al. 1988). In fish, the presence of ionocytes in the saccule has only recently been clearly demonstrated (Mayer-Gostan et al. 1997). This has been achieved by techniques used to demonstrate fish gill ionocytes: labeling after zinc iodide/osmium (Watrin and Mayer-Gostan 1996), mitochondrial fluorescence after exposure to isomeric steryl dimethylaminostyrylmethylpyridinium iodine (DASPMI; Bereiter-Hahn 1976), and fluorescence of a ouabain derivative that binds to Na^+/K^+ ATPase sites (McCormick 1990). In a recent study (Takagi 1997), antibodies to the Na^+/K^+ ATPase have also been used to visualize ionocytes within the saccular epithelium. Two studies (Mayer-Gostan et al. 1997; Takagi 1997) report large ionocytes forming a meshwork around the macula, but only Mayer-Gostan et al. (1997) describe groups of small ionocytes in areas located opposite the macula. It is therefore important to determine whether both groups of cells display the ultrastructural features of ionocytes, and if so, to analyse any differences. The proteins of the otolith (Asano and Mugiya 1993), otolith membrane (Khan and Drescher 1990), and endolymph are probably secreted by the saccular epithelium. Therefore, the present study has also analysed ultrastructural features of cells that might be involved in secretion. The observations have

been performed in two species: the freshwater trout (*Oncorhynchus mykiss*) and seawater turbot (*Psetta maxima*), which live in different media and belong to phylogenetically distant orders.

Materials and methods

Fish handling

Trout, *Oncorhynchus mykiss*, of about 200 g body weight were collected from a local fish farm near Nice (France) and reared in running tap water at about 14°C in circular tanks. Turbot *Psetta maxima* weighing 100–150 g were grown at IFREMER (Brest) in running seawater at 17°C.

Both groups were fed with an automatic food distributor in the morning. The experiments reported in this article comply with the Principles of Animal Care of the National Institute for Health (publication no.86-23, revised 1985) and the French Law on experiments on animals (decree no. 87-848).

Ultrastructural studies

Each fish was decapitated and the head kept on ice. The head was then opened and the inner ear exposed. After section of the semicircular canals and nerve branches, the saccule was quickly removed and fixed in 2% glutaraldehyde in 0.08 M sodium cacodylate (pH 7.6) for 30 min at room temperature and then overnight at 4°C. To visualize the intracytoplasmic membranous systems, the saccules were postfixed for 90 min at room temperature in a 1% mixture of 2% aqueous osmium tetroxide and 3% aqueous potassium ferricyanide (Karnovsky 1971) and dehydrated in ethanol. Before embedding in Epon 812, the otolith was removed, and the saccule was cut into three parts containing respectively the macula, the region opposite the macula, and the intermediate region between the two poles. Thin sections (serial thin sections for the macula) were prepared on a Reichert ultramicrotome. They were contrasted for 2 min with lead citrate and were examined at 80 kV with a Philips CM12 electron microscope.

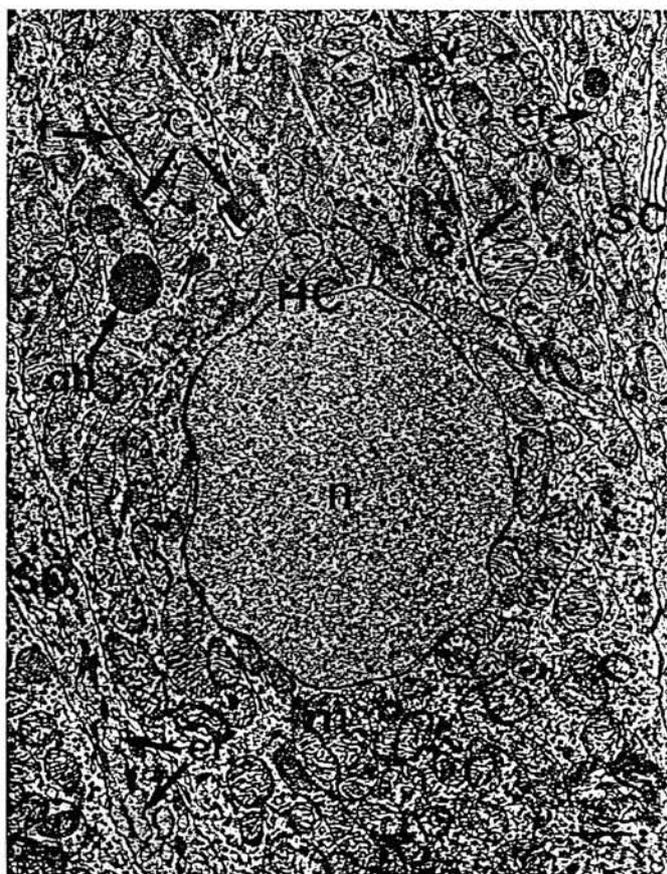
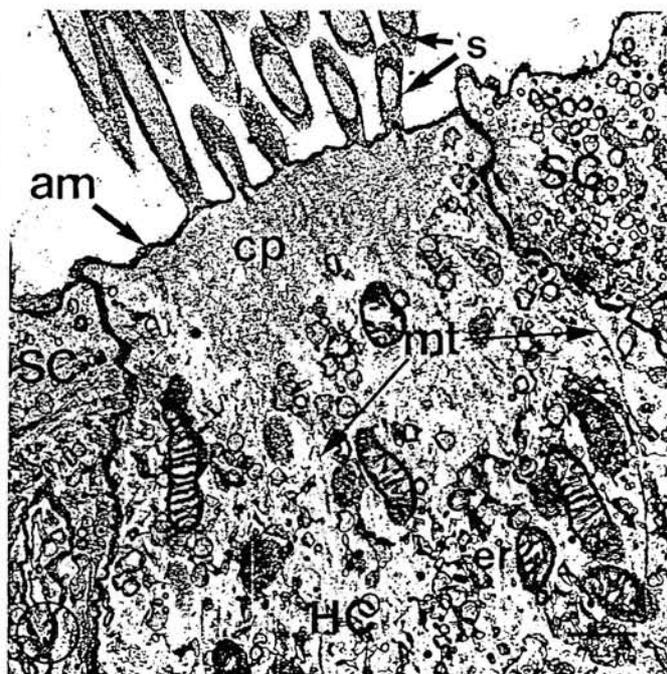
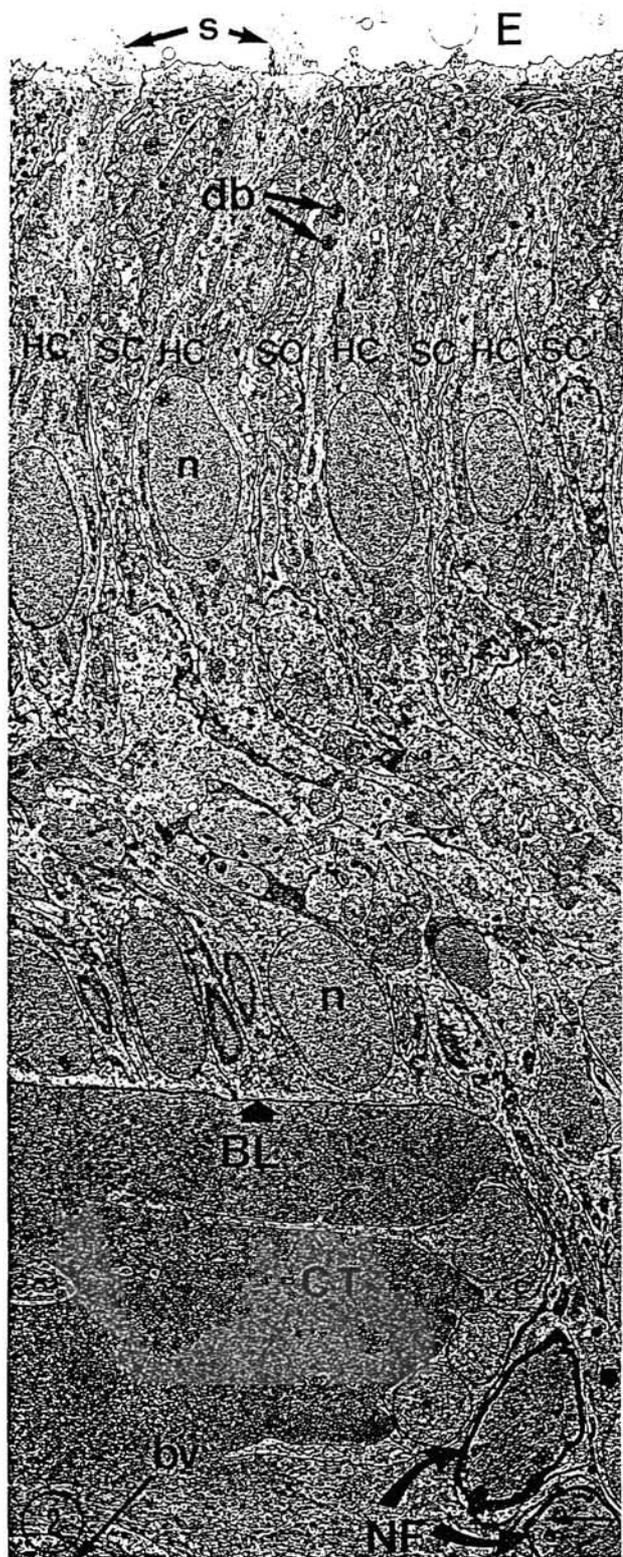


Fig. 2 Epithelium of the macula in turbot at low magnification. The hair cells (HC) have stereocilia (s) at their apical surface, and do not reach the basal lamina (BL). The supporting cells (SC) have a smooth, slightly wavy apical surface. The connective tissue (CT) contains myelinated nerve fibers (NF) and blood vessels (bv) (E endolymph, db dense body, n nucleus). $\times 2900$. Bar $3 \mu\text{m}$

Fig. 3 Apical region of a hair cell (HC) in trout. A cuticular plate (cp) located just below the apical plasma membrane (am) contains a web of thin microfilaments similar to those observed in the stereo-

ilia (s) (m longitudinally oriented microtubules, SC supporting cell, er endoplasmic reticulum). $\times 18000$. Bar $0.5 \mu\text{m}$

Fig. 4 Perinuclear region of a hair cell (HC) in turbot. The cytoplasm contains many mitochondria (m) and poorly stained vesicles (v) seemingly originating from the Golgi area (G). Longitudinally oriented bundles of filaments (f) and a dense body (db) can be seen. The cytoplasm of adjacent supporting cells (SC) contains cisternae of endoplasmic reticulum (er) (n nucleus). $\times 8000$. Bar $1 \mu\text{m}$

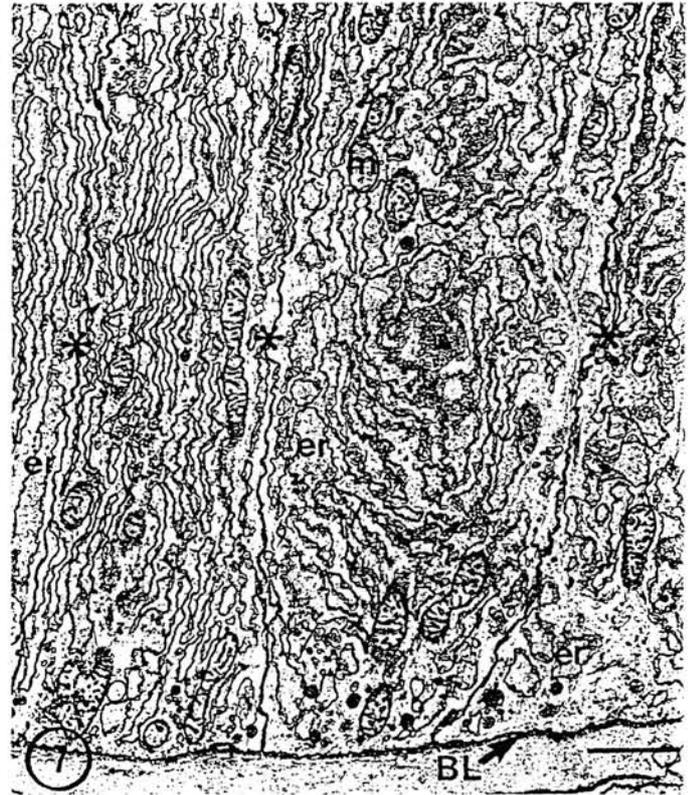
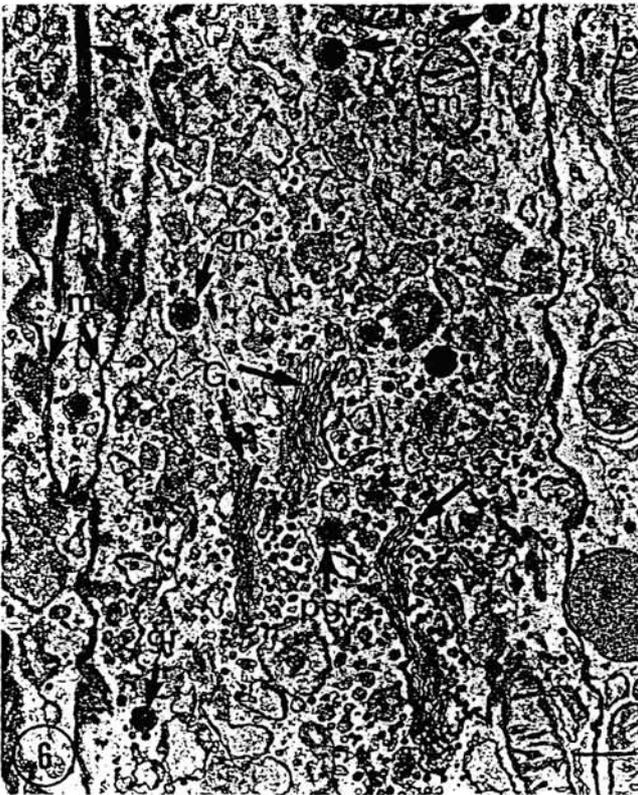
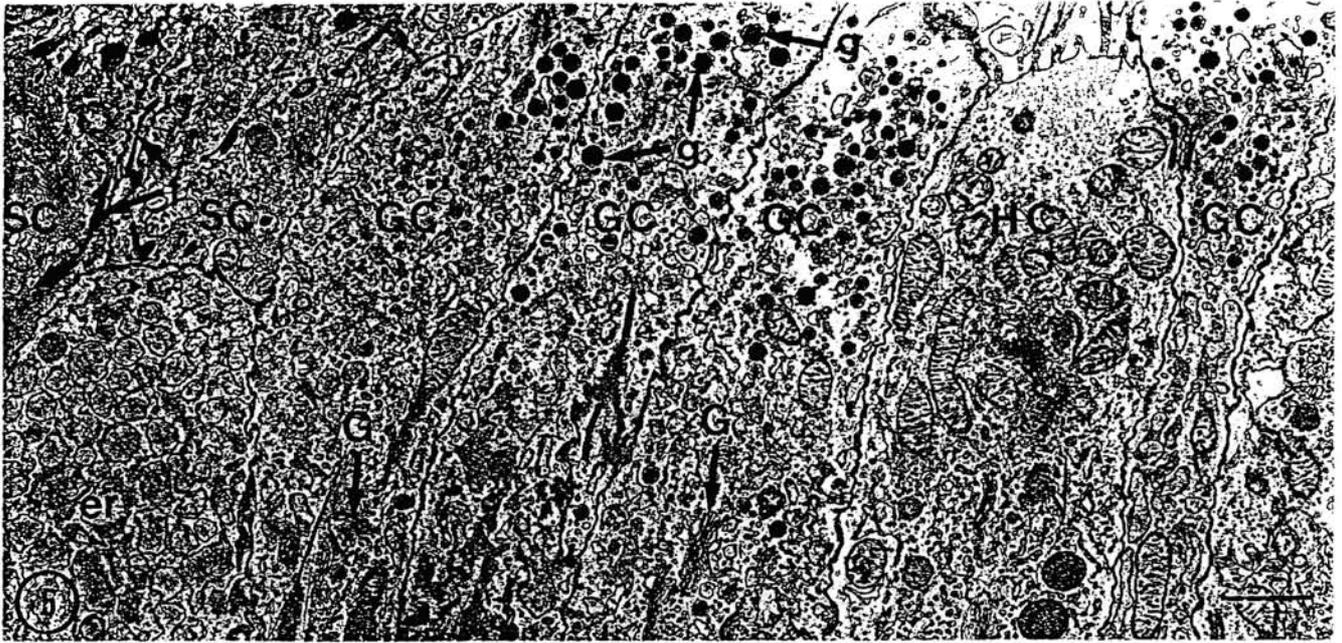


Fig. 5 Epithelial cells of the macula in trout comprise hair cells (HC), granular cells (GC) with secretion granules (g) in their apical cytoplasm and supporting cells (SC) with large, longitudinally oriented filament bundles (f). Left Dilated endoplasmic reticulum cisternae (er) contain a granulo-filamentous material in a granular cell (G Golgi apparatus). $\times 12000$. Bar $1 \mu\text{m}$

Fig. 6 Golgi region of a granular cell in trout. Irregularly shaped progranules (pgr) surrounded by small vesicles are present on one side of the Golgi stacks (G). Small vesicles are frequently attached

to granules (gr) located in the Golgi area but not to fully formed granules (g) in the apical portion of the cell (f longitudinal bundles of filaments. lm lateral plasma membrane, m mitochondria) $\times 17000$. Bar $0.5 \mu\text{m}$

Fig. 7 Basal regions of granular cells in trout. Dilated cisternae of endoplasmic reticulum (er) form parallel arrays in the basal region of the cells and contain a faintly contrasted granulo-filamentous material. The lateral plasma membranes are indicated by asterisks (BL basal lamina, m mitochondria). $\times 12000$. Bar $1 \mu\text{m}$

Results

The saccular epithelium could be subdivided into several zones (Fig. 1). The macula contained the sensory cells. The "meshwork area" around the macula contained large mitochondria-rich cells: the large ionocytes. Located at the pole opposite the macula, the "patches area" contained groups of smaller mitochondria-rich cells: the small ionocytes. The intermediate areas between the two meshwork areas and the patches area contained epithelial cells that progressively decreased in height from the meshwork areas to the patches area.

In both turbot and trout, the epithelium of the macula was bistratified: the bases of sensory hair cells did not reach the basal lamina but were located in rounded recesses between the apical halves of the supporting cells. As a result, nuclei of the supporting cells formed a single row just above the basal lamina, and nuclei of the hair cells formed a second row about mid-way between the basal lamina and the apical surface of this columnar epithelium (Fig. 2).

The "hair cells" were prismatic or ovoid in shape and characterized by cilia at their apical surface and numerous mitochondria in the cytoplasm. A single long kinocilium was anchored on a basal body. Numerous shorter stereocilia packed with microfilaments decreased in height from the kinocilium to the opposite sides of the apical surface (Fig. 3). A dense web of microfilaments just below the apical plasma membrane formed the cuticular plate (Fig. 3). Other cytoskeletal elements in the hair cells included microtubules (Fig. 3) and filament bundles mainly oriented along the longitudinal axis (Fig. 4). The ovoid nucleus and numerous mitochondria were located in the lower third of the cells. The endoplasmic reticulum consisted of anastomosed, relatively flattened cisternae; Golgi stacks were observed in the supranuclear region (Fig. 4).

The "supporting cells" were elongated columnar cells sandwiched between the hair cells (Figs. 2, 4). As a result, the middle part of their cell body consisted of a narrow layer of cytoplasm bridging an expanded apical region showing longitudinal or oblique bundles of filaments (Fig. 5) and a dilated basal extremity containing the nucleus and numerous dilated cisternae of the endoplasmic reticulum.

In trout, the prominent "granular cells" in the peripheral part of the macula formed an elongated band along the ventral side of the anterior part of the macula. The rostral part of this band comprised approximately 200 granular cells intermingled with 20 hair cells. The number of granular cells progressively diminished in a rostral to caudal direction. The granular cells were characterized by densely stained spherical granules (100–500 nm in diameter) at their apical pole (Fig. 5) and a wavy apical surface. Their extensive endoplasmic reticulum formed distended cisternae filled with a moderately stained granulofilamentous material (Figs. 5–7). On the *trans* side of Golgi stacks, progranules with irregular contours contained a granulofilamentous material more intensely stained than that in

the endoplasmic reticulum and were surrounded by small vesicles, some of which were still attached to the limiting membrane of the granule (Fig. 6).

In the meshwork area around the macula, numerous large ionocytes with irregular, highly indented nuclei sent pseudopods to both the apical and basal surfaces of the epithelium (Fig. 8). Contacts between pseudopods, which were more developed toward the base of the epithelium, created a meshwork of large ionocytes, hence the name given to this region. The apical surface of the large ionocytes was endowed with short thick microvilli (Fig. 9). The intercellular spaces surrounding them were closed by apical junctions, the height of which varied from 300 nm (Fig. 9) to 40 nm (Fig. 10). The ionocyte cytoplasm was characterized by numerous mitochondria that were significantly larger in turbot ($0.66 \pm 0.05 \mu\text{m}$ in diameter, $n=4$) than in trout ($0.32 \pm 0.02 \mu\text{m}$ in diameter, $n=4$, $P < 0.05$; Figs. 14, 13) and a highly developed system of anastomosing membranous tubules that intertwined with the endoplasmic reticulum and opened into the lateral intercellular space (Figs. 11, 12). Along these tubules, irregularly dilated (60–100 nm in diameter), faintly stained tubular areas alternated with more flattened parts sand-

Fig. 8 Epithelium in the meshwork area in trout. At this low magnification, a large ionocyte (*LI*) is seen in the basal region of the epithelium. Its pale nucleus (*n*) is deeply indented. *Right* Another large ionocyte (*asterisk*) sends a pseudopod toward the apex of the epithelium (*arrow*). (*m* mitochondrion, *E* endolymph). $\times 2500$. Bar $3 \mu\text{m}$

Fig. 9 Apical region of a large ionocyte in the meshwork area of the trout. The apical plasma membrane of a large ionocyte (*LI*) endowed with microvilli (*mv*) is in contact with the endolymph (*E*). The endoplasmic reticulum (*er*) comprises flattened cisternae that can be easily distinguished from elements of the tubular system (*ts*). Vesiculotubular and cup-shaped elements (*v*) accumulate in a cytoplasmic area located just below the apical membrane (*aj* apical junction). $\times 18000$. Bar $0.5 \mu\text{m}$

Fig. 10 Apical regions of large ionocytes (*LI*) in the trout. The apical junction (*aj*) between the two cells is shallow (*ts* tubular system). $\times 39000$. Bar $0.2 \mu\text{m}$

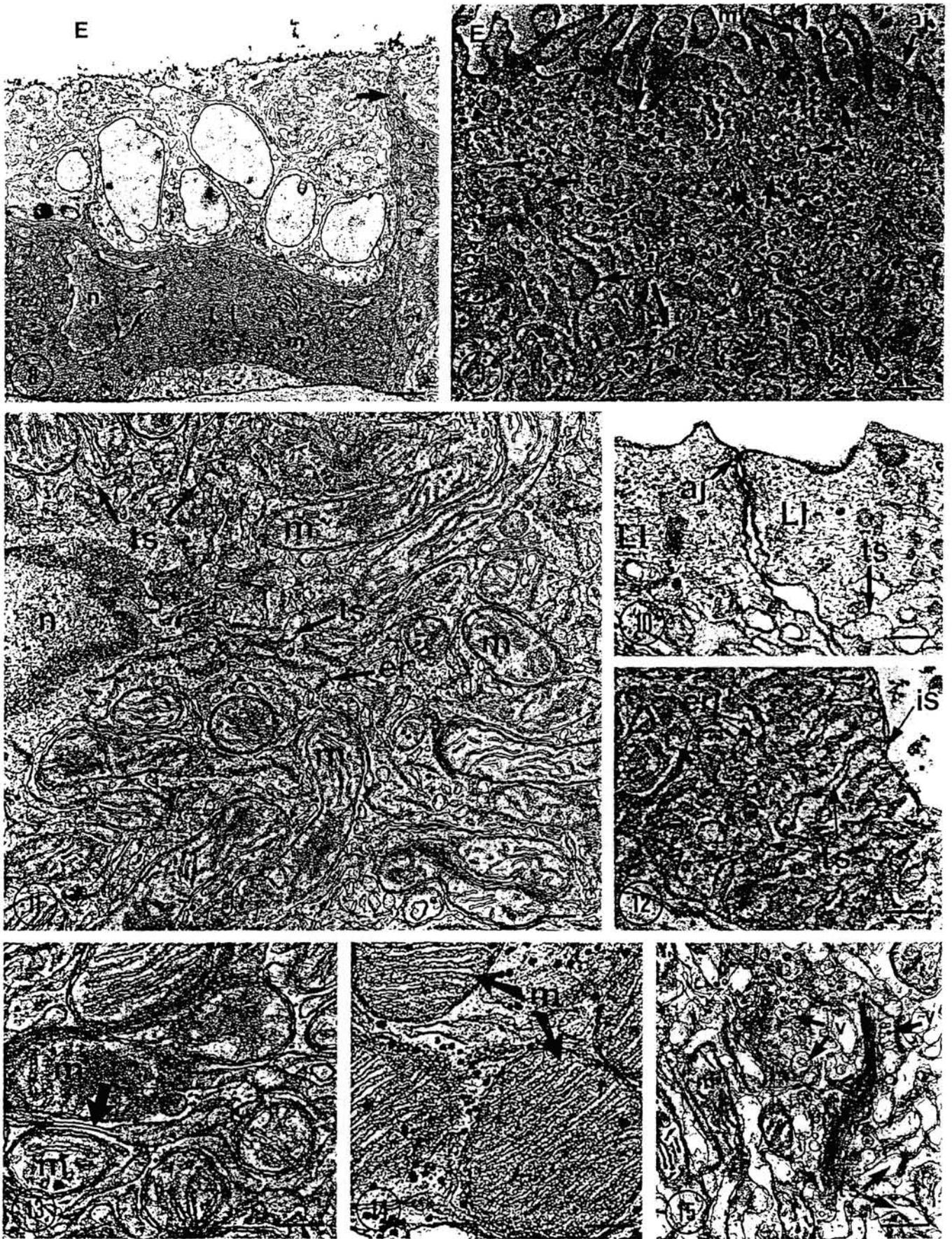
Fig. 11 Perinuclear region of a large ionocyte in trout. Numerous mitochondria (*m*) are observed between the flattened endoplasmic reticulum cisternae (*er*) and the slightly dilated tubular elements of the tubular system (*ts*). (*n* nucleus. $\times 22000$. Bar $0.3 \mu\text{m}$

Fig. 12 The dilated elements of the tubular system (*ts*) of a large ionocyte in turbot is open to the cell surface in the intercellular space (*IS*). In this area, which is devoid of mitochondria, the elements of the tubular system (*ts*) are easily distinguished from the flattened cisternae making up the endoplasmic reticulum (*er*). $\times 28000$. Bar $0.3 \mu\text{m}$

Fig. 13 Mitochondria (*m*) are in close contact with elements of the tubular system in a large ionocyte in trout. *Arrow* A tubular element is sandwiched between two mitochondria and is flattened. $\times 46000$. Bar $0.2 \mu\text{m}$

Fig. 14 The cristae of the mitochondria (*m*) in a large ionocyte of the turbot are more densely packed than in those of the trout (cf. Fig. 13). $\times 46000$. Bar $0.2 \mu\text{m}$

Fig. 15 Golgi area of a large ionocyte in trout. Tubulovesicular and cup-shaped elements (*v*) similar to those encountered in the apical subplasmalemmal region of the cell are frequently observed in close proximity to the stacks of saccules (*G*) of the Golgi apparatus (*m* mitochondrion, *ts* tubular system). $\times 18000$. Bar $0.5 \mu\text{m}$



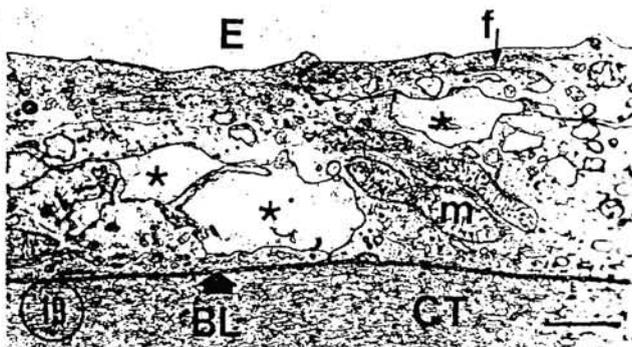
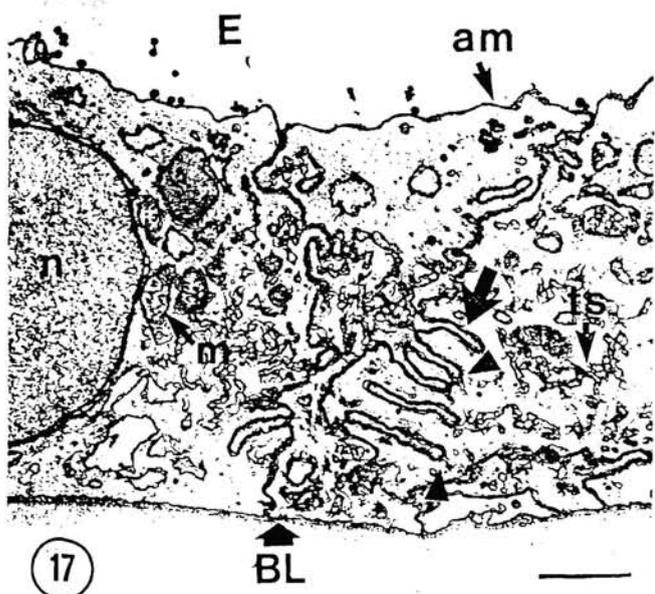
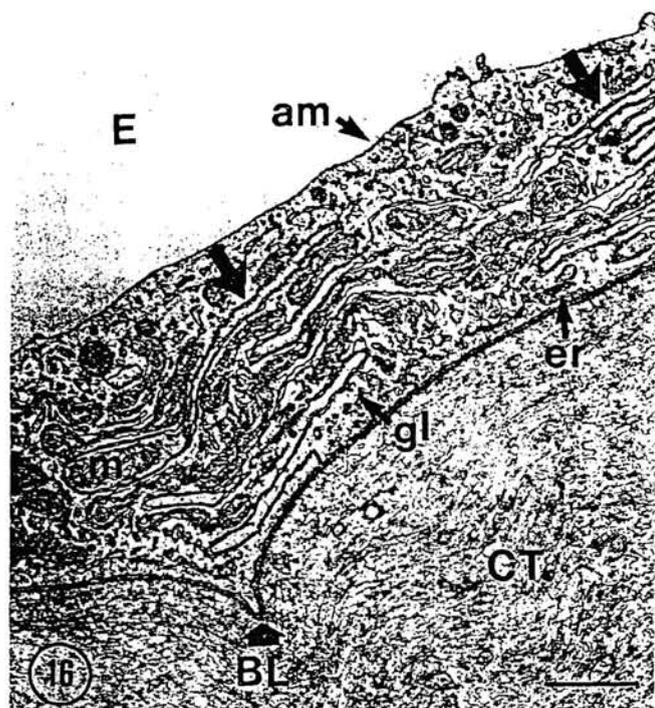


Fig. 16 Small ionocytes in the patches area of the turbot. The lateral plasma membranes of these flattened cells are highly infolded (arrows). The apical plasma membrane (am) facing the endolymph (E) is almost completely devoid of microvilli. A thin basal lamina (BL) separates the epithelial cells from the underlying connective tissue (CT). The mitochondria (m) are mainly encountered between the infoldings of the lateral plasma membrane (er flattened cisternae of the endoplasmic reticulum, gl glycogen particles). $\times 12000$. Bar $1 \mu\text{m}$

Fig. 17 Small ionocytes in the patches area of the trout. The cuboidal cells rest on a thin basal lamina (BL). Plasma membrane infoldings are mainly observed on the lateral surface (arrows) and are continuous (arrowheads) with elements of the tubular system (ts). which consists of anastomosed membranous tubules making up a network with irregular polygonal meshes. (E endolymph, am apical membrane, m mitochondria, n nucleus). $\times 12000$. Bar $1 \mu\text{m}$

Fig. 18 Epithelium of the intermediate area in turbot. In the vicinity of large ionocytes (LI) filled with mitochondria, the cells are cylindrical and display numerous dilated cisternae of endoplasmic reticulum containing a granulofilamentous material (er). Their apical plasma membrane is endowed with a few microvilli (mv). The lateral plasma membranes are straight. Small electron-dense granules (g) are found both in the Golgi area (G) and below the apical plasma membrane (E endolymph, n nucleus, m mitochondrion, gl glycogen particles, BL basal lamina, CT connective tissue). $\times 10000$. Bar $1 \mu\text{m}$

Fig. 19 Epithelium of the intermediate zone in turbot. In the vicinity of small ionocytes, the cells are flattened. The intercellular spaces (asterisks) are dilated (E endolymph, m mitochondrion, BL basal lamina, CT connective tissue, f filaments). $\times 10000$. Bar $1 \mu\text{m}$

wiched between mitochondria (Fig. 13). Tubular parts of the endoplasmic reticulum were more irregular in diameter, thinner, and more strongly contrasted than those of the tubular system (Figs. 11, 12). The Golgi apparatus consisted of stacks of anastomosed sacculotubular elements. On the apical side of the stacks, a "vesicular system" of pale vesicles (100 nm in diameter) accumulated in the apical region of the cell (Figs. 9, 15).

In the patches area, the groups of mitochondria-rich small ionocytes differed in appearance in the two species. In turbot (Fig. 16), they were flattened, with highly folded interdigitating lateral plasma membranes and numerous elongated mitochondria between the infoldings. Flattened cisternae of the endoplasmic reticulum were oriented parallel to the cell surfaces in the apical and basal regions of the cytoplasm. In trout (Fig. 17), the cells were more cuboidal in shape. The lateral plasma membrane infoldings and mitochondria were less numerous and less extensive than in turbot. In trout, the infoldings were in continuity on the cytoplasmic side with a network of anastomosed membranous tubules (~60 nm in diameter) with irregular meshes.

Cells in the intermediate area close to the meshwork area, were columnar (~10 μm in height; Fig. 18), with thin elongated apical microvilli. Infoldings of the lateral plasma membrane were less extensive than in the patches area and were restricted to the apical portion of the intercellular space. Some cells contained electron-dense granules in the apical region of the cytoplasm and an extensive Golgi apparatus. In all cells in both species, the endoplasmic reticulum was extensively developed and consisted of dilated cisternae filled with a granulofilamentous material. Near the patches area (Fig. 19), the cells were flattened (~3 μm in height) with a flat apical surface devoid of microvilli. The cytoplasm was relatively poor in cell organelles. The cisternae of the endoplasmic reticulum were moderately dilated, and mitochondria were scarce. The intercellular spaces were often dilated, particularly in the turbot.

Discussion

Most previous morphological studies on the inner ear of fish have concerned its neurosensory function (Popper 1976; Dale 1976; Saidel and Popper 1983; Becerra and Anadon 1993). However, because the composition of the endolymph is determined by the cells of the saccular epithelium, it is important to understand their location and functions.

The hair cells and their supporting cells have been described in the macula of various species of fish: goldfish (Hama 1969), carp and loach (Saito 1973), eel (Popper 1979), catfish (Jenkins 1979), and oscar (Popper et al. 1993). Some hair cells also contain numerous mitochondria, which could explain the fluorescence of the macula observed after DAPSMI treatment (Mayer-Gostan et al. 1997). The highly developed endoplasmic reticulum in the supporting cells suggests that, although they play a

supporting function through their numerous bundles of filaments, they may also have a secretory function (Dohleman 1971).

At the periphery of the macula, the granular cells possess endoplasmic reticulum cisternae distended by a granulofilamentous content and an apical accumulation of granules originating from the Golgi apparatus, strongly suggesting that these cells have a secretory function (Rambourg et al. 1988). They could thus play a role in endolymph secretion and otolith formation. Davis et al. (1995) have characterized an inner-ear-specific structural protein and shown that the expression of this saccular collagen is localized in cells that are located at the outer perimeter of the sensory surface and that they consider as "supporting cells". The granular cells, which are also abundant at the periphery of the macula, may well be their ultrastructural equivalent and might therefore be expected to secrete a material similar to collagens VIII and X, structural constituents of the otolithic membrane (Davis et al. 1995, 1997). Granules are also present in supporting cells in the inner ear in mammals such as fetal rats (Kawamata and Igarashi 1993) and gerbils (Tachibana et al. 1987; Tachibana and Morioka 1992), but, in these species, no preferential accumulation of such supporting cells has been observed.

Ionocytes have been observed in the perimacular epithelium, which is designated as a "transitional epithelium" in the goldfish (Saitoh 1990). In the inner ear of mammals (Kimura 1969), birds (Ishiyama et al. 1970), and batrachians (Oudar 1988), "dark cells" that have characteristics of ionocytes are also observed near the sensory cells. The appearance of a "meshwork" distribution of the large ionocytes in the perimacular area visualized in flattened tissue (Mayer-Gostan et al. 1997; Takagi 1997) is explained by the contacts between the pseudopods of the neighboring ionocytes. The meaning of this arrangement remains unclear. Popper and Hoxter (1981) have described mitochondria-rich cells with an extended endoplasmic reticulum in the sacculus of the blue gourami but do not mention the presence, in these cells, of a tubular system in continuity with the basolateral plasma membrane, such as we have observed; however, the cells probably correspond to the large ionocytes described in the present paper. Ultrastructurally, the large ionocytes have the characteristic features of ionocytes called "chloride cells", viz., three membranous systems (endoplasmic reticulum, tubular, and vesicular) and numerous mitochondria (Pisam 1981), in fish acclimatized to seawater (trout; Pisam et al. 1989) or seawater fish (turbot; Pisam et al. 1990). As in the chloride cells of fish gill, the exposure of the apical membrane to the outer medium is less extensive than that of the basal membrane to the inner medium. As a result, ionic exchanges between the ionocyte and the endolymph, which is in contact with the apical plasma membrane, are probably less important than those between this cell type and the perilymph on its laterobasal surface. As shown by DAPSMI labeling (Mayer-Gostan et al. 1997) and electron microscopy (Takagi 1997), the large ionocytes in trout are rich in mitochondria. They

also contain many Na^+/K^+ ATPase sites demonstrable by anthroyl ouabain or immunolabeling (Mayer-Gostan et al. 1997; Takagi 1997). The extensive development of basolateral membranes where this enzyme is probably located is consistent with these observations. Saccular ionocytes have all the characteristics of cells involved in active ion transport and could therefore maintain the differences in ionic composition between endolymph and plasma (Payan et al. 1997). Only small differences have been observed between trout and turbot ionocytes, which therefore probably fulfil similar functions and may be present in all species.

In the lateral wall of the sacculus of tilapia, Saitoh (1990) has reported ionocytes resembling in size and location the small ionocytes observed in the patches area of the present study, but no mention is made of a distribution in patches. The lateral infoldings of the plasma membrane and arrangement of mitochondria in the small ionocytes of the turbot are reminiscent of features of cells known to create a KCl gradient in the anal gland of insects (Berridge 1970). Elaborate interdigitations of the lateral cell membranes have also been observed in cells of the nasal gland of the lizard (Ellis and Goertemiller 1974); these cells secrete more K^+ than Na^+ (Shoemaker et al. 1972). The DAPSMI and anthroyl ouabain signal is lighter in small ionocytes than in large ionocytes (Mayer-Gostan et al. 1997). We therefore suggest that the small ionocytes observed in the patches could be the cells secreting K^+ , which is highly concentrated in the endolymph. Payan et al. (1997) have shown, in an in vitro study of the saccular epithelium, that proton secretion is driven by an energy-dependent mechanism involving ouabain-sensitive Na/K and amiloride-sensitive Na/H exchangers; the ionocytes are good candidates for the location of such exchangers, but whether the large and/or small ionocytes are involved is unknown. In the fish gill, chloride cells have also been shown to be responsible for calcium transfer (Payan et al. 1981; Perry and Wood 1985), but whether the ionocytes of the saccular epithelium contribute to calcium exchange between plasma and endolymph is also unknown.

Some of the columnar epithelial cells in the intermediate area near the large ionocytes have apical microvilli and apical granules and so could also be secretory cells, but, as with the granular cells, the nature of the secretory product and its role in the elaboration of the otolith remain to be investigated. The role of the thin epithelial cells observed in the patches area (Fig. 19) is also unknown.

In conclusion, the presence, in different locations, of two types of saccular ionocytes that may have specific functions has been confirmed. Cells with the morphological characteristics of the secretory cells in the macula and its periphery could be involved in the formation of the otolith and/or the otolithic membrane. The observations suggest that the endolymph could be a heterogeneous medium.

References

- Asano M, Mugiya Y (1993) Biochemical and calcium-binding properties of water-soluble proteins isolated from otoliths of the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Comp Biochem Physiol [B]* 104:201–205
- Becerra M, Anadon R (1993) Fine structure and development of ionocyte areas in the labyrinth of the trout (*Salmo trutta fario*). *J Anat* 183:463–474
- Bereiter-Hahn J (1976) Dimethylaminostyrylmethylpyridiniumiodide (DAPSMI) as a fluorescent probe for mitochondria in situ. *Biochim Biophys Acta* 423:1–14
- Berridge MJ (1970) A structural analysis of intestinal absorption. *Symp R Ent Soc Lond* 5:135–151
- Campana SE, Neilson JD (1980) Microstructure of fish otoliths. *Can J Fish Aquat Sci* 42:1014–1032
- Dale T (1976) The labyrinthine mechanoreceptor organs of the cod *Gadus morhua* L. (Teleostei:Gadidae); a scanning electron microscopic study, with special reference to the morphological polarization of the macular sensory cells. *Norw J Zool* 24:85–128
- Davis JG, Oberholtzer JC, Burns FR, Greene MI (1995) Molecular cloning and characterization of an inner ear-specific structural protein. *Science* 267:1031–1034
- Davis JG, Burns FR, Navaratnam D, Lee AM, Ichimiya S, Oberholtzer JC, Greene MI (1997) Identification of a structural constituent and one possible site of postembryonic formation of a teleost otolithic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:707–712
- Dohlman GF (1971) The attachment of the cupular, otolith and tectorial membranes to the sensory cell area. *Acta Otolaryngol* 51:435–438
- Dunkelberger DG, Dean JM, Watabe N (1980) The ultrastructure of the otolithic membrane and otolith of juvenile mummichog. *J Morphol* 163:367–377
- Ellis RA, Goertemiller CC (1974) Cytological effects of salt-stress and localization of transport adenosine triphosphatase in the lateral nasal glands of the desert iguana, *Dipsosaurus dorsalis*. *Anat Rec* 180:285–298
- Enger PR (1964) Ionic composition of the cranial and labyrinthine fluids and saccular DC potentials in fish. *Comp Biochem Physiol* 11:131–137
- Gauldie RW, Nelson DGA (1988) Aragonite twinning and neuroprotein secretion are the cause of daily growth rings in fish otoliths. *Comp Biochem Physiol [A]* 90:501–509
- Gauldie RW, Nelson DGA (1990) Otolith growth in fishes. *Comp Biochem Physiol [A]* 97:119–135
- Hama K (1969) A study on the fine structure of the saccular macula of the gold fish. *Z Zellforsch* 94:155–171
- Ishiyama M, Cult R, Keels W (1970) Ultrastructure of the tegmentum vasculosum and transitional zone. *Ann Otol Rhino and Laryngol* 79:997–1009
- Jenkins DB (1979) A transmission and scanning electron microscopy study of the saccular of five species of catfishes. *Am J Anat* 154:81–102
- Jones CM (1992) Development and application of the otolith increment technique. In: Stevenson DK, Campana SE (eds) Otolithic microstructure examination and analysis. Canadian Special Publication of Fish Aquatic Science, no. 117, pp 1–11
- Karnovsky MJ (1971) Use of ferrocyanide reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *Proc Soc Cell Biol Abstr* 284:146
- Kawamata S, Igarashi Y (1993) The fine structure of the developing otolithic organs of the rat. *Acta Otolaryngol [Suppl]* 504:30–37
- Khan KM, Drescher DG (1990) Proteins of the gelatinous layer of the trout saccular otolith membrane. *Hear Res* 43:149–158
- Kimura R (1969) Distribution, structure and function of dark cells in the vestibular labyrinth. *Ann Otol Rhino Laryngol* 78:542–561
- Mayer-Gostan N, Kossmann H, Watrin A, Payan P, Boeuf G (1997) Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*). *Cell Tissue Res* 289:53–61

- McCormick SD (1990) Fluorescent labelling of Na⁺, K⁺-ATPase in intact cells by use of a fluorescent derivative of ouabain: salinity and teleost chloride cells. *Cell Tissue Res* 260:259–533
- Mugiya Y, Takahashi K (1985) Chemical properties of the saccular endolymph in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* 36:57–63
- Oudar O, Ferrary E, Feldmann G (1988) Ultrastructural study of the semicircular canal cells of the frog *Rana esculenta*. *Anat Rec* 220:328–334
- Payan P, Mayer-Gostan N, Pang PKT (1981) Site of calcium uptake in the freshwater trout gill. *J Exp Zool* 216:346–347
- Payan P, Kossmann H, Watrin A, Mayer-Gostan N, Boeuf G (1997) Ionic composition of endolymph in teleosts: origin and importance of endolymph alkalinity. *J Exp Biol* 200:1905–1912
- Perry SF, Wood CM (1985) Kinetics of branchial uptake in the rainbow trout: effects of acclimation to various external calcium levels. *J Exp Biol* 116:411–434
- Pisam M (1981) Membranous systems in the chloride cell of teleost fish gill: their modifications in response to the salinity of the environment. *Anat Rec* 200:401–414
- Pisam M, Prunet P, Rambourg A (1989) Accessory cells in the gill epithelium of the freshwater rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Am J Anat* 184:311–320
- Pisam M, Boeuf G, Prunet P, Rambourg A (1990) Ultrastructural features of mitochondria-rich cells in stenohaline freshwater and seawater fishes. *Am J Anat* 187:21–31
- Popper AN (1976) Ultrastructure of the auditory regions in the inner ear of the lake whitefish. *Science* 192:1020–1023
- Popper AN (1979) Ultrastructure of the sacculus and lagena in a moray eel (*Gymnothorax* sp.). *J Morphol* 161:241–256
- Popper AN, Fay RR (1993) Sound detection and processing by fish: critical review and major research questions. *Brain Behav Evol* 41:14–38
- Popper AN, Hoxter B (1981) The fine structure of the sacculus and lagena of a teleost fish. *Hear Res* 5:245–263
- Popper AN, Saidel WM, Chang JSY (1993) Two types of sensory hair cell in the sacculus of the teleost fish. *Hear Res* 64:211–216
- Rambourg A, Clermont Y, Hermo L (1988) Formation of secretion granules in the Golgi apparatus of pancreatic cells of the rat. *Am J Anat* 183:187–199
- Saidel WM, Popper AN (1983) Spacial organization in the sacculus and lagena of a teleost: hair cell pattern and innervation. *J Morphol* 177:301–317
- Saito K (1973) Fine structure of macula of lagena in the teleost inner ear. *Acta Anat Nippon* 48:1–18
- Saitoh S (1990) Localization and ultrastructure of mitochondria-rich cells in the inner ears of goldfish and tilapia. *Jpn J Ichthyol* 37:49–55
- Shoemaker VH, Nagy KA, Bradshaw SD (1972) Studies on the control of electrolyte excretion by the nasal gland of the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Comp Biochem Physiol [A]* 42:749–773
- Sterkers O, Ferrary E, Amiel C (1988) Production of inner ear fluids. *Physiol Rev* 68:1083–1128
- Tachibana M, Morioka H (1992) Glucuronic acid containing glycosaminoglycans occur in otoconia: cytochemical evidence by hyaluronidase-gold labeling. *Hear Res* 62:11–15
- Tachibana M, Morioka H, Machino M, Tanimura F, Mizukochi O (1987) Cupulogenesis and glycoconjugates in the labyrinthine ampulla as revealed by WGA-gold labeling. *Arch Otorhinolaryngol* 244:112–116
- Takagi Y (1997) Meshwork arrangement of mitochondria-rich, Na⁺,K⁺-ATPase-rich cells in the saccular epithelium of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inner ear. *Anat Rec* 248:483–489
- Watrin A, Mayer-Gostan N (1996) Simultaneous recognition of ionocytes and mucus cells in the gill epithelium of turbot and in rat stomach. *J Exp Zool* 276:96–101

Daily variations of the saccular endolymph and plasma compositions in the turbot *Psetta maxima*: relationship with the diurnal rhythm in otolith formation

A. Edeyer¹, H. de Pontual^{1,*}, P. Payan³, H. Troadec¹, A. Sévère², N. Mayer-Gostan⁴

¹Laboratoire de Sclérochronologie des Animaux Aquatiques, IFREMER, DRV/RH/LASAA, and ²Laboratoire de Physiologie des poissons, IFREMER, DRV/RA, BP 70, 29280 Plouzané, France

³Laboratoire de Physiologie et Toxicologie Environnementale EA 2138, and ⁴Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire UMR CNRS 6548, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, BP 71, 06108 Nice Cedex 2, France

ABSTRACT: We studied the circadian variations of the ionic composition ($[Na^+]$, $[K^+]$, $[Cl^-]$), total CO_2 ($[tot\ CO_2]$), and protein concentration ($[protein]$) in the plasma and endolymph in the distal and proximal sides of the sacculus in the turbot *Psetta maxima*. Daily variations in total plasma calcium ($[tot\ Ca]$) were also recorded. Significant diurnal fluctuations occurred in most parameters and the spatial heterogeneity of the endolymph composition was maintained throughout a 24 h period. The main parameters implicated in otolith calcification, endolymph $[tot\ CO_2]$ and endolymph $[protein]$, fluctuated diurnally. $[tot\ CO_2]$ was highest and $[protein]$ lowest at night; the relative concentrations were reversed during the day. The inverse, alternating relationship of maximal and minimal $[tot\ CO_2]$ and $[protein]$ implies that calcium carbonate and organic matrix rates of deposition vary in antiphase. We therefore propose that in the turbot *P. maxima*, in autumn, the incremental zone (L-zone) is formed at night whereas the discontinuous zone (D-zone) is formed during the daytime.

KEY WORDS: Daily cycle · Endolymph · Otolith · Chemical composition · Teleost

INTRODUCTION

Teleost otoliths are calcareous structures involved in fish balancing and hearing processes (Fay 1980, Gauldie & Radtke 1990). They are composed of calcium carbonate, mainly in the mineral form of aragonite (Carlstrom 1963) and an organic matrix in which acidic amino acids dominate (Degens et al. 1969). Accretion occurs by successive depositions of incremental (calcium dominant) and discontinuous (matrix dominant) zones (Watabe et al. 1982, Morales-Nin 1987). In many fish the deposition of these 2 layers occurs throughout the day, producing a recognisable

daily increment (Pannella 1980). Since the structure and chemical composition of otoliths is scarcely modified after deposition, they can be considered as biological archives and are commonly used for age and growth estimations (Campana & Neilson 1985). They also allow studies on stock discrimination of exploited populations (Campana et al. 1995, Severin et al. 1995) and permit the characterisation of certain events in the life cycle (Kalish 1992, Otake et al. 1994, Secor et al. 1995).

In relation to the cyclic formation of otolith increments, several studies have suggested the importance of photoperiodicity (Taubert & Coble 1977, Tanaka et al. 1981, Radtke & Dean 1982). Tanaka et al. (1981) demonstrated that in *Tilapia nilotica* (L.), the order of formation of the incremental zone (L-zone) and discon-

*Corresponding author. E-mail: pontual@ifremer.fr

tinuous zone (D-zone) was photoperiod dependent, since a reversal of the light-dark cycle induced a reversal in the order of the 2 layers. It has also been shown that the daily rate of increment formation is maintained in juvenile fish after transfer to constant light (Campana 1984, Wright et al. 1991) or darkness (Radtke & Dean 1982). Mugiya (1987) and Wright et al. (1992) suggested that the rhythm in otolith calcification is controlled by a circadian variation in plasma chemistry, since they found that during the dark period there is a parallel decline in otolith calcification and total and free plasma calcium concentrations. Furthermore, Mugiya (1984) found a seasonal reversal in the rhythm of otolith calcification associated with a reversal in the plasma calcium cycle.

Fish have, in each inner ear, 3 otoliths bathed in endolymph within a sac. The largest otolith, called the sagitta, is located within the sacculus. Although the main characteristics of the endolymph have been described earlier (Mugiya & Takahashi 1985), it is only recently that endolymph samples have been analysed individually (Payan et al. 1997). It has been suggested that otolith biocalcification is related to endolymph composition (Romanek & Gauldie 1996). In a recent work Payan et al. (1999) showed that inside the sacculus the endolymph has a lack of spatial uniformity of its chemical composition, probably due to the presence of several types of ionocyte population on the 2 sides of the saccular epithelium which are probably concerned with active ion transport (Mayer-Gostan et al. 1997). Payan et al. (1999) proposed that the spatial heterogeneity of some parameters in the endolymph is necessary for the mineralization of the otolith. They suggested that CaCO_3 deposition is initiated on the proximal side of the otolith. When CaCO_3 is generated, a H^+ is produced which must be removed. As the saccular epithelium is relatively far from the mineralization site, the proximo-distal bicarbonate gradient would locally buffer the H^+ and help calcification to proceed all around the otolith. These authors also demonstrated a close relationship between the spatial heterogeneity in the K concentration of the endolymph and that of the otolith. Very little research has been carried out on daily variations in endolymph chemistry. Mugiya & Takahashi (1985) found simultaneous diurnal variations in plasma and endolymph [tot CO_2].

The present study was undertaken to determine, by sampling both distal and proximal zones, whether this endolymph heterogeneity is maintained throughout the diurnal cycle. Rhythms of otolith calcification reflect the chemical compositions of plasma and endolymph during the daily cycle. Diurnal profiles of plasma and endolymph concentrations of protein, carbon dioxide, sodium, potassium and chlorine, and also plasma calcium concentration were therefore made.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were carried out over the 2 days of 22 to 23 October 1997, on turbot *Psetta maxima* reared in running seawater at 18°C, and subjected to a photoperiodicity of 13 h light to 11 h darkness (the light period starting at 07:00 h). Turbot weighing about 400 to 500 g were fed once a day in the morning (around 10:00 h) but food was withheld 24 h prior to the beginning of the experiments. The fish were acclimated to the experimental conditions 3 wk before sampling.

Batches of 6 fish netted from the tank were taken at 3 h intervals. Blood was rapidly collected from the caudal vessels and centrifuged, the separated plasma being kept in a refrigerator until analysis. The techniques of endolymph and plasma sampling have been described previously (Payan et al. 1997, 1999). Briefly, after decapitating the fish and exposing the inner ear, 2 samples of endolymph of about 5 μl each were taken in the left sacculus using calibrated capillaries. The right sacculus was sampled in the same way immediately after. The sample withdrawn near the macula will be designed as 'proximal' while that from the opposite side will be designed as 'distal'. The endolymph contained in capillaries was stored in a refrigerator and analysed shortly after. The right sacculus samples were used to measure [protein], $[\text{Na}^+]$, $[\text{Cl}^-]$ and $[\text{K}^+]$, while [tot CO_2] was measured on samples of the left sacculus.

Plasma and endolymph were analysed as described in Payan et al. (1997). $[\text{Na}^+]$ and $[\text{K}^+]$ were measured by flame photometry. [tot Ca], $[\text{Cl}^-]$, [tot CO_2] and [protein] were measured by spectrophotometry using Sigma kits for the first 3 parameters and Comassie blue for proteins with BSA (bovin serum albumin) as standard. As fish were not anaesthetised in these experiments the level of stress and its variability were estimated by measuring the plasma cortisol concentrations by radioimmunoassay.

Data are expressed as means and standard errors. The diurnal cycles are analysed using univariate ANOVA after having checked variable normality. In case of deviation, a Kruskal and Wallis test was employed. A contrast analysis was used for the comparison of individual peaks or troughs with the initial value at 14:00 h. Significance was attributed at $p < 0.05$.

RESULTS

Plasma cortisol concentrations (mean 42.8 ± 5.32 ng ml^{-1}) did not vary significantly during the diurnal cycle. Values at the beginning (14:00 h) and at the end of experiments (14:00 h following day) were not significantly different.

To clarify the variations of endolymph composition and their relationships to those of plasma, the data for the 2 fluids are presented on the same graphs. First, the initial and final concentrations measured at the same hour of the day were compared, and although some variation was observed, none of the differences were significant. Statistical comparisons of the data against the reference initial value (corresponding to the midpoint of the daylight period) were made, except where mentioned.

Fig. 1 shows the daily variations of the concentrations of monovalent ions in plasma and endolymph (distal and proximal). $[Na^+]$ did not vary simultaneously in plasma and endolymph. Although the low levels occurred during the dark period in both fluids, the plasma concentration showed a significant minimum at 23:00 h ($p = 0.004$), whereas that of the distal endolymph was at 05:00 h ($p = 0.003$). Proximal endolymph $[Na^+]$ remained roughly stable throughout the cycle. There was no significant difference between the $[Na^+]$ of the proximal and distal endolymphs. Plasma $[K^+]$ variations were more or less similar to those of plasma $[Na^+]$ with low levels during the dark period and characterised by a significant minimum at 23:00 h ($p < 0.0001$). There were no corresponding variations of proximal and distal endolymph $[K^+]$ which fluctuated non-significantly around their means. The difference between proximal and distal endolymph $[K^+]$ was maintained throughout the cycle. $[Cl^-]$ varied simultaneously in plasma and distal endolymph. However, plasma $[Cl^-]$ fell to a significant minimum at 20:00 h ($p = 0.020$) whereas that of the distal endolymph was at 05:00 h ($p = 0.004$). No corresponding variations were seen in the proximal endolymph $[Cl^-]$.

Fig. 2 shows the diurnal variations of the main parameter contents involved in otolith calcification. Plasma $[tot\ Ca]$ values were high and stable between 20:00 h and 8:00 h (dark period) and significantly different from the initial concentration. Plasma $[tot\ Ca]$ and plasma $[tot\ CO_2]$ show synchronous variations with a significant positive correlation ($p = 0.006$). $[tot\ Ca]$ in the endolymph were not measured because too little endolymph could be sampled. In the 2 fluids, $[tot\ CO_2]$ varied simultaneously with high levels during the dark period (significant maxima at 05:00 h, with $p < 0.0001$, $p = 0.006$, and $p = 0.025$ for plasma, proximal endolymph and distal endolymph values respectively) whereas the low levels observed during the light period were not synchronous (minimum at 14:00 h in plasma and at 17:00 h in endolymph). In both plasma and proximal endolymph, the magnitude of the variations of $[tot\ CO_2]$ between the extreme values was substantial (81% for both media) during the 24 h period whereas it was only 47% in the distal endolymph. It is noteworthy that a difference of 3 mM between the

proximal and distal sides, within the sacculus, was maintained throughout the experiment. Plasma [protein] appeared to decline slightly during the 24 h period and were characterised by 2 significant minima, at 23:00 h ($p < 0.001$) and 11:00 h ($p < 0.001$). Endolymph [protein] clearly decreased during the dark period particularly in the proximal side. Between 20:00 and 02:00 h the magnitude of variation was 65 and 58% for proximal and distal sides, respectively. Nevertheless, a large scatter of the values obscured this phenomenon and none of the mean values was signifi-

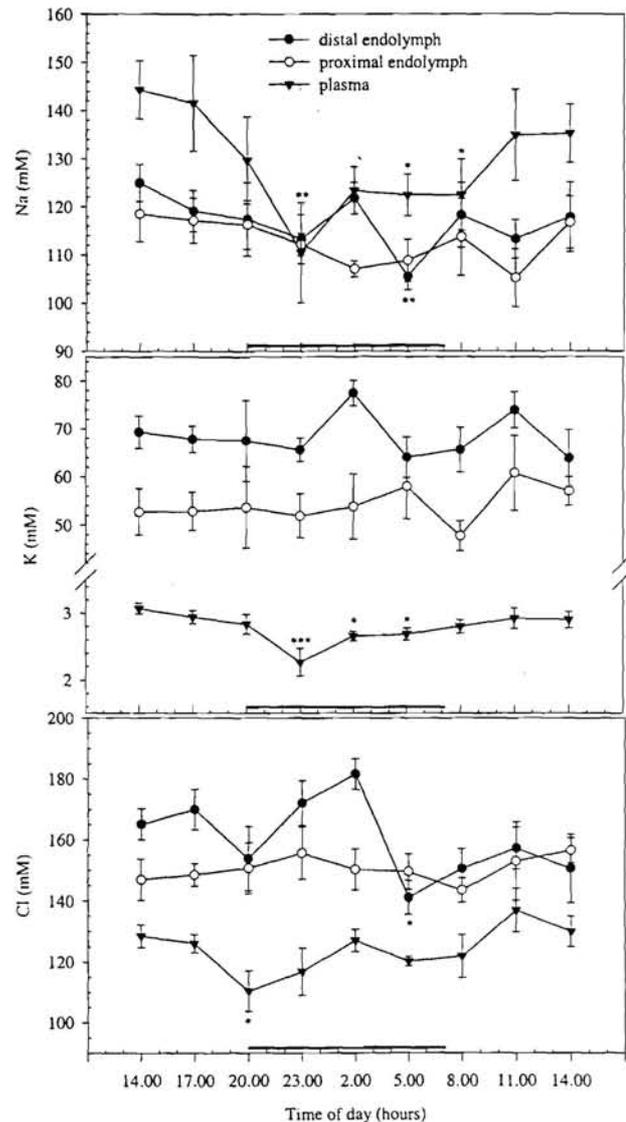


Fig. 1. *Psetta maxima*. Diurnal variations of $[Na^+]$, $[K^+]$ and $[Cl^-]$ in plasma (\blacktriangledown), proximal endolymph (\circ) and distal endolymph (\bullet) in the turbot. Each point represents the mean \pm SE of 6 fish. The dark horizontal bars indicate the nocturnal period. (Individual peaks or troughs were compared with the initial value at 14:00 h. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

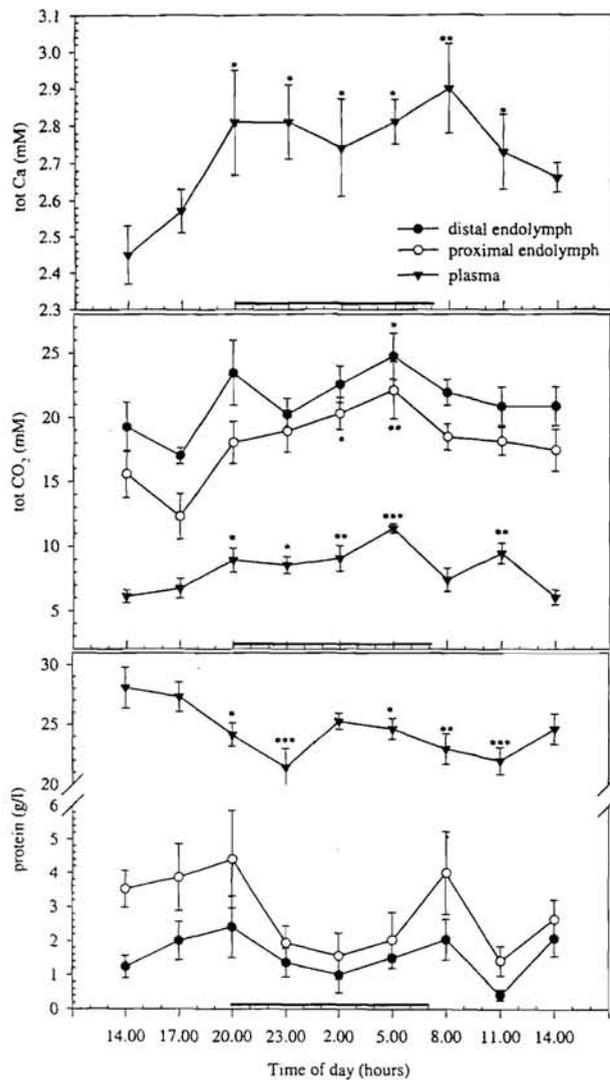


Fig. 2. *Psetta maxima*. Diurnal variations of [tot Ca], [tot CO₂], and [protein] in plasma (▼), proximal endolymph (○) and distal endolymph (●) in the turbot. Each point represents the mean \pm SE of 6 fish. The dark horizontal bars indicate the nocturnal period. (Individual peaks or troughs were compared with the initial value at 14:00 h. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

cantly different from the initial. However, a significant difference ($p = 0.005$) was observed between the pooled samples of proximal endolymph at 14:00, 17:00 and 20:00 h compared with those at 23:00, 02:00 and 05:00 h. The time profile of endolymph [protein] shows a second minimum at 11:00 h concomitant with a significant minimum in plasma [protein] perhaps in relation to the time at which fish were usually fed. The proximo-distal [protein] gradient was maintained throughout the cycle. Time variations of endolymph [protein] appeared to be reversed relative to those of [tot CO₂] and, although these parameters were measured on 2 different sacculi (see above), they showed a

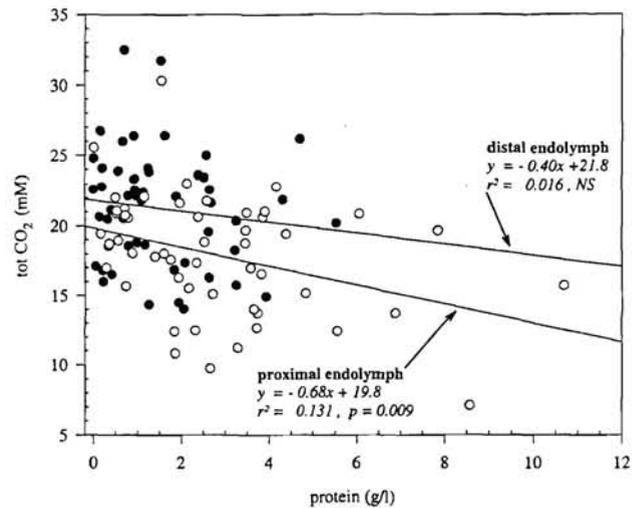


Fig. 3. *Psetta maxima*. Relationships between [tot CO₂] and [protein] of saccular endolymph, on proximal (○) and distal (●) sides

significant negative correlation ($p = 0.009$) in the proximal endolymph although it was not significant in the distal endolymph (Fig. 3).

[Na⁺], [K⁺], [Cl⁻] and [protein] were measured in the same sacculus, permitting the relationships between these different parameters to be evaluated. There were significant negative linear regressions of [K⁺] and [Cl⁻] compared with [protein] (data not shown). The relationships observed during the light period were preserved during the dark in spite of a lower [protein] during the latter. No correlation between endolymph [Na⁺] and endolymph [protein] was observed irrespective of side.

DISCUSSION

Could stress have influenced the experimental results?

In experiments in which samples are taken regularly over a period, stress via internal factors could either obscure or amplify the true cyclic physiological changes being studied. Björnsson et al. (1989), for example, showed that plasma levels of calcium increased significantly from the first to the tenth fish sampled and that the slopes of the linear regressions were similar in freshwater and seawater animals. The cortisol level is generally considered to be a good indicator of stress in fish. In the present study, cortisol concentrations were above the resting level, which is known to be very low in turbot (Waring et al. 1996, Person-Le Ruyet pers. comm.), indicating a stress which has already been recorded in turbot after confinement (Waring et al. 1996). The physical stress encountered

in the present study was probably complex: exposure to air before bleeding was generally brief (about 60 s) and all fish were similarly treated. We suggest that the observed high cortisol level was the result of the inevitable chasing and netting of the fish and the fact that they were not anaesthetised. This could explain the magnitude of the standard errors due to individual variability. Nycthemeral variations of cortisol have been reported in freshwater fish by Pickering & Pottinger (1983) and Gomez et al. (1996), who concluded that cortisol increases are intrinsic phenomena not caused by stress. To our knowledge similar studies have not been made with seawater fish. However, as the cortisol values did not vary significantly over the experimental period, we can assume that this factor did not bias the results.

Monovalent ion variations in plasma and endolymph

There are few studies of circadian variations in various blood and endolymph components in seawater adapted fish. In the endolymph, they only concerned a few parameters which were generally measured in pooled samples from different individuals. The present study is the first to analyse individual endolymph ionic compositions over a diurnal cycle by taking 2 samples from each sacculus.

Our results show diurnal fluctuations of plasma osmotic composition which are in agreement with those of Audet et al. (1993), although these authors also recorded important seasonal variations as well as species differences. In our experiments monovalent ion concentrations were lower during the dark period. We suggest that this is related to a lower level of activity at night. There are various ways to explain ion circadian variations, such as water loss or the reduction at night of passive ion influxes through the gills, probably associated with reduced drinking of seawater.

Individual ionic concentrations varied differently in endolymph and plasma. $[K^+]$ was significantly lower in the plasma at night but not in the endolymph, suggesting that endolymph $[K^+]$ does not directly depend on plasma $[K^+]$ and that its transfer through the saccular epithelium is controlled. The $[NaCl]$ variations in the distal region of the endolymph reflected those of the plasma but to a lesser degree, whereas in the proximal region $[NaCl]$ did not vary significantly. This result corroborates the hypothesis that Na^+ assumes a role in the mechanically sensitive transduction mechanism (Payan et al. 1999) which should remain functional throughout the daily cycle. Two different types of ionocyte have been observed in the saccular epithelium in the proximal and distal zones, respectively (Mayer-

Gostan et al. 1997). Although their specific relation to ion transport and regulation has not been demonstrated yet, they are undoubtedly involved in the movements of the monovalent ions which appear to maintain a stable environment on the proximal side around the sensorial cells of the macula.

[tot Ca], [tot CO_2] and [protein] variations in plasma and endolymph

Although calcium concentration is high in seawater, seawater fishes maintain a high (inside positive) trans-epithelial potential across the branchial epithelium (Maetz & Bornancin 1975) which is higher than the equilibrium potential for Ca^{2+} ; calcium entry through the gills must therefore be an active process which takes place via the transcellular route. The rate of gill calcium transport has been shown to vary following different cycles. For instance, gill calcium transport monitored 3 times weekly for 2 mo showed a 14 d cyclical pattern (Wagner et al. 1993), which in salmonids has been considered to be related to the cyclic pattern of weight gain (Wagner & McKeown 1985). Tahara & Mugiya (1996) observed a diurnal variation in the branchial calcium uptake of rainbow trout, similar to that of plasma [tot Ca] (Mugiya & Oka 1991). To our knowledge, no circadian [tot Ca] cycle in the plasma has been recorded in seawater fish. The present study clearly suggests that such a cycle exists in turbot *Psetta maxima*, at least in the autumn. More experiments are needed to determine if there is a seasonal reversal of the plasma [tot Ca] cycle similar to that observed by Mugiya (1984). Although endolymph [tot Ca] was not measured in the present study, there are arguments (see below) for considering that plasma [tot Ca] variations rapidly induce similar variations in the endolymph.

Our results agree with a previous report of diurnal variations of [tot CO_2] in plasma and saccular endolymph (Mugiya & Takahashi 1985). However, nothing has yet been published concerning endolymph [protein] time variations. Our results showed a considerable depletion of endolymph [protein] during the dark period. The magnitude of these changes cannot simply be explained by the amount of protein deposited as matrix on the otolith since the matrix deposit per day is much smaller than the decrease observed (there is an approximate deposition of 20 ng d^{-1} while the decrease observed in the endolymph is of the order of $\mu\text{g d}^{-1}$). Thus the decrease observed during the dark period could probably result from proteolysis potentially associated with a reduced process of synthesis and secretion. This hypothesis is in agreement with the existence of phases of activity/inactivity in protein biosynthesis and deposition already suggested by Mugiya (1987).

Moreover, the diurnal variations of [protein] and [tot CO₂] in the endolymph imply that calcium carbonate and organic matrix deposition rates vary in antiphase. The simultaneous variations in plasma and endolymph (on both proximal and distal sides) for some of the analysed parameters imply a close relationship between these 2 compartments. However it is not clear whether the variations depend on the plasma parameters alone or whether the saccular epithelium, which is known to be complex (Mayer-Gostan et al. 1997, Takagi 1997, Pisam et al. 1998), responds directly to specific hormonal controls which themselves show diurnal rhythms. In point of fact, both mechanisms are probably involved.

Maintenance of the gradient

Payan et al. (1999) showed that some of the components of endolymph are not uniformly distributed. In the present study, the differences between proximal and distal [K⁺], [tot CO₂] and [protein] appeared to be maintained during the diurnal cycle. Moreover, the relationships between [protein] and monovalent ions were similar to those described by Payan et al. (1999), and the correlations were concordant during the 2 periods (light and dark), indicating that the gradients of chemical components are maintained throughout the cycle. Payan et al. (1999) proposed that the [tot CO₂] and [protein] gradients in the endolymph are involved in otolith growth and could explain the asymmetrical shape of otoliths. Actually, the decreasing proximo-distal gradient in the [protein] endolymph would favor a greater matrix deposition on the proximal side of the otolith, resulting in differential otolith growth. The [protein] gradient is the consequence of the distribution of the various cell types in the saccular epithelium since it has been shown that the cells secreting organic material are located around the macula and in the proximal zone (Pisam et al. 1998, Takagi & Takahashi 1999). However, the present results do not afford any conclusion concerning the specific proteins of the otolith organic matrix.

Relationship between endolymph concentration rhythms and daily otolith increments

The inverse relationship between the diurnal rhythms of [tot CO₂] and [protein] found in the endolymph in the present study strongly suggests the occurrence of alternating phases of otolith calcification (L-zone formation) and organic matrix deposition (D-zone formation) on the otoliths: this is consistent with previous findings (Tanaka et al. 1981, Watabe et al. 1982,

Mugiya 1987). A decrease of [tot CO₂] in the endolymph has been observed after starvation (Payan et al. 1998), and the induced change in endolymph alkalinity has been related to a reduced rate of otolith growth in fasting fishes (Molony & Choat 1990, Umezawa & Tsukamoto 1991), corresponding to the reduction in calcium deposition observed by Mugiya & Oka (1991). The decrease of [tot CO₂] recorded in the present work was of the same order of magnitude and took place during the light periods, suggesting that mineralisation of the otolith occurred during the dark period. We were not able to measure endolymph [tot Ca], however the coincidence between the rise of plasma [tot Ca] and the decrease of plasma [protein], observed during the dark period, would presumably imply a nocturnal increase in plasma protein-free Ca ([Ca²⁺]). Moreover, investigations on the isolated sacculus indicated that the endolymph [Ca²⁺] is dependent on a transcellular active transport in the saccular epithelium which is sensitive to plasma [Ca²⁺] (Mugiya & Yoshida 1995). If that is also true in the turbot, a nocturnal increase in plasma [tot Ca] would be expected to induce a nocturnal increase in endolymph [tot Ca]. Finally, some authors have reported a parallel decline in plasma [tot Ca] and plasma [Ca²⁺] and otolith calcification in goldfish (Mugiya et al. 1981), rainbow trout (Mugiya 1984, Mugiya & Oka 1991) and salmon parr (Wright et al. 1992). These arguments support our hypothesis that endolymph [Ca²⁺] would have been greater during the dark period when [tot CO₂] was high and [protein] low. Such results lead us to suggest that, in *Psetta maxima* in the autumn, L-zones and D-zones are formed during the dark periods and light periods, respectively. Several studies have shown the opposite, with the mineral-rich zone of the otolith formed during the light period (Mugiya 1987, Wright et al. 1992, Zhang & Runham 1992). However, Mugiya (1984) found a seasonal reversal in the rhythm of otolith calcification associated with a reversal in the plasma [tot Ca] cycle. Further experiments are needed to determine whether the present results are specific to *P. maxima* or if there is also, in this species, a reversal rhythm with respect to the season.

The mechanisms which regulate otolith calcification are not yet fully elucidated. Wright (1991) demonstrated that the soluble matrix of salmon otoliths contains a glycoprotein capable of inhibiting calcification *in vitro*, even after crystallisation has begun. Consequently, the secretion of this protein into the endolymph would be expected to affect the rate of otolith mineralisation. Indeed diurnal variations in this protein secretion may periodically limit otolith mineralisation and explain the formation of the mineral deficient layer. Further investigation of endolymph protein characterisation is required.

Acknowledgements. This study was supported by IFREMER and A.E. is a recipient of a grant from IFREMER and the Brittany district. We are indebted to Mrs B. Maetz for correcting the manuscript.

LITERATURE CITED

- Audet C, Besner M, Munro J, Dutil JD (1993) Seasonal and diel variations of various blood parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). *Can J Zool* 71:611–618
- Björnsson BTh, Young G, Lin RJ, Deftos LJ, Bern HA (1989) Smoltification and seawater adaptation in cohosalmon (*Oncorhynchus kisutch*): plasma calcium regulation, osmoregulation, and calcitonin. *Gen Comp Endocrinol* 74: 346–354
- Campana SE (1984) Interactive effects of age and environmental modifiers on the production of daily growth increments in the otoliths of plainfin midshipman, *Porichthys notatus*. *Fish Bull US* 82:165–177
- Campana SE, Neilson JD (1985) Microstructure of fish otoliths. *Can J Fish Aquat Sci* 42:1014–1032
- Campana SE, Gagné JA, McLaren J (1995) Elemental fingerprinting of fish otoliths using ID-ICPMS. *Mar Ecol Prog Ser* 122:115–120
- Carlstrom D (1963) A crystallographic study of vertebrate otoliths. *Biol Bull* 125:441–463
- Degens ET, Deuser WG, Haedrich RL (1969) Molecular structure and composition of fish otoliths. *Mar Biol* 2:105–113
- Fay RR (1980) The goldfish ear codes the axis of acoustic particle motion in three dimensions. *Science* 225:951–963
- Gauldie RW, Radtke RL (1990) Using the physical dimensions of the semicircular canal as a probe to evaluate inner ear function in fishes. *Comp Biochem Physiol* 96A(1):199–203
- Gomez JM, Boujard T, Fostier A, LeBail PY (1996) Characterization of growth hormone nycthemeral plasma profiles in catheterized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Zool* 274:171–180
- Kalish JM (1992) Formation of a stress-induced chemical check in fish otoliths. *J Exp Mar Biol Ecol* 162:265–277
- Maetz J, Bornancin M (1975) Biochemical and biophysical aspects of salt excretion by chloride cells in teleosts. *Fortschr Zool* 23:322–362
- Mayer-Gostan N, Kossman H, Watrin A, Payan P, Boeuf G (1997) Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*). *Cell Tissue Res* 480:1–9
- Molony BW, Choat JH (1990) Otolith increment widths and somatic growth rate: the presence of a time-lag. *J Fish Biol* 37:541–551
- Morales-Nin B (1987) Ultrastructure of the organic and inorganic constituents of the otoliths of the sea bass. In: Summerfelt RC, Hall GE (eds) *The age and growth of fish*. Iowa State University Press, Ames, p 331–344
- Mugiya Y (1984) Diurnal rhythm in otolith formation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: seasonal reversal of the rhythm in relation to plasma calcium concentrations. *Comp Biochem Physiol* 78A(2):289–293
- Mugiya Y (1987) Phase difference between calcification and organic matrix formation in the diurnal growth of otoliths in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Bull* 85(3): 395–401
- Mugiya Y, Oka H (1991) Biochemical relationship between otolith and somatic growth in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: consequence of starvation, resumed feeding, and diel variations. *Fish Bull* 89:239–245
- Mugiya Y, Takahashi K (1985) Chemical properties of the saccular endolymph in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* 36(2):57–63
- Mugiya Y, Yoshida M (1995) Effects of calcium antagonists and other metabolic modulators on *in vitro* calcium deposition on otoliths in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Sci* 61(6):1026–1030
- Mugiya Y, Watabe N, Yamada J, Dean JM, Dunkelberger DG, Shimizu M (1981) Diurnal rhythm in otolith formation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol* 68A:659–662
- Otake T, Ishii T, Nakahara M, Nakamura R (1994) Drastic changes in otolith strontium/calcium ratios in leptocephali and glass eels of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Mar Ecol Prog Ser* 112:189–193
- Pannella G (1980) Growth pattern in fish sagittae. In: Rhoads DC, Lutz RA (eds) *Skeletal growth of aquatic organisms: biological records of environmental change*, Plenum Press, New York, p 519–560
- Payan P, Kossman H, Watrin A, Mayer-Gostan N, Boeuf G (1997) Ionic composition of endolymph in teleosts: origin and importance of endolymph alkalinity. *J Exp Biol* 200: 1905–1912
- Payan P, Borelli G, Boeuf G, Mayer-Gostan N (1998) Relationship between otolith and somatic growths: consequence of starvation on acid-base balance in plasma and endolymph in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem* 19:35–41
- Payan P, Edeyer A, de Pontual H, Borelli G, Boeuf G, Mayer-Gostan N (1999) Chemical composition of saccular endolymph and otolith in fish inner ear: lack of spatial uniformity. *Am J Physiol* 46:R123–R131
- Pickering AD, Pottinger TG (1983) Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen Comp Endocrinol* 49:232–239
- Pisam M, Payan P, Le Moal C, Edeyer A, Boeuf G, Mayer-Gostan N (1998) Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Psetta maxima*). *Cell Tissue Res* 294:261–270
- Radtke RL, Dean JM (1982) Increment formation in the embryos, larvae and juveniles of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Fish Bull US* 80:41–55
- Romanek CS, Gauldie RW (1996) A predictive model of otolith growth in fish based on the chemistry of the endolymph. *Comp Biochem Physiol* 114A:71–79
- Secor DH, Henderson-Arzapalo A, Piccoli PM (1995) Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *J Exp Mar Biol Ecol* 192:15–33
- Severin KP, Carroll J, Norcross BL (1995) Electron microprobe analysis of juvenile walleye pollock, *Theragra chalcogramma*, otoliths from Alaska: a pilot stock separation study. *Environ Biol Fish* 43:269–283
- Tahara D, Mugiya Y (1996) Diel variation in branchial calcium uptake by the rainbow trout. *J Fish Biol* 49:1034–1037
- Takagi Y (1997) Meshwork arrangement of mitochondria-rich, Na⁺-K⁺-ATPase rich cells in the saccular epithelium of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inner ear. *Anat Rec* 248:483–489
- Takagi Y, Takahashi A (1999) Characterization of otolith soluble-matrix producing cells in the saccular epithelium of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inner ear. *Anat Rec* 254:322–329
- Tanaka K, Mugiya Y, Yamada J (1981) Effects of photoperiod and feeding on daily growth patterns in otoliths of juvenile *Tilapia nilotica*. *Fish Bull* 79(3):459–466
- Taubert BD, Coble DW (1977) Daily rings in otoliths of three

- species of *Lepomis* and *Tilapia mossambica*. *J Fish Res Bd Can* 34:332–340
- Umezawa A, Tsukamoto K (1991) Factors influencing otolith increment formation in Japanese eel, *Anguilla japonica* T & S, elvers. *J Fish Biol* 39:211–223
- Wagner GF, McKeown BA (1985) Cyclical growth in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can J Zool* 63(10): 2473–2474
- Wagner GF, Fargher RC, Milliken C, McKeown BA, Copp DH (1993) The gill calcium transport cycle in rainbow trout is correlated with plasma levels of bioactive, not immunoreactive, stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol* 93:185–191
- Waring CP, Stagg RM, Poxton MG (1996) Physiological responses to handling in the turbot. *J Fish Biol* 48:161–173
- Watabe N, Tanaka K, Yamada J, Dean JM (1982) Scanning electron microscope observations of the organic matrix in the otolith of the teleost fish *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus) and *Tilapia Nilotica* (Linnaeus). *J Exp Mar Biol Ecol* 58:127–134
- Wright PJ (1991) Calcium binding by soluble matrix of the otoliths of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Biol* 38: 625–627
- Wright PJ, Rowe D, Thorpe JE (1991) Daily growth increments in the otoliths of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.) and the influence of environmental factors on their periodicity. *J Fish Biol* 39:103–113
- Wright PJ, Talbot C, Thorpe JE (1992) Otolith calcification in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L. and its relation to photoperiod and calcium metabolism. *J Fish Biol* 40:779–790
- Zhang Z, Runham NW (1992) Temporal deposition of incremental and discontinuous zones in the otoliths of *Oreochromis niloticus* (L.). *J Fish Biol* 40:333–339

Editorial responsibility: Otto Kinne (Editor), Oldendorf/Luhe, Germany

*Submitted: March 3, 1999; Accepted: April 23, 1999
Proofs received from author(s): December 27, 1999*

DEUXIEME PARTIE :

**REPERCUSSIONS DE DIVERSES PERTURBATIONS
ENVIRONNEMENTALES INDUITES SUR LE
COMPLEXE (PLASMA – ENDOLYMPHE – OTOLITHE).**

La formation des otolithes étant liée à des fluctuations de facteurs endogènes et exogènes, de nombreux travaux ont étudié la répercussion de facteurs environnementaux sur la croissance (micro, macrostructures et discontinuités, cf. introduction) et la composition chimique de l'otolithe. Les principaux facteurs environnementaux sont : la photopériode (discutée dans la partie précédente, cf. §4.), les caractéristiques physico-chimiques de l'eau (température, salinité, composition chimique), l'alimentation et le stress.

L'influence de la température de l'eau sur la croissance somatique et sur la formation des otolithes est bien documentée. Toutes les études menées sur différentes espèces montrent que les accroissements des otolithes sont plus étroits chez les poissons élevés dans des eaux à basse température (Zhang et Runham, 1992 ; Umezawa et Tsukamoto, 1991 ; Neilson et Geen, 1982 ; Neilson et Geen, 1985). Hoff et Fuiman (1993) ont montré que les poissons élevés à basse température possèdent des otolithes plus petits et moins denses ayant une teneur en matière organique plus forte que les poissons de même taille élevés à des températures plus hautes. Un abaissement brutal de la température se traduit sur l'otolithe par une discontinuité c'est à dire un ralentissement de la croissance (Karakiri et al., 1989 ; Lagardère, 1989 ; Campana et Jones, 1992). Ce phénomène a été exploité par Volk et al. (1990 ; 1994) pour effectuer des marquages d'otolithes sous forme de codes barres grâce à des stress répétés.

Concernant l'effet de la nourriture, Pannella (1980) a suggéré que la périodicité des accroissements des otolithes devait être liée à l'activité alimentaire. Certaines études ont montré que la fréquence des repas influençait à la fois le nombre et la largeur des zones de croissance de l'otolithe chez *Oncorhynchus tshawytscha* (Neilson et Geen, 1982), *Pleuronectes platessa* (Alhossaini et Pitcher, 1988), d'autres ont mis en évidence une indépendance de ces deux paramètres chez *Platichthys stellatus* (Campana, 1983 a), *Salmo salar* (Wright et al., 1992). De plus, des expériences ont montré que lors de la mise à jeun des poissons, les otolithes continuaient de croître selon un rythme journalier mais à un taux de croissance réduit (Marshall et Parker, 1982 ; Maillet et Checkley, 1989 ; Molony, 1996 ; Molony et Sheaves, 1998).

Un des facteurs environnementaux étudié concerne le stress qui peut avoir différentes origines : choc thermique, choc osmotique, jeûne, transport, capture (Pannella, 1980). Il est établi qu'un stress subi par un poisson se matérialise sur l'otolithe par une discontinuité (discontinuité structurale dont la magnitude reflète l'importance de l'événement qui l'a causé dans la vie du

poisson, Pannella (1980)). Campana (1983 b) a démontré que chez le saumon (*Oncorhynchus kisutch*), un stress induit une baisse de l'entrée branchiale de calcium, résultant en une baisse de la calcification de l'otolithe via probablement une diminution de la concentration plasmatique du calcium.

Les effets de ces facteurs environnementaux sur la croissance de l'otolithe sont désormais relativement bien connus. Un nouveau type d'étude, pour estimer l'impact de modifications environnementales sur l'otolithe, est actuellement en plein essor : la microchimie. Les éléments contenus dans les otolithes peuvent être classés en trois catégories en fonction de leur concentration : (1) élément majeur : Ca ($\approx 40\%$) ; (2) éléments mineurs ($>200\text{ppm}$) : Na, K, Sr ; (3) éléments traces ($<200\text{ppm}$) : Mg, Fe, Ni, Cu, Ba, Pb, Zn, Mn... (Pontual et al., 1998). Ces éléments mineurs et traces coprécipitent avec le CaCO_3 (aragonite généralement) durant la croissance des otolithes. Le principal compétiteur est le strontium (Sr^{2+}) qui possède la même valence (+2) et un rayon ionique comparable à celui du calcium (Ca $0,99\text{\AA}$; Sr $1,13\text{\AA}$) et se substitue ainsi au Ca lors de la précipitation (Kinsman et Holland, 1969). Ainsi, entrant dans la composition naturelle de l'otolithe, la plupart des études portent sur les variations du rapport Sr/Ca pour caractériser des événements vitaux :

(1) les migrations anadromes et catadromes liées à un changement environnemental de la salinité (Kalish, 1990 ; Tzeng et Tsai, 1994 ; Rieman et al., 1994 ; Halden et al., 1995 ; Radtke et al., 1995 ; Tzeng, 1995 ; Radtke et al., 1996) : la concentration en Sr de l'eau de mer est beaucoup plus élevée que celle de l'eau douce (Ingram et Sloan, 1992) ; le rapport Sr/Ca en eau de mer est généralement de 0,0087 (0,09mM/kg Sr : 10,3mM/kg Ca) (Bruland, 1983) alors qu'il est environ de 0,0019 ($68 \cdot 10^{-5}$ mM/kg Sr : 0,35mM/kg Ca) en eau douce (Rosenthal et al., 1970), ce rapport dépendant en fait de la dureté de l'eau douce. Cette différence de teneur en strontium de l'environnement se retrouve sur l'otolithe et permet de la relier à la migration.

(2) les changements de température de l'eau dans laquelle les poissons évoluent : beaucoup d'études ont montré l'existence d'une relation inverse entre la température et le rapport Sr/Ca (Radtke, 1989 ; Radtke et Morales-Nin, 1989 ; Townsend et al., 1989 ; Townsend et al., 1992 ; Tzeng, 1994 ; Townsend et al., 1995). Cependant, Mugiya et Tanaka (1995) ont montré que, chez *Carassius auratus*, cette relation se déclinait en deux relations, l'une positive pour des

températures comprises entre 16 et 24°C et l'autre négative entre 24 et 28°C. Arai et al. (1995) ont constaté que les éléments Mn, Fe, Zn et Sr augmentaient proportionnellement à la température. De plus, Arai et al. (1996) ont mis en évidence une relation positive entre la température et Sr/Ca des otolithes chez des poissons juvéniles et l'absence de cette relation chez des animaux deux fois plus âgés. Ainsi, l'effet de la température demeure incertain. Des études récentes n'ont pas trouvé de relation entre T°C et Sr (Gallahar et Kingsford, 1992 ; Limburg, 1995 ; Gallahar et Kingsford, 1996 ; Kawakami et al., 1998). Selon Sadovy et Severin (1992 ; 1994) cette relation serait plutôt indirecte et liée à l'augmentation de la croissance somatique.

(3) la composition de l'eau et de la nourriture : un enrichissement par du Sr de l'eau (Mugiya et Tanaka, 1995), ainsi que de la nourriture (Gallahar et Kingsford, 1996 ; Limburg, 1995), conduit à une augmentation du rapport Sr/Ca dans l'otolithe. Cependant Hoff et Fuiman (1995) ont montré que l'enrichissement de la nourriture par Na, Mg, K et Sr n'avait pas d'effet sur la composition chimique des otolithes.

(4) l'ontogénèse : la métamorphose semble être caractérisée par une chute du rapport Sr/Ca des otolithes (Tzeng, 1996 ; Arai et al., 1997 ; Otake et al., 1997 ; de Pontual, comm. pers.). Selon Otake et al. (1994), la chute, durant la métamorphose, du taux de glycoaminoglycans (GAG), qui possèdent une affinité pour le Sr, entraîne une réduction de l'absorption du Sr de l'eau de mer, conduisant à une baisse des concentrations de Sr dans l'otolithe. Des études récentes ont essayé d'utiliser les variations du rapport Sr/Ca pour la validation indirecte des estimations d'âge (Fuiman et Hoff, 1995 ; Mugiya et Satoh, 1995 ; Gauldie et al., 1995).

Malgré le nombre important de publications, les mécanismes responsables de ces modifications structurales et chimiques de l'otolithe dépendant de facteurs environnementaux ne sont pas clairement établis. Cela vient probablement du fait qu'entre le milieu externe et l'otolithe s'interposent deux compartiments en série : le milieu intérieur ou plasma dont le rôle naturel est de tamponner les variations du milieu externe et l'endolymphe. Au cours de ce transit, l'information environnementale est certainement atténuée voire transformée, ce qui rend très complexe la reconnaissance au niveau de l'otolithe des signatures environnementales.

Peu de travaux ont étudié les variations de composition de l'endolymphe et du plasma en parallèle à l'otolithe lors de changements environnementaux. Payan et al. (1998) ont mis en

évidence que la réduction du taux de croissance des otolithes lors de période de jeûne, qui correspond à une baisse du dépôt de CaCO_3 observée *in vitro* par Mugiya et Oka (1991), est corrélée à une diminution de l'alcalinité de l'endolymphe (i.e. la concentration du CO_2 total) tandis que les concentrations de protéines restent stables. Kalish (1991) a mis en évidence une relation linéaire positive entre les concentrations de Sr de l'endolymphe et du plasma, et entre celles de l'endolymphe et de l'otolithe, suggérant ainsi une étroite relation entre ces trois compartiments.

Dans le travail présenté ci-après, nous nous sommes attachés à étudier dans un premier temps les relations entre les compositions du plasma et de l'endolymphe lors d'un stress environnemental : la chloration de l'eau, puis nous avons étudié les relations entre les trois compartiments (plasma – endolymphe – otolithe) lors d'un changement de salinité et de température du milieu biotique.

1. Etude d'un facteur abiotique : la chloration de l'eau :

Le gaz chlore est un toxique biocide utilisé dans le traitement de l'eau potable et la présence de ce xénobiotique dans le milieu externe est une situation susceptible d'être rencontrée par les poissons d'aquarium ou dans certaines piscicultures d'eau douce. Les truites sont très sensibles au chlore et l'opportunité nous a été offerte par la compagnie qui gère la distribution de l'eau de la ville de Nice d'étudier l'effet d'un stress chronique de chlore sur le couplage fonctionnel entre plasma et endolymphe chez la truite. Cette opportunité ayant été fortuite, nous n'avons pu marquer les truites à la tétracycline avant le début de l'expérimentation et n'avons en conséquence pas étudié l'effet de ce stress environnemental sur la structure de l'otolithe. Cette étude a fait l'objet de la rédaction d'un article (voir après ce paragraphe) qui est en révision pour être soumis à publication (Edeyer et al.).

La chloration de l'eau a provoqué un dysfonctionnement des échanges ioniques (Na^+/H^+ -ATPase, échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) situés au niveau de l'épithélium branchial et responsables de l'équilibre hydrominéral et acido-basique de l'organisme. Cela s'est traduit au niveau plasmatique par un effondrement des concentrations en Na^+ et Cl^- (-40%), une rétention de CO_2 total (+40%) alors que le pH et les concentrations de protéines, Ca total, PO_4^{3-} et Mg^{2+} sont restés inchangés. L'hyperkaliémie observée (+80%) a probablement été due à une lésion des cellules musculaires sous l'action du chlore gazeux passé dans le milieu intérieur via l'épithélium branchial.

Ces perturbations ioniques plasmatiques observées chez les truites stressées ne se sont que partiellement répercutées sur la composition chimique de l'endolymphe. En effet, la diminution de la teneur en NaCl dans l'endolymphe était deux fois moins importante que dans le plasma et la $[\text{K}^+]$ est resté comparable malgré l'hyperkaliémie. Ces résultats suggèrent que vis à vis de l'équilibre osmotique, le compartiment endolymphatique est relativement « protégé » des variations plasmatiques, phénomène probablement en relation avec les fonctions primordiales d'équilibration et d'audition assurées par l'oreille interne.

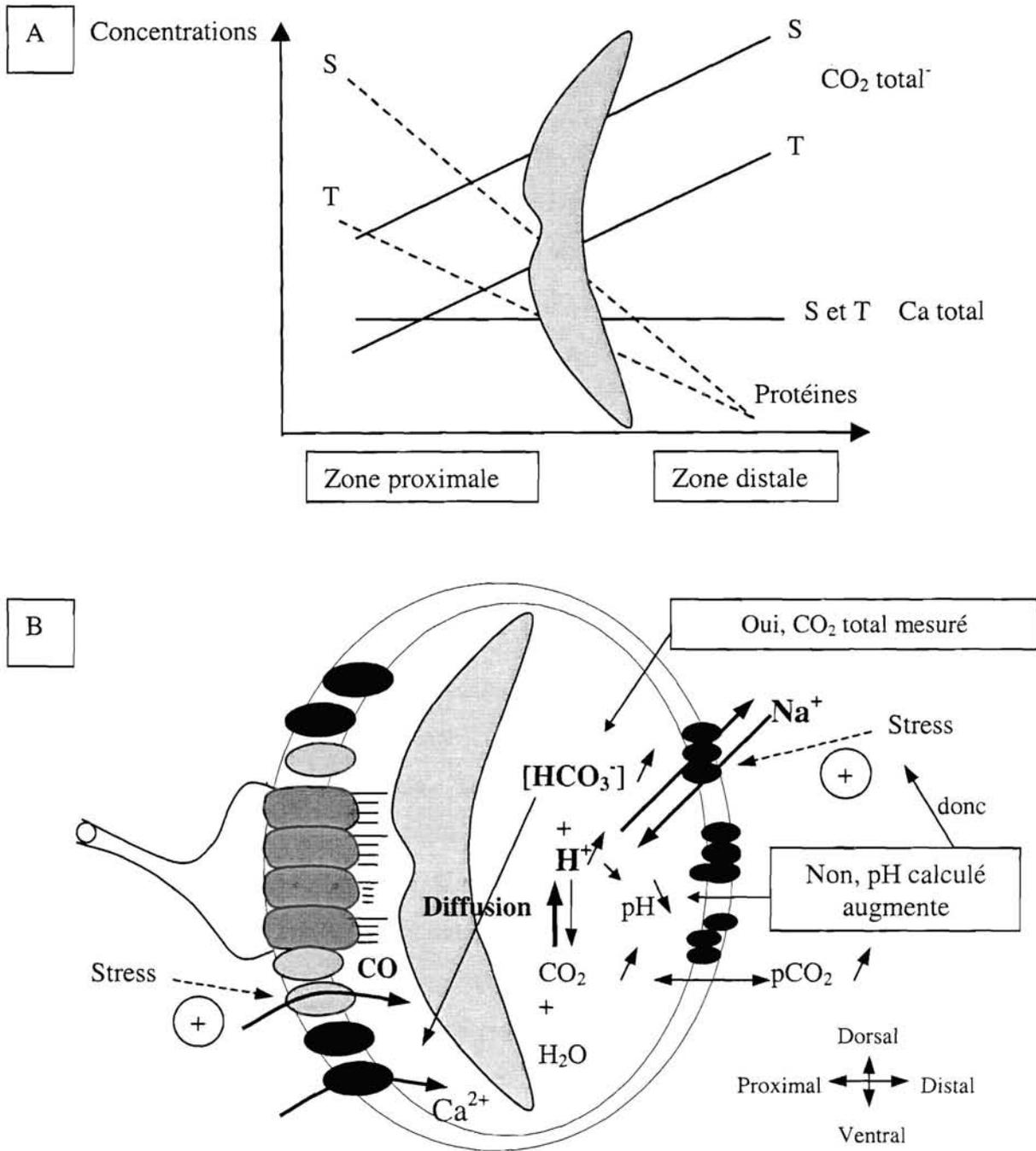


Figure 16 : A : Représentation schématique des variations de concentrations de CO₂ total, Ca total et protéines dans les zones distales et proximales, entre les truites stressées au chlore (S) et les témoins (T). B : Mécanismes hypothétiques (établis à partir des variations de la pCO₂ plasmatique pour les paramètres acido-basiques) impliqués dans les variations de la composition de l'endolymphe au travers des cellules de l'épithélium sacculaire lors du stress chloré. Le signe + est à associer à une stimulation.

Concernant les paramètres calcificateurs de l'endolymphe, le « stress chlore » a provoqué une augmentation très importante de la [Protéines] dans la zone proximale, une augmentation globale (côtés proximal et distal) du CO₂ total et aucune modification du Ca total (voir figure 16A). Il est probable, bien que non vérifié dans notre étude, que le « stress chlore » provoque aussi des dépôts anormaux sur l'otolithe. Par rapport à une situation normale de croissance de l'otolithe, comment peut-on interpréter les modifications de la chimie de l'endolymphe sous « stress chlore »?

(1) L'augmentation de la [Protéines] est cohérente avec un dépôt plus prononcé de matières organiques caractérisant habituellement une discontinuité de croissance de l'otolithe sous l'effet d'un stress. Il est intéressant de noter que cet effet s'observe uniquement dans la zone proximale qui baigne la macula, zone de sécrétion des protéines et de forte croissance de l'otolithe.

(2) L'évolution de la répartition du CO₂ total dans l'endolymphe chez les truites stressées est plus complexe à interpréter car nous observons une augmentation comparable du côté proximal (+15mM) et du côté distal (+14mM) (voir figure 16A). En admettant que l'hypercapnie observée lors de stress (pCO₂ plasmatique passe de 5,6 à 8,0 mmHg) se répercute dans l'endolymphe, compte tenu de la grande diffusabilité de ce gaz, nous devrions observer une acidose de type métabolique caractérisée par une augmentation du CO₂ total et une baisse du pH. Or, le calcul théorique du pH endolympatique (à l'aide des constantes plasmatiques pK CO₂/HCO₃⁻ = 5,86 à 14°C et α CO₂ = 0,059mmol.l⁻¹/mm Hg à 14°C, Albers 1970) fait apparaître une alcalose plus prononcée du côté proximal (+0,35 UpH) que du distal (+0,20 UpH). Plusieurs hypothèses peuvent être proposées sur l'origine et les conséquences de ce phénomène (figure 16B).

(a) L'augmentation distale de CO₂ total résulte probablement de la stimulation lors du stress de l'échangeur Na⁺/H⁺ précédemment localisé dans les ionocytes de la zone distale de l'épithélium. L'enlèvement d'ions H⁺ sans faire intervenir de mouvements transépithéliaux de HCO₃⁻ peut rendre compte des résultats.

- (b) L'augmentation du CO₂ total du côté proximal peut résulter de la simple diffusion d'une zone de forte concentration (distale) vers une zone de plus faible concentration (proximale) des ions HCO₃⁻.
- (c) L'augmentation plus importante du pH proximal résulte probablement de la forte augmentation du pouvoir tampon dans cette zone, consécutive à l'augmentation de la [Protéines].
- (d) Le maintien du gradient proximo-distal de CO₂ total, dans l'endolymphe chez les animaux stressés, conforte l'hypothèse développée précédemment qui expliquait son rôle dans la progression spatiale du dépôt de CaCO₃ autour de l'otolithe. L'intensité de ce gradient serait donc un vecteur indispensable au dépôt de CaCO₃ mais indépendant de l'importance du dépôt. Cette hypothèse doit être vérifiée dans d'autres conditions expérimentales.
- (e) Le rôle de la [CO₂ total] de l'endolymphe dans l'intensité du dépôt quotidien de CaCO₃ reste une question posée qui ne sera résolue que par l'analyse simultanée de ces deux paramètres. Une vue plus synthétique du rôle du niveau de CO₂ total endolympatique sera développée dans la discussion générale.

(3) Le dernier composant calcificateur concerne le Ca total de l'endolymphe qui reste comparable chez les animaux stressés. Il est difficile d'interpréter ce résultat sachant que (1) le taux de renouvellement du Ca total de l'endolymphe est très élevé et (2) la relation avec le dépôt de CaCO₃ intéresse essentiellement la forme ionisée du calcium, donnée actuellement indisponible dans nos études.

Il est clair qu'un schéma synthétique du rôle et de l'importance relative des différents précurseurs de la calcification ne pouvait raisonnablement être proposé à ce stade de notre recherche. Nous avons donc développé d'autres situations connues pour modifier la croissance et la microchimie de l'endolymphe.

Modification of endolymph composition in the inner ear of Cl₂-stressed trout (*Oncorhynchus mykiss*).

*Edeyer A., **Borelli G., *De Pontual H., ***Mayer-Gostan N., ****Boeuf G. and **P. Payan

*IFREMER, DRV, RH, Laboratoire de Sclérochronologie des Animaux Aquatiques, BP 70, 29280 PLOUZANE, FRANCE.

**Laboratoire de Physiologie et Toxicologie Environnementales, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06108 NICE Cedex 2, FRANCE.

***Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire, UMR CNRS 6458, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06108 NICE Cedex 2, FRANCE.

****IFREMER, DRV, RA, Laboratoire de Physiologie des Poissons, BP 70, 29280 PLOUZANE, FRANCE

Abbreviated title : Endolymph composition in Cl₂-stressed trout.

Mailing address : Professor Patrick Payan, Laboratoire de Physiologie et Toxicologie Environnementales, EA 2138, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, B.P. 71, 06108 NICE Cedex, FRANCE.

Tel. : (33) 04 92 07 68 95

Fax : (33) 04 92 07 65 63

E-Mail : payan@unice.fr

Abstract

The effects of a short period of Cl₂-stress (10 days) on the ionic balance (Na⁺, K⁺, Cl⁻, PO₄³⁻ and Mg²⁺), on the total Ca, total CO₂ and protein concentrations of plasma and endolymph in distal and proximal sides of the sacculus was studied in trout (*Oncorhynchus mykiss*). In plasma, Na⁺ and Cl⁻ decreased by 70mmol l⁻¹, while K⁺ increased by 2.0 mmol l⁻¹, in Cl₂-stressed trout. Cl₂-stress induced a metabolic alkalosis in plasma characterized by a significant rise of 40% of total CO₂. In endolymph, Na⁺ and Cl⁻ also decreased by 17-25% on both sides (distal and proximal) while K⁺, PO₄³⁻, total Ca and Mg²⁺ remained stable. In relation to otolith calcification, the most significant difference found between controls and stressed trouts was the increase of proteins and total CO₂ by respectively factors of 2.6 and 3.1 in the proximal side of the endolymph. The effect of the modification of endolymph composition on otolith is discussed in relation to environmental stress.

Key words : Teleost, Cl₂-stress, sacculus, otolith, endolymph, gradient.

Introduction

Many living organisms share the ability to record as a memory within their hard tissues the principal events of their lives (events related to the physical and physiological conditions of the surroundings). The otoliths found in the inner ear of the teleost fish are functionally equivalent to the otoconies of the vertebrate and are a striking example of this hard tissue memory. They are composed of carbonate of calcium, mainly in the mineral form of aragonite (Carlstrom, 1963), and of an organic womb made of proteins (Degens et al., 1969). Their growth is made by daily deposit of a bipartite structure composed of a large diurnal and highly mineralized zone and a narrow nocturnal and little mineralized zone (Pannella, 1971). The otoliths are assimilated to biological archives and are commonly used for : age and growth estimations (Campana & Neilson, 1985), studies on stock discrimination of exploited populations (Campana et al., 1995 ; Severin et al., 1995) and characterization of events in the vital cycle (Otake et al., 1994 ; Kalish, 1992 ; Secor et al., 1995 ; Arai et al., 1997).

While many works are found on the microchemistry of the otoliths, there is little work on the physiologic process of calcification and specifically on the relations between the chemical composition of the otolith and the endolymphatic fluid (in which the otolith bathes). In all vertebrates, the endolymphatic fluid (extracellular compartment) is very rich in K^+ and poor in NaCl and proteins (Sterkers et al., 1990). In the teleost, Na^+ concentrations are much higher than in mammals (110-140 mmol l^{-1} Fänge et al., 1972, against 3-40 mmol l^{-1} Sterkers et al., 1990). However, the most striking difference lies in the endolymph alkalinity in comparison with that of plasma (Mugiya & Takahashi, 1985), in mammals both are similar (Sterkers et al., 1988). This alkalinity is due to a CO_2 concentration higher in endolymph (30mmol l^{-1}), which is in relation with the continue growth of the otolith, than in plasma (15mmol l^{-1}) (Payan et al., 1997). Recently, Payan et al. (1999) in studying endolymph composition on different sites of the saccule in the trout and turbot have undoubtedly modified the usual approach on chemistry of the endolymphatic liquid in fish. The endolymph has a heterogeneous composition and presents gradients with most of its components. These authors have proposed that: (1) the protein gradient decreased from one hand of the saccule to the other (proximal to distal) and was in relation with the different axis of growth of the otolith, (2) increasing ionic gradients (HCO_3^- and Ca^{2+}) between proximal and distal sides of the saccule have a function in the process of the deposit of the mineral substance. Furthermore these authors have noticed a significant correlation of K^+ concentration spatial heterogeneity between the endolymph and the otolith.

Stressing situations, such as temperature changes, saline solutions, fasting periods..., leave discontinuities on the otolith (hazy areas rich in proteins called "cheks") interrupting the areas of daily growth (Pannella, 1980). The chemical genesis of this phenomenon remains poorly known but is probably due to the endolymph parameters (nature and concentration) which interact to the making of the otolith : (1) the proteins which at the start shape the organic matrix, (2) the Ca^{2+} and HCO_3^- which will form the $CaCO_3$ main component of the mineral part.

At this stage of our quest about the otolith physiology, it was worth while studying the effects of a change in the environment on the chemical composition of endolymph to help identify which of all the several components involved in otolith calcification were affected by external stress. This phenomenon has been approached in this study by the analysis of modifications induced by a chronic stress to chlorine, which is a toxic biocide used in the treatment of water and which could thus be met in the fish life.

Materials and methods

Fish handling

13 months old trouts (*Oncorhynchus mykiss*) coming from a local fish farm, have been reared in the following conditions : running tap water, temperature regulated at 14°C, constant photoperiod of 10h light and daily food distribution.

Environmental stress

In order to realise our experiments, we have purposely used the opportunity of the change of treatment from ozonisation to chlorination made by the city of Nice Water Company. Thus, a group of thirty trouts has been submitted to stress by progressive introduction of gaseous chlorine in the tap water canalizations. The final Cl₂ concentration of 25ng l⁻¹ was reached after three days. The samplings were made 10 days after the beginning of the stress. The samplings of the control trouts were made eight days before the beginning of the running water chlorination.

Collection of plasma and endolymph

Techniques of endolymph and plasma sampling are described by Payan et al. (1997 ; 1999). Briefly, a blood sample in the caudal vessels is made at the animal capture. The blood pH is immediately measured, then plasma collected after centrifugation is kept on ice until analysis. After fish decapitation, a 4-5 µl endolymph volume is sampled on each side of the otolith (distal and proximal) with a capillary tube connected to a micromanipulator and a withdrawal pump. The endolymph contained in capillaries is kept on ice until analysis.

Plasma and endolymph analysis

Protocols of plasma and endolymph analysis are detailed in Payan et al. (1997). Sodium (Na⁺) and potassium (K⁺) concentrations were measured by flame photometry. Calcium (Ca²⁺), chlorine (Cl⁻), magnesium (Mg²⁺), phosphorus (PO₄³⁻), total carbon dioxide (CO₂) and proteins were measured by spectrophotometry by using Sigma kits for the first five parameters and Commassie blue for proteins with BSA (Bovine Serum Albumin) as standard.

Statistics

Data are expressed as means and standard errors. Statistical analysis correspond to univariate ANOVA after checking of variables normality. In case of deviation, a Kruskal and Wallis test was employed. Significance was attributed to p<0.05.

Results

Effects of Cl₂-stress on plasma composition

Analysis show a collapse of plasmatic concentrations in Na⁺ and Cl⁻ (decrease of 70mmol l⁻¹, which means in relative value 40%) and an increase of kaliemy (+ 2.0 mmol l⁻¹ i.e. 81%) in stressed trouts. Concentrations of other ions (total Ca, PO₄³⁻, Mg²⁺) and proteins remained unchanged (Table I and figure 1).

Values of pH remained stable (Table II) while a significant increase of total CO₂ concentration was observed (+ 5.4mmol l⁻¹ i.e. 40%). The Henderson-Hasselbach relation which uses data of pH and total CO₂ (made with a pK CO₂-HCO₃⁻ value of 5.75 at 14°C, (Albers, 1970)) allows estimation of dissolved CO₂ concentrations. Dissolved CO₂ values increased significantly in stressed trouts (+ 0.14mmol l⁻¹ i.e. 44%), that involves a significant increase of the CO₂ partial pressure in plasma (+ 2.4 mmHg, results obtained with a CO₂ solubility coefficient of 0.057mmol l⁻¹/mmHg at 14°C, (Albers, 1970)).

Effects of Cl₂-stress on endolymph composition

Concerning the endolymph composition, a decrease of Na⁺ and Cl⁻ concentrations ranging from 17 to 25% in proximal and distal sides was observed in stressed trouts in comparison with the levels observed in control trouts. Values of the other ions (K⁺, total Ca, PO₄³⁻, Mg²⁺) remained unchanged (Table III and Fig. 1). Concerning the level of proteins and the total CO₂, significant differences were found (fig. 1). If protein concentration did not vary on the distal side, it increased significantly of a factor 2.6 at the proximal side (p<0.001). In the same way, a significant increase of total CO₂ was observed at the proximal side (factor 3.1 ; p<0.001) ; a lower but significant increase (factor 1.5 ; p=0.001) was also found at the distal side. Despite these important modified concentrations, the proximo-distal gradient of total CO₂ is preserved.

Relationships between monovalent ions and proteins

Monovalent ions and proteins measurements, on a same sample, allow the study of relationships between these different variables. The protein spatial distribution according to an important proximo-distal gradient makes the analysis of proteins/monovalents relationship particularly interesting (fig. 2).

In distal samplings, Na⁺/proteins and Cl⁻/proteins relationship observed in control trout are globally preserved in stressed individuals, with however a decrease of ordinates to the origin linked to the collapse of these two ions concentrations in endolymph during the stress. We note otherwise, for the stressed group, a decrease of the Na/distal proteins regression slope which remains however significant (p<0.001, R=0.65). The K⁺/proteins straight line, in stressed trouts, is not significant (R=0.18, p=0.08), though there is a K⁺/protein relationship in controls (R=0.79, p<0.000). This difference can be explained by the little moving of some samples to higher protein concentrations, while K⁺ values remain in the same order of magnitude.

Concerning proximal side endolymph, the most important difference between stressed animals and controls corresponds to the protein moving to higher concentrations. Relationships between Na⁺, Cl⁻ and proteins, which were not significant in controls, get it in stressed (respectively R=0.67, p<0.001 ; R=0.52, p=0.002). The K⁺/protein regression slope is inverted and is significant (R=0.30, p=0.034). This can be due to the combination of the scattering of protein concentrations with the maintenance of K⁺ values. This rise in proximal levels of proteins leads to an inversion of the K⁺/proteins relation at the proximal side in the stressed trouts whereas the ratio is unchanged on the distal side.

Discussion

Viability of stressed individuals

The viability of stressed individuals is an important criteria to justify the validity of obtained results. Various indicators prove it. The fact that divalent ions and phosphate concentrations are not altered by the shock with chlorine is the first argument, the plasma calcium levels specially known as an extremely well regulated parameter in teleost fishes (Hanssen et al., 1989). The plasma constant pH is another indicator of a satisfactory health state. In heterothermes as in fishes, the pH is an homeostasic parameter which must remain stable at constant temperature even to the detriment of other acido-basic parameters. The fact that pH remains stable despite an increase of total CO₂ and pCO₂ can be attributed to the perfectly adapted acid-base regulating systems. Otherwise, the study has been led on trouts in equilibrium. Effectively in spite of a high demineralization, Na⁺ and Cl⁻ plasmatic concentrations have remained stable during the 3 days of samplings. Finally, after darkening of their coat, which is a specific sign of stress, the stressed individual skin has then become clearer, which shows an adaptation phenomenon.

Origin of plasmatic perturbations in Cl₂-stressed trout

Fish exposure to stress usually induces endocrinologic reactions which in turn initiate secondary effects such as osmoregulatory dysfunctions (Barton and Iwama 1991). Indeed, in fresh water, stress causes a loss of ions and an uptake of water, resulting in a dilution of body fluid (review by Eddy 1981, Mac Donald et al., 1993, Mac Donald & Robinson, 1993). In the present work, stressed trout plasma was characterized by ionic and acid-base imbalance (decrease of NaCl, hyperkaliemia) (increase of total CO₂, hypercapny). The plasma changes observed can be linked to a dysfunction of the gill epithelium which constitutes the main contact surface with the external environment. The gill epithelium has effectively on the apical side two exchangers Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ which are both used in the regulation of acid-base balance by HCO₃⁻ and H⁺ excretion and in the regulation of ionic balance by Na⁺ and Cl⁻ absorption compensating the renal loss (Payan et al., 1984). The ionic imbalance observed in stressed trouts can be due to a dysfunction of these exchangers at the branchial level. Furthermore, the chronic inhibition of the functioning of these two exchangers can induce, at the end, a total CO₂ retention which would be then of a metabolic origin. The increase of kaliemy may reflect tissue suffering with specific lesions of muscular cells, induced by dissolved chlorine, leading to a liberation of potassium.

Osmotic equilibrium in endolymph in Cl₂-stressed trout

The analysis of monovalent ions in the endolymph (table III and figure 2) shows a general decrease in the concentration of these ions in the stressed trouts. This result is probably in relation with plasma demineralization usually reported in stressed animals (table I). Nevertheless it appears that the lowering of NaCl levels in the endolymphatic fluid is lessened (20%) compared to the decrease observed in plasma (40%). These results involving ions with osmotic activity (mainly NaCl) clearly suggest that the endolymphatic compartment of the inner ear has osmotic regulating systems which are very efficient. Furthermore, despite a high increase of plasmatic K⁺, distal and proximal K⁺ endolymphatic concentrations do not increase in a significant manner. In fact, inner ear functions being essential for fish survival, this compartment must be protected in

priority, even if plasmatic variations occur, to preserve that functional integrity. This protection giving a pseudo constancy of endolymph composition is probably dependent on the activity of different ionocytes constitutive of the saccular epithelium recently described (Mayer-Gostan et al., 1997 ; Takagi et al., 1997 ; Pisam et al., 1998).

The physiologic application of all these relations between monovalent ions and proteins brought into light by Payan et al. (1999) seems to be an osmotic compensation. Changes in these relations during stress due to Cl_2 are harder to analyse because both elements change at the same time. It is likely that the decrease of slope of the relation $Na/prot$ is a result of the high levels of proximal proteins associated to a global lessening of the Na level. For the potassium there is a totally dissociation between the proximal side and the distal side in the stressed trouts with an inversion of the correlation at the proximal side due to proximal high levels of proteins.

Environnemental Cl_2 -stress and processus of otolith calcification

Amongst the endolymph components taking part in the otolith calcification the only ones to be modified following a Cl_2 environmental stress in the trout are the proteins and the acid-base balance.

The rise in protein concentrations is only observed on the proximal side of the saccule which is in fact the area where the macula is nested (it is the sensitive part of the saccular epithelium under the influence of the central nervous system). This result meets those of the several studies on the subject (Pannella, 1980 ; Gauldie & Nelson, 1988 ; Pisam et al., 1998) who showed that this area was the endolymph protein secretion site by specialised cells. This suggests that all environmental events (here a chlorinated stress) would show an increase of proteins secretion first of all in the proximal side.

Concerning total CO_2 concentration, a very significant increase is observed in stressed trouts in distal and proximal sides with conservation of intra-endolymphatic gradient. The constants of Henderson-Hasselbach equation (pK and solubility coefficient) are not known for endolymph so the absolute pH value cannot be calculated. However, assuming that these parameters are constant and considering the rise in the levels of pCO_2 in the stressed trouts (table II), it appears that the proximal-distal gradient of pH goes from 0.45 in the control trout to 0.13 in the stressed trout. This is a consequence of an increased pH at the proximal side, the pH at the distal side remaining unchanged. All this suggests that similar to the protein factor, it is the macular area that is responsible of changes in the endolymph acid-base balance in the stressed trout. Furthermore, this increase of tot CO_2 is clearly higher in endolymph (mainly at the proximal side) than in plasma. Undoubtedly, there is a phenomenon of amplification in the saccular epithelium (the changes in the plasma acid-base balance can not explain through simple electrochemical reactions those recorded in the endolymph) whose the genesis and mechanistic support are not yet known.

In conclusion, our results clearly established a close relationship between an environmental stress and a change of the protein and acid-base balance in the endolymph with a leading role of the cells found in the macular area of the saccular epithelium. These results can be compared to a situation of fasting characterized by a decreased in the deposit of $CaCO_3$ on the otolith (Molony & Choat, 1990 ; Molony, 1996). During this period of fasting, Payan et al. (1998) have showed that the tot CO_2 concentration was significantly lessened in the endolymph. In the same study, the authors did not notice any changes in the endolymph proteins suggesting through

that these two elements may have a different evolution according to the environment to which they are submitted.

Acknowledgements :

This study was supported by IFREMER and A. Edeyer is a recipient of a grant from IFREMER and the Britain district. We are indebted to Mr A. Haddad for correcting the manuscript.

References

- Albers, C. (1970). Acid base balance in Fish Physiology. In *The nervous system, circulation and respiration* (Hoar, W.S. & Randall, D.J., eds), pp. 173-205. IV.
- Arai, T., Otake, T. & Tsukamoto, K. (1997). Drastic changes in otolith microstructure and microchemistry accompanying the onset of metamorphosis in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecology Progress Series* 161, 17-22.
- Barton, B. A. & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effect of corticosteroids. *Annual Review of Fish Disease* 1, 3-26.
- Campana, S. E. & Neilson, J. D. (1985). Microstructure of fish otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42, 1014-1032.
- Campana, S. E., Gagné, J. A. & Mc Laren, J. (1995). Elemental fingerprinting of fish otoliths using ID-ICPMS. *Marine Ecology Progress Series* 122, 115-120.
- Carlstrom, D. (1963). A crystallographic study of vertebrate otoliths. *Biological Bulletin* 125, 441-463.
- Degens, E. T., Deuser, W. G. & Haedrich, R. L. (1969). Molecular structure and composition of fish otoliths. *Marine Biology* 2, 105-113.
- Eddy, E. B. (1981). Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In *Stress and Fish* (Pickering, A. D., Eds), pp. 77-102. Academic Press, London/New-york.
- Fänge, R., Larsson, A. & Lidman, U. (1972). Fluids and jellies of the acusticolateralis system in relation to body fluids in *Coryphaenoides rupestris* and other fishes. *Marine Biology* 17, 180-185.
- Gauldie, R. W. & Nelson, D. G. A. (1988). Aragonite twinning and neuroprotein secretion are cause of daily growth rings in fish otoliths. *Comparative Biochemistry and Physiology* 90A, 501-509.
- Hanssen, R. G. J. M., Lafeber, F. P. J. G., Flik, G. & Wendelaar Bonga, S. E. (1989). Ionic and total calcium levels in the blood of the european eel (*Anguilla anguilla*) : effects of stanniectomy and stannioalcin replacement therapy. *Journal of Experimental Biology* 141, 177-186.
- Kalish, J. M. (1992). Formation of a stress-induced chemical check in fish otoliths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 162, 265-277.
- Mayer-Gostan, N., Kossman, H., Watrin, A., Payan, P. & Boeuf, G. (1997). Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*). *Cellular and Tissue Research* 480, 1-9.

- McDonald, D. G., Goldstein, M. D. & Mitton, C. (1993). Response of hatchery-reared trout, lake trout, and splake to transport stress. *Transactions of the American Fisheries Society* 106, 201-212.
- McDonald, D. G. & Robinson, J. G. (1993). Physiological response of lake trout to stress : effect of water hardness and genotype. *Transactions of the American Fisheries Society* 122, 1127-1138.
- Molony, B.W. (1996). Episodes of starvation are recorded in the otoliths of juvenile (*Ambassis vachelli* Chandidae), a tropical estuarine fish. *Marine Biology* 125, 439-446.
- Molony, B.W. & Choat, J.H. (1990). Otolith increment widths and somatic growth rate : the presence of a time lag. *Journal of Fish Biology* 37, 541-551.
- Mugiya, Y. & Takahashi, T. (1985). Chemical properties of the saccular endolymph in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University* 36, 57-63.
- Otake, T., Ishii, T., Nakahara, M. & Nakamura, R. (1994). Drastic changes in otolith strontium/calcium ratios in leptocephali and glass eels of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecology Progress Series* 112, 189-193.
- Pannella, G. (1971). Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science* 173, 1124-1127.
- Pannella, G. (1980). Growth pattern in fish sagittae. In *Skeletal growth of aquatic organisms: biological records of environmental change*. (Rhoads, D.C. & Lutz, R.A., eds), pp. 519-560. New York and London, Plenum press.
- Payan, P., Girard, J. P. & Mayer-Gostan, N. (1984). Ionic exchange across the gills of freshwater and seawater adapted teleost. *Fish Physiology* Vol X.
- Payan, P., Kossman, H., Watrin, A., Mayer-Gostan, N. & Boeuf, G. (1997). Ionic composition of endolymph in teleosts : origin and importance of endolymph alkalinity. *Journal of Experimental Biology* 200, 1905-1912.
- Payan, P., Borelli, G., Boeuf, G. & Mayer-Gostan, N. (1998). Relationship between otolith and somatic growth : consequence of starvation on acid-base balance in plasma and endolymph in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 35-41.
- Payan, P., Edeyer, A., De pontual, H., Borelli, G., Boeuf, G. & Mayer-Gostan, N. (1999). Chemical composition of saccular endolymph and otolith in fish inner ear : Lack of spatial uniformity. *American Journal of Physiology* (accepted).
- Pisam, M., Payan, P., Le Moal, C., Edeyer, A., Boeuf, G. & Mayer-Gostan, N. (1998). Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Psetta maxima*). *Cellular and Tissue Research* 294, 261-270.
- Secor, D.H., Henderson-Arzapalo, A. & Piccoli, P.M. (1995). Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 192, 15-33.
- Severin, K. P., Carroll, J. & Norcross, B. L. (1995). Electron microprobe analysis of juvenile walleye pollock, *Theragra chalcogramma*, otoliths from Alaska: a pilot stock separation study. *Environmental Biology of Fishes* 43, 269-283.
- Sterkers, O., Evelyne, F. & Claude, A. (1988). Production of inner ear fluids. *Physiological Reviews* 68, 4, 1083-1128.

- Sterkers, O., Tran Ba Huy, P. & Ferrary, E. (1990). Physiologie des liquides de l'oreille interne. In *Données actuelles sur la physiologie et la pathologie de l'oreille interne* (Morgon et al., eds), pp. 93-135. Arnette, Paris.
- Takagi, Y. (1997). Meshwork arrangement of mitochondria-rich, Na⁺-K⁺-ATPase rich cells in the saccular epithelium of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inner ear. *Anatomical Record* 248, 483-489.

Legend of figures

Figure 1. Effects of Cl₂ stress on tot Ca, CO₂ and protein concentrations of plasma, distal and proximal endolymph in trout. Mean ± SE.

Figure 2. Relationship between monovalent ions and protein concentrations of saccular endolymph, in distal (triangle) and proximal (square) sides, in control (black points) and Cl₂ stressed trouts (open points).

Table I : **Ions concentrations of plasma in control and Cl₂ stressed trouts (*O. Mykiss*).**

(ANOVA and non parametric test Kruskal-Wallis).

	Control trouts	Cl₂ Stressed trouts	p values
Na⁺ (mmol l⁻¹)	170.8 ± 2.75 (6)	100.9 ± 4.09 (9)	0.000
Cl⁻ (mmol l⁻¹)	150.7 ± 3.63 (6)	83.8 ± 4.46 (9)	0.000
K⁺ (mmol l⁻¹)	2.48 ± 0.153 (6)	4.49 ± 0.186 (9)	0.000
PO₄³⁻ (mmol l⁻¹)	3.67 ± 0.418 (7)	3.63 ± 0.235 (5)	0.928
Mg²⁺ (mmol l⁻¹)	0.63 ± 0.088 (6)	0.69 ± 0.187 (5)	0.929

Mean ± SE.

() : number of measurements.

p values : comparison between control and Cl₂ stressed trouts.

Table II : **Acido-basic balance in plasma of control and Cl₂ stressed trouts (*O. Mykiss*).** (non parametric test Kruskal-Wallis).

	Control trouts	Cl₂ stressed trouts	p values
pH	7.37 ± 0.030 (5)	7.36 ± 0.031 (8)	0.741
CO₂ total (mmol l⁻¹)	13.7 ± 0.59 (5)	19.1 ± 1.40 (8)	0.008
CO₂ dissolved (mmol l⁻¹)	0.32 ± 0.016 (5)	0.46 ± 0.034 (8)	0.008
p CO₂ (mm Hg)	5.58 ± 0.295 (5)	7.98 ± 0.567 (8)	0.008

Mean ± SE.

() : number of measurements.

p values : comparison between control and Cl₂ stressed trouts.

Table III : Ions concentrations of saccular endolymph in control and Cl₂ stressed trouts (*O. Mykiss*). (ANOVA and non parametric test Kruskal-Wallis).

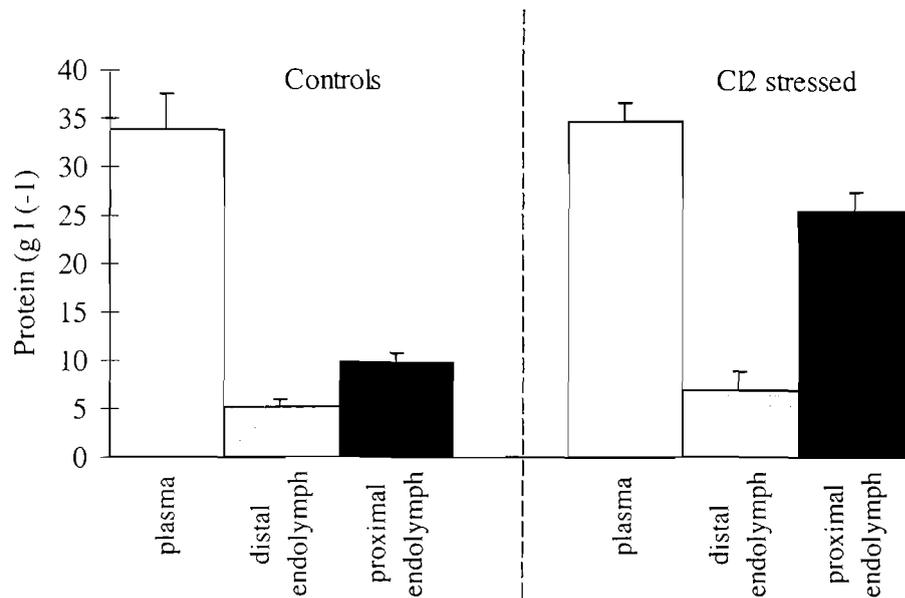
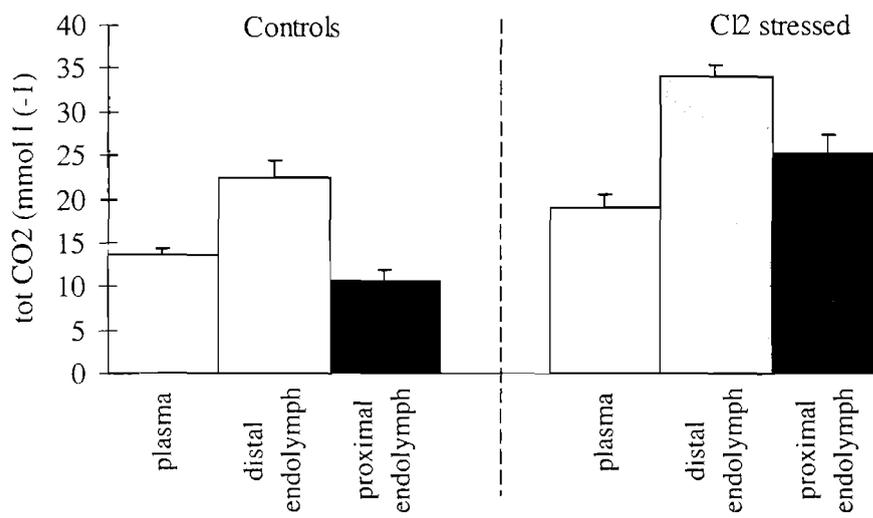
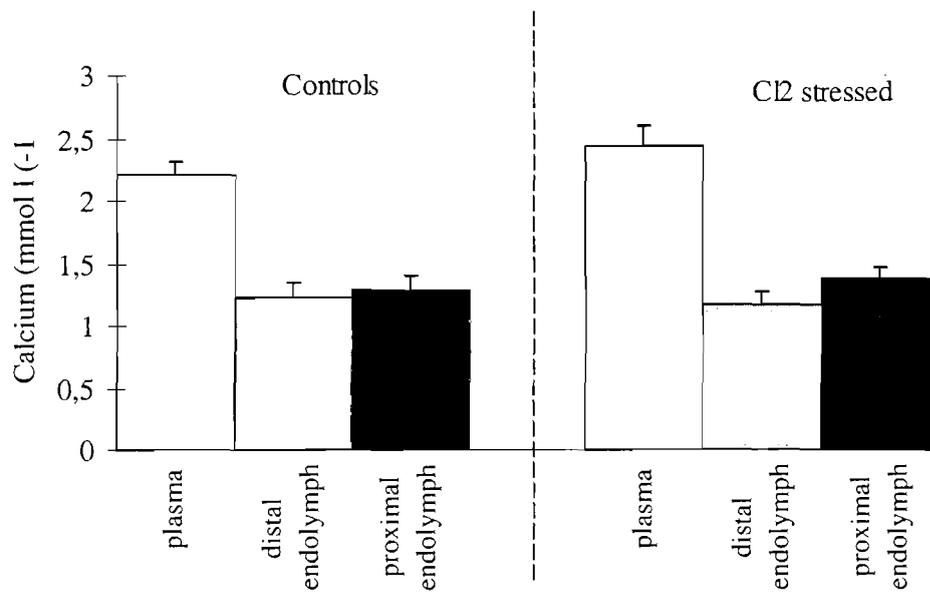
Proximal endolymph			
	Control trouts	Cl₂ stressed trouts	p values
Na⁺ (mmol l⁻¹)	131.9 ± 6.15 (16)	109.0 ± 4.94 (16)	0.007
Cl⁻ (mmol l⁻¹)	151.1 ± 5.72 (15)	110.9 ± 6.06 (16)	0.000
K⁺ (mmol l⁻¹)	18.5 ± 4.07 (15)	14.7 ± 2.96 (16)	0.456
PO₄³⁻ (mmol l⁻¹)	2.12 ± 0.262 (13)	1.85 ± 0.327 (10)	0.526
Mg²⁺ (mmol l⁻¹)	0.45 ± 0.070 (8)	0.51 ± 0.063 (7)	0.549

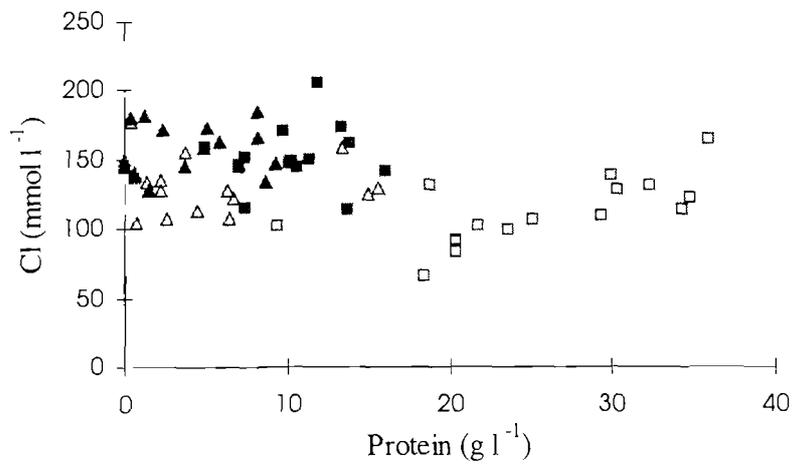
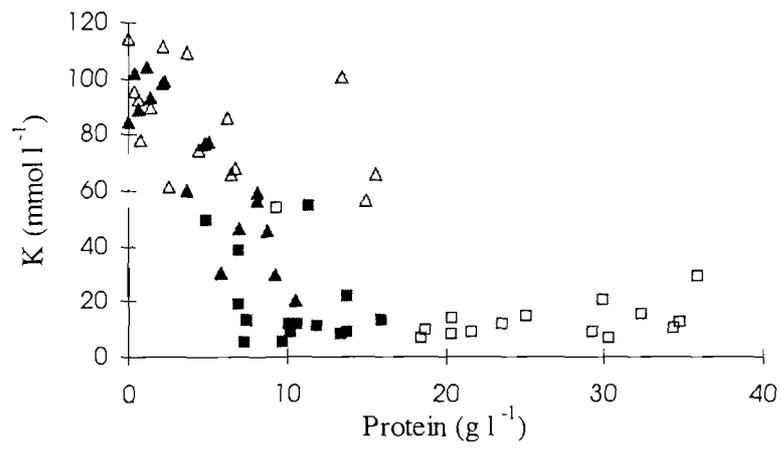
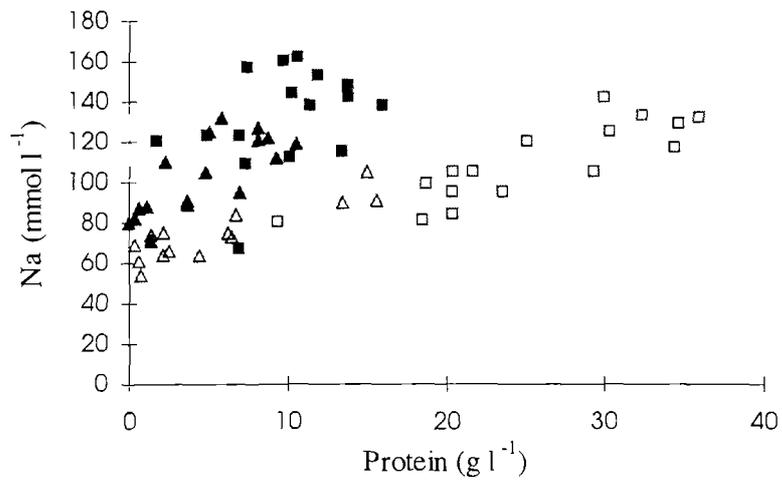
Distal endolymph			
	Control trouts	Cl₂ stressed trouts	p values
Na⁺ (mmol l⁻¹)	104.0 ± 4.87 (16)	78.4 ± 3.83 (18)	0.004
Cl⁻ (mmol l⁻¹)	157.4 ± 4.75 (15)	130.8 ± 4.86 (18)	0.001
K⁺ (mmol l⁻¹)	67.0 ± 6.90 (16)	80.8 ± 6.21 (18)	0.083
PO₄³⁻ (mmol l⁻¹)	0.64 ± 0.232 (11)	0.44 ± 0.179 (10)	0.513
Mg²⁺ (mmol l⁻¹)	0.21 ± 0.045 (9)	0.14 ± 0.035 (8)	0.294

Mean ± SE.

() : number of measurements.

p values : comparison between control and Cl₂ stressed trouts.





2. Etude de deux facteurs abiotiques : salinité et température de l'eau :

La salinité et la température sont les deux facteurs environnementaux abiotiques les plus étudiés dans la littérature, aussi bien au niveau de la physiologie de l'organisme que sur la microchimie de l'otolithe par l'analyse du rapport Sr/Ca en particulier (cf. introduction de la 2^e partie). Nous avons choisi de faire varier ces deux paramètres dans les limites qui provoquent des effets sur la croissance pondérale ainsi que sur la croissance et ou la microchimie de l'otolithe (Clarke et al., 1981 ; Radtke et Shafer, 1992). Le but de ces expériences est d'étudier les relations entre les différents compartiments (plasma – endolymphe - otolithe) qui assurent le transfert de l'information environnementale vers le processus de calcification de l'otolithe. Nous avons suivi ces différents paramètres pendant une semaine après le transfert rapide (choc salin et choc de température) et sur des animaux élevés pendant 6 semaines après le transfert et que l'on peut considérer comme complètement adaptés.

Nous insisterons sur les résultats obtenus chez les animaux pleinement adaptés à leur milieu, la phase de transition (expériences « court terme » qui couvrent les 7 jours suivant le transfert de température ou de salinité) n'ayant pas donné lieu à l'analyse de la croissance ou de la microchimie de l'otolithe. Cette phase adaptative nous renseigne uniquement sur l'évolution transitoire de l'homéostasie plasmatique et de la chimie de l'endolymphe i.e. des relations fonctionnelles entre ces deux compartiments.

Les résultats de ces études doivent faire l'objet de la rédaction de 3 articles.

2.1. Matériels et méthodes :

L'expérience a été menée durant 6 semaines entre septembre et novembre 1998, sur des turbots (*Psetta maxima*), élevés sous une photopériodicité de 16h de lumière et 8h d'obscurité. Les poissons pesant 350g environ ont été nourris à l'aide d'un distributeur automatique. Afin de marquer l'otolithe, une injection de tétracycline (50mg/kg) dans la cavité intrapéritonéale a été faite 8 jours avant le début de l'expérience.

A partir d'une cohorte de 200 turbots élevés à 35‰ et 17°C, 5 lots ont été séparés et élevés selon des conditions différentes (tableau 2) pour étudier l'effet de la salinité et de la température régulièrement pendant les 7 premiers jours après le changement environnemental puis au bout de 6 semaines.

<i>Lots</i>	<i>Nombre de turbots</i>	<i>Conditions d'élevage</i>
1	40	35‰ 17°C durant 6 semaines
2	40	8‰ 17°C durant 6 semaines
3	20	35‰ 10°C durant 6 semaines
4	50	35‰ 10°C durant 6 semaines puis 35‰ 17°C pendant 7 jours
5	50	35‰ 17°C durant 6 semaines puis 8‰ 17°C pendant 7 jours

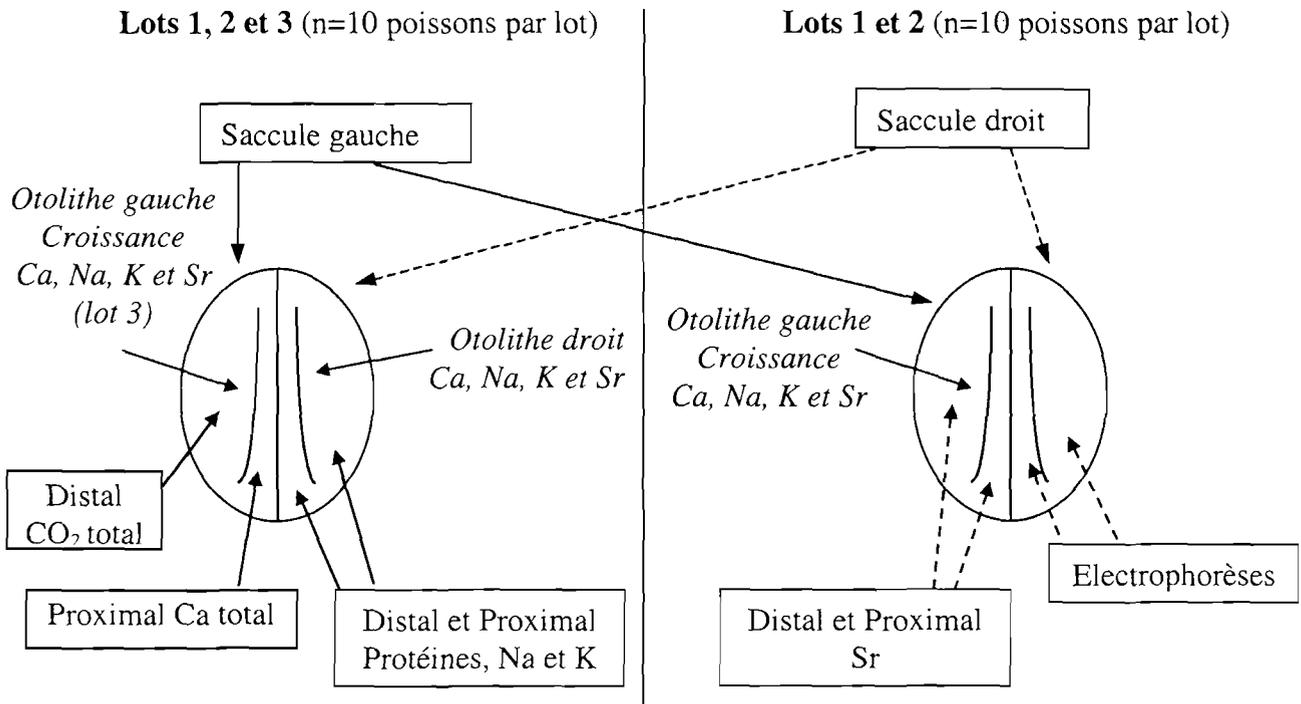
Tableau 2 : Conditions d'élevage des divers lots de poissons.

La croissance somatique des poissons, en fonction des conditions d'élevage, a été suivie en effectuant une pesée de tous les individus en début et fin d'expérience.

Pour les chocs courts termes (lots 4 et 5), des prélèvements de plasma et d'endolymphe ont été effectués sur 4 turbots de chaque lot, entre 10h et 11h (mis à part le point 8h après le transfert) aux points suivants : 8h00, 24h00, 48h00, 72h00, 7 jours après le transfert (différents lots de 4 turbots pour chaque point horaire, soit au final prélèvement de 20 poissons). Les protéines, les monovalents (Na^+ et K^+), le CO_2 total et le Ca total ont été mesurés sur les échantillons de plasma et d'endolymphe selon les sites schématisés dans la figure 17.

Pour les chocs longs termes (lots 1, 2 et 3) dont les prélèvements se sont étalés sur une semaine entre 10h et 11h, les protéines, les monovalents (Na^+ et K^+), le CO_2 total et le Ca total ont été mesurés sur les échantillons de plasma et d'endolymphe de 10 poissons de chaque lot selon les sites schématisés dans la figure 17. Les échantillons de plasma et d'endolymphe de 10 autres poissons des lots 35‰ 17°C et 8‰ 17°C sont conservés au congélateur dans l'attente de mesurer les [Sr] et les caractéristiques de la phase organique de l'endolymphe (figure 17). Les protocoles d'analyses du plasma et de l'endolymphe sont décrits ultérieurement (cf. annexe I). Des prélèvements d'otolithe ont également été réalisés sur les poissons maintenus durant 6 semaines à 35‰ 17°C, 8‰ 17°C et 35‰ 10°C. Les techniques de prélèvements sont décrites ultérieurement (cf. annexe I).

Expérience long terme :



Expérience court terme :

Lots 3 et 4 (n=20 poissons par lot, 4 à chaque point t_{8h}, t_{24h}, t_{48h}, t_{72h} et t_{7j})

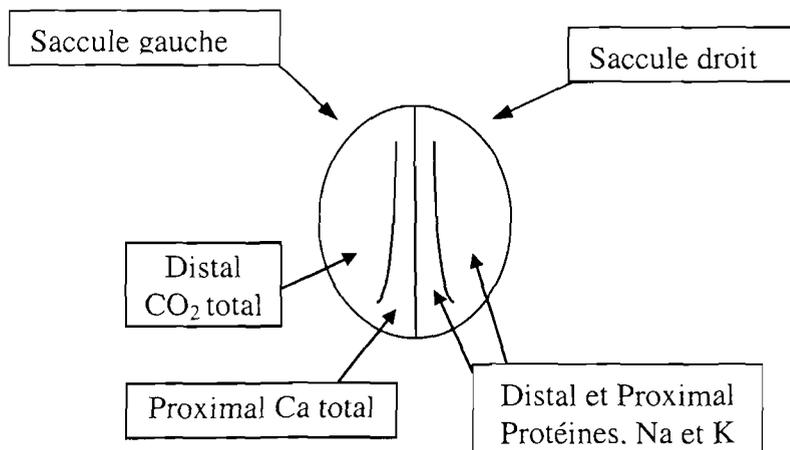


Figure 17 : Sites de prélèvements d'endolymphe et analyses effectuées sur ces échantillons, localisation des otolithes analysés en fonction des divers lots de poissons et du type d'expérience. Les flèches en pointillés correspondent aux analyses en attente. Pour le lot 3, les prélèvements pour les analyses de Sr de l'endolymphe n'ont pas été effectués, les otolithes gauches et droits analysés proviennent du même poisson.

Les otolithes ont été préparés selon le plan frontal (cf. annexe I) avec pour objectif l'obtention d'une double information : (1) analyse de la composition chimique des 2 côtés (proximal et distal) permettant l'étude de la distribution spatiale des éléments, (2) l'étude de la croissance otolithique durant l'expérience sur le plus grand axe de croissance.

En fait, la croissance des otolithes du côté distal des turbots prélevés étant très faible, l'analyse chimique des 2 côtés (distal et proximal) s'est avérée impossible. La mesure des concentrations des éléments majeurs et mineurs (Ca, Na, K et Sr) sur les sagittae gauches et droites, à l'aide de la microsonde, a été réalisée sur l'antirostre (face dorsale). Les conditions d'analyses étaient les suivantes : taille du spot 5 μ m, tension 10kV, intensité du courant 15nA, temps de comptage 40s pour Ca et 120s pour Na, K et Sr. Pour chaque otolithe, 3 analyses ont été effectuées sur chaque site défini comme suit : (1) avant l'expérience (avant la marque de tétracycline), (2) fin d'expérience (bord de l'otolithe). Les analyses de ces données ont été faites en utilisant la moyenne des 3 tirs de chacun des sites.

La croissance otolithique a été estimée sur les otolithes gauches qui ont un axe de croissance plus long en raison de leur nucleus excentré. A l'aide du logiciel informatique TNPC (Traitement Numérique de Pièces Calcifiées), la distance entre la marque de tétracycline et le bord de l'otolithe a été mesurée. Cette distance a ensuite été divisée par le nombre de jours d'expérience plus les 5 jours, correspondant à la période écoulée entre le marquage à la tétracycline et le début de l'expérience, pour estimer la largeur des accroissements journaliers.

Les données sont exprimées sous forme de moyennes accompagnées des erreurs standards. Les analyses statistiques effectuées sont des ANOVA multivariées, après vérification de la normalité des variables. En cas d'hétérogénéité, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été employé. Une analyse de contraste a été utilisée pour comparer les lots maintenus à 35‰ 10°C et 8‰ 17°C pendant 6 semaines par rapport au lot témoin (35‰ 17°C) et pour étudier les variations des paramètres par rapport au temps 0 lors du suivi des chocs durant 7 jours. Le seuil de signification a été attribué à $p < 0,05$.

2.2. Effets d'un changement de la température de l'eau :

2.2.1. Résultats :

Croissance pondérale :

Après un transfert de 6 semaines dans une eau à 10°C, la différence de poids des poissons n'est pas significative par rapport aux animaux maintenus à 17°C (figure 18). L'analyse des données a montré que le sous-échantillon analysé n'était pas représentatif du bac et en conséquence on admet que le poids des poissons reflète la croissance somatique effective.

Homéostasie plasmatique :

Lors du transfert en eau plus chaude (passage de 10°C à 17°C), nous observons une chute transitoire du Ca total et des protéines du plasma. Entre 8 et 24h après le transfert (figure 19), le Ca total et les protéines diminuent respectivement de 0,55mM et 4,2g/l soit 22% et 15,5% ($p=0,005$ et NS respectivement). Trois jours après le transfert, le Ca total et les protéines retrouvent les valeurs initiales des témoins (10°C). L'expérience long terme a montré que chez les animaux adaptés à 17°C après 6 semaines, les [Ca total] et [protéines] sont comparables aux valeurs des 10°C.

L'équilibre acido-basique est également modifié lors du choc de température (figure 20). Dès 8h après le transfert, une augmentation du pH de 0,1UpH est observée, tandis qu'une diminution du CO₂ total et de la pCO₂ apparaît (-3mM soit 34% $p=0,011$ et -0,65mmHg soit 34% NS) (pCO₂ calculée avec les constantes suivantes : à 17°C $pK(\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-)=5,88$ et coefficient de solubilité de CO₂=0,052mM/mmHg ; à 10°C $pK(\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-)=5,83$ et coefficient de solubilité de CO₂=0,064mM/mmHg). Au bout de 7 jours, le pH est toujours plus élevé de 0,1UpH et le CO₂ total et la pCO₂ plus faibles par rapport aux témoins à 10°C mais de façon non significative (respectivement -1,5mM soit 17% et -0,34mmHg soit 18%). Chez les animaux adaptés à 17°C, le pH est similaire à celui des 10°C, tandis que le CO₂ total et la pCO₂ sont plus faibles (-3,7mM soit 42% $p=0,001$ et -0,65mmHg soit 34% NS).

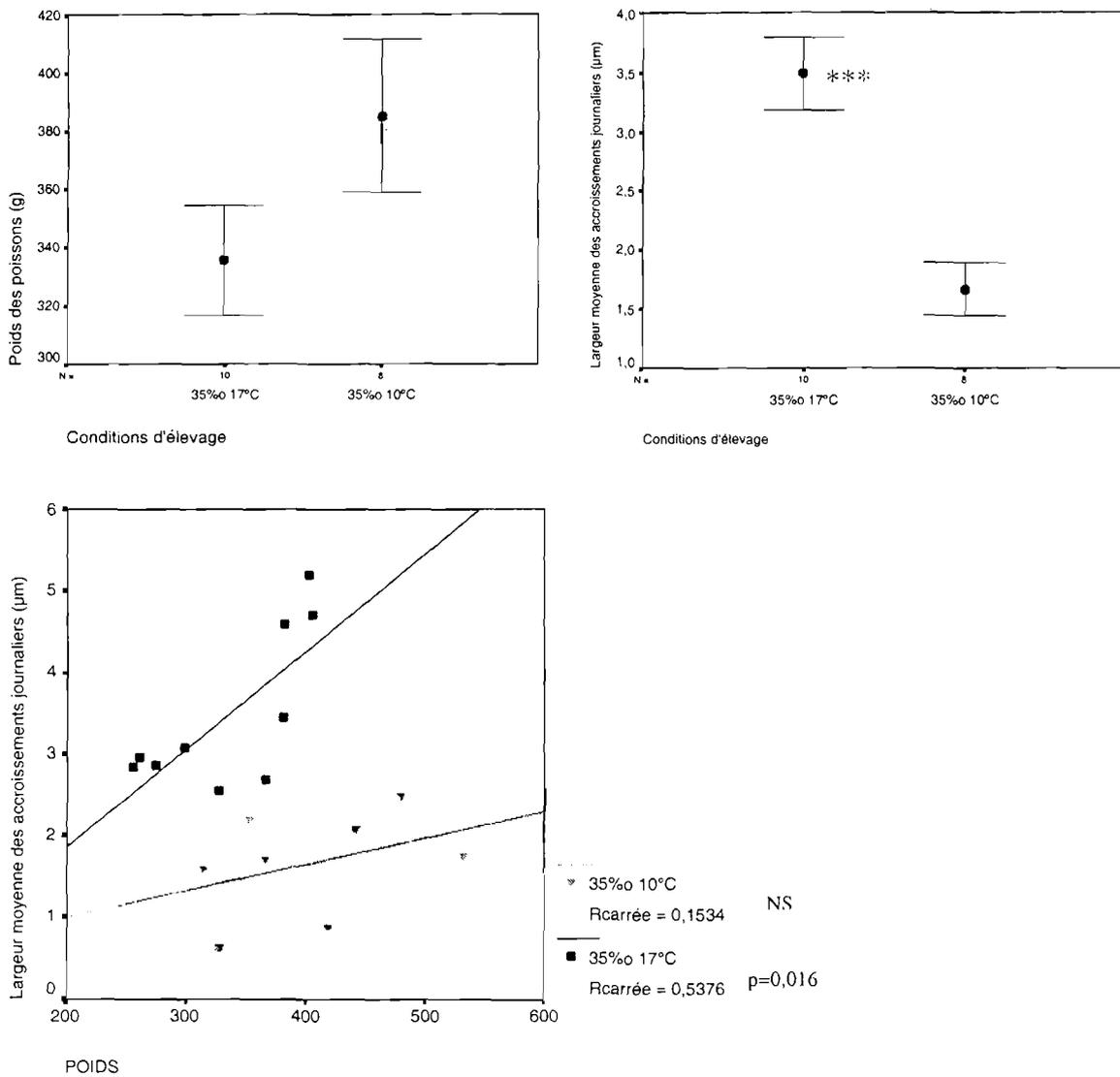


Figure 18 : Variations de poids des poissons et de la largeur des accroissements journaliers en fonction de la température de l'eau en fin d'expérience. Moyenne \pm SE de N mesures. Comparaison à l'aide d'ANOVA. *** $p < 0,001$.

Plasma

Endolymphe

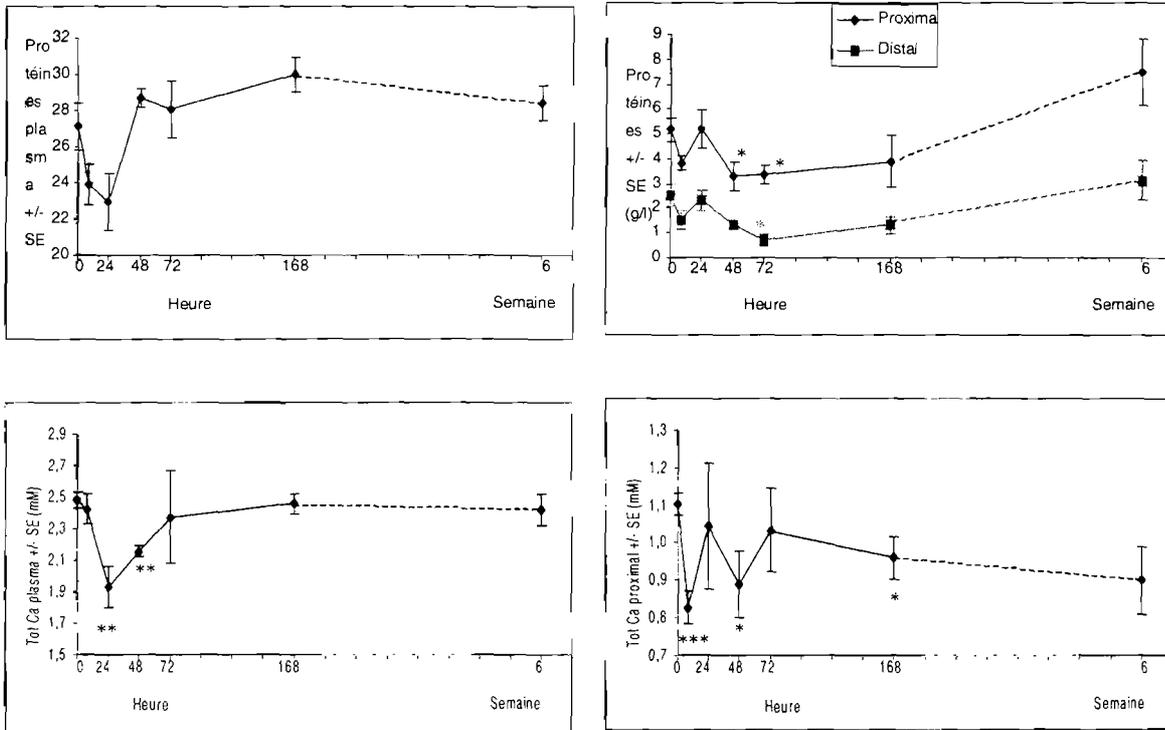
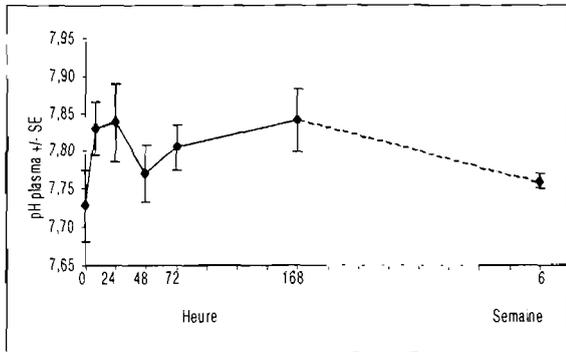


Figure 19 : Variations des concentrations en protéines et calcium total dans le plasma et l'endolymphe (distal et proximal) durant 7 jours et à l'équilibre au bout de 6 semaines après un transfert en eau plus chaude. Moyennes \pm SE de 9 mesures à t=0 et 6 semaines et 4 mesures pour les autres points. Comparaison à l'aide d'ANOVA et d'analyse de contraste par rapport au temps zéro (0 heure), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Plasma



Endolymphe

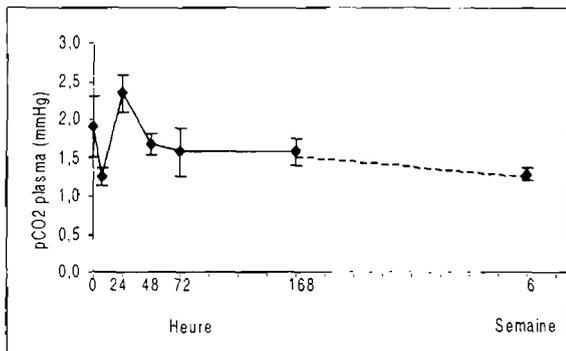
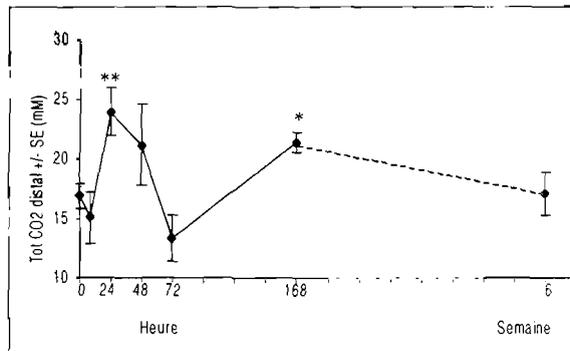
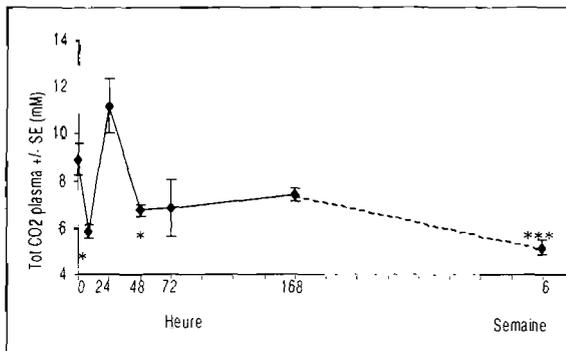
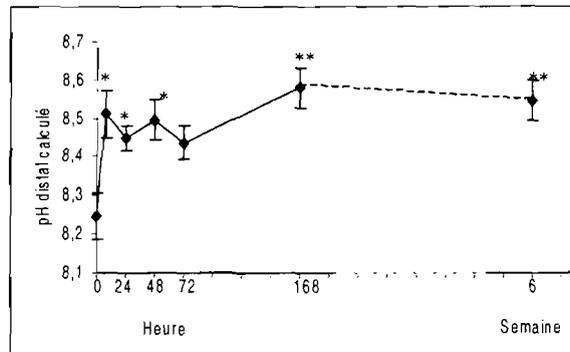


Figure 20 : Variations des concentrations en pH et CO₂ total dans le plasma et l'endolymphe (distal) et de la pCO₂ dans le plasma durant 7 jours et à l'équilibre au bout de 6 semaines après un transfert en eau plus chaude. Moyennes ± SE de 9 mesures à t=0 et 6 semaines et 4 mesures pour les autres points. Comparaison à l'aide d'ANOVA et d'analyse de contraste par rapport au temps zéro (0 heure), * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Chimie de l'endolymphe :

Les concentrations de calcium et de protéines dans l'endolymphe (distal et proximal) présentent également des variations (figure 19). Le Ca total diminue dès 8h après le transfert (-0,27mM soit 25% p=0,000), tandis que les protéines baissent progressivement pour atteindre un minimum entre t=48h et 72h (-1,9g/l soit 36% p=0,040 du côté proximal et -1,83g/l soit 72% p=0,031 du côté distal). Après 7 jours, le Ca total est toujours significativement inférieur par rapport au 10°C (-0,14mM soit 13% p=0,034) tandis que les protéines possèdent des valeurs proches des initiales. Au bout de 6 semaines à 17°C, les concentrations de ces paramètres sont pour le Ca à 0,9mM et pour les protéines à 0,31g/l pour le côté distal et à 0,75g/l pour le proximal (figure 19) et elles ne sont pas significativement différentes de celles des 10°C. L'hétérogénéité entre les zones proximales et distales des concentrations protéiques est similaire chez les animaux maintenus à 10°C et 17°C.

Concernant l'équilibre acido-basique, dans un premier temps, le CO₂ total a tendance à diminuer, puis augmente significativement entre 8h et 24h (+7mM soit 29% p=0,006) avant d'amorcer une baisse progressive qui atteint un minimum vers 72h (-3,6mM soit 21% NS) (figure 20). Au bout de 7 jours le CO₂ total est supérieur à la valeur initiale (+4,5mM soit 26% p=0,023). Chez les animaux adaptés à 17°C au bout de 6 semaines, les valeurs de [CO₂ total] sont à 17mM et sont comparables à celles des poissons maintenus à 10°C (figure 20).

Croissance otolithique :

Cette étude ne concerne que les animaux adaptés à 17°C et 10°C (au bout de 6 semaines)

La largeur des accroissements journaliers des otolithes est significativement différente entre les lots 10°C et 17°C ; elle est supérieure chez les poissons maintenus à 17°C de +1,8µm (soit +110% p=0,000 figure 18) par rapport à celle des poissons maintenus à 10°C. On observe également l'existence d'une corrélation positive entre le poids des poissons et la largeur des

accroissements journaliers chez les poissons maintenus à 17°C ($p=0,016$), corrélation qui est non significative chez les poissons maintenus à 10°C (figure 18).

2.2.2. Discussion :

Les effets de la température de l'eau sur l'homéostasie plasmatique ayant déjà été largement développés dans la littérature (Dockray et al., 1998 ; Houston et Koss, 1982 ; Zaprudnova et Martem'yanov, 1988), ce point ne sera pas évoqué ici de façon exhaustive. Nous insisterons principalement sur l'aspect novateur de nos résultats car c'est la première fois qu'une étude caractérise les différentes étapes de ce système très complexe organisé en « poupées russes », chaque niveau d'étude dépendant directement de son environnement immédiat.

Effets à court terme du choc de température :

Le passage de 10 à 17°C provoque un stress qui se répercute, entre autres, sur la prise alimentaire d'où cette variation momentanée de certains paramètres plasmatiques (calcémie, protéinémie, équilibre acido-basique). Toutes ces variations sont rapidement neutralisées et les résultats montrent que moins de 7 jours sont nécessaires au turbot pour s'adapter à ce nouvel environnement et recouvrer des paramètres homéostatiques à l'exception du CO₂ total et de la pCO₂ qui restent plus faibles chez les turbots adaptés à 17°C.

En ce qui concerne les paramètres des relations plasma - endolymphe, nos résultats font apparaître que : (1) la [Ca total] présente une baisse simultanée dans les deux compartiments confirmant ainsi une grande perméabilité de l'épithélium sacculaire au Ca²⁺ et (2) un découplage de l'équilibre acido-basique, la baisse du CO₂ total associée à l'hypocapnie plasmatique ne se répercutant pas dans l'endolymphe où l'on observe au contraire une augmentation du CO₂ total.

Nous verrons dans le paragraphe suivant quelle est l'origine probable de ce phénomène qui perdure chez les animaux adaptés.

Tout au long des suivis durant 7 jours après le transfert, l'hétérogénéité spatiale des concentrations protéiques dans l'endolymphe est maintenue. Ces observations corroborent l'importance de ce gradient pour la calcification intrinsèque de l'otolithe précédemment mise en évidence dans le §3. de la première partie.

Effets à long terme du choc de température :

Croissance somatique et croissance otolithique :

N'ayant pas les poids de départ des individus prélevés, nous admettrons que le poids final reflète la croissance somatique. En fin d'expérience, aucune différence de poids des poissons n'a été observée entre les animaux maintenus à 10°C et 17°C.

Burel et al. (1996) ont montré que la température influence la croissance des juvéniles de turbot (*Psetta maxima*), avec une croissance optimale à 17°C pour les poissons de poids compris entre 70 et 110g. Cependant cette étude a également montré que les gros turbots (500-600g) étaient relativement thermo-indépendants, puisqu'une consommation d'oxygène similaire apparaissait pour les lots élevés à 11°C et 17°C. Nos résultats corroborent cette étude puisque notre expérience a été menée sur des poissons de 350g en moyenne initialement et 400g en final, poids qui sont plus proches du lot « gros turbots » de Burel et al. (1996).

La croissance des otolithes présente d'importantes et significatives variations : elle est nettement supérieure chez les poissons maintenus à 17°C par rapport aux témoins (10°C). Aucune corrélation significative n'a été trouvée entre le poids des poissons et la croissance otolithique chez les poissons maintenus à 10°C tandis qu'elle est présente chez les poissons maintenus à 17°C, ce qui montre que le couplage entre ces 2 paramètres n'est pas aussi strict que

ce qu'ont démontré, par exemple, Neilson et Geen (1985) ou Volk et al. (1984). Les premiers ont montré, chez des juvéniles de saumons (*Oncorhynchus tshawytscha*), l'existence d'une corrélation positive entre le taux de croissance des poissons et la largeur moyenne des accroissements de l'otolithe. De même, Volk et al. (1984) ont trouvé une relation directe entre la largeur moyenne des accroissements journaliers de l'otolithe et le rythme de croissance de jeunes saumons (*Oncorhynchus keta*). En fait il semble que ces deux processus de croissance ne sont pas toujours couplés et sont corrélés positivement seulement lors de forte croissance somatique (Wright, 1990). Mosegaard et al. (1988) ont mis en évidence le découplage des croissances somatiques et otolithiques lors de conditions inhibitrices de la croissance somatique, i.e. des températures hyperoptimales. Wright (1991 b), à l'aide d'une corrélation positive entre le taux de consommation d'O₂ journalier et la largeur de l'accroissement otolithique chez des saumons en forte et faible croissance, a suggéré qu'un processus relié au métabolisme, plus qu'à la croissance somatique, gouverne le taux d'accrétion de l'otolithe. Les travaux de Bradford et Geen (1992) sont en accord avec cette hypothèse à savoir que ces auteurs ont trouvé des accroissements otolithiques plus larges quand la température de l'eau augmentait tandis qu'aucune différence de croissance somatique n'était observée. Ainsi les travaux récemment publiés s'orientent plus vers un découplage de ces deux croissances otolithiques et somatiques que nous retrouvons dans nos résultats.

L'effet de la température sur la croissance des otolithes est bien connu. Dans notre expérience, les accroissements sont beaucoup plus étroits pour les poissons maintenus à basse température, ce qui confirme les études déjà publiées (Neilson et Geen, 1982 ; Umezawa et Tsukamoto, 1991 ; Wang et Eckmann, 1992 ; Zhang et Runham, 1992). De plus, Bradford et Geen (1992), ont montré une diminution de la largeur des accroissements des otolithes des poissons maintenus à basse température, tandis qu'aucune différence de croissance somatique n'était observée. Nos résultats corroborent ces observations et confirment, dans certaines conditions, le découplage entre la croissance somatique et celle de l'otolithe.

Couplage fonctionnel entre plasma et endolymphe :

Les [Ca tot] plasmatiques ne sont pas significativement différentes à 10°C et 17°C. Ces résultats corroborent des études antérieures, telle celle de Houston et Koss (1982) qui a montré que la [Ca tot] plasmatique ne présentait pas de variations en fonction de la température. Le Ca total plasmatique étant connu pour être un paramètre extrêmement bien régulé chez les téléostéens (Hanssen et al., 1989), sa stabilité est un indicateur d'un bon état de santé des poissons. Simultanément, le Ca total endolympatique reste comparable aux deux températures étudiées, résultats en accord avec ceux obtenus lors du cycle nycthémeral qui avaient permis d'émettre une hypothèse hautement probable quant à l'existence d'une dépendance du Ca^{2+} endolympatique vis à vis de la calcémie plasmatique. Ceci est à mettre en parallèle avec les concentrations protéiques qui ne varient pas de façon significative en fonction de la température aussi bien dans le plasma que l'endolymphe distale et proximale.

Contrairement aux protéines et au calcium, le troisième composant calcificateur, en l'occurrence le couple HCO_3^- -pH présente des modifications en fonction de la température d'adaptation. L'hypocapnie significative observée chez les turbots adaptés à 17°C doit se répercuter également sur la pCO_2 de l'endolymphe. Dans ce milieu, les constantes de l'équation d'Henderson-Hasselbach (pK et coefficient de solubilité) n'étant pas connues, le pH ne peut pas être calculé directement. Cependant, en considérant que ces constantes évoluent de façon comparable en fonction de la température dans le plasma et l'endolymphe, on peut en déduire que dès 8h après le transfert, une augmentation significative du pH est observée (+0,26 UpH, $p=0,023$) et se maintient durant toute la durée de l'expérience pour atteindre un maximum au bout de 6 semaines (+0,30 UpH, $p=0,002$) (figure 20). Dans ce cas, l'augmentation très nette de plus de 0,25 UpH de l'endolymphe devrait se traduire par une baisse de la $[\text{HCO}_3^-]$ relative à l'hypocapnie. Or, nous observons le maintien de ce paramètre, ce qui suggère la présence d'un transport ionique, en l'occurrence l'échangeur Na^+/H^+ précédemment localisé au niveau des petits ionocytes distaux, dont la stimulation favoriserait l'apparition d'ions bicarbonates dans l'endolymphe (figure 21).

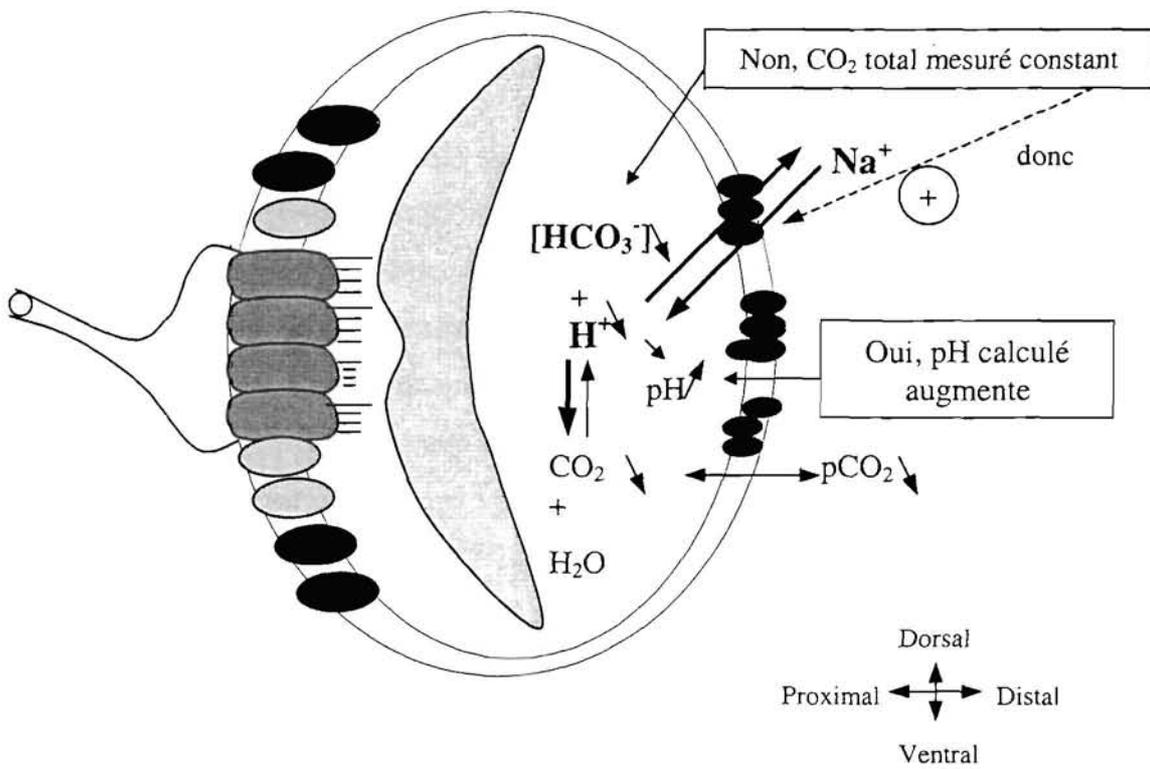


Figure 21 : Schéma d'interprétation des variations acido-basiques de l'endolymphe lors du passage en eau plus chaude à partir de la pCO₂ plasmatique. Stimulation (signe +) de l'échangeur Na⁺-H⁺ pour maintenir la [HCO₃⁻] constante.

Couplage fonctionnel entre endolymphe et croissance otolithique :

Les principaux éléments de l'endolymphe impliqués dans la calcification de l'otolithe correspondent aux protéines, au calcium libre (Ca^{2+}) et aux ions bicarbonates (HCO_3^-). Jusqu'à présent, seuls nos travaux et ceux de Mugiya et Takahashi (1985) sur les variations circadiennes de la composition de l'endolymphe (Mugiya et Takahashi n'ont mesuré que le CO_2 total) ont suggéré une relation positive entre le niveau de précurseurs ioniques dans l'endolymphe et le dépôt opéré sur l'otolithe. L'accroissement de la température ne provoque aucune modification de la concentration protéique, calcique et du CO_2 total de l'endolymphe bien que la largeur des accroissements des otolithes soit nettement plus importante à 17°C qu'à 10°C . Il est donc probable que, l'effet de la température sur la croissance otolithique implique un effet direct sur les différentes étapes et réactions chimiques impliquées dans la biominéralisation. En effet, la vitesse d'une réaction chimique, la synthèse des protéines ainsi que les cinétiques des transferts transépithéliaux augmentent avec la température ce qui favorise la disponibilité des précurseurs de l'otolithe. Cependant, une analyse plus fine peut moduler les conclusions concernant l'effet de la température sur l'équilibre acido-basique de l'endolymphe. En présence d'une [CO_2 total] constante, une baisse de pCO_2 , illustrée par une alcalinisation de l'endolymphe à 17°C , doit probablement se répercuter par une distribution différente des composantes de la famille CO_2 total en favorisant l'apparition de carbonates (CO_3^{2-}).

En conclusion, au vu de la complexité et de la diversité de ces phénomènes, cette étude montre que la composition chimique globale de l'endolymphe n'est pas le seul paramètre responsable de la croissance de l'otolithe et qu'il est difficile d'établir la part relative d'un effet lié à l'augmentation relative d'un précurseur de la calcification de celui dépendant directement de l'augmentation de la température.

2.3. Effets d'un changement de la salinité de l'eau :

2.3.1. Résultats :

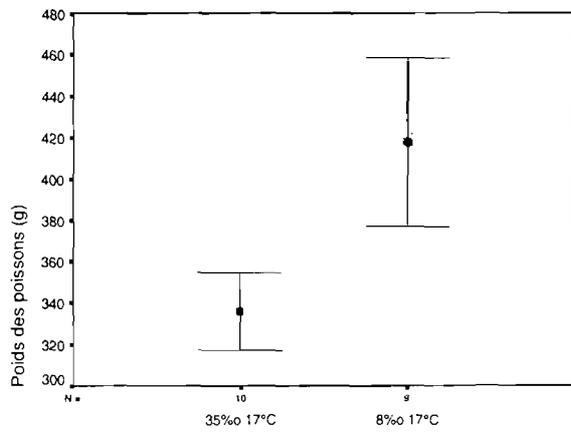
Croissance pondérale :

Après 6 semaines de transfert en eau dessalée (8‰ 17°C), le poids des poissons n'est pas significativement différent de celui des témoins (35‰ 17°C) (figure 22). L'analyse des données a montré que le sous échantillonnage analysé n'était pas représentatif du bac et en conséquence on admet que le poids des poissons reflète la croissance somatique effective.

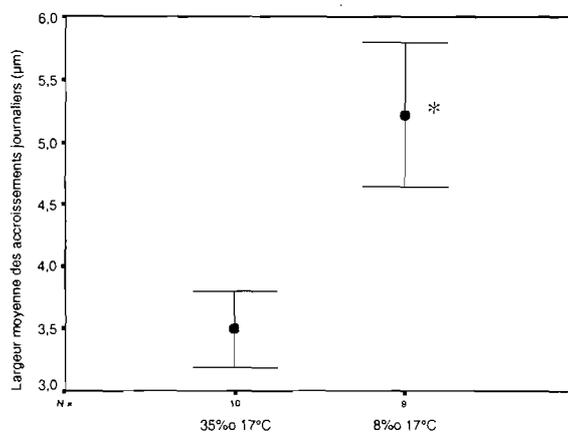
Homéostasie plasmatique :

Le transfert en milieu dessalé se traduit par une baisse de la [Ca total] et de la [protéines] respectivement de 0,31mM et 5 g/l soit 13% et 17% ($p=0,031$ et $p=0,014$, figure 23). Environ 7 jours après le transfert en eau à 8‰, les concentrations de Ca total et de protéines sont toujours significativement plus basses ($p=0,030$ et $p=0,018$ respectivement). Chez les animaux adaptés au bout de 6 semaines, la [Ca total] et [protéines] observent des valeurs comparables à celles des témoins (35‰).

Le passage à une salinité de 8‰ déséquilibre la balance acido-basique de l'organisme avec une augmentation très nette du CO₂ total et de la pCO₂ enregistrée dès 8h après le transfert ($p=0,000$ et $p=0,000$) (figure 24). Ce phénomène précède une alcalinisation plasmatique de 0,1UpH ($p=0,007$) qui culmine à $t=72h$. Au bout de 7 jours, le pH, le CO₂ total et la pCO₂ sont toujours significativement plus élevés par rapport aux 35‰ (respectivement $p=0,036$, $p<0,001$ et $p=0,009$). Chez les turbots adaptés à 8‰, 6 semaines après le transfert, le pH sanguin est au même niveau que chez les 35‰, par contre, l'alcalinité titrable et la pCO₂ sont significativement plus élevées (CO₂ total +5,9mM soit +114%, $p=0,000$ et pCO₂ +1,61mmHg soit +125% $p=0,000$).



Conditions d'élevage



Conditions d'élevage

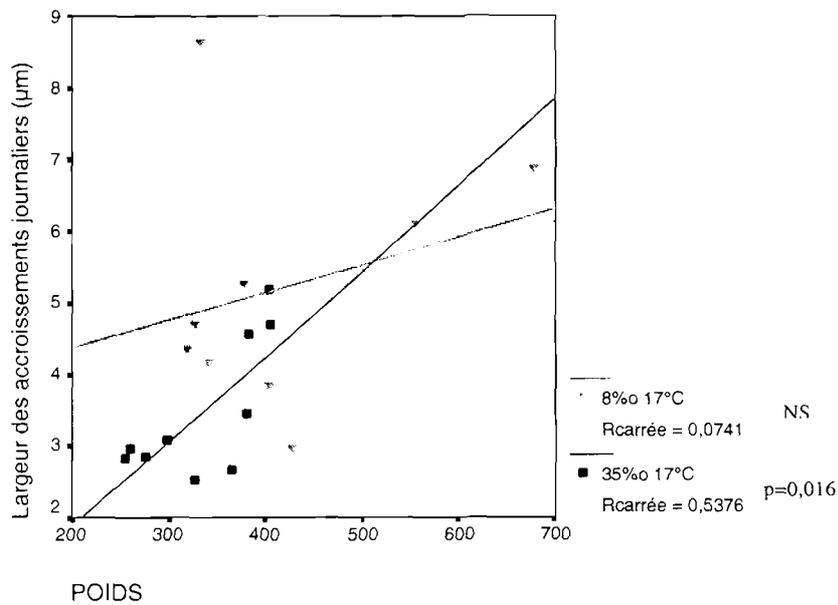
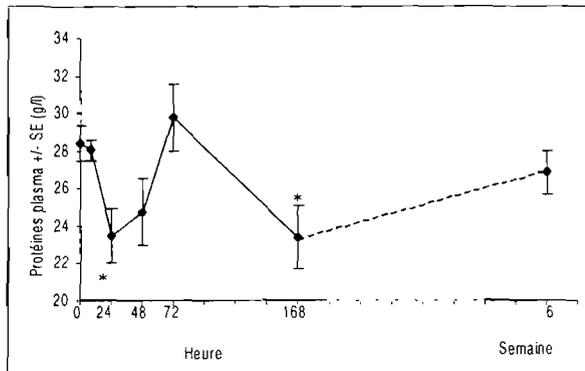


Figure 22 : Variations du poids des poissons et de la largeur des accroissements journaliers en fonction de la salinité de l'eau en fin d'expérience. Moyenne \pm SE de N mesures. Comparaison à l'aide d'ANOVA. * $p < 0,05$.

Plasma



Endolymphe

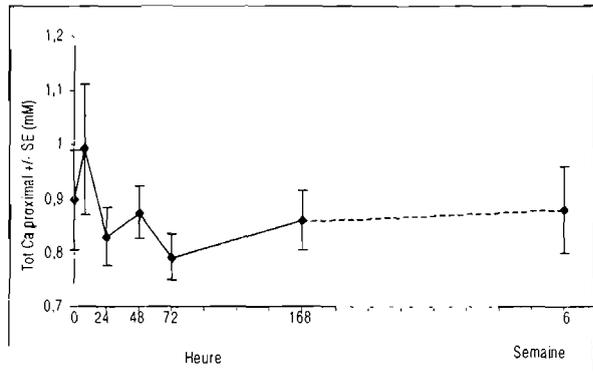
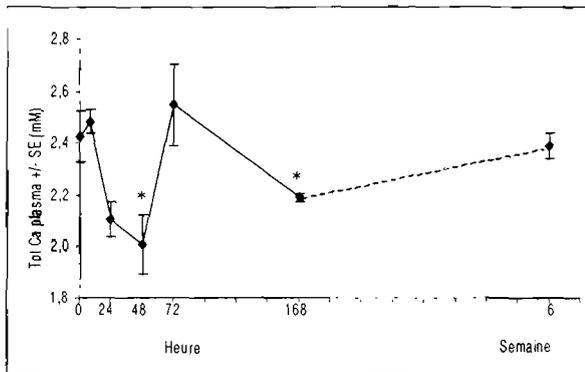
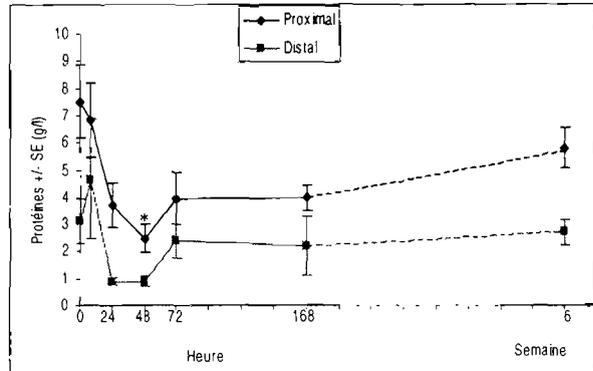


Figure 23 : Variations des concentrations en protéines et calcium total dans le plasma et l'endolymphe (distal et proximal) durant 7 jours et à l'équilibre au bout de 6 semaines après un transfert en eau dessalée. Moyennes \pm SE de 9 mesures à $t=0$ et 6 semaines et 4 mesures pour les autres points. Comparaison à l'aide d'ANOVA et d'analyse de contraste par rapport au temps zéro (0 heure), * $p<0,05$.

Plasma

Endolymphe

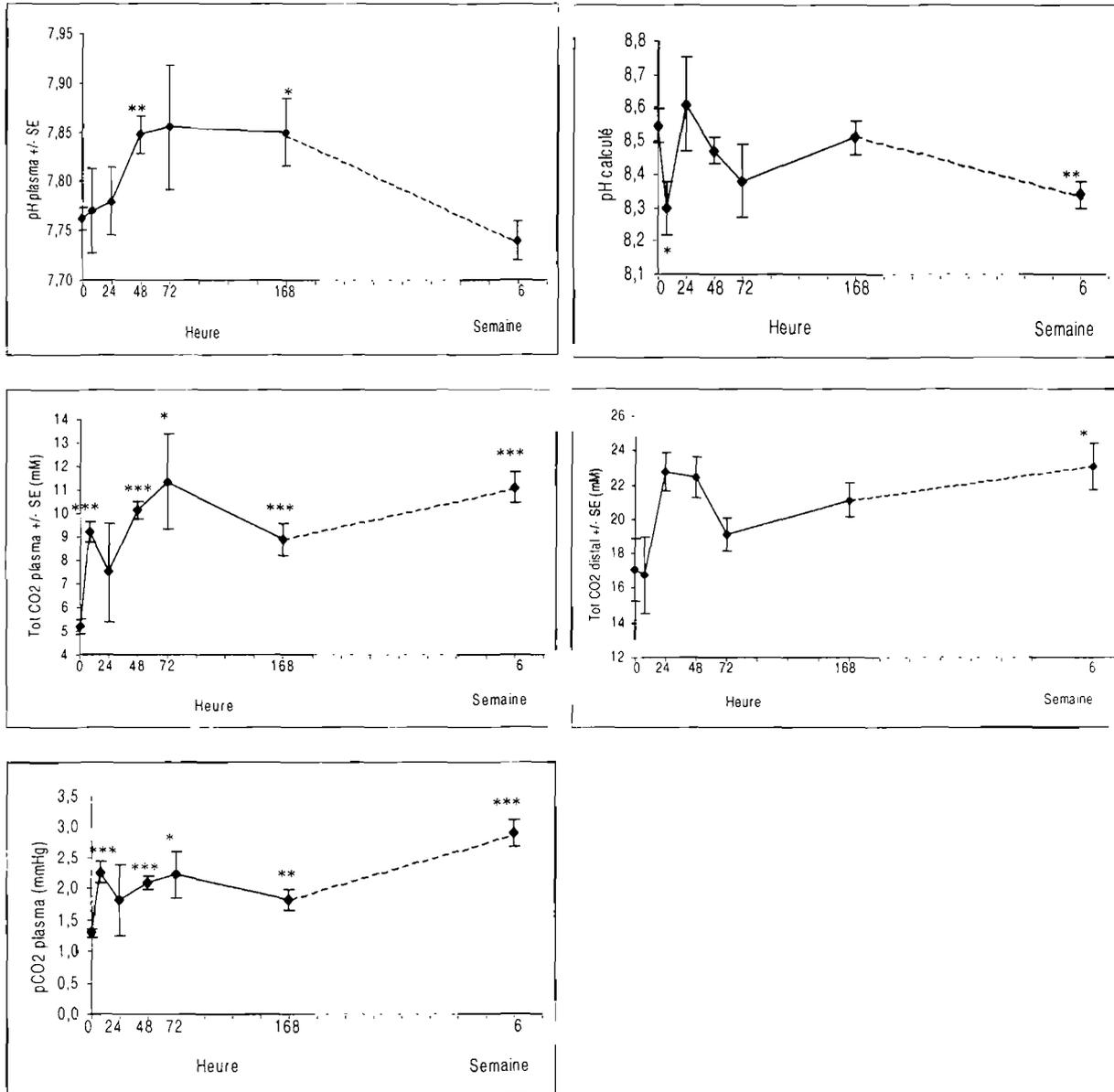


Figure 24 : Variations des concentrations en pH et CO₂ total dans le plasma et l'endolymphe (distal) et de la pCO₂ dans le plasma durant 7 jours et à l'équilibre au bout de 6 semaines après un transfert en eau dessalée. Moyennes ± SE de 9 mesures à t=0 et 6 semaines et 4 mesures pour les autres points. Comparaison à l'aide d'ANOVA et d'analyse de contraste par rapport au temps zéro (0 heure), * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. (pCO₂ calculée avec les constantes suivantes : à 35‰ et 8‰ pK(CO₂-HCO₃)=5,88 et coefficient de solubilité de CO₂=0,052mM/mmHg).

Chimie de l'endolymphe :

Globalement, l'équilibre ionique et protéique de l'endolymphe dans les zones proximales et distales présente une évolution caractérisée par une baisse transitoire entre 8h et 48h de la concentration de Ca total et des protéines respectivement de 0,11mM et 5g/l soit 12%, 67% du côté proximal (NS et $p=0,034$ respectivement) et 2,24g/l soit 71% pour protéines du côté distal (NS) (figure 23). Au bout de 7 jours, le Ca total a retrouvé les valeurs initiales et les protéines sont toujours plus basses que chez les 35‰ mais de façon non significative. Après 6 semaines d'adaptation à 8‰, les concentrations de Ca total et des protéines sont similaires à celles des 35‰. L'hétérogénéité entre les zones proximales et distales des concentrations protéiques est maintenue chez les animaux adaptés à 8‰.

La [CO₂ total] augmente de façon non significative dans l'endolymphe (+5,7mM soit 33%) avec un retard évalué à environ 12h par rapport à l'évolution du CO₂ total plasmatique (figure 24). Cette concentration plus élevée est maintenue jusqu'à 7 jours après le transfert et devient significative chez les animaux adaptés à 8‰ au bout de 6 semaines (+35% $p=0,014$).

Croissance otolithique :

Cette étude ne concerne que les animaux adaptés à 35 et 8‰, le choc de salinité suivi durant 7 jours ayant été effectué chez d'autres turbots dont les otolithes n'ont pas été analysés.

Une augmentation significative de la largeur moyenne des accroissements journaliers des otolithes est observée pour le lot à 8‰ par rapport au 35‰ (+1,73µm soit +50% $p=0,014$, figure 22). Une corrélation positive existe entre le poids des poissons et la largeur moyenne des accroissements journaliers chez les 35‰ ($p=0,016$) mais est non significative chez les 8‰ (figure 22).

2.3.2. Discussion :

Effets à court terme du choc salin :

Le choc salin provoque au niveau plasmatique une déminéralisation transitoire et une alcalose. Les présents résultats confirment la capacité du turbot à résister à de fortes variations de la salinité de l'eau (Gaumet et al., 1994). Après le choc osmotique, moins de 7 jours sont nécessaires à la balance ionique pour retrouver le niveau stable de départ. L'alcalose plasmatique précédée de l'hypercapnie observée lors du transfert en eau dessalée ont déjà été décrites dans la littérature. Par exemple, Nonnotte et Truchot (1990) ont observé qu'un transfert abrupt des flets (*P. flesus*) de l'eau de mer vers l'eau douce provoquait une baisse transitoire de l'osmolarité plasmatique et une concomitante alcalose métabolique associée à une hypercapnie persistante. La modification de la salinité provoque un stress qui se répercute sur la prise alimentaire d'où la diminution transitoire des protéines plasmatiques.

Dans l'endolymphe pour les zones distales et proximales, les variations des concentrations de Ca total et CO₂ total sont comparables à celles du plasma et suggèrent l'existence d'un couplage étroit entre ces deux compartiments. Notons que, contrairement au choc de température, le stress salin provoque une évolution parallèle des paramètres acido-basiques dont l'origine peut résider simplement dans une équilibration de la pCO₂ entre plasma et endolymphe. Le maintien de l'hétérogénéité de composition de l'endolymphe durant toute l'expérience confirme l'importance de ces gradients pour la biocalcification de l'otolithe (cf. §3. de la première partie).

Effets à long terme du choc salin :

Croissance somatique et croissance otolithique :

En fin d'expérience, aucune différence de croissance somatique n'est observée entre les 35‰ et les 8‰.

Gaumet et al. (1995) ont étudié les effets de la salinité sur la croissance des juvéniles de turbot. Bien que *Psetta maxima* soit un poisson marin, ces auteurs ont mis en évidence une croissance plus forte des turbots acclimatés à des salinités de 19‰ et 10‰ par rapport à ceux maintenus à 35‰. Ces auteurs ont également mesuré la consommation d'O₂ qui est un moyen d'estimer les dépenses énergétiques pour l'osmorégulation ; la valeur la plus basse apparaissait pour les turbots maintenus à 10‰ par rapport à 19‰, 27‰ et 35‰, c'est à dire près du point iso-osmotique (osmolarité identique entre le plasma et l'eau, 12‰ environ). Ainsi à 10‰, le turbot dépense moins d'énergie pour équilibrer sa balance ionique et possède une croissance somatique plus favorable. Cependant, Gaumet et al. (1995) ont montré que cette différence de croissance était inférieure à 8% au bout de 3 mois. Notre expérience s'est déroulée seulement durant 6 semaines ce qui peut expliquer qu'à 8‰ et 35‰ (dans notre expérience) les croissances somatiques soient similaires.

La croissance des otolithes est très supérieure chez les 8‰ par rapport aux témoins (35‰). Dans la littérature, Umezawa et Tsukamoto (1991) ont montré que les anguilles élevées dans une eau à 12‰ présentaient un taux de croissance de l'otolithe supérieur à celui de celles élevées dans l'eau douce, malgré une croissance somatique similaire. Par contre, Karakiri et Von Westernhagen (1989) ont observé, chez la plie, une diminution de la largeur des accroissements associée à une baisse de croissance somatique à basse salinité. Dans notre expérience, les accroissements sont plus larges et la croissance somatique constante quand la salinité diminue. De plus, aucune corrélation n'existe entre les croissances somatiques et otolithiques à 8‰. Ce résultat suggère, là encore, un découplage de ces deux processus de croissance, question précédemment discutée dans le cadre des effets d'un changement de température.

Couplage fonctionnel entre plasma et endolymphe :

De façon similaire à ce qui a été observé lors d'un changement de température du milieu, le Ca total et les protéines restent stables dans le plasma et l'endolymphe. Cette stabilité du Ca plasmatique est un indice de bonne santé des animaux. Ces résultats confirment l'étude de Gaumet et al. (1995) qui avaient effectué un transfert des turbots vers 10‰ pendant 3 mois.

Le pH plasmatique reste également constant lors d'un changement de salinité, malgré une forte augmentation du CO₂ total et de la pCO₂. Ceci confirme le bon fonctionnement des systèmes de régulation acido-basique. Au niveau de l'endolymphe, l'estimation de la valeur du pH distal à partir des constantes plasmatiques a permis de montrer une chute du pH dès 8h après le transfert (-0,24UpH p=0,021) et le maintien de son niveau inférieur chez les animaux adaptés (-0,2UpH p=0,003) (figure 24). Cette relative acidose endolympatique résulte probablement de l'hypercapnie observée chez les turbots adaptés à 8‰ : l'hydratation du CO₂ produit des protons (d'où l'acidose calculée) et des ions bicarbonates (d'où l'augmentation du CO₂ total mesurée). En conclusion, la modification de l'équilibre acido-basique de l'endolymphe peut se justifier par le simple ré-équilibrage du couple CO₂-HCO₃⁻ consécutif à l'hypercapnie plasmatique, il n'est pas nécessaire de faire intervenir une action spécifique au niveau de l'épithélium sacculaire (figure 25).

Couplage fonctionnel entre endolymphe et croissance otolithique :

Par analogie à l'étude menée sur le changement de température, nous avons essayé dans ce paragraphe de relier les variations de composition de l'endolymphe, en particulier celles des concentrations des protéines, Ca total et CO₂ total, aux modifications structurales observées sur l'otolithe.

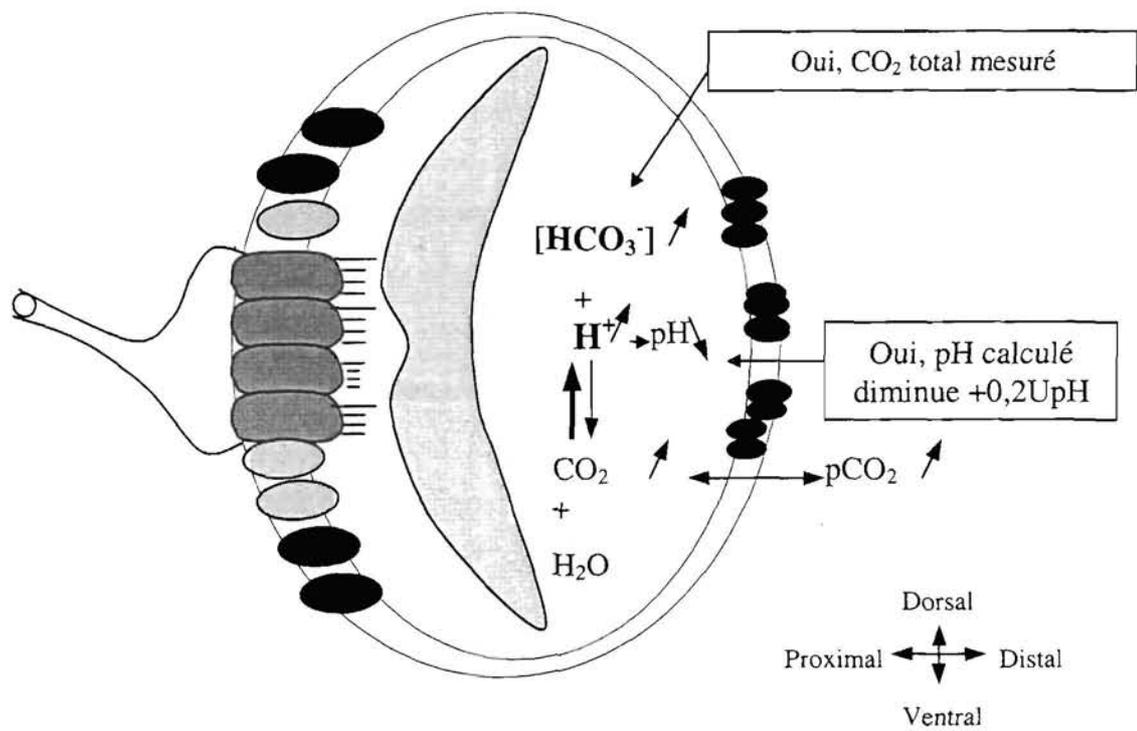


Figure 25 : Schéma d'interprétation des variations acido-basiques de l'endolymphe lors du passage en eau dessalée à partir de la pCO_2 plasmatique. Simple ré-équilibre sans faire intervenir une action spécifique au niveau de l'épithélium sacculaire.

Nos résultats ont montré que parmi ces trois paramètres seul le CO₂ total varie lors d'un changement de salinité. Payan et al. (1998) ont mis en évidence une relation étroite entre [CO₂ total] et la croissance de l'otolithe, à savoir que sur des animaux à jeun le CO₂ total de l'endolymphe diminue (les protéines sont constantes) et la croissance des otolithes est réduite. Ainsi l'augmentation du CO₂ total observée à basse salinité dans l'endolymphe est probablement responsable d'un dépôt plus important de CaCO₃ sur l'otolithe, d'où une croissance otolithique nettement plus forte à 8‰ qu'à 35‰. Cette hypothèse nécessite évidemment un dépôt plus important de matrice organique pour former la trame à laquelle se lie le CaCO₃. Les mesures réalisées pour l'instant correspondent aux protéines totales or seule une petite partie se retrouve sur l'otolithe. Des analyses d'électrophorèses sur des échantillons d'endolymphe sont en cours pour essayer de caractériser des variations éventuelles des teneurs de protéines en fonction de leur nature.

2.4. Relations entre les compositions chimiques de l'endolymphe et de l'otolithe :

Dans cette partie, nous traitons de l'évolution de la concentration des cations Na⁺, K⁺ et Sr²⁺ dans les trois compartiments successifs : plasma – endolymphe - otolithe chez des turbots sous l'effet d'un changement de température (10°C → 17°C) et de salinité (35‰ → 8‰) du milieu biotique. L'évolution du plasma et de l'endolymphe a été suivie au cours de la phase adaptative (expériences de courte durée de 7 jours), par contre, l'analyse microchimique de l'otolithe a été menée uniquement chez les turbots adaptés i.e. après 6 semaines dans le milieu considéré. En l'absence de données concernant la microchimie de l'otolithe pendant la phase transitoire, la discussion portera essentiellement sur la comparaison entre les organismes adaptés.

2.4.1. Résultats :

Les prélèvements d'endolymphe, pour les analyses de Na⁺ et K⁺, ayant été effectués sur les saccules droits, seules les compositions chimiques des otolithes droits sont présentées ci-après. Les mesures de croissance ayant été faites sur les otolithes gauches, nous avons analysé l'évolution de ces 3 paramètres (Na, K et Sr) en fonction des conditions d'élevage dans les otolithes gauches (résultats non présentés). Etant donné que cette évolution est comparable entre les deux types d'otolithes, nous avons utilisé l'analyse de croissance faite sur les otolithes gauches pour interpréter les résultats microchimiques des otolithes droits. Cependant les mesures de croissance sur les otolithes droits sont en cours.

Les concentrations de Sr dans le plasma et l'endolymphe n'ont pas pu être encore mesurées pour des raisons de planning chargé pour l'utilisation de l'ICPMS.

2.4.1.1. Effets d'un changement de la température de l'eau :

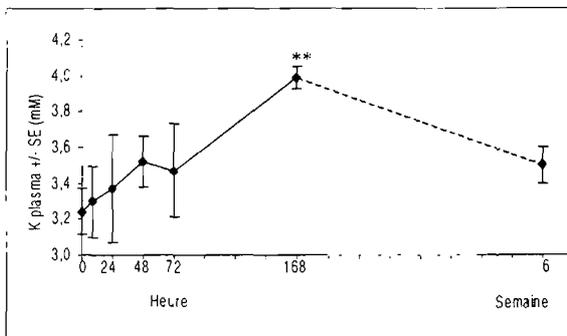
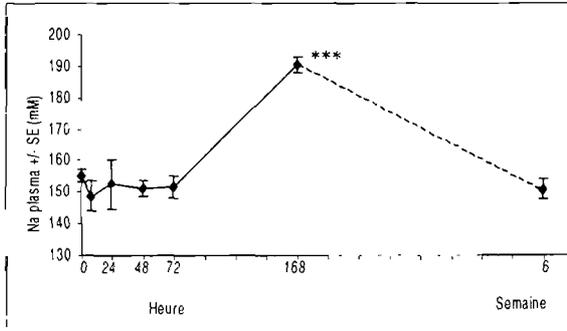
Plasma :

Lors du transfert de 10 à 17°C, la [Na] plasmatique reste stable durant les 4 premiers jours tandis qu'une tendance à la hausse est observée pour K mais cette augmentation reste non significative en raison d'une forte variabilité inter-individuelle. Sept jours après le transfert, les concentrations de Na et de K ont fortement augmenté (dernier point de notre suivi, respectivement +35mM soit 23% p=0,000 et +0,75mM soit 23% p=0,007) mais après 6 semaines retrouvent des valeurs comparables aux valeurs initiales. (Figure 26).

Endolymphe :

Dans l'endolymphe après une augmentation non significative un jour après le transfert, la [Na] baisse pour atteindre un minimum entre t=48h et 72h (-19,8mM soit 16% p=0,014 du côté proximal et -14,8mM soit 13% p=0,008 du côté distal). Une tendance à l'augmentation est observée pour la [K] du côté distal et proximal mais elle reste non significative en raison d'une forte variabilité. Sept jours après le transfert, la [Na] et la [K] se rapprochent des valeurs initiales. Au bout 6 semaines à 17°C, ces paramètres ont retrouvé des valeurs comparables à celles des niveaux de départ (figure 26). L'hétérogénéité entre les zones proximales et distales des concentrations de K est similaire chez les animaux adaptés à 10°C et 17°C.

Plasma



Endolymph

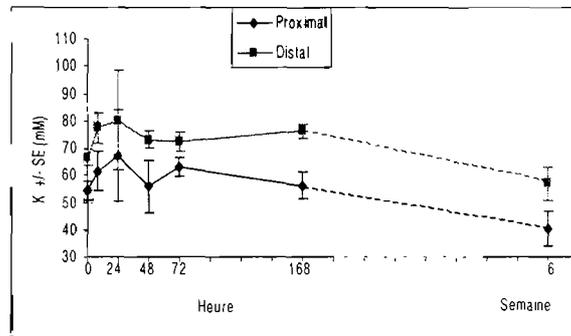
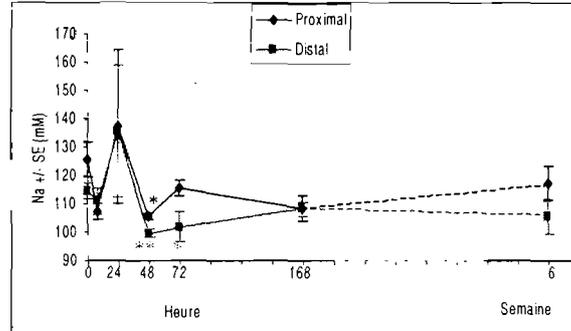


Figure 26: Variations des concentrations en sodium et potassium dans le plasma et l'endolymph (distal et proximal) durant 7 jours et à l'équilibre au bout de 6 semaines après un transfert en eau plus chaude. Moyennes \pm SE de 9 mesures à $t=0$ et 6 semaines et 4 mesures pour les autres points. Comparaison à l'aide d'ANOVA et d'analyse de contraste par rapport au temps zéro (0 heure), * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

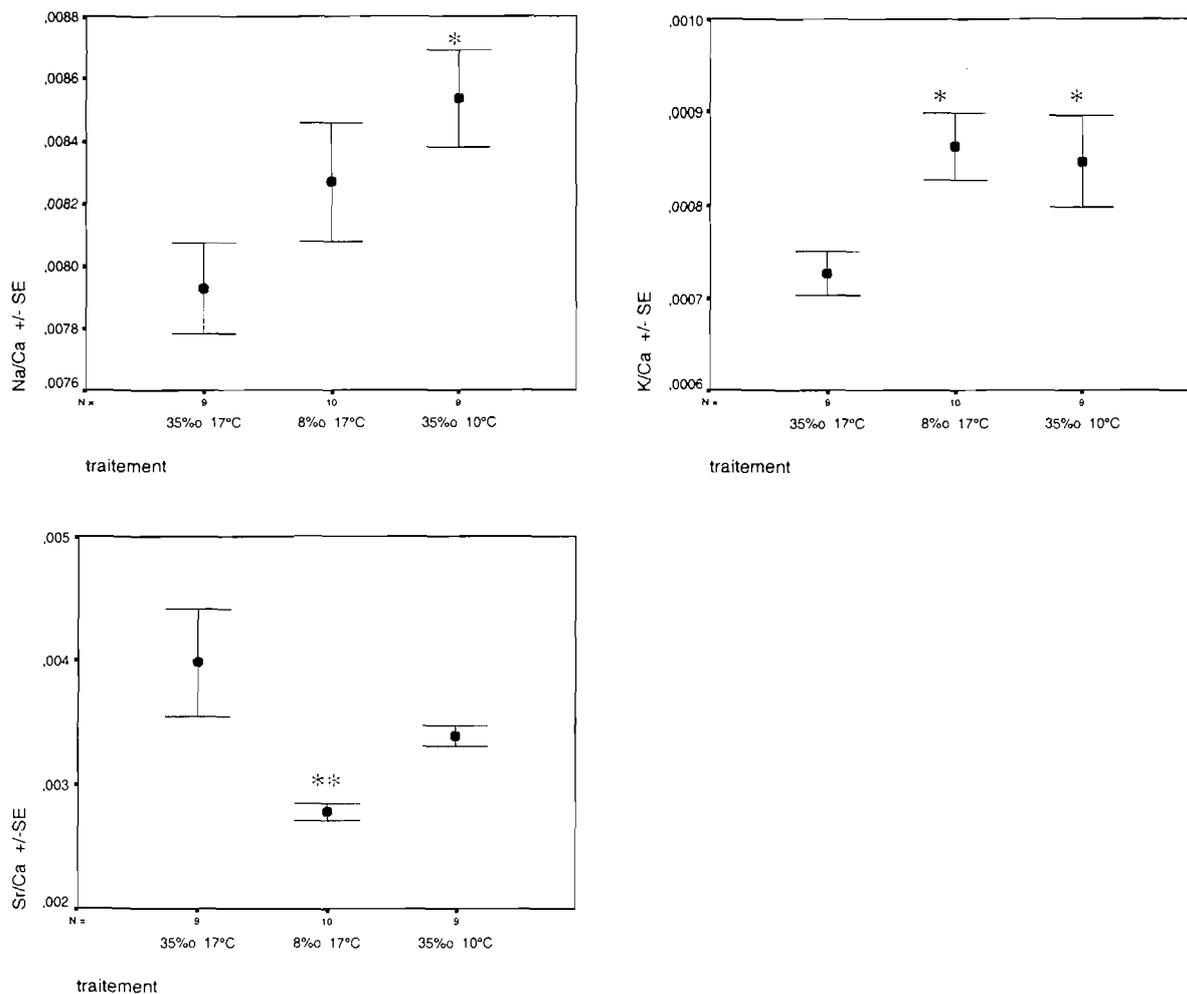
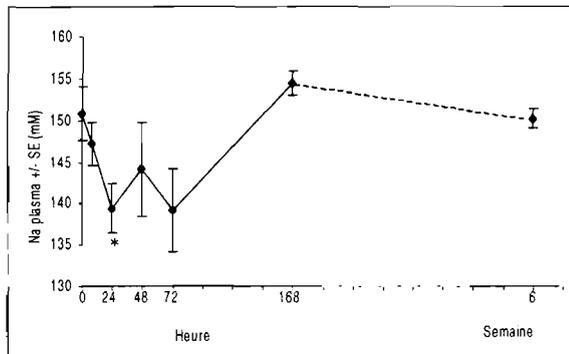


Figure 27 : Variations des rapports Na/Ca, K/Ca et Sr/Ca des otolithes droits en fin d'expérience, en fonction des 3 conditions d'élevage. Moyennes \pm SE de N mesures. Comparaison à l'aide d'ANOVA et d'analyse de contraste par rapport aux témoins (35‰ 17°C), lors de variable hétérogène le test de Kruskal-Wallis a été employé. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

	35‰ 17°C			8‰ 17°C			35‰ 10°C		
	<i>Avant manip</i>	<i>Fin manip</i>	<i>p</i>	<i>Avant manip</i>	<i>Fin manip</i>	<i>p</i>	<i>Avant manip</i>	<i>Fin manip</i>	<i>p</i>
Na/Ca	0,00831	0,00793	NS	0,00828	0,00827	NS	0,0084	0,0085	NS
SE	0,00018	0,00015		0,0001	0,0002		0,0001	0,0002	
Nbval	9	9		10	10		9	9	
K/Ca	0,00078	0,00073	NS	0,00088	0,00086	NS	0,0009	0,0008	NS
SE	0,00003	0,00002		0,00004	0,00004		0,0001	0,00005	
Nbval	9	9		10	10		9	9	
Sr/Ca	0,00342	0,00399	NS	0,00332	0,00278	<0,0001	0,0035	0,0034	NS
SE	0,00012	0,00043		0,0001	0,0001		0,0001	0,0001	
Nbval	9	9		10	10		9	9	

Tableau 3 : Composition chimique des otolithes droits chez le turbot en fonction des trois conditions d'élevage expérimentées, avant et en fin d'expérience. Moyennes \pm SE avec le nombre de mesures. Les analyses statistiques entre les valeurs correspondant à l'avant et la fin d'expérience ont été faites à l'aide d'ANOVA. La significativité a été attribuée au $p < 0,05$. Les limites de détection correspondantes sont les suivantes : 486ppm pour Ca, 169ppm pour K, 81ppm pour Na et 366ppm pour Sr.

Plasma



Endolymphe

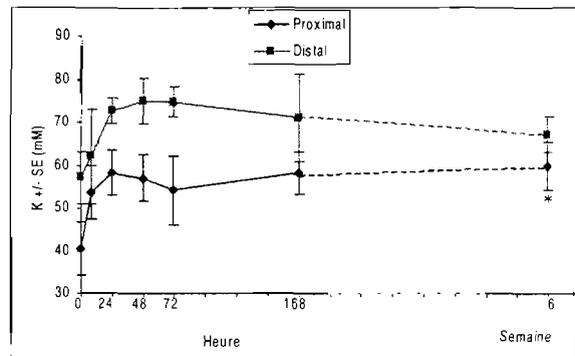
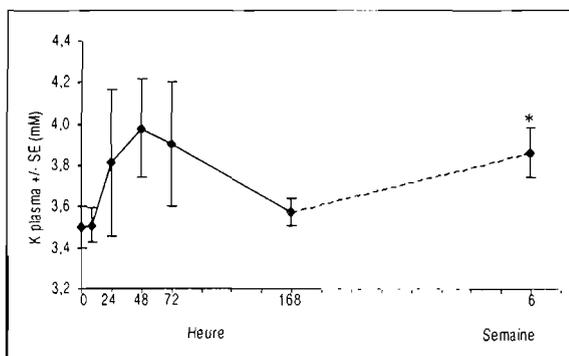
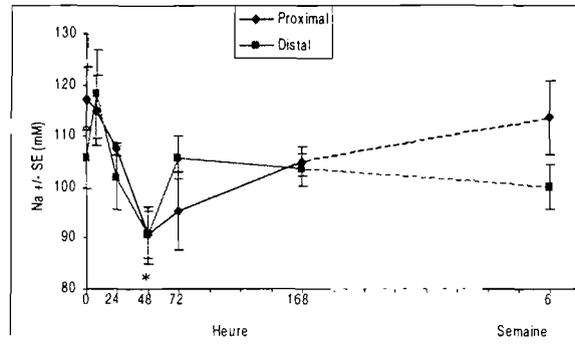


Figure 28 : Variations des concentrations en sodium et potassium dans le plasma et l'endolymphe (distal et proximal) durant 7 jours et à l'équilibre au bout de 6 semaines après un transfert en eau dessalée. Moyennes \pm SE de 9 mesures à t=0 et 6 semaines et 4 mesures pour les autres points. Comparaison à l'aide d'ANOVA et d'analyse de contraste par rapport au temps zéro (0 heure), * p<0,05.

Otolithe :

Cette étude a été menée uniquement chez les animaux adaptés au bout de 6 semaines. Les données sont exprimées sous forme de rapport avec le calcium pour s'affranchir d'une éventuelle variation du Ca dans les otolithes qui masquerait les réelles variations de composition de l'otolithe.

La figure 27 indique que, en fin d'expérience, les rapports Na/Ca et K/Ca sont supérieurs chez les animaux adaptés à 10°C par rapport aux 17°C (respectivement $-0,61 \cdot 10^{-3}$ soit $-7,1\%$ $p=0,012$ et $-1,19 \cdot 10^{-4}$ soit -14% $p=0,042$). Par contre, le rapport Sr/Ca reste inchangé, la légère augmentation observée à 17°C ($+0,58 \cdot 10^{-3}$ soit $+17\%$) n'étant pas significative.

Le tableau 3 montre qu'aucune différence de composition n'est observée entre la période avant l'expérience et la fin de l'expérience pour les animaux adaptés à 10°C et 17°C.

2.4.1.2. Effets d'un changement de la salinité de l'eau :

Plasma :

Le transfert en milieu dessalé se traduit par une baisse de la [Na] qui atteint un minimum 24h après le passage en 8‰ ($-11,4\text{mM}$ soit $-7,5\%$ $p=0,050$). La [K] a tendance à augmenter mais présente une importante variabilité probablement en relation avec la désynchronisation de la réponse au choc salin des animaux. Environ 6 jours après le transfert en eau à 8‰, les concentrations de Na et de K retrouvent une valeur comparable à celles des témoins 35‰. Cependant après une adaptation de 6 semaines à 8‰, la [K] est significativement plus élevée ($+0,36\text{mM}$ soit $+10,3\%$ $p=0,036$) tandis que la [Na] reste stable. (Figure 28).

Endolymphe :

Les variations de composition observées dans l'endolymphe proximale et distale sont semblables à celles du plasma (figure 28). Une baisse de la [Na] apparaît entre 8h et 48h (-27mEq soit -23% du côté proximal $p=0,023$ et -15mEq soit -14% du côté distal). La [K] augmente de façon non significative dans les deux zones distales et proximales. Cette hausse, qui atteint un maximum deux jours après le transfert, se maintient jusqu'au dernier point de notre suivi (7

jours). Au bout de 7 jours, la [Na] retrouve des valeurs proches des initiales. Après 6 semaines à 8‰, la [Na] revient aux niveaux de départ, tandis que la [K] présente une tendance à la hausse qui est significative uniquement dans la zone proximale (+19,3mM soit 48% p=0,036). L'hétérogénéité entre les zones proximales et distales des concentrations de K est maintenue chez les animaux adaptés à 8‰.

Otolithe :

La comparaison des 3 différents lots en fin d'expérience montre que le rapport K/Ca est supérieur chez les 8‰ par rapport aux 35‰ ($+1,36 \cdot 10^{-4}$ soit +19% p=0,027) alors que le rapport Na/Ca reste stable. Par contre, le rapport Sr/Ca est très inférieur chez les 8‰ ($-1,19 \cdot 10^{-3}$ soit -30% p=0,003) (Figure 27).

Le tableau 3 indique que chez les animaux adaptés à 8‰ seul le rapport Sr/Ca est significativement inférieur en fin d'expérience par rapport à la période avant l'expérience (p<0,0001).

2.4.2. Discussion :

Afin de mieux visualiser les effets d'un changement de température ou de salinité externe sur l'évolution des paramètres ioniques entre les différents compartiments en contact (externe – plasma – endolymphe - otolithe), nous avons compilé les résultats dans la figure 29. Les modifications des paramètres étudiés sont exprimées par rapport à la situation 35‰-17°C prise comme référence et le sens des flèches indique donc l'évolution lors d'une baisse de la température ou de la salinité externes.

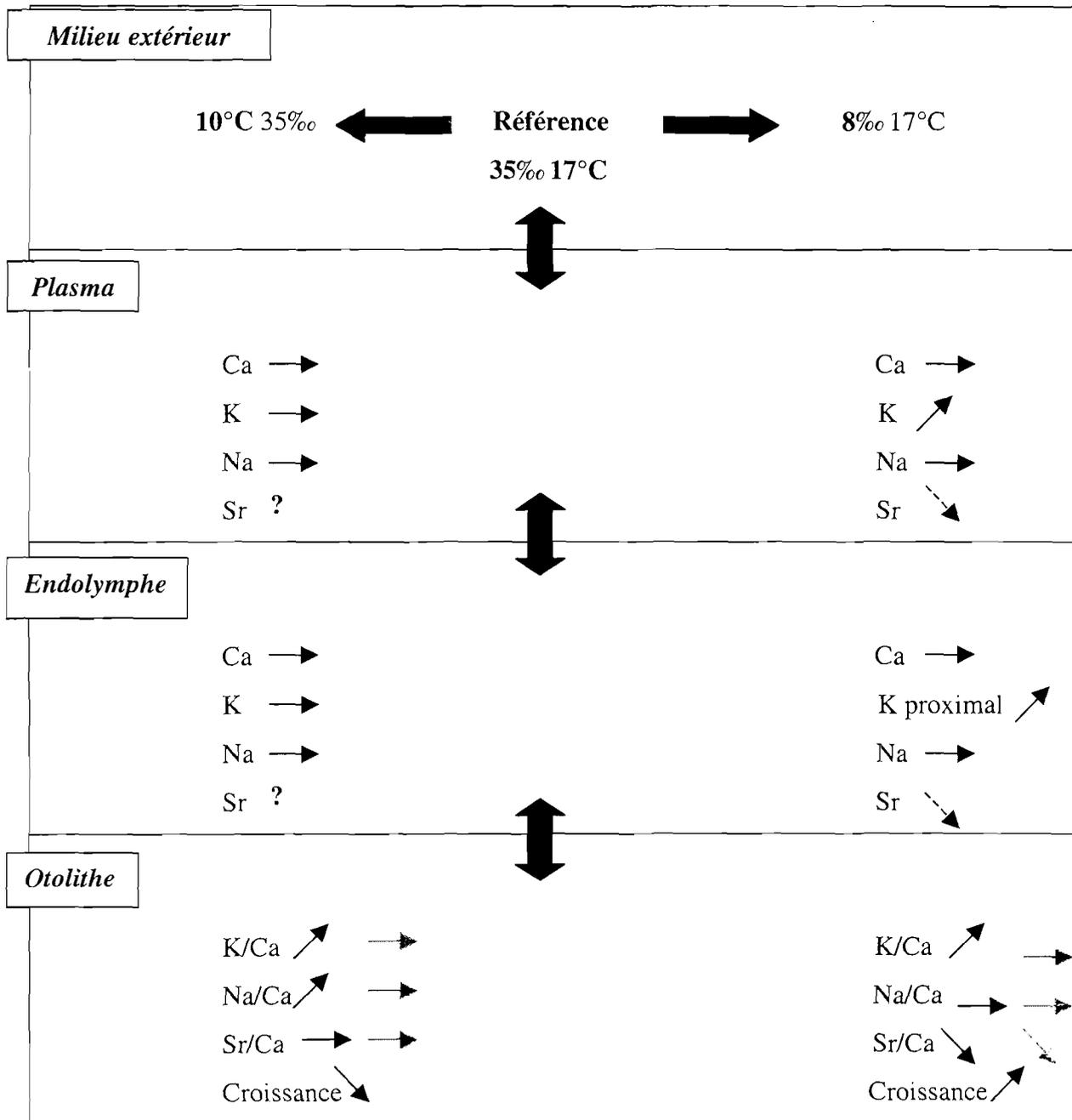


Figure 29 : Schéma récapitulatif des variations de K et Na dans le plasma et l'endolymph, de K/Ca, Na/Ca et Sr/Ca dans l'otolithe entre les lots maintenus à différentes températures et salinités en fin d'expérience (flèches noires pour les otolithes). Variations de K/Ca, Na/Ca et Sr/Ca sur un même otolithe entre la période avant l'expérience et la fin de l'expérience (flèches grises) qui font de l'otolithe son propre témoin et permettent ainsi de déduire si les variations sont dues à un changement environnemental ou à des différences physiologiques entre les poissons. Les flèches en pointillés correspondent à des variations non mesurées mais supposées d'après la littérature.

Nos résultats illustrent clairement un fort degré de couplage entre le plasma et l'endolymphe exprimé par une évolution comparable des concentrations des éléments étudiés : Na^+ et K^+ . Bien que non mesurés dans nos expériences, il est établi que la baisse de la salinité du milieu externe (la concentration en Sr de l'eau de mer est beaucoup plus élevée que celle de l'eau douce (Ingram et Sloan, 1992)) s'accompagne d'une diminution de la $[\text{Sr}^{2+}]$ dans les 2 compartiments : plasma qui reflète selon une relation non linéaire la teneur en Sr^{2+} de l'environnement (Mugiya et Tanaka, 1995) et endolymphe, Kalish (1991) ayant montré une corrélation positive entre la $[\text{Sr}]$ plasmatique et la $[\text{Sr}]$ de l'endolymphe. Ainsi bien que ce paramètre n'ait pas été analysé dans notre expérience, il est fort probable que la baisse de la $[\text{Sr}^{2+}]$ plasmatique due au passage en milieu dessalé induise une diminution de la $[\text{Sr}^{2+}]$ de l'endolymphe.

L'étude des relations entre chimie de l'endolymphe et chimie de l'otolithe s'avère par contre plus délicate. Il faut probablement différencier les variations de Sr et de Ca de celles de Na et de K et ce pour différentes raisons.

1- Le Sr entre en compétition avec le Ca lors de la calcification pour former de la strontionite (SrCO_3), il est donc incorporé dans la phase minérale de l'accroissement et donc principalement dans la zone L. Onuma et al. (1979) ont montré que Na et K sont incorporés, dans la coquille des mollusques, dans la phase minérale et/ou la phase organique de l'accroissement. Cependant, les protéines sont globalement chargées négativement et il est admis, concernant l'otolithe, que les cations monovalents tels que Na^+ et K^+ sont incorporés sous forme liée aux protéines et donc préférentiellement au niveau de la phase organique c'est à dire principalement dans la zone D de l'accroissement. La méconnaissance des distributions relatives des différents éléments au sein d'un accroissement journalier est susceptible d'entraîner des biais dans l'analyse quantitative avec une taille de faisceau constante lors de la comparaison de spécimens présentant d'importantes différences de croissance. L'analyse du Sr par rapport à la référence calcique permet « a priori » de s'affranchir de ce problème et est de ce fait largement utilisée. La référence calcique semble par contre beaucoup plus contestable s'agissant de l'analyse du Na et du K. En effet, si les proportions relatives zoneL/zoneD ne sont pas conservées lors d'une variation de la croissance otolithique, la probabilité de sonder x% et y% de zone L et D respectivement varie en

fonction de la taille de l'accroissement. La dimension du faisceau d'analyse a de ce fait été choisie de façon à ce que la probabilité de ne sonder qu'une zone L ou une zone D soit nulle. D'autre part, les données quantitatives traitées correspondent à la moyenne de plusieurs (3) analyses qui permettent au moins au sein d'un lot homogène de réduire le biais éventuellement induit par ce facteur. Enfin, la non conservation des proportions relatives des zones L et D devrait en toute hypothèse se traduire par l'existence d'une corrélation entre la concentration en calcium et la taille de l'accroissement. L'analyse de nos résultats montre qu'une telle corrélation ne peut être mise en évidence et nous permet de postuler, en première approche que, chez le turbot et dans nos conditions expérimentales, la proportion relative des deux phases d'un accroissement est conservée lors de variations de croissance. En corollaire, le facteur taille de faisceau constante/taille d'accroissement variable n'introduirait pas de biais significatif dans les mesures. On notera enfin que l'analyse des résultats sur les concentrations élémentaires aboutissent aux mêmes conclusions que celles formulées d'après l'analyse des ratios.

2- Le cas du Sr doit être différencié de celui du K et du Na par l'amplitude des phénomènes observés dans l'une et l'autre des deux expériences température et salinité. Concernant le Sr, les variations de concentrations du milieu externe, plasmatique et endolymphatique sont supposées être faibles sinon nulles lors d'un changement de température et très importantes lors d'un changement de salinité. Farrell et Campana (1996) ont, à ce titre, montré que, chez les tilapias (*Oreochromis niloticus*), l'eau est la principale source de Ca et Sr, contribuant pour 75,5% du Ca et 88% du Sr déposé sur l'otolithe pendant la période expérimentale. Ces auteurs ont par ailleurs noté que seul le taux de dépôt du Sr sur l'otolithe reflète la disponibilité environnementale. Concernant nos expériences, l'analyse des variations du Sr/Ca aboutit aux mêmes conclusions quelle que soit l'approche retenue, comparaison inter lots en fin d'analyse et analyse des variations intra-individuelles : le rapport Sr/Ca ne varie pas en fonction de la température et diminue fortement quand la salinité diminue fortement. Concernant l'analyse du rapport Sr/Ca en fonction de la température, aucune différence significative n'a été observée lors de notre expérimentation. Ainsi que nous l'avons développé dans l'introduction l'effet de ce facteur environnemental est encore mal appréhendé et très controversé. Certains travaux ont montré l'existence d'une relation négative entre Sr/Ca et la température (Townsend et al., 1992 ; Tzeng, 1994 ; Townsend et al., 1995), d'autres l'existence d'une relation positive (Arai et al., 1995 ; Arai et al., 1996), tandis que

des études récentes postulent pour une absence de relation (Limburg, 1995 ; Gallahar et Kingsford, 1996). Concernant la réponse du rapport Sr/Ca en fonction de la salinité, nos résultats sont conformes à ceux, très nombreux, sur ce sujet (i.e. Arai et Tsukamoto, 1998 ; Secor et al., 1998). Cette caractéristique est ainsi très largement utilisée pour l'étude de migrations anadromes/catadromes effectuées par certaines espèces pendant leur cycle vital (Tzeng et al., 1997 ; Otake et Uchida, 1998 ; Limburg, 1998).

Le couplage endolymphe/otolithe semble plus difficile à mettre en évidence s'agissant des cations monovalents Na et K.

Nos expérimentations montrent que dans le cas d'un changement de salinité, ce couplage semble relativement étroit : augmentation du K proximal et constance du Na endolympatiques lors d'un passage à 8‰ se traduisant respectivement sur l'otolithe par une augmentation du rapport K/Ca, une constance du rapport Na/Ca lorsque l'on compare les deux lots en fin d'expérience. L'analyse de la composition chimique avant et en fin d'expérience sur un même otolithe, qui fait ainsi de l'otolithe son propre témoin, suggère cependant que les différences de K/Ca observées entre les lots 35‰ et 8‰ en fin d'expérience ne sont pas dues à un changement de salinité puisque les rapports K/Ca intra-individuels n'évoluent pas significativement pendant l'expérience. La comparaison des 2 lots avant expérience montre en fait une différence dans le rapport K/Ca, proche de la significativité ($p=0,064$). Sous-réserve qu'elle reflète bien un phénomène biologique et non un biais d'analyse, la différence inter-lot en fin d'expérience serait donc plus probablement liée à un/des facteurs endogènes, hypothèse étayée par l'analyse de l'hétérogénéité des lots quand à leur potentiel de croissance somatique.

L'effet d'une baisse de la température pose lui aussi un problème d'interprétation : Na et K ne varient pas dans l'endolymphe alors que les rapports Na/Ca et K/Ca sont significativement différents entre les lots 10°C et 17°C en fin d'expérience. Sous l'hypothèse précédemment étayée d'un maintien des proportions relatives des zones L et D, ce résultat ne peut être, en première approche, expliqué par l'introduction d'un biais d'analyse d'accroissements de tailles très différentes par un faisceau de taille constante. Une interprétation possible de ces résultats réside dans le fait que les concentrations de Na et K mesurées dans l'endolymphe correspondent aux concentrations totales. Or seuls les éléments libres sont incorporés dans les otolithes. Bien que la

teneur en protéines endolymphatiques soit comparable dans les deux lots, on peut émettre l'hypothèse d'une variation qualitative entraînant un changement des concentrations en ions libres se répercutant par une incorporation différentielle dans l'otolithe. On notera par ailleurs que, comme dans le cas d'un changement de salinité, l'analyse des variations intra-individuelles (avant/fin d'expérience) ne permet pas de montrer de différence significative dans l'incorporation de ces deux cations lors d'un changement de température. L'hypothèse de l'intervention de facteurs endogènes peut à nouveau dans les mêmes conditions être formulée.

En conclusion, ces deux expériences ont montré que le couplage entre la composition de l'endolymphe et celle de l'otolithe peut dans certains cas être difficile à appréhender et qu'il faut probablement orienter les recherches vers l'analyse des ions libres dans l'endolymphe et la caractérisation des protéines.

3. Recherche d'éléments traces dans le complexe plasma – endolymphe – otolithe :

La recherche de signatures environnementales dans la composition des otolithes a principalement été menée à l'aide d'une microsonde WDS (pour les éléments majeurs et mineurs) ou d'un ICPMS (pour les mineurs et traces) soit, en solution (analyse globale) soit par ablation laser (analyse locale). Dans le plasma et l'endolymphe, les majeurs et mineurs ont été mesurés à l'aide de kits sigma par spectrophotométrie. Dans nos études présentées ci-après, nous avons essayé de comparer ces techniques avec les analyses des éléments majeurs et mineurs dans l'endolymphe distale et proximale en conditions normales, puis en comparant les résultats obtenus sur la composition chimique des otolithes, du plasma et de l'endolymphe lors de deux expériences basées sur un changement de la température de l'eau. Dans une deuxième partie, nous avons analysé les concentrations des éléments traces pour étudier une éventuelle hétérogénéité spatiale dans l'endolymphe et essayer de caractériser un changement de température du milieu biotique.

3.1. Matériels et méthodes :

3.1.1. Hétérogénéité de composition de l'endolymphe :

Les résultats obtenus à l'aide de la spectrophotométrie proviennent de l'expérience menée sur l'hétérogénéité de composition de l'endolymphe (cf. 1^e partie §1.). Lors de cette expérience, des prélèvements supplémentaires d'endolymphe côté distal et proximal ont été réalisés dans les saccules gauches de 12 turbots. Les échantillons ont été conservés dans 50µl d'eau milliQ au congélateur, puis minéralisés et analysés à l'aide d'un ICPMS (cf. annexe I §2.1.). Les concentrations élémentaires ont été calculées à partir des concentrations isotopiques suivantes : ^{44}Ca , ^{23}Na , ^{39}K , ^{24}Mg , ^{27}Al , ^{66}Zn , ^{56}Fe et ^{88}Sr avec des limites de détection respectivement de : 15,5ppb, 18,6ppb, 17,4ppb, 0,57ppb, 0,45ppb, 0,76ppb, 1,32ppb et 0,013ppb. Les détails opératoires (relatifs au type d'étalon interne utilisé, coefficient de dilution des échantillons...) sont mentionnés dans l'annexe I §2.1. Après soustraction du blanc, les résultats ont été exprimés

sous forme de concentrations élémentaires, basées sur les pourcentages d'abondance naturelle de chaque isotope. Les valeurs inférieures aux limites de détection ont été mises à zéro. Les analyses statistiques ont été faites à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. La significativité a été acceptée pour $p < 0,05$.

3.1.2. Changement de la température du milieu biotique :

Les turbots (poids moyens de 50g) ont été maintenus durant 8 semaines à 35‰ 17°C pour un lot et 35‰ 10°C pour l'autre lot. Des prélèvements de plasma, d'endolymphe (sacculé gauche) et d'otolithe ont été réalisés sur 6 poissons de chaque lot. Cette expérience s'est déroulée avant de connaître l'hétérogénéité de composition de l'endolymphe. Aussi les échantillons d'endolymphe prélevés correspondent-ils à un mélange plus ou moins important des côtés distaux et proximaux. Les compositions chimiques du plasma et de l'endolymphe ont été déterminées à l'aide d'un ICPMS après minéralisation et dilution (cf. annexe I §2.1.). Les concentrations élémentaires ont été calculées à partir des concentrations isotopiques suivantes : ^{44}Ca , ^{23}Na , ^{39}K , ^{24}Mg , ^{27}Al , ^{66}Zn , ^{56}Fe et ^{88}Sr avec des limites de détection respectivement de : 25,1ppb, 15,5ppb, 19,6ppb, 2,2ppb, 0,71ppb, 0,88ppb, 0,37ppb et 0,08ppb. Les détails opératoires (relatifs au type d'étalon interne utilisé, coefficient de dilution des échantillons...) sont mentionnés dans l'annexe I §2.1. Les otolithes ont été préparés selon le plan sagittal et les analyses ont été faites sur l'antirostre à l'aide d'un ICPMS à ablation laser (cf. annexe I §2.2.1.). Lors de l'expérience, les limites de détection des isotopes analysés correspondent à : ^{23}Na 100ppm, ^{39}K 50ppm, ^{24}Mg 9ppm, ^{27}Al 3ppm, ^{66}Zn 2ppm, ^{56}Fe 20ppm et ^{88}Sr 20ppm.

Pour les deux types d'analyses (liquide et solide), après soustraction du blanc, les résultats ont été exprimés sous forme de concentrations élémentaires, basées sur les pourcentages d'abondance naturelle de chaque isotope. Les valeurs inférieures aux limites de détection ont été mises à zéro.

Les résultats, obtenus par la spectrophotométrie et la WDS lors de l'expérience décrite dans le §2.4.1.1. précédent basée sur le changement de température du milieu biotique (10°C et 17°C), ont été utilisés pour effectuer la comparaison des techniques. Les analyses statistiques ont été

faites à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. La significativité a été acceptée pour $p < 0,05$.

3.2. Comparaison des techniques :

Pour les échantillons liquides (plasma et endolymphe), cette comparaison entre la spectrophotométrie et l'ICPMS est effectuée en comparant les concentrations de Ca, Na et K, tandis que pour les otolithes la comparaison entre la WDS et l'ICPMS à ablation laser est réalisée à l'aide de [Na], [K] et [Sr].

3.2.1. Hétérogénéité de composition de l'endolymphe :

Les résultats obtenus par ICPMS en solution et spectrophotométrie sur les éléments majeurs et mineurs de l'endolymphe distale et proximale sont représentés dans la figure 30. Globalement les concentrations de Ca, Na et K sont du même ordre de grandeur. La [Ca total] ne montre pas de différence significative entre ces deux techniques. On peut cependant noter que les erreurs standards sont nettement plus fortes pour les moyennes obtenues par ICPMS. Le Na présente des concentrations comparables du côté distal, par contre du côté proximal, les valeurs mesurées par ICPMS sont significativement plus faibles que celles mesurées par spectrophotométrie ($p=0,001$). Inversement, le K montre des concentrations significativement plus faibles lors de mesures par ICPMS du côté distal ($p=0,038$) tandis que du côté proximal elles sont similaires. L'hétérogénéité des [K] dans l'endolymphe, observée par spectrophotométrie, n'est pas décelée par ICPMS.

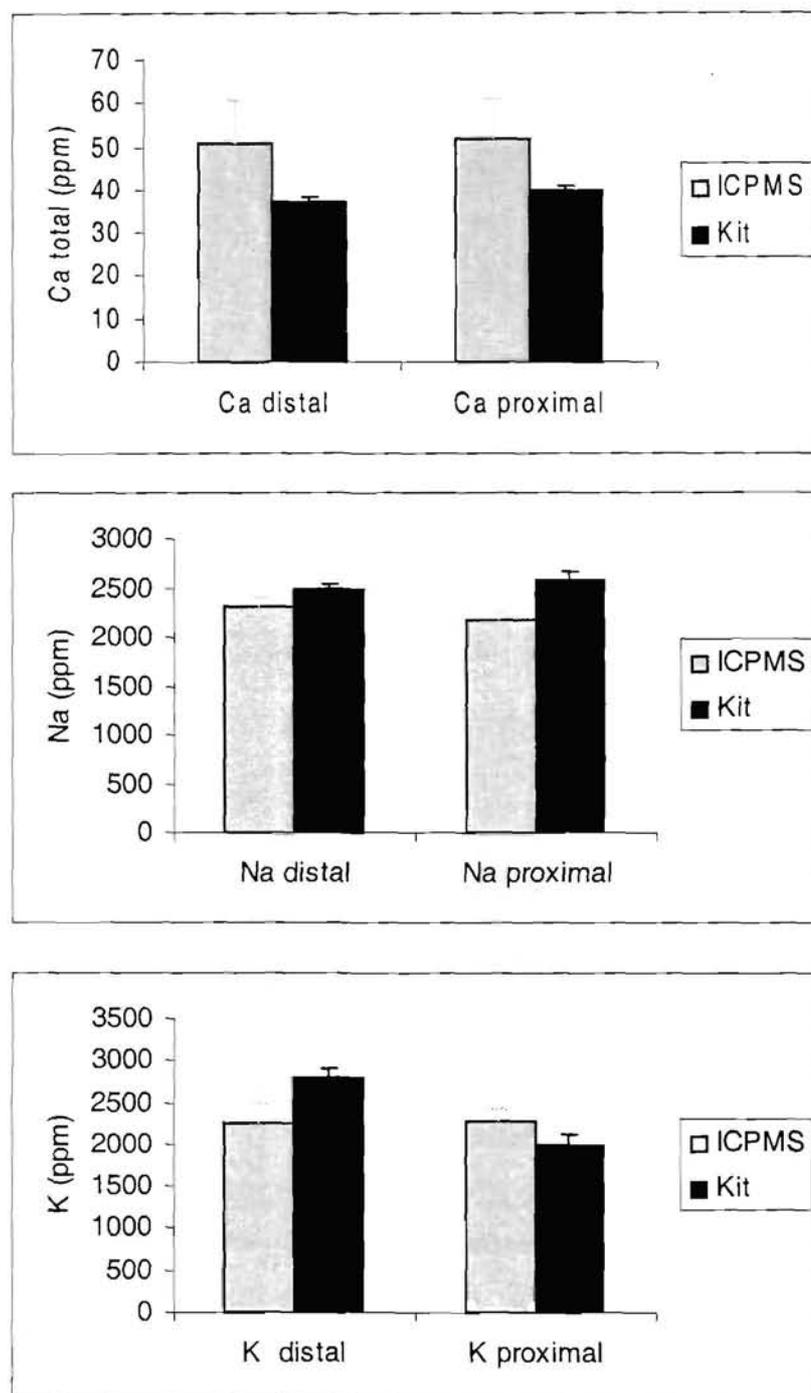


Figure 30 : Comparaison des deux techniques (ICPMS en solution et spectrophotométrie à l'aide de kits sigma) par l'analyse des éléments majeurs et mineurs de l'endolymph distale et proximale chez le turbot. Moyenne et erreur standard de 12 mesures.

3.2.2. *Changement de la température du milieu biotique :*

Concernant les échantillons d'endolymphe, les analyses par ICPMS ont été réalisées sur un mélange des zones proximales et distales. Par contre, les analyses de [Na] et [K] effectuées par spectrophotométrie ont été faites sur l'endolymphe de ces deux zones et la [Ca] a été mesurée seulement du côté proximal. Ainsi arbitrairement nous avons choisi de comparer uniquement les résultats « proximaux » obtenus par spectrophotométrie avec ceux obtenus par ICPMS.

Une comparaison directe de ces deux expériences ne peut pas être réalisée pour plusieurs raisons : (1) Ces deux expériences n'ont pas été réalisées sur les mêmes lots de poissons : l'une est faite avec des poissons de poids moyens de 50g tandis que pour l'autre le poids avoisinait les 350g, (2) elles n'ont pas été faites à la même période de l'année : l'une au printemps l'autre en automne, et (3) les prélèvements d'endolymphe sont localisés (distal et proximal) pour l'une et correspondent à un mélange des deux zones pour l'autre, le saccule (droit vs. gauche) différant lui même d'une expérience à l'autre. Ainsi nous effectuons simplement une comparaison des tendances qui caractérisent le changement de température dans chaque expérience.

Dans l'expérience analysée par spectrophotométrie, nous avons observé une stabilité des concentrations de Ca, Na et K dans le plasma et l'endolymphe lors du passage de 10°C à 17°C du milieu biotique. Dans celle analysée par ICPMS, les [Na] et [K] sont constantes dans le plasma et l'endolymphe, la [Ca] plasmatique diminue 17°C par rapport à 10°C ($p=0,004$) et la [Ca] endolympatique reste stable. (Figure 31).

Concernant les mesures réalisées sur les otolithes (figure 32), l'expérience menée à l'aide de la WDS a montré une différence entre les lots 10°C et 17°C avec une chute des rapports K/Ca et Na/Ca, principalement due à une baisse des [K] et [Na], lors du passage de 10°C à 17°C (respectivement $p=0,042$ et $p=0,012$). Cependant l'analyse sur un même otolithe des rapports K/Ca et Na/Ca avant et en fin d'expérience (présentée dans le § 2.4.1.1.) a permis de montrer que ces différences ne sont pas dues au changement de température du milieu biotique mais à une différence de concentration de K et Na déjà présente avant le début de l'expérience. Le rapport Sr/Ca est stable entre les deux lots. Dans l'expérience menée à l'aide de l'ICPMS à ablation laser, aucune variation n'est observée, ces trois éléments (Na, K et Sr) présentent des teneurs similaires à 10°C et 17°C.

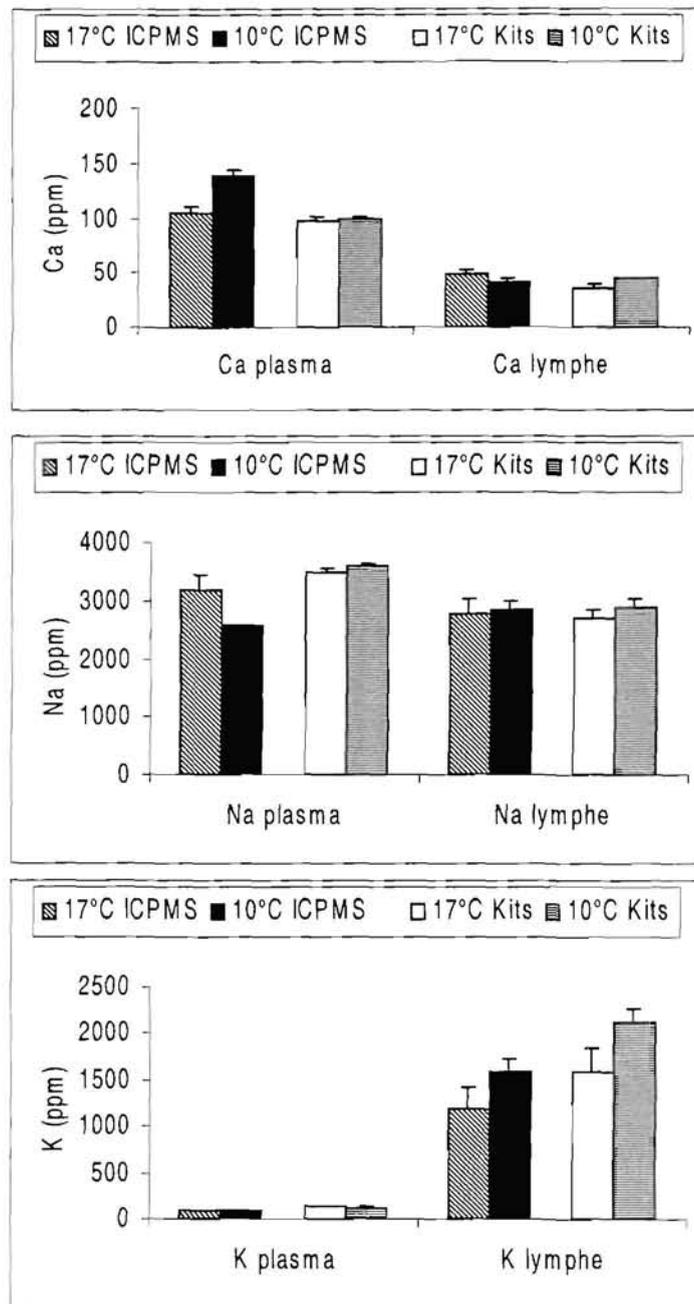


Figure 31 : Comparaison des deux techniques (ICPMS en solution et spectrophotométrie à l'aide de kits sigma) par l'analyse des éléments majeurs et mineurs de l'endolymphe et du plasma chez des turbots maintenus à 10°C et 17°C. Moyenne et erreur standard de 6 mesures pour les analyses par ICPMS et 9 mesures pour les kits.

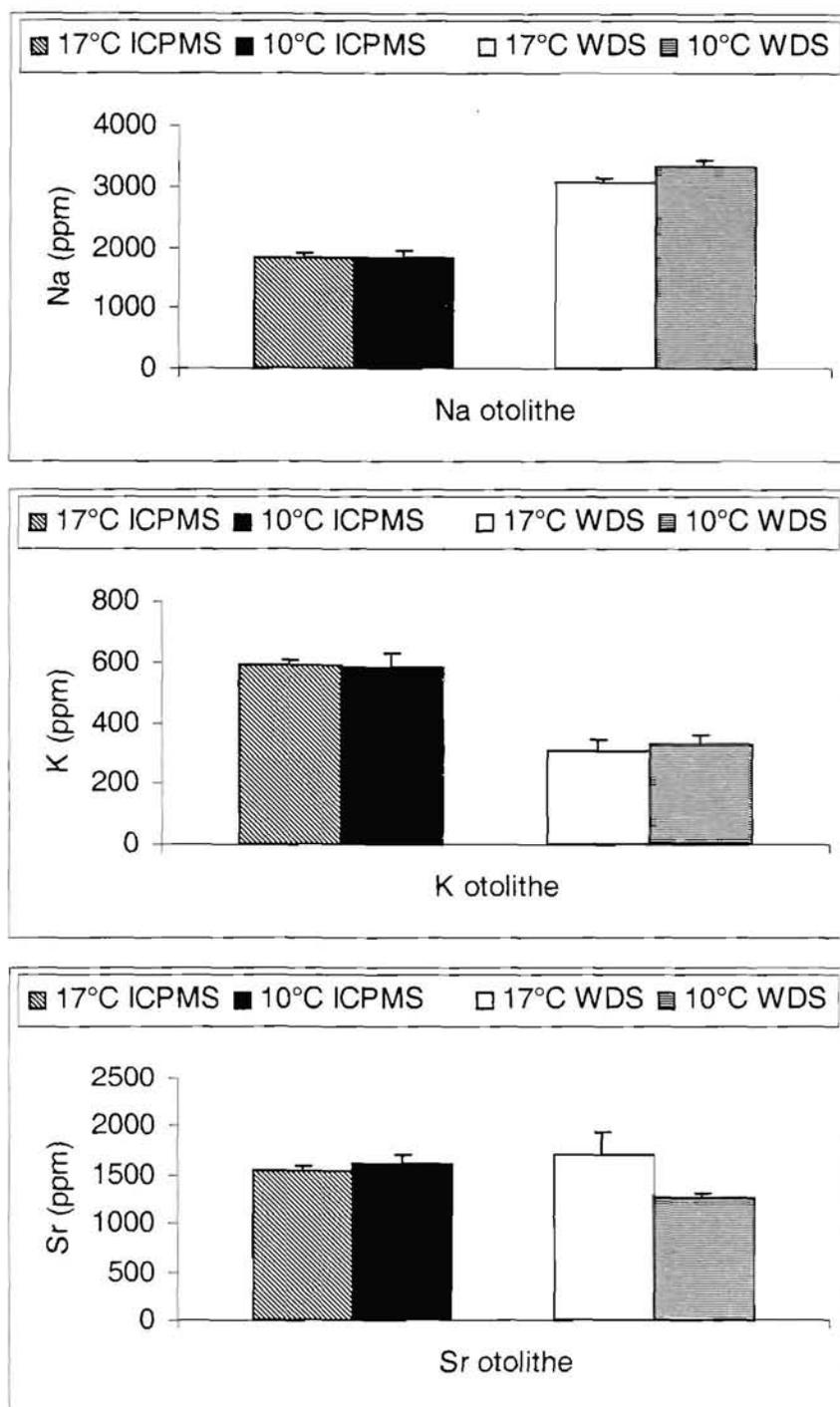


Figure 32 : Comparaison des deux techniques (ICPMS avec ablation laser et microsonde électronique WDS) par l'analyse des éléments mineurs des otolithes chez des turbots maintenus à 10°C et 17°C. Moyenne et erreur standard de 6 mesures pour les analyses par ICPMS et 9 mesures par la WDS.

3.2.3. Discussion :

La spectrophotométrie est la principale technique utilisée pour les mesures des composants plasmatiques et endolymphatiques. Cependant cette technique est mono-élémentaire et nécessite pour l'analyse de plusieurs éléments différentes aliquotes d'échantillon. Le volume d'endolymphe pouvant être prélevé étant très faible (5 μ l dans chaque zone proximale et distale pour des poissons de poids avoisinant 350g pour une expérience et 6 μ l de volume total pour des poissons de 85g pour l'autre expérience où les prélèvements correspondent à un mélange des deux zones), la totalité de l'échantillon est requise pour l'analyse d'un seul élément chimique. L'ICPMS en solution est par contre une technique multi-élémentaire et permet ainsi de déterminer les concentrations de plusieurs éléments sur un seul échantillon d'endolymphe. Cette caractéristique en fait un outil d'analyse potentiellement très puissant.

Notre étude montre que les concentrations de Ca, Na et K obtenues dans le plasma et l'endolymphe par ces deux techniques sont globalement du même ordre de grandeur même s'il existe des différences significatives. Ces différences observées sont probablement le résultat d'un trop grand nombre de manipulations. En effet, contrairement aux analyses par spectrophotométrie qui sont directes (échantillon dans réactif puis lecture au spectrophotomètre), l'analyse des échantillons liquides par ICPMS nécessite une minéralisation à l'aide d'acide nitrique. Elle a pour but de détruire les matières organiques contenues en fortes concentrations dans ces deux fluides et ainsi éviter la formation d'un dépôt à l'intérieur du spectromètre de masse. Cette minéralisation (décrite dans l'annexe I) impose plusieurs dilutions de l'échantillon. Ces dilutions sont faites sur de très petits volumes et n'ont pas été suivies de façon précise par des pesées. Le coefficient de dilution étant assez important (1/100^e pour les mesures de Ca et 1/1000^e pour Na et K), la méconnaissance de sa valeur exacte pour chaque échantillon (le poids initial de l'échantillon n'a pas été mesuré) se répercute donc probablement sur le calcul des concentrations ce qui induit les différences observées entre les deux techniques.

Les mesures effectuées par ICPMS montrent que la baisse de la [Ca] plasmatique à 17°C par rapport à 10°C ne se répercute pas dans l'endolymphe. Ce résultat peut probablement être expliqué par l'existence d'un biais technique. L'analyse des résultats montre en effet que la mesure

de la [Ca] endolymphatique à partir de la [^{44}Ca] est sujette à caution, du fait que les concentrations isotopiques mesurées sont proches et parfois inférieures aux limites de détection. Le nombre d'échantillons analysé est par ailleurs très faible.

Dans la littérature chez les poissons, l'ICPMS n'a jamais été utilisé pour des analyses de compositions chimiques d'endolymphe. Notre étude montre qu'un intérêt croissant doit être porté à cette technique et que des améliorations doivent être apportées au niveau de la préparation des échantillons, en particulier par le suivi des dilutions à l'aide de pesées. De plus, l'utilisation de micronébuliseur pour vaporiser l'échantillon dans le spectromètre de masse est une voie à développer. En effet, cet appareil permet l'analyse de très petits volumes (10-100 μl) ce qui permettrait de diminuer le coefficient de dilution des échantillons dans un rapport fonction de la quantité de sels présents dans les échantillons.

Les deux appareils les plus fréquemment rencontrés dans les analyses de composition chimique des otolithes correspondent à la WDS et à l'ICPMS à ablation laser. Dans notre étude, aucune différence de concentration de Na, K et Sr n'est observée entre 10°C et 17°C avec les deux techniques employées et nous aboutissons aux mêmes résultats. Les otolithes analysés par ICPMS provenant d'une expérience différente de ceux analysés par WDS (cf. ci-dessus), nous ne pouvons pas dire si les différences dans les niveaux de concentrations observées sont dues à la technique ou à la composition des otolithes qui varie. En fait ces deux expériences qui aboutissent à des résultats comparables permettent de corroborer notre hypothèse émise précédemment à savoir que chez le turbot, il ne semble pas y avoir de relation entre le rapport Sr/Ca (très corrélé à la concentration en strontium) et la température du milieu biotique. Ceci corrobore les études récentes de Gallahar et Kingsford (1996) sur *Girella elevata*, Kawakami et al. (1998) sur *Anguilla japonica* et Chesney et al. (1998) sur *Brevoortia patronus*.

3.3. Analyses des éléments traces :

La recherche des éléments traces dans les otolithes est généralement menée à l'aide d'un ICPMS à ablation laser. Dans la littérature, à notre connaissance, l'ICPMS n'a pas été utilisée

chez les poissons pour analyser la composition en éléments traces de l'endolymphe. Ainsi dans nos études suivantes, nous avons déterminé les concentrations élémentaires de Mg, Al, Zn, Fe et Sr (à partir des isotopes mentionnés dans le § matériels et méthodes) dans les deux zones distales et proximales de l'endolymphe pour déterminer leur localisation spatiale. Puis dans une deuxième partie, nous avons analysé ces éléments dans le plasma, l'endolymphe (mélange des deux zones proximales et distales) et l'otolithe de poissons maintenus à 10°C et 17°C pour essayer de caractériser un changement de température du milieu biotique.

3.3.1. Composition en éléments traces de l'endolymphe distale et proximale :

Les résultats sont présentés dans la figure 33. Aucune différence significative n'a été observée entre les côtés distaux et proximaux de l'endolymphe pour les 5 éléments mesurés. Dans ces deux zones, la concentration de Mg avoisine 7ppm, [Al] 4ppm, [Zn] 4,7ppm, [Fe] 1,3ppm et [Sr] 0,16ppm.

3.3.2. Concentrations des éléments traces dans le plasma, l'endolymphe et l'otolithe lors d'un changement de la température du milieu biotique :

Les concentrations de Mg, Al, Fe, Zn et Sr mesurées dans le plasma, l'endolymphe et l'otolithe de poissons maintenus à 10°C et 17°C sont présentées dans la figure 34.

Tandis qu'aucune variation de ces 4 éléments n'est observée dans les otolithes en fonction de la température, des modifications apparaissent dans le plasma et l'endolymphe. [Mg], [Al], [Sr] et [Zn] plasmatiques diminuent à 17°C par rapport à 10°C ($p=0,002$, $p=0,007$, $p=0,004$ et $p=0,004$ respectivement), contrairement à [Fe] qui augmente ($p=0,002$). Dans l'endolymphe, ce transfert en eau plus chaude provoque une augmentation de [Fe] et [Zn] ($p=0,004$ et $p=0,006$ respectivement), une baisse faiblement significative de [Al] ($p=0,045$) tandis que [Mg] et [Sr] restent stables.

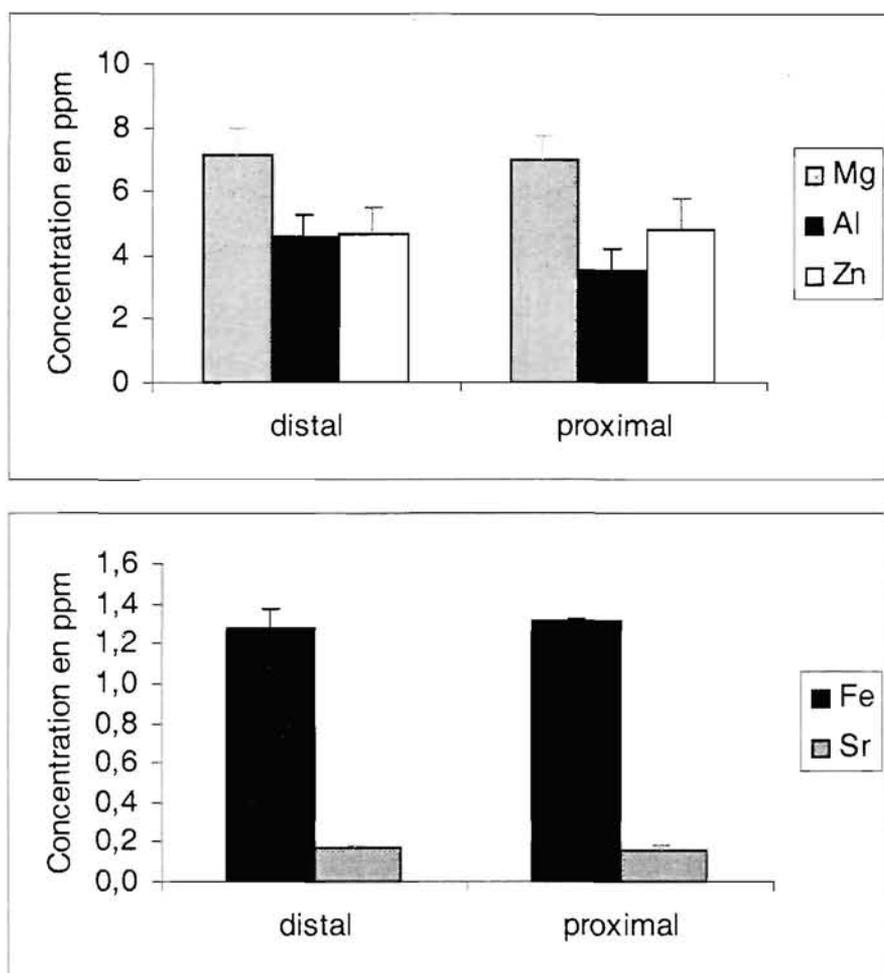


Figure 33 : Concentrations des éléments traces dans l'endolymphe distale et proximale chez le turbot. Moyenne et erreur standard de 12 mesures.

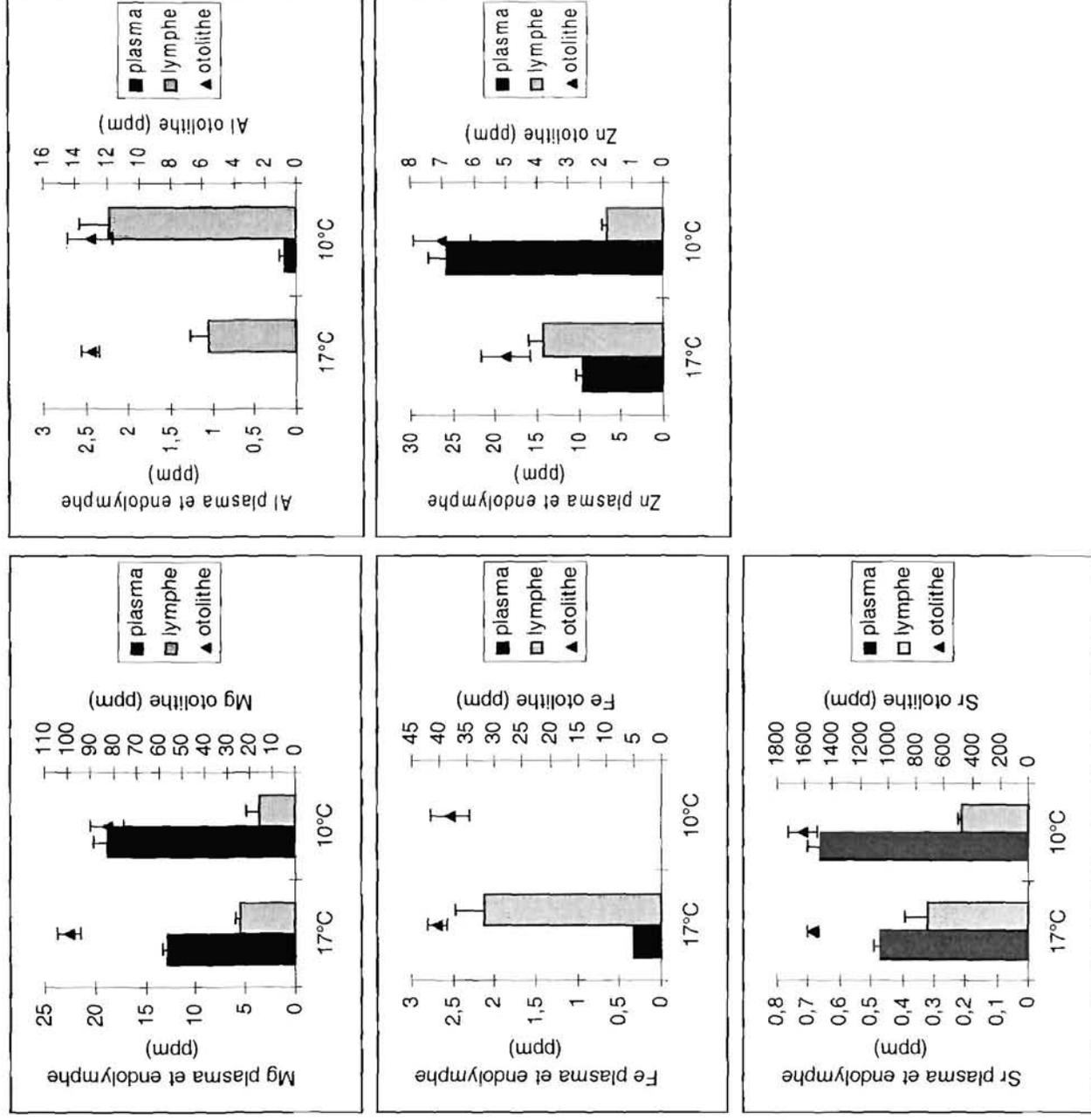


Figure 34 : Concentrations des éléments traces dans l'endolymphe et le plasma chez des turbot maintenus à 17°C et 10°C. Moyenne et erreur standard de 6 mesures.

3.3.3. Discussion :

Ces analyses prospectives nous ont permis de déterminer l'ordre de grandeur des concentrations de certains éléments qui n'ont à notre connaissance jamais été analysés dans l'endolymphe excepté le Sr. Kalish (1991) a mesuré la [Sr] dans l'endolymphe chez une morue *Pseudophycis barbatus* et a montré que les valeurs oscillent entre $2\mu\text{M}$ et $7\mu\text{M}$ en fonction du mois de l'année. La concentration de Sr obtenue dans l'analyse sur la distribution spatiale des éléments est du même ordre de grandeur ($0,16\text{ppm}$ soit $1,8\mu\text{M}$), ce qui valide nos résultats. Cette même expérience montre que les différents éléments analysés sont distribués de façon homogène dans l'endolymphe. Cependant dans le paragraphe précédent sur la comparaison entre la spectrophotométrie et l'ICPMS en solution, nous avons évoqué un manque de précision dans la technique de préparation des échantillons à analyser par ICPMS, qui pourrait induire le masquage de l'hétérogénéité de [K] dans l'endolymphe mise en évidence par spectrophotométrie. Il est « a fortiori » difficile de conclure sur l'homogénéité de la distribution spatiale des éléments traces dans l'endolymphe. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour établir si les concentrations de ces éléments sont homogènes dans l'endolymphe ou s'il existe une hétérogénéité qui est pour l'instant masquée.

Concernant les relations plasma/endolymphe étudiées en fonction de la température, les résultats obtenus sont globalement cohérents avec les analyses des expériences précédentes, dans le sens où les variations plasmatiques ne se répercutent qu'en partie dans le compartiment endolymphatique suggérant que ce dernier « est protégé » par des mécanismes régulateurs dans le transport des ions, contenus dans l'épithélium sacculaire. S'agissant de la concentration en Sr, nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence une relation nette entre les deux compartiments plasma et endolymphe. Kalish (1991) a trouvé une corrélation positive significative entre les [Sr] de ces deux compartiments. De plus, cet auteur a montré que la [Sr] de l'endolymphe est négativement corrélée avec la température chez la morue mais que cette relation est probablement la manifestation de changements physiologiques associés à la reproduction plus qu'une relation directe avec la température. Dans notre expérience, menée sur des juvéniles de turbots, aucune relation n'a été trouvée entre la [Sr] endolymphatique et la température, ce qui semble être en

accord avec l'hypothèse de Kalish (1991). Les variations des autres éléments entre les deux compartiments et en fonction de la température semblent plus complexes à interpréter. Concernant le Zn, à 17°C, il n'existe pas de différence significative entre les concentrations des deux compartiments. A 10°C, les concentrations en Zn sont beaucoup plus élevées dans le plasma que dans l'endolymphe du fait de l'augmentation très significative de la concentration plasmatique à 10°C. Si ce phénomène n'est pas un artéfact de mesure (ce qui ne peut être exclu), il reflète probablement des modifications du métabolisme étant établi que le zinc est un élément trace métaboliquement actif (intervenant comme cofacteur dans l'activation de nombreuses enzymes). A notre connaissance, les autres éléments (Al, Fe et Mg) n'ont pas été analysés dans l'endolymphe des poissons. Excepté pour le Mg et le Sr, les concentrations plasmatiques sont inférieures aux concentrations endolymphatiques, résultats là encore difficilement interprétables en l'absence d'éléments permettant de statuer sur la qualité des données obtenues. Lors d'un changement de température, les variations plasmatiques de [Al] et de [Fe] semblent se répercuter dans l'endolymphe. Or ce sont des ions métalliques et généralement, les éléments métalliques chargés positivement sont transportés par les protéines. Ainsi la concentration de ces éléments dépend non seulement des flux ioniques entre ces deux compartiments (plasma et endolymphe) mais aussi de la qualité des protéines et de leur taux de renouvellement.

Concernant les otolithes, la technique utilisée (ICPMS à ablation laser) est considérée comme la plus adaptée pour ce type d'analyse puisqu'à l'inverse des techniques de microanalyse X, elle autorise des dosages sur des éléments en faible concentration. Les ordres de grandeurs des concentrations otolithiques obtenues dans notre expérience sont cohérents avec les résultats déjà publiés dans la littérature. Nos résultats montrent qu'aucune modification de la composition en éléments traces des otolithes n'est observée en fonction de la température. Relativement peu de travaux ont été dédiés à ce sujet et les données publiées sont assez contradictoires. Arai et al. (1995) ont constaté que les éléments Mn, Fe, Zn et Sr augmentaient proportionnellement à la température chez *Pagrus major*. Fowler et al. (1995) ont analysé les otolithes de poissons de tambours brésiliens (*Micropogonias undulatus*), élevés sous divers régimes constants de température et de salinité, pour déterminer si leur composition élémentaire changeait pendant l'ontogénèse. Des variations significatives de ^{10}B , ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{66}Zn et ^{138}Ba ont été observées

entre les régimes, l'influence la plus forte étant celle de la température. Gaudie (1996) a noté que chez les saumons, *Oncorhynchus tshawytscha*, la composition chimique des otolithes présentait une relation peu marquée avec la température et que la variation des [Sr], [Mn], [Mg], [Fe] et [Zn] était en grande partie attribuable au remplacement de l'aragonite par de la vaterite

Concernant les relations entre chimie de l'endolymphe et chimie de l'otolithe, nos résultats ne nous permettent pas d'établir de relation claire entre les deux compartiments. De façon générale toutefois, les concentrations de ces éléments dans les otolithes sont nettement supérieures à celles dans l'endolymphe (sauf pour le Zn). Ces résultats suggèrent que le pool endolymphatique de ces éléments est rapidement échangeable, observation qui est à relier avec le taux de renouvellement du pool de Ca^{2+} de l'endolymphe de l'ordre de $100\% \cdot \text{h}^{-1}$ (P. Payan communication personnelle). Le Zn semble être un élément à différencier des autres en raison de l'observation mentionnée précédemment sur l'absence de répercussions des variations plasmatiques dans l'endolymphe et du fait de l'observation d'une concentration plus faible dans l'otolithe que dans l'endolymphe, phénomènes qui ne se retrouvent pas pour les autres ions. Il faut noter que Zn est le cofacteur de l'anhydrase carbonique qui est le catalyseur de la réaction : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Or la [Zn] endolymphatique est supérieure à 17°C par rapport à 10°C c'est à dire quand la croissance otolithique est normalement plus élevée. Ainsi les variations de la [Zn] endolymphatique pourraient être expliquées par la présence d'anhydrase carbonique dans l'endolymphe (hypothèse non vérifiée jusqu'à présent). La [Zn] endolymphatique augmentant à 17°C, son couplage avec l'anhydrase carbonique devrait induire plus de HCO_3^- et donc plus de croissance otolithique. De plus, le fait que Zn soit impliqué comme cofacteur de l'anhydrase carbonique pour catalyser la réaction ci dessus, ce qui lui confère un autre rôle que contaminant de CaCO_3 , peut expliquer sa faible concentration dans l'otolithe par rapport à l'endolymphe par comparaison aux autres ions. Ces résultats nécessitent de nouvelles investigations, en particulier la mesure de l'anhydrase carbonique dans l'endolymphe.

Nous avons précédemment évoqué les difficultés techniques rencontrées lors de l'analyse des échantillons plasmatiques et endolymphatiques par ICPMS. L'ICPMS à ablation laser est elle même une technique récente encore en voie de développement et des problèmes d'ordre technique

subsistent pour l'analyse des otolithes liés (1) à l'impossibilité d'utiliser un étalon interne permettant de contrôler la dérive de l'appareil, (2) à une relative imprécision du laser qui entraîne des variations dans la quantité de matière ablatée et (3) à l'absence d'échantillons de référence (standards) adaptés permettant une calibration optimale de l'appareil (de Pontual 1999a). Jusqu'à présent, le calcium (considéré comme constant et fixé à environ 40% selon les études) a ainsi été utilisé comme référence interne pour le calcul de la concentration des autres éléments ce qui nécessairement influe sur la précision des données obtenues. Des développements techniques récents permettent d'escompter une augmentation significative dans la précision des données (nouvelle génération de laser particulièrement stable et précis, couplage d'un système d'optimisation et de contrôle du signal basé sur l'addition dans le flux de la cellule d'ablation d'un aérosol sec de composition connue, de Pontual comm. pers.). Concernant le 3^{ème} point, des travaux sont en cours, au niveau international pour tenter d'élaborer des standards adaptés à l'analyse des otolithes.

TROISIEME PARTIE :

DISCUSSION GENERALE.

Le rôle d'archive biologique que nous faisons jouer à l'otolithe est une conséquence de la physiologie du poisson (croissance somatique toute la vie de l'organisme et donc nécessité d'une croissance simultanée de l'otolithe) et des mécanismes de calcification de l'otolithe (dépôts quotidiens et très peu de résorption du dépôt sauf en cas de stress intense (Mugiya et Uchimura, 1989)). La difficulté de cette étude, qui est basée en grande partie sur la chimie de l'endolymphe, réside dans le fait que les constituants de ce compartiment ne sont certainement pas tous impliqués dans la calcification de l'otolithe. Cependant, en fonction des conditions environnementales connues pour modifier la croissance de l'otolithe, on s'aperçoit que les composants « calcificateurs » classiques (protéines totales, CO₂ total et Ca total) se modifient dans de larges proportions. Cela suggère une relation étroite entre concentration de ces composants et calcification, hypothèse évidente mais pour la première fois étayée par des résultats expérimentaux clairs.

Les résultats de cette étude nous permettent de proposer une vue synthétique de la biosynthèse de l'otolithe et de cerner avec plus de précisions la relative importance des paramètres impliqués dans ce processus.

1. Renouvellement du compartiment endolympatique :

L'oreille interne a principalement un rôle d'équilibration et d'audition et son fonctionnement dépend, au niveau du codage du stimulus, de la qualité de l'endolymphe (principalement les ions Na⁺, K⁺) qui baigne les cils des cellules sensorielles localisées au niveau de la macula. La démarche expérimentale qui consistait à perturber l'équilibre du milieu intérieur, a permis d'en étudier les effets sur la formation de l'otolithe. L'analyse des résultats de ces différentes situations environnementales montrent clairement que des relations fonctionnelles existent entre plasma et endolymphe, relations qui se traduisent par des variations corrélées du niveau des ions dans les deux compartiments. Cependant, il est important de souligner que les variations endolympatiques sont toujours très atténuées par rapport à celles observées au niveau plasmatique. Cela correspond à un taux de renouvellement très lent de ces composants (2-4%.h⁻¹ pour le K⁺, P. Payan, communication personnelle) à mettre en opposition avec les taux de

renouvellement extrêmement rapides des composants calcificateurs ioniques (plus de $100\%.h^{-1}$ pour le Ca^{2+} et le H^+ , P. Payan, communication personnelle). Il existe donc deux catégories de composants ioniques dans l'endolymphe : (1) les composants impliqués dans les fonctions d'audition et d'équilibration vitales pour l'organisme, relativement « protégés » des variations du compartiment plasmatique et (2) ceux qui sont en relation avec la calcification de l'otolithe et qui présentent une dépendance assez forte vis à vis du compartiment plasmatique. Cela peut se traduire par des variations rapides et importantes du niveau de ces composants dans l'endolymphe. En ce qui concerne les protéines présentes dans l'endolymphe, il semble également qu'elles possèdent un turnover important bien que non évalué actuellement. En effet, la concentration double en quelques heures au cours du cycle (début de la phase diurne), ce qui suppose une synthèse rapide pour retourner rapidement à son niveau le plus bas en phase nocturne, ce qui suggère la présence de phénomène de protéolyse intense (chez la truite la concentration endolymphatique de protéines triple au cours du cycle, G. Borelli, communication personnelle). L'ensemble de ces caractéristiques reflète certainement les capacités de transport et de synthèse des différents types de cellules présents dans l'épithélium sacculaire.

La capacité de l'épithélium sacculaire à renouveler très rapidement les 3 principaux composants calcificateurs est en accord avec le fait que l'otolithe peut enregistrer dans sa structure des événements rapides comme des changements de température (Volk et al., 1994 ; Casas, 1998) et de salinité (Karakiri et Westernhagen, 1989) ou toutes autres perturbations environnementales telle la capture de l'animal ou le transport (Pannella, 1980). De même, il est intéressant de noter que des photopériodes anormalement courtes peuvent entraîner la formation de deux accroissements par jour (Wright et al., 1991).

Situation environnementale	CO ₂ total		Ca total		Protéines		Croissance otolithique
	Plasma	Endolymphe	Plasma	Endolymphe	Plasma	Endolymphe	
Cycle circadien (période diurne)	↘	↘	↘	↘	↗	↗	calcification ↘
Cycle circadien (période nocturne)	↗	↗	↗	↗	↘	↘	calcification ↗
Stress chlore	↗	↗	→	→	→	Zone proximale ↗	?
Passage de 10°C à 17°C	↘	→	→	→	→	→	↗
Passage de 35‰ à 8‰	↗	↗	→	→	→	→	↗
Jeûne (Payan et al., 1998)	↘	↘	↘	→	↘	→	↘
Transport (P. Payan, com. personnelle)	↘	↗	→	→	→	↗	?

Tableau 4 : Récapitulatif des différentes expériences réalisées dans ce travail et dans la littérature. Mise en parallèle des variations de [CO₂ total], [Ca total] et [protéines] dans le plasma et l'endolymphe avec le type de croissance otolithique en fonction de la situation environnementale. Les flèches en pointillés représentent des variations supposées mais pas mesurées.

2. Degré de couplage entre homéostasie plasmatique et chimie de l'endolymphe :

Si l'on considère l'ensemble de nos expérimentations et les résultats de deux autres études (la première provenant de la littérature : le jeûne ; la seconde étant une communication personnelle : le transport des animaux), récapitulés dans le tableau 4, une généralisation des relations plasma – endolymphe pour les trois composants étudiés (protéines, CO₂ total et Ca total) peut être établie.

Protéines :

Une évolution parallèle entre taux de protéines plasmatiques et endolymphatiques est observée au cours du cycle nyctéméral, du changement de température et de salinité, avec des variations de concentration nettement moins importantes dans le plasma que dans l'endolymphe (2,7 fois moins pour les variations circadiennes, 3 fois moins pour le choc court terme de température avec le passage de 10°C à 17°C et 4 fois moins pour le passage de 35‰ à 8‰). Les protéines étant synthétisées *de novo* par l'épithélium sacculaire, on ne peut pas évoquer un couplage direct entre ces deux paramètres. La signification de ce phénomène n'est pas claire et reflète probablement l'évolution du métabolisme général de l'organisme.

CO₂ :

Dans l'ensemble des travaux récapitulés dans le tableau 4, les variations de CO₂ total de l'endolymphe reflètent celles du plasma sauf pour le changement de température du milieu biotique où [CO₂tot] endolymphatique est stable tandis qu'une diminution est observée dans le plasma. Nous proposons un couplage direct de ces deux compartiments par l'intermédiaire du CO₂ gaz, composé très soluble, diffusible et dont la pression partielle s'équilibre très rapidement entre le plasma et l'endolymphe qui sont séparés par l'épithélium sacculaire richement vascularisé (Mayer-Gostan et al., 1997). L'estimation des paramètres acido-basiques de l'endolymphe à partir du CO₂ total mesuré et des constantes plasmatiques est certainement critiquable, cependant, s'agissant de différences de pH et non de valeurs absolues, les résultats restent significatifs. Ces valeurs nous indiquent que l'évolution des paramètres acido-basiques de l'endolymphe ne résulte pas seulement d'un couplage passif par l'intermédiaire de la pCO₂ mais

fait également intervenir un processus via les systèmes de régulation de pH situés dans l'épithélium sacculaire, tel que l'échangeur Na^+/H^+ mis en évidence par Payan et al. (1997). Ces mécanismes sont probablement sous le contrôle d'hormones circulantes impliquées lors des différents stress que nous avons étudiés.

Ca :

Dans toutes ces expériences, le Ca total de l'endolymphe varie de façon similaire à celui du plasma sauf dans le cas du jeûne où la variation plasmatique ne se répercute pas dans l'endolymphe. Nos techniques d'analyses permettent de déterminer les concentrations totales de calcium or seul le Ca^{2+} est transporté du plasma vers l'endolymphe selon une voie transcellulaire (Mugiya et Yoshida, 1995). De plus, le problème est relativement complexe car la $[\text{Ca}^{2+}]$ résulte d'une combinatoire pH, $[\text{Ca total}]$ et $[\text{Protéines}]$ aussi bien dans le plasma que dans l'endolymphe et il est donc très difficile d'évaluer le degré de couplage entre ces deux compartiments. En régime d'équilibre i.e. chez des organismes bien adaptés, aucune modification de la calcémie n'a jamais été observée dans nos conditions expérimentales, qu'il s'agisse du stress Cl_2 , du changement, de température, de salinité, ni dans d'autres conditions, telle le stress de transport (P. Payan, communication personnelle). Cela correspond au fait que la calcémie, qui intervient dans les phénomènes de contraction musculaire et d'activité des cellules nerveuses, est un paramètre homéostasique extrêmement bien régulé chez tous les vertébrés (Hansen et al., 1989). Il est donc difficile d'évaluer le degré de couplage entre plasma et endolymphe dans ces conditions. Par contre, en rupture d'équilibre rencontrée lors du suivi de 7 jours après un changement de température ou de salinité, nous avons observé que la $[\text{Ca total}]$ dans l'endolymphe évoluait dans le même sens que la calcémie plasmatique. Cette constatation est en accord avec la notion de pool de Ca^{2+} rapidement échangeable dans l'endolymphe que nous avons déjà mentionné.

En conclusion, nous proposons que la $[\text{Ca total}]$ de l'endolymphe est certainement dépendante de la $[\text{Ca}^{2+}]$ du plasma, mais l'évaluation du degré de couplage entre ces deux variables est rendue très complexe par les autres paramètres variables que sont le pH et la $[\text{Protéines}]$. Il est également intéressant de noter que l'endolymphe contient de nombreuses protéines de poids moléculaires très variés (Mugiya, 1966). Asano et Mugiya (1993) et Sasagawa et Mugiya (1996) ont étudié les protéines solubles de l'otolithe et montré que certaines fractions

possèdent un fort pouvoir chélateur de Ca^{2+} . Ces observations suggèrent la présence de ce type de composé dans l'endolymphe. Les relations entre Ca et protéines sont donc très complexes et le seul moyen d'évaluer l'activité de l'ion Ca^{2+} dans l'endolymphe serait de la mesurer directement par des techniques de microélectrode sensible aux ions.

3. Précurseurs endolymphatiques et calcification de l'otolithe :

A ce stade de la discussion et au vu des résultats obtenus sur la [Ca total], la [CO₂ total] et la [protéines] de l'endolymphe en fonction de diverses situations environnementales, une question émerge : quelle est l'importance relative de ces trois éléments contenus dans l'endolymphe dans le processus de biominéralisation de l'otolithe, sont-ils tous les trois impliqués ou existe-t-il une prépondérance de certains facteurs ? L'analyse globale de nos expériences permet de dégager plusieurs points importants :

Gradient proximo-distal de CO₂ total :

Ce gradient, mis en évidence lors de l'expérience en conditions normales, se maintient avec une intensité comparable dans les différentes situations que nous avons étudiées : cycle nyctéméral et stress variés. Ainsi, cela confirme notre hypothèse de départ selon laquelle le gradient proximo-distal de CO₂ total est une constante dans le compartiment endolymphatique et fait certainement partie du processus intrinsèque de calcification de l'otolithe tel que cela a été proposé dans la figure 13.

Disponibilité des précurseurs endolymphatiques de la calcification :

Protéines :

Quel que soit le modèle étudié, la phase de dépôt protéique précède la phase minérale et possède un rôle important dans l'orientation et le contrôle de la croissance du cristal (Krampitz et al., 1983 ; Morales-nin, 1986). La difficulté de notre modèle otolithe réside dans le fait que

l'étude des précurseurs endolympatiques de la calcification est basée sur la variation de leur concentration dans un système qui présente lui-même des variations cycliques, d'où la complexité de l'interprétation. Cependant, mis à part l'expérience concernant l'étude du cycle nyctéméral, la totalité des prélèvements ont été effectués entre 10h du matin et 16h de l'après-midi, i.e. pendant la période diurne, ce qui devrait minimiser les variations intrinsèques du système. Dans ces conditions, nos résultats montrent que (tableau 4) :

(1) En régime d'équilibre (organismes adaptés au changement de température, de salinité et au jeûne Payan et al., 1998), la concentration des protéines reste constante, il ne semble pas y avoir de relation directe entre ce paramètre et la largeur de l'accroissement journalier. En conclusion, l'aspect quantitatif des protéines ne semble pas être un index de l'intensité des dépôts otolithiques. Il faut probablement envisager l'aspect qualitatif du paramètre protéique et la piste du facteur inhibiteur mis en présence dans l'otolithe par Wright (1991 a) et dans l'endolymphe (G. Borelli, communication personnelle) semble intéressante à développer.

(2) Par contre, en phase de rupture d'équilibre, i.e. de formation de discontinuités sur l'otolithe, il semble que la concentration de protéines de l'endolymphe soit systématiquement augmentée. C'est le cas du stress Cl (d'ordre chimique) et du stress de transport (d'ordre nerveux et endocrinien) (P. Payan, communication personnelle). L'augmentation s'effectue principalement du côté proximal, zone de commande du départ de la calcification (Gauldie et Nelson, 1988). Bien que le nombre de situations d'augmentation de la [Protéines] soit nettement insuffisant pour généraliser, il est indicatif des relations qui semblent exister entre le taux de protéines et les dépôts anormaux sur l'otolithe. Notre étude représente bien évidemment une approche préliminaire qui devra être complétée par des études analytiques.

Si l'on compare le complexe saccule - otolithe avec la coquille de l'œuf des espèces aviaires, le point commun à ces deux processus de calcification est le type acellulaire. Le fluide utérin des poules est caractérisé par une forte concentration en HCO_3^- , un pH très alcalin et des variations de ces paramètres en fonction du degré d'avancement de la formation de la coquille (Nys et al., 1999), tout comme l'endolymphe. La minéralisation de la coquille est contrôlée par les composés organiques solubles contenus dans le fluide utérin. Ces composés sont sécrétés par l'utérus au même moment que la phase de minéralisation et leurs compositions varient selon le

stade d'avancement de formation de la coquille. S'il en est de même dans le complexe saccule – otolithe, i.e. si les protéines solubles sont sécrétées en fonction du stade de minéralisation, cela impose un contrôle hormonal régulateur du processus de formation de l'otolithe. Des travaux ont montré qu'une hypophysectomie des poissons entraîne une diminution de la croissance des otolithes Mugiya (1990) et de leur calcification (Mugiya et Odawara, 1988). Dans une étude récente cependant, Shinobu et Mugiya (1995) ont démontré que cette réduction de croissance otolithique est neutralisée par des injections de GH (hormone de croissance), tandis que des injections de prolactine et de T₃ (triiodothyronine) n'ont aucun effet. Ces observations suggèrent ainsi l'implication des hormones de croissance dans le processus de formation de l'otolithe. Cette régulation hormonale influence probablement le transport des ions et la sécrétion de matières organiques par le saccule. Des travaux ont montré des modifications nyctémérales de la teneur de plusieurs hormones dans le plasma des téléostéens (Leatherland et al., 1974 ; Laidley et Leatherland, 1988 ; Reddy et Leatherland, 1994). Ces fluctuations pourraient induire les variations circadiennes de la teneur en protéines, telle qu'observées dans l'endolymph.

CO₂ :

Pour une même concentration de CO₂ total, la proportion relative de CO₂ dissous, de HCO₃⁻ et de CO₃²⁻ est fonction du pH. Ainsi, par analogie à l'étude de Payan et al. (1998) qui ont montré la baisse de CO₂ total et l'acidose endolymphatique au cours du jeûne chez la truite qui est à associer à une réduction de croissance otolithique lors de jeûne (Molony et Choat, 1990), on peut donc proposer que les deux facteurs : augmentation du CO₂ total et/ou alcalose sont des conditions qui favorisent la formation de CaCO₃. C'est le cas du changement de salinité, de température et du cycle circadien. Cependant, lors d'un stress (chllore ou transport), la [CO₂ total] augmente et l'alcalose est présente, tandis que des discontinuités se forment probablement sur l'otolithe. Dans ce cas la nature des protéines dont la concentration augmente joue certainement un rôle important et nécessite de nouvelles investigations.

Ca :

En régime d'équilibre (changement de température, de salinité et jeûne), la [Ca total] ne semble pas reliée à l'intensité des dépôts otolithiques. Ainsi, ce paramètre peut-être considéré comme un facteur structurant non limitant et non régulateur. Cependant, en régime de transition, lorsque la calcémie plasmatique varie, il est possible que le facteur calcique de l'endolymphe influence par sa concentration l'intensité du dépôt minéral sur l'otolithe. De plus, il faut rappeler que le paramètre important pour la calcification concerne le calcium ionisé Ca^{2+} qui dépend également des deux composants protéine et pH.

K :

Le rôle de K^+ dans le processus de calcification reste posé. En effet, il est intéressant de noter la présence de fortes concentrations de K^+ dans la matrice de nombreux systèmes osseux en voie de minéralisation : os long de rat (Wroblewski 1987) ou de dinde (Quint et al 1977), prédentine de mammifères (Wiesmann et al 1995). De plus, une étude récente (Wiesmann *et al.*, 1998) a montré que $[\text{K}^+]$ diminue significativement au début de la formation d'apatite sur la dentine chez le rat. Pour l'instant, nous n'avons aucun rôle à attribuer au gradient de K^+ endolympatique mais cette analogie fonctionnelle entre des systèmes phylogénétiquement très éloignés doit certainement avoir une signification physiologique qui reste à élucider.

En conclusion, le CO_2 total et les protéines sont les deux paramètres les plus impliqués dans la biominéralisation de l'otolithe. Cependant dans nos études, nous avons mesuré les concentrations de protéines totales or *a priori* la nature des protéines est susceptible de changer en fonction de la phase de formation de l'otolithe. Il s'agit donc maintenant d'orienter les travaux vers la caractérisation des protéines contenues dans l'endolymphe et d'étudier leurs modifications éventuelles en fonction des changements environnementaux subi par le poisson. Cette voie de recherche permettra certainement d'avancer dans l'élucidation du processus de calcification de l'otolithe.

4. Relation entre chimie de l'endolymphe et microchimie de l'otolithe :

Le bilan de notre étude fait apparaître deux exemples de relations fonctionnelles significatives entre les deux compartiments (endolymphe et otolithe) : incorporation différentielle du K^+ entre les faces proximales et distales de l'otolithe en relation avec l'existence d'un gradient endolympatique pour cet élément et variation de la concentration en Sr dans l'otolithe en fonction de la salinité du milieu externe, déjà largement démontrée par d'autres études. Ces deux situations très différentes possèdent cependant un point commun : dans les deux cas, la variation de la concentration de l'élément considéré est très importante dans l'endolymphe et, probablement, sa répercussion dans l'otolithe est suffisamment importante pour être décelée. Cela peut expliquer que les autres exemples de modifications moins intenses de composition de l'endolymphe (variations de Na^+ et K^+ en fonction des paramètres de l'environnement par exemple) aient des répercussions sur la composition chimique de l'otolithe plus difficile à mettre en évidence.

Il est certain que de nombreux composants de nature très différente interfèrent dans la relation endolymphe-otolithe et leur analyse pose un certain nombre de difficultés d'ordre méthodologique. Au niveau de l'otolithe, nous pouvons citer : la préparation des échantillons, les problèmes de standardisation de la localisation des mesures et la nécessité d'une mise en correspondance spatiale des mesures endolymphe/otolithe, les dimensions relatives du spot d'analyse (faisceau d'électrons ou impact du laser) et des microstructures, la nature duale des accroissements journaliers, présentant deux zones respectivement faiblement et fortement calcifiées (zone D et L) dans des proportions relatives mal appréhendées et susceptible de varier en fonction de la taille des accroissements, la non homogénéité du Ca dans le minéral pris pourtant comme référence, la probable hétérogénéité de localisation des cations monovalents (plus affine pour la zone D ?)... Simultanément, au niveau de l'endolymphe, nos approches expérimentales ne permettent actuellement d'accéder qu'à la concentration totale de l'ion considéré alors que son incorporation dans l'otolithe dépend essentiellement de son activité dans l'endolymphe c'est à dire de la forme ionisée. Rappelons que tous les cations étudiés (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Sr^{2+}) sont, à des degrés divers, liés aux protéines globalement chargées négativement et que la proportion de l'ion lié dépend de la nature et de la concentration des protéines et du pH de

la solution qui influence leur degré d'ionisation. En ce qui concerne le paramètre protéique, il est certain que le seul critère quantitatif que nous avons mesuré dans nos expériences n'est pas suffisant. L'étude de la qualité de ce paramètre, incluant d'autres composants tels que les protéolipides et les protéoglycans, devrait fournir de précieuses indications sur leur rôle dans la calcification de l'otolithe. Enfin, nos prélèvements pourtant très localisés dans l'endolymphe, s'ils constituent une avancée significative dans ce domaine, restent tout de même relativement imprécis au vu du volume prélevé par rapport au volume total de l'otosac. En dernier lieu, on soulignera que l'analyse de l'endolymphe est ponctuelle, alors que l'analyse de l'otolithe est nécessairement intégrée dans le temps. Ces deux types d'analyse ne peuvent être de plus concomitants sur un même individu, l'accès à l'information chimique de l'accroissement otolithique en cours de formation n'étant pas possible avec les techniques d'analyse disponibles. Le niveau de complexité est encore augmenté, s'agissant de l'analyse des relations endolymphe/otolithe relative aux éléments traces, analyse présentant elle-même des difficultés techniques spécifiques. En conclusion, cet ensemble d'inconnues constitue un handicap certain pour l'étude des relations endolymphe-otolithe et en a probablement masqué certaines.

Le but initial de cette étude concernait la validation dans l'otolithe des signatures environnementales. Rappelons que le signal externe transite par deux compartiments successifs placés en série (le plasma et l'endolymphe) avant de s'inscrire dans l'otolithe. Nous avons dans une première étape observé que la chimie de l'endolymphe n'était pas un simple reflet de celle du plasma et que l'épithélium sacculaire possédait un rôle spécifique dans la composition de l'endolymphe pratiquement pour tous les paramètres, qu'ils soient calcificateurs ou pas, excepté pour le Ca total. Ainsi, s'ouvre un champ potentiel d'études de la régulation du fonctionnement de cet épithélium. La deuxième partie traitant des relations endolymphe-otolithe nous a fait entrevoir la complexité de cette problématique qui ne sera résolue que par l'amélioration de nos techniques d'investigations à tous les niveaux d'études : milieu intérieur, endolymphe et otolithe.

CONCLUSION GENERALE :

Au fur et à mesure de l'évolution de nos travaux, chaque résultat significatif débouchait sur de nouvelles interrogations. Nous avons successivement mis en évidence que l'endolymphe était un milieu complexe, caractérisé par de nombreux gradients de concentrations de ses constituants, qui résultaient du fonctionnement d'un épithélium présentant une hétérogénéité de types cellulaires. A ce volet « endolymphe », s'ajoute la complexité de l'analyse de l'otolithe qui présente également une hétérogénéité de composition et une morphologie asymétrique. Chez les deux espèces étudiées (turbot et truite), nous avons pu montrer l'origine de cette structure asymétrique par l'hétérogénéité spatiale de composition de l'endolymphe. Le modèle proposé, bien que très novateur, correspond cependant à une vision encore très simplifiée du fonctionnement du système otosac/otolithe (et plus précisément saccule/sagitta). Il ne rend pas compte par exemple des variations morphologiques interspécifiques, ni au niveau intraspécifique des changements d'orientation des axes de croissance au cours de l'ontogenèse. Par ailleurs, il s'applique mal à certains cas d'espèces : espèces chez lesquelles la sagitta présente un nucleus décentré vers la face proximale telle la sole commune (Lagardère et al. 1994) ou espèces possédant des sagittae de morphologie particulièrement atypique telle l'hoplostète.

Les quelques perturbations environnementales étudiées dans le présent travail, en provoquant des modifications importantes de la chimie de l'endolymphe et des caractéristiques de l'otolithe, ont conforté notre hypothèse d'une relation étroite entre les deux compartiments. Nos résultats suggèrent d'orienter les recherches vers la caractérisation des protéines endolympatiques qui sont certainement la clé de la compréhension du processus de calcification de l'otolithe. Une meilleure compréhension du couplage chimie de l'endolymphe/chimie de l'otolithe nécessite quand à elle une amélioration des techniques d'investigation tant au niveau de l'endolymphe que de l'otolithe.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams L. A.** (1940) Some characteristic otoliths of American Ostariophysi. *J. Morphol.* 66, 497-519.
- Albers C.** (1970). Acid base balance in Fish Physiology. Dans *The nervous system, circulation and respiration* (Hoar, W.S. & Randall, D.J., eds), pp. 173-205. IV.
- Alhossaini M. et Pitcher T.J.** (1988) The relationship between daily rings, body growth and environmental factors in plaice, *Pleuronectes platessa L.*, juvenile otoliths. *J. Fish. Biol.* 33, 409-418.
- Arai N., Sakamoto W. et Maeda K.** (1995) Analysis of trace elements in otoliths of red sea bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.* 61 (1), 43-47.
- Arai N., Sakamoto W. et Maeda K.** (1996) Correlation between ambient seawater temperature and strontium-calcium concentration ratios in otoliths of Red Sea Bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.* 62 (4) 652-653.
- Arai T., Otake T. et Tsukamoto K.** (1997) Drastic changes in otolith microstructure and microchemistry accompanying the onset of metamorphosis in the japanese eel *Anguilla japonica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 161, 17-22.
- Arai T. and Tsukamoto K.** (1998) Application of otolith Sr:Ca ratios to estimate the migratory history of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Ichthyol. Res.* 45 (3), 309-313.
- Asano M. et Mugiya Y.** (1993) Biochemical and calcium-binding properties of water soluble proteins isolated from otoliths of the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B (1), 201-205.
- Babaluk J. A. et Campbell J. S.** (1987) Preliminary results of tetracycline labelling for validating annual growth increments in opercula of walleyes. *North Amer. J. Fish. Manag.* 7, 138-141.
- Babaluk J. A. et Craig J. F.** (1990) Tetracycline marking studies with pike, *Esox lucius L.* *Aquac. Fish. Manag.* 21, 307-315.
- Becerra M. et Anadon R.** (1993) Fine structure and development of ionocyte areas in the labyrinth of the trout (*Salmo trutta fario*). *J. Anat.* 183, 463-474.
- Beckman D. W., Wilson C. A., Lorica F. et Dean J. M.** (1990) Variability in incorporation of calcein as a fluorescent marker in fish otoliths. *Amer. Fish. Soc. Symp.* 7, 547-549.
- Beckman D.W. et Wilson C.A.** (1995) Seasonal timing of opaque zone formation in fish otoliths. Dans *Recent developments in fish otolith research* (Secor D.H., Dean J.M. & Campana S.E., eds). pp. 27-43. Belle W. Baruch Library in Marine Science, no. 19, University of South Carolina Press, Columbia, SC, USA.

- Bernhardt A., Kunigelis S.C. et Wilbur K.M.** (1985) Effects of phosphates on shell growth and calcium carbonate crystal formation. *Aquat. Toxicol.* 7, 1-13.
- Berridge M.J.** (1970) A structural analysis of intestinal absorption. *Symp. R. Ent. Soc. Lond.*, 5, 135-151.
- Bradford M.J. and Geen G.H.** (1992) Growth estimates from otolith increment widths of juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) reared in changing environments. *J. Fish. Biol.* 41, 825-832.
- Bronte C.R., Hesselberg R.J., Shoesmith J.A. et Hoff M.** (1996) Discrimination among spawning concentrations of lake herring based on trace element profiles in sagittae. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 125, 852-859.
- Bruland K.W.** (1983) Trace elements in sea water. Dans : *Chemical oceanography. Ripley and R. Chester (ed). Academic Press, London.* 8, 157-220.
- Bumgardner B. W.** (1991) Marking subadult red drums with oxytetracycline. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 120, 537-540.
- Burel, C., Person-Le Ruyet, J., Gaumet, F., Le Roux, A., Severe, A. et Boeuf, G.** (1996) Effects of temperature on growth and metabolism in juvenile turbot. *J. Fish. Biol.* 49 (4), 678-692.
- Campana S.E.** (1983 a) Feeding periodicity and the production of daily growth increments in otoliths of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) and starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Can. J. Zool.* 61, 1591-1597.
- Campana S.E.** (1983 b) Calcium deposition and otolith check formation during periods of stress in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A (2), 215-220.
- Campana S.E.** (1984) Interactive effects of age and environmental modifiers on the production of daily growth increments in the otoliths of plainfin midshipman, *Porichthys notatus*. *Fish. Bull. U.S.* 82, 165-177.
- Campana S. E. et Neilson J. D.** (1985) Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 1014-1032.
- Campana S.E. et Jones C.M.** (1992) Analysis of otoliths microstructure data. Dans : *Otolith microstructure examination and analysis. D.K. Stevenson and S.E. Campana (eds). Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 117, 73-100.
- Campana S. E., Fowler A. J. et Jones C. M.** (1994) Otolith elemental fingerprinting for stock identification of atlantic cod (*Gadus morhua*) using laser ablation ICPMS. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 1942-1950.

- Campana S.E., Gagné J.A. et Mc Laren J.** (1995) Elemental fingerprinting of fish otoliths using ID-ICPMS. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122, 115-120.
- Campana S. E., S. R. Thorrold, C. M. Jones, D. Gunther, M. Tubrett, H. Longerich, S. Jackson, N. M. Halden, J. M. Kalish, P. Piccoli, H. de Pontual, H. Troadec, J. Panfili, D. H. Secor, K. P. Severin, S. H. Sie, R. Thresher, W. J. Teesdale and J. L. Campbell.** (1997) Comparison of accuracy, precision, and sensitivity in elemental assays of fish otoliths using the electron microprobe, proton-induced X-ray emission, and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 2068-2079.
- Carlstrom D.** (1963) A crystallographic study of vertebrate otoliths. *Biol. Bull.* 125, 441-463.
- Casas M.C.** (1998) Increment formation in otoliths of slow-growing winter flounder (*Pleuronectes americanus*) larvae in cold water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 162-169.
- Chesney E.J., McKee B.M., Blanchard T. et Chan L.H.** (1998) Chemistry of otoliths from juvenile menhaden *Brevoortia patronus*: evaluating strontium, strontium : calcium and strontium isotope ratios as environmental indicators. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 171, 261-273.
- Clarke W.C., Shelbourn J.R. et Brett J.R.** (1981) Effect of artificial photoperiod cycles, temperature, and salinity on growth and smolting in underyearling coho (*Oncorhynchus kisutch*), chinook (*O. Tshawytscha*), and sockeye (*O. Nerka*) salmon. *Aquaculture* 22, 105-116.
- Dabrowski K. et Tsukamoto K.** (1986) Tetracycline tagging in coregonid embryos and larvae. *J. Fish. Biol.* 29, 691-698.
- Davis J.G., Oberholtzer J.C., Burns F.R. et Greene M.I.** (1995) Molecular cloning and characterization of an inner ear specific structural protein. *Sci.* 267, 1031-1034.
- Degens E. T., Deuser W. G. et Haedrich R. L.** (1969) Molecular structure and composition of fish otoliths. *Mar. Biol.* 2, 105-113.
- Dockray J.J., Morgan I.J., Reid S.D. et Wood C.M.** (1998) Responses of juvenile rainbow trout, under food limitation, to chronic low pH and elevated summer temperatures, alone and in combination. *J. Fish. Biol.*, 52, 62-82.
- Dohlman G. F.** (1971) The attachment of the cupular, otolith and tectorial membranes to the sensory cell area. *Acta Otolaryngol.* 51, 435-438.
- Dove S.G., Gillanders B.M. et Kingsford M.J.** (1996) An investigation of chronological differences in the deposition of trace metals in the otoliths of two temperate reef fishes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 205, 15-33.

- Dove S.G. et Kingsford M.J.** (1998) Use of otoliths and eye lenses for measuring trace-metal incorporation in fishes : a biogeographic study. *Mar. Biol.* 130, 377-387.
- Dunkelberger D. G., Dean J. M. et Watabe N.** (1980) The ultrastructure of the otolithic membrane and otolith in the juvenile mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *J. Morphol.* 163, 367-377.
- Edmonds J.S., Caputi N., Moran M.J., Fletcher W.J. et Morita M.** (1994) Population discrimination by variation in concentrations of minor and trace elements in sagittae of two western australian teleosts. Dans : *Recent developments in fish otolith research*. Secor D.H., Dean J.M. and Campana (eds), Belle W. Baruch Library in Marine Science. University of south Carolina Press, Columbia, SC, USA. 19, 655-670.
- Edmonds J.S. et Fletcher W.J.** (1997) Stock discrimination of pilchards *Sardinops sagax* by stable isotope ratio analysis of otolith carbonate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 152, 241-247.
- Enger P. R.** (1964) Ionic composition of the cranial and labyrinthine fluids and saccular D.C. potentials in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 11, 131-137.
- Fänge R., Larsson A. et Lidman U.** (1972) Fluids and jellies of the acusticolateralis system in relation to body fluids in *Coryphaenoides rupestris* and other fishes. *Mar. Biol.* 17, 180-185.
- Farrell J. et Campana S.E.** (1996) Regulation of calcium and strontium deposition on the otoliths of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 115A (2), 103-109.
- Fay R. R.** (1984) The goldfish ear codes the axis of acoustic particle motion in three dimensions. *Science* 225, 951-963.
- Fowler A. J., Campana S. E., Jones C. M. et Thorrold S. R.** (1995) Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otoliths using laser ablation ICPMS. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1431-1441.
- Fuiman L.A. et Hoff G.R.** (1995) Natural variation in elemental composition of sagittae from red drum. *J. Fish. Biol.* 47, 940-955.
- Gallahar N.K. et Kingsford M.J.** (1992) Patterns of increment width and strontium : calcium ratios in otoliths of juvenile rock blackfish, *Girella elevata* (M.). *J. Fish. Biol.* 41, 749-763.
- Gallahar N.K. et Kingsford M.J.** (1996) Factors influencing Sr/Ca ratios in otoliths of *Girella elevata* : an experimental investigation. *J. Fish. Biol.* 48, 174-186.
- Gauldie R. W. and Nelson D. G. A.** (1988) Aragonite twinning and neuroprotein secretion are cause of daily growth rings in fish otoliths. *Comp. Biochem. Physiol.* 90A : 501-509.

- Gauldie R. W. and Nelson D. G. A.** (1990) Otolith growth in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 97A, 119-135.
- Gauldie R. W. et Radtke R. L.** (1990) Using the physical dimensions of the semicircular canal as a probe to evaluate inner ear function in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 96A (1), 199-203.
- Gauldie R. W., West I.F. et Coote G.E.** (1995) Evaluating otolith age estimates for *Hoplostethus atlanticus* by comparing patterns of checks, cycles in microincrement width, and cycles in strontium and calcium composition. *Bull. Mar. Sci.* 56, 76-102.
- Gauldie R. W. et Xhie J.** (1995) Atomic force microscopy of the morphology of the matrix and mineral components of the otolith of *Hyperoglyphe antarctica*. *J. Morphol.* 223, 203-214.
- Gauldie R. W.** (1996) Effects of temperature and vaterite replacement on the chemistry of metal ions in the otoliths of *Oncorhynchus tshawytscha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 2015-2026.
- Gaumet F., Bœuf G., Truchot J.P. and Nonnotte G.** (1994) Effects of environmental water salinity on blood acid-base status in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A (4), 985-994.
- Gaumet F., Bœuf G., Severe A., Le Roux A. and Mayer-Gostan N.** (1995) Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. *J. Fish. Biol.* 47, 865-876.
- Grassé P. P.** (1958) L'oreille et ses annexes. Dans : *Traité de zoologie : anatomie, systématique, biologie. Agnathes et Poissons : anatomie, éthologie, systématique.* Grassé P. P. (eds). Tome XIII (2), Masson, Paris, 1061-1098.
- Gunn J.S., Harrowfield I.R., Proctor C.H. and Thresher R.E.** (1992) Electron probe microanalysis of fish otoliths - evaluation of techniques for studying age and stock discrimination. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 158, 1-36.
- Halden N.M., Babaluk J.A., Campbell J.L. and Teesdale W.J.** (1995) Scanning proton microprobe analysis of Sr in an arctic charr, *Salvelinus alpinus*, otolith : implications for the interpretation of anadromy. *Env. Biol. Fish.* 43, 333-339.
- Hanssen R.G., Lafeber F.P.J.G., Flik G. and Wendelaar Bonga S.E.** (1989) Ionic and total calcium levels in the blood of the european eel (*Anguilla anguilla*) : effects of stanniectomy and stannioalcalin replacement therapy. *J. Exp. Biol.* 141, 177-186.
- Hettler W. F.** (1984) Marking otoliths by immersion of marine fish larvae in tetracycline. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 113, 370-373.

- Hoff G.R. et Fuiman L.A.** (1993) Morphometry and composition of red drum otoliths : changes associated with temperature, somatic growth rate, and age. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A (2), 209-219.
- Hoff G.R. et Fuiman L.A.** (1995) Environmentally induced variation in elemental composition of red drum, *Sciaenops ocellatus*, otoliths. *Bull. Mar. Sci.* 56, 578-591.
- Houk R.S.** (1994) Elemental and isotopic analysis by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Acc. Chem. Res.* 27 (11), 333-339.
- Houston A.H. and Koss T.F.** (1982) Water-electrolyte balance in goldfish *Carassius auratus*, under constant and diurnally cycling temperature conditions. *J. Exp. Biol.* 97, 427-440.
- Hudspeth A.J.** (1989) How the ear's works work. *Nature* 341, 397-404.
- Ingram B.L. et Sloan D.** (1992) Strontium isotopic composition of estuarine sediments as paleosalinity-paleoclimate indicator. *Science* 255 (5040), 68-72.
- Kalish J.M.** (1990) Use of otolith microchemistry to distinguish the progeny of sympatric anadromous and non-anadromous salmonids. *Fish. Bull.* 88, 657-666.
- Kalish J. M.** (1991) Determinants of otolith chemistry: seasonal variation in the composition of blood plasma, endolymph and otoliths of bearded rock cod, *Pseudophycis barbatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 74, 137-159.
- Kalish J.M., Beamish R.J., Brothers E.B., Casselman J.M., Francis C., Mosegaard H., Panfili J., Prince E.D., Thresher R.E., Wilson C.A. et Wright P.J.** (1995) Glossary. Dans *Recent developments in fish otolith research* (Secor D.H., Dean J.M. & Campana S.E., eds). pp. 723-729. Belle W. Baruch Library in Marine Science, no. 19, University of South Carolina Press, Columbia, SC, USA.
- Karakiri M., Berghahn R. et Westernhagen H.V.** (1989) Growth differences in 0-group plaice *Pleuronectes platessa* as revealed by otolith microstructure analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55, 15-22.
- Karakiri M. and Westernhagen H.V.** (1989) Daily growth patterns in otoliths of larval and juvenile plaice (*Pleuronectes platessa* L.): influence of temperature, salinity, and light conditions. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. Int. Explor. Mer.* 191, 376-382.
- Kawakami Y., Mochioka N., Morishita K., Tajima T., Nakagawa H., Toh H. et Nakazono A.** (1998) Factors influencing otolith strontium / calcium ratios in *Anguilla japonica* elvers. *Env. Biol. Fish.* 52, 299-303.

- Kinsman D.J.J. et Holland H.D.** (1969) The co-precipitation of cations with CaCO₃-IV. The co-precipitation of Sr²⁺ with aragonite between 16° and 96°C. *Geochem. Cosmochem. Acta* 33, 1-17.
- Krampitz G., Drolshagen H., Hausle J. et Hof-Irmscher.** (1983) Organic matrices of mollusc shells. *Biomineralization and biological metal accumulation*, P. Westbroek and E.W. de Jong eds. 231-247.
- Lagardère F.** (1989) Influence of feeding conditions and temperature on the growth rate and otolith increment deposition of larval Dover sole (*Solea solea* (L.)). *Rapports et procès verbaux des réunions. Conseil international pour l'exploitation de la mer.* 191, 390-399.
- Lagardère F., Chaumillon G., Amara R., Heineman G., et Iago J.M.** (1994) Examination of otolith morphology and microstructure using laser scanning microscopy. Dans *Recent developments in fish otolith research* (Secor D.H., Dean J.M. & Campana S.E., eds). pp. 7-26. Belle W. Baruch Library in Marine Science, no. 19, University of South Carolina Press, Columbia, SC, USA.
- Laidley C.W. et Leatherland J.F.** (1988) Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* richardson. *Comp. Biochem. Physiol.* 89A (3), 495-502.
- Landron C.** (1989) Microanalyse d'échantillons rugueux. IN *Microanalyse et microscopie électronique : aspects quantitatifs*. Ecole d'été de St Martin d'Hères. Les éditions de physique. Orsay. 11-114.
- Leatherland J.F., McKeown B.A. et John T.M.** (1974) Circadian rhythm of plasma prolactin, growth hormone, glucose and free fatty acid in juvenile kokanee salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Comp. Biochem. Physiol.* 47A, 821-828.
- Limburg K.E.** (1995) Otolith strontium traces environmental history of subyearling american shad, *Alosa sapidissima*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 119, 25-35.
- Limburg K.E.** (1998) Anomalous migrations of anadromous herrings revealed with natural chemical tracers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 431-437.
- Lowenstein O.** (1971) The labyrinth. Dans : *Fish Physiology*. Eds. Hoar W. S. and Randall D. J. Academic Press London 5, 207-240.
- Maillet G.L. et Checkley Jr.** (1989) Effects of starvation on the frequency of formation and width of growth increments in sagittae of laboratory-reared atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus* larvae. *Fish. Bull.* 88, 155-165.

- Marshall S.L. et Parker S.S.** (1982) Pattern identification in the microstructure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 542-547.
- Maurice F.** (1989) Processus physiques et leur simulation par la méthode de Monte-Carlo. Dans *Microanalyse et microscopie électronique : aspects quantitatifs. Ecole d'été de St Martin d'Hères. Les éditions de physique. Orsay.* A1-A37.
- Maurice F.** (1993) Microsonde électronique. Dans *Les techniques de l'ingénieur, T1 : Analyse et caractérisation.* P885, 1-22.
- Mayer-Gostan N., Kossman H., Watrin A., Payan P. and Boeuf G.** (1997) Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*). *Cell. Tissue Res.* 480, 1-9.
- McFarlane G. A. et Beamish R. J.** (1987) Selection of dosages of oxytetracycline for age validation studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 905-909.
- Meunier F.** (1974) La technique de marquage vital des tissus squelettiques des poissons. *Bull. Fran. Pisci.* 255, 51-57.
- Meunier F. J. et Boivin G.** (1974) Divers aspects de la fixation du chlorhydrate de tétracycline sur les tissus squelettiques de quelques téléostéens. *Bull. Soc. Zool. Fran.* 99 (3), 495-504.
- Meunier F. J. et Boivin G.** (1978) Action de la fluorescéine, de l'alizarine, du bleu de calcéine et de diverses doses de tétracycline sur la croissance de la truite et de la carpe. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18 (6), 1293-1308.
- Molins R.** (1989) Choix des conditions opératoires en microanalyse X. IN *Microanalyse et microscopie électronique : aspects quantitatifs. Ecole d'été de St Martin d'Hères. Les éditions de physique. Orsay.* D1-D16.
- Molony B.W. et Choat J.H.** (1990) Otolith increment widths and somatic growth rate : the presence of a time lag. *J. Fish. Biol.* 37, 541-551.
- Molony B.W.** (1996) Episodes of starvation are recorded in the otoliths of juvenile *Ambassis vachelli* (Chandidae), a tropical estuarine fish. *Mar. Biol.* 125, 439-446.
- Molony B.W. et Sheaves M.J.** (1998) Otolith increment widths and lipid contents during starvation and recovery feeding in adult *Ambassis vachelli* (Richardson). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221, 257-276.
- Morales-Nin B.** (1986) Chemical composition of the otoliths of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758) (Pisces, Serranidae). *Cybium* 10 (2), 115-120.

- Morales-Nin B.** (1987) Ultrastructure of the organic and inorganic constituents of the otolith of the sea bass. Dans : *The age and growth of fish*, Summerfelt R.C. and Hall G.E. (eds), Iowa State University Press, Ames, Iowa, 331-343.
- Morales-Nin B.** (1991) Determinación del crecimiento de peces oseos en base a la microestructura de los otolitos. *FAO Documento Técnico de Pesca*. 322, Roma, FAO, 58p.
- Mosegaard H., Svedang H. and Taberman K.** (1988) Uncoupling of somatic and otolith growth rates in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) as an effect of differences in temperature response. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45, 1514-1524.
- Mugiya Y.** (1966) Calcification in fish and shell-fish. V. A study on paper electrophoretic patterns of the acid mucopolysaccharides and PAS positive materials in the otolith fluid of some fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 32 (2), 117-123.
- Mugiya Y., Watabe N., Yamada J., Dean J.M., Dunkelberger D.G. et Shimizu M.** (1981) Diurnal rhythm in otolith formation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68A, 659-662.
- Mugiya Y.** (1984) Diurnal rhythm in otolith formation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* : seasonal reversal of the rhythm in relation to plasma calcium concentration. *Comp. Biochem. Physiol.* 78A (2), 289-293.
- Mugiya Y. et Takahashi T.** (1985) Chemical properties of the saccular endolymph in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 36, 57-63.
- Mugiya Y.** (1986) Effects of calmodulin inhibitors and other metabolic modulators on *in vitro* otolith formation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 84A, 57-60.
- Mugiya Y.** (1987) Phase difference between calcification and organic matrix formation in the diurnal growth of otoliths in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish. Bull.* 85 (3), 395-401.
- Mugiya Y. et Odawara F.** (1988) Effects of hypophysectomy and replacement therapy with ovine prolactin on serum calcium levels, and calcification in otoliths and scales in goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54 (12), 2079-2083.
- Mugiya Y. et Uchimura T.** (1989) Otolith resorption induced by anaerobic stress in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Fish. Biol.* 35, 813-818.
- Mugiya Y.** (1990) Long-term effects of hypophysectomy on the growth and calcification of otoliths and scales in the goldfish, *Carassius auratus*. *Zool. Sci.* 7, 273-279.

- Mugiya Y. et Oka H.** (1991) Biochemical relationship between otolith and somatic growth in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* : consequence of starvation, resumed feeding, and diel variations. *Fish. Bull.* 89, 239-245.
- Mugiya Y. et Satoh C.** (1995) Strontium-calcium ratios change corresponding to microincrements in otoliths of the goldfish *Carassius auratus*. *Fish. Sci.* 61, 361-362.
- Mugiya Y. et Tanaka S.** (1995) Incorporation of water borne strontium into otoliths and its turnover in the goldfish, *Carassius auratus*: effects of strontium concentration, temperature, 17β estradiol. *Fish. Sci.* 61, 29-35.
- Mugiya Y. et Yoshida M.** (1995) Effects of calcium antagonists and other metabolic modulators on *in vitro* calcium deposition on otoliths in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.* 61 (6), 1026-1030.
- Murphy M.D. et Taylor R.G.** (1991) Direct validation of ages determined for adult red drums from otolith sections. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 120, 267-269.
- Nagiec N., Dabrowski K., Nagiec C. et Murawska E.** (1988) Mass-marking of coregonid larvae and fry by tetracycline tagging of otoliths. *Aquac. Fish. Manag.* 19, 171-178.
- Neilson J.D. et Geen G.H.** (1982) Otoliths of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) : daily growth increments and factors influencing their production. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 1340-1347.
- Neilson J.D. et Geen G.H.** (1985) Effects of feeding regimes and diel temperature cycles on otoliths increment formation in juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Fish. Bull.* 83 (1), 91-101.
- Nonnotte G. and Truchot J.P.** (1990) Time course of extracellular acid-base adjustments under hypo- or hyperosmotic conditions in the euryhaline fish (*Platichthys flesus*). *J. Fish. Biol.*, 36, 181-190.
- Nys Y., Hincke M.T., Arias J.L., Garcia-Ruiz J.M. et Solomon S.E.** (1999) Avian eggshell mineralization. *Poultry and avian biology reviews* (sous presse).
- Onuma N., Masuda F., Hirano M. et Wada K.** (1979) Crystal structure control on trace element partition in molluscan shell formation. *Geochem. J.* 13, 187-189.
- Otake T., Ishii T., Nakahara M. et Nakamura R.** (1994) Drastic changes in otolith strontium/calcium ratios in leptocephali and glass eels of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 112, 189-193.
- Otake T., Ishii T., Nakahara M. et Nakamura R.** (1997) Changes in otolith strontium : calcium ratios in metamorphosing *Conger myriaster* leptocephali. *Mar. Biol.* 128, 565-572.

- Otake T. et Uchida K.** (1998) Application of otolith microchemistry for distinguishing between amphidromous and non – amphidromous stocked ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.* 64 (4), 517-521.
- Panfili J.** (1993) Estimation de l'âge individuel des poissons : méthodologies et applications à des populations tropicales et tempérées. *Collection Travaux et Documents Microfichés, ORSTOM, Paris*, 449p.
- Pannella G.** (1971) Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science* 173, 1124-1127.
- Pannella G.** (1980) Growth pattern in fish sagittae. In: *Skeletal growth of aquatic organisms: biological records of environmental change*. Rhoads D.C. and Lutz R.A. eds Plenum press, New York and London, 519-560.
- Payan P., Kossman H., Watrin A., Mayer-Gostan N. et Boeuf G.** (1997) Ionic composition of endolymph in teleosts : origin and importance of endolymph alkalinity. *J. Exp. Biol.* 200, 1905-1912.
- Payan P., Borelli G., Boeuf G. et Mayer-Gostan N.** (1998) Relationship between otolith and somatic growths : consequence of starvation on acid-base balance in plasma and endolymph in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Physiol. Biochem.* 19, 35-41.
- Pearce N.J.G., Perkins W.T., Abell I., Duller G.A.T. et Fuge R.** (1992) Mineral microanalysis by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectr.* 7, 53-57.
- Pontual de H., Panfili J., Millner R. et Geffen A.** (1998) Otolith microchemistry in Fishes: application to stock discrimination and temperature record. *EFAN report 1-98, Wright P.J. (ed), The present status of otolith research and applications. Proceedings of a workshop held at Orstom, Brest, France, 27-29 May 1997.* pp 32-53.
- Pontual de H.** (1999 a) Microchimie de l'otolithe : méthodes et applications. *Colloques et séminaires de l'IRD.* (soumis).
- Pontual de H., Lagardère F., Troadec H., Batel A., Désaunay Y. et Koutsikopoulos C.** (1999 b) Elemental analyses of sole otoliths (*Solea solea*) from the Bay of Biscay (France): a tool to discriminate individuals from nursery environmental imprints ? (soumis).
- Popper A. N.** (1977) A scanning electron microscopic study of the sacculus and lagena in the ears of fifteen species of teleost fishes. *J. Morphol.* 153, 397-418.
- Popper A. N.** (1979) Ultrastructure of the sacculus and lagena in a moray eel (*Gymnothorax* sp.). *J. Morphol.* 161, 241-256.

- Popper A. N. et Fay R.R.** (1993) Sound detection and processing by fish : critical review and major research questions. *Brain Behav. Evol.* 41, 14-38.
- Popper A. N., Saidel W.M. et Chang J.S.Y.** (1993) Two types of sensory hair cell in the saccule of the teleost fish. *Hear. Res.* 64, 211-216.
- Quint P., Althoff J. et Höhling H.J.** (1977) Topochemical analysis of a mineralizing collagen-rich system *Naturwiss.* 64, 389-390.
- Radtke R.L. et Dean J.M.** (1982) Increment formation in the embryos, larvae and juveniles of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Fish. Bull. U.S.* 80, 41-55.
- Radtke R.L.** (1989) Strontium-calcium concentration ratios in fish otoliths as environmental indicators. *Comp. Biochem. Physiol.* 92A (2), 189-193.
- Radtke R.L. et Morales-Nin** (1989) Mediterranean juvenile bluefin tuna : life history patterns. *J. Fish. Biol.* 35, 485-496.
- Radtke R.L. et Shafer D.J.** (1992) Environmental sensitivity of fish otolith microchemistry. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 43, 935-951.
- Radtke R.L., Klemetsen A., Jonsson B. et Elliott J.M.** (1995) Otolith microchemistry of charr use in life history studies. *Nord. J. Freshw. Res.* 71, 392-395.
- Radtke R.L., Svenning M., Malone D., Klemetsen A., Ruzicka J. et Fey D.** (1996) Migrations in an extreme northern population of arctic charr *Salvelinus alpinus* : insights from otolith microchemistry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 136, 13-23.
- Reddy P.K. et Leatherland J.F.** (1994) Does the time of feeding affect the diurnal rhythms of plasma hormone and glucose concentration and hepatic glycogen content of rainbow trout ? *Fish. Physiol. Biochem.* 13 (2), 133-140.
- Rieman B.E., Myers D.L. et Nielsen R.L.** (1994) Use of otolith microchemistry to discriminate *Oncorhynchus nerka* of resident and anadromous origin. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 68-77.
- Rosenthal H.L., Eves M.M. et Cochran O.A.** (1970) Common strontium of mineralized tissues from marine and sweet water animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 32, 445-450.
- Ruhlé C. et Winecki-Kühn C.** (1992) Tetracycline marking of coregonids at the time of egg fertilization. *Aquat. Sci.* 54 (2), 165-175.
- Saitoh S. et Yamada J.** (1989) Ultrastructure of the saccular epithelium and the otolithic membrane in relation to otolith growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei : Cichlidae). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 108 (3), 223-238.

- Saitoh S.** (1990) Localization and ultrastructure of mitochondria-rich cells in the inner ears of goldfish and tilapia. *Jpn. J. Ichthyol.* 37, 49-55.
- Sadovy Y. et Severin K.P.** (1992) Trace elements in biogenic aragonite : correlation of body growth rate and strontium levels in the otoliths of the white grunt, *Haemulon plumieri* (Pisces : Haemulidae). *Bull. Mar. Sci.* 50, 237-257.
- Sadovy Y. et Severin K.P.** (1994) Elemental patterns in Red Hind, *Epinephelus guttatus*, otoliths from Bermuda and Puerto Rico reflect growth rate, not temperature. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 133-141.
- Sasagawa T. et Mugiya Y.** (1996) Biochemical properties of water-soluble otolith proteins and the immunobiochemical detection of the proteins in serum and various tissues in the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish. Sci.* 62 (6), 970-976.
- Schellart N. A. M. et Buwalda R. J. A.** (1990) Directional variant and invariant hearing thresholds in the rainbow trout (*Salmo Gairdneri*). *J. Exp. Biol.* 149, 113-131.
- Schellart N. A. M. et de Munck J. C.** (1987) A model for directional and distance hearing in swimbladder bearing fish based on the displacement orbits of the hair cells. *J. Acoust. Soc. Am.* 82 (3), 822-829.
- Secor D.H., Henderson-Arzapalo A. et Piccoli P.M.** (1995) Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 192, 15-33.
- Secor D.H., Ohta T., Nakayama K. and Tanaka M.** (1998) Use of otolith microanalysis to determine estuarine migrations of japanese sea bass *Lateolabrax japonicus* distributed in ariake sea. *Fish. Sci.* 64 (5), 740-743.
- Severin K.P., Carroll J. et Norcross B.L.** (1995) Electron microprobe analysis of juvenile walleye pollock, *Theragra chalcogramma*, otoliths from Alaska: a pilot stock separation study. *Env. Biol. Fish.* 43, 269-283.
- Schmitt P. D.** (1984) Marking growth increments in otoliths of larval and juvenile fish by immersion in tetracycline to examine the rate of increment formation. *Fish. Bull.* 82, 237-242.
- Shinobu N. et Mugiya Y.** (1995) Effects of ovine prolactin, bovine growth hormone and triiodothyronine on the calcification of otoliths and scales in the hypophysectomized goldfish *Carassius auratus*. *Fish. Sci.* 61 (6), 960-963.
- Shoemaker V.H., Nagy K.A. et Bradshaw S.D.** (1972) Studies on the control of electrolyte excretion by the nasal gland of the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* A, 42, 749-773.

- Simkiss K.** (1964) Phosphates as crystal poisons of calcification. *Biol. Rev.* 39, 487-505.
- Sterkers O., Ferrary E. et Amiel C.** (1988) Production of inner ear fluids. *Physiol. Reviews* 68 (4) October 1988 USA.
- Sterkers O., Tran Ba Huy P. et Ferrary E.** (1990) Physiologie des liquides de l'oreille interne. Dans : *Données actuelles sur la physiologie et la pathologie de l'oreille interne. Morgon et al., 1990. Arnette (eds) Soc. Française d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Pathologie Cervico-Faciale, Paris.*
- Takagi Y.** (1997) Meshwork arrangement of mitochondria-rich, Na⁺-K⁺-ATPase rich cells in the saccular epithelium of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inner ear. *Anat.Rec.* 248, 483-489.
- Takahashi Y.** (1994) Otolith staining by oral administration of alizarin complexon for juveniles of japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nipp. Suis. Gakk.* 60 (5), 611-615.
- Tanaka K., Mugiya Y. et Yamada J.** (1981) Effects of photoperiod and feeding on daily growth patterns in otoliths of juvenile *Tilapia nilotica*. *Fish. Bull.* 79 (3), 459-466.
- Thorrold S.R., Jones C. et Campana S.E.** (1997) Response of otolith microchemistry to environmental variations experienced by larval and juvenile atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Limnol. Oceanogr.* 42 (1), 102-111.
- Thresher R.E., Proctor C.H., Gunn J.S. et Harrowfield I.R.** (1994) An evaluation of electron-probe microanalysis of otoliths for stock delineation and identification of nursery areas in a southern temperate groundfish, *Nemadactylus macropterus* (Cheilodactylidae). *Fish. Bull.* 92, 817-840.
- Townsend D.W., Radtke R.L., Morrison M.A. et Folsom S.D.** (1989) Recruitment implications of larval herring overwintering distributions in the gulf of Maine, inferred using a new otolith technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55, 1-13.
- Townsend D.W., Radtke R.L., Corwin S. et Libby D.A.** (1992) Sr/Ca ratios in juvenile atlantic herring *Clupea harengus* L. otoliths as a function of water temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 160 131-140.
- Townsend D.W., Radtke R.L., Malone D.P. et Wallinga J.P.** (1995) Use of otolith Sr/Ca ratios for hind-casting larval cod, *Gadus morhua*, distributions relative to water masses on Georges Bank. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 119, 37-44.
- Tsukamoto K.** (1988) Otolith tagging of ayu with fluorescent substances. *Nipp. Suis. Gakkai.* 54 (8), 1289-1295.

- Tzeng W.N.** (1994) Temperature effects on the incorporation of strontium in otolith of Japanese eel *Anguilla japonica*. *J. Fish. Biol.* 45, 1055-1066.
- Tzeng W.N. et Tsai Y.C.** (1994) Changes in otolith microchemistry of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, during its migration from the ocean to the rivers of Taiwan. *J. Fish. Biol.* 45, 671-683.
- Tzeng W.N.** (1995) Migratory history recorded in otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, elvers as revealed from SEM and WDS analyses. *Zool. Stud.* 34 (supplement I), 234-236.
- Tzeng W.N.** (1996) Effects of salinity and ontogenetic movements on strontium:calcium ratios in the otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, Temminck and Schlegel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 199, 111-122.
- Tzeng W.N., Severin K.P. and Wickström H.** (1997) Use of otolith microchemistry to investigate the environmental history of European eel *Anguilla anguilla*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 149, 73-81.
- Umezawa A. et Tsukamoto K.** (1991) Factors influencing otolith increment formation in Japanese eel, *Anguilla japonica* T. & S., elvers. *J. Fish. Biol.* 39, 211-223.
- Umino T., Takeda T. et Nakagawa H.** (1996) Estimation of growth pattern based on otolith-tagging in the early life stage of reared red sea bream. *Fish. Sci.* 62 (1), 142-143.
- Volk E.C., Wissmar R.C., Simenstad C.A. et Eggers D.M.** (1984) Relationship between otolith microstructure and the growth of juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*) under different prey rations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41 (1), 126-133.
- Volk E.C., Schroder S.L. et Fresh K.L.** (1990) Inducement of unique otolith banding patterns as a practical means to mass-mark juvenile Pacific salmon. *Am. Fish. Soc. Symp.* 7, 203-215.
- Volk E.C., Schroder S.L., Grimm J.J. et Sprague Ackley H.** (1994) Use of a bar code symbology to produce multiple thermally induced otolith marks. *Trans. Am. Fish. Soc.* 123 (5), 811-816.
- Wang N. et Eckmann R.** (1992) Effects of photoperiod, feeding regime and water temperature on the formation of daily growth increments in otoliths of larval pike. *J. Appl. Ichthyol.* 8, 246-250.
- Watabe N., Tanaka K., Yamada J. et Dean J. M.** (1982) Scanning electron microscope observations of the organic matrix in the otolith of the teleost fish *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus) and *Tilapia nilotica* (Linnaeus). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 58, 127-134.

- Watanabe Y. et Miyamoto H.** (1973) Biochemistry study of labyrinthine fluids of the fish. *Med. J. Osaka Univ.* 23, 273-282.
- Weber D. et Rigway G. J.** (1967) Marking pacific salmon with tetracycline antibiotics. *J. Fish. Res. Board of Canada.* 24 (4), 849-865.
- Wiesmann H.P., Höhling H.J., Zierold K. et Barckhaus R.H.** (1995) Elemental distribution in predentin associated with dentin mineralization in rat incisor. *Connect. Tissue Res.* 33, 179-184.
- Wiesmann H.P., Plate U., Zierold K. et Höhling H.J.** (1998) Potassium is involved in apatite biomineralization. *J. Dent. Res.* 77, 1654-1657.
- Wilson C. A., Beckman D. W. et Den J. M.** (1987) Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 116, 668-670.
- Wright P.J., Metcalfe N.B. et Thorpe J.E.** (1990) Otolith and somatic growth rates in Atlantic salmon parr, *Salmo salar L.* : evidence against coupling. *J. Fish. Biol.* 36, 241-249.
- Wright P.J.** (1991) a. Calcium binding by soluble matrix of the otoliths of atlantic salmon, *Salmo salar L.* *J. Fish. Biol.* 38, 625-627.
- Wright P.J.** (1991) b. The influence of metabolic rate on otolith increment width in Atlantic salmon parr, *Salmo salar L.* *J. Fish. Biol.* 38, 929-933.
- Wright P.J., Rowe D. et Thorpe J.E.** (1991) Daily growth increments in the otoliths of atlantic salmon parr, *Salmo salar L.*, and the influence of environmental factors on their periodicity. *J. Fish. Biol.* 39, 103-113.
- Wright P.J., Talbot C. et Thorpe J.E.** (1992) Otolith calcification in Atlantic salmon parr, *Salmo salar L.*, and its relation to photoperiod and calcium metabolism. *J. Fish. Biol.* 40, 779-790.
- Wroblewski J.** (1987) Elemental change associated with chondrocyte differentiation in rat rib growth plate. *Histochem.* 87, 145-149.
- Zaprudnova R.A. and Martem'yanov V.I.** (1988) Seasonal changes in cations in the blood plasma of freshwater fishes. *Voprosy Ikhtiologii* 4, 671-676.
- Zhang Z. et Runham N.W.** (1992) Effects of food ration and temperature level on the growth of *Oreochromis niloticus* (L.) and their otoliths. *J. Fish. Biol.* 40, 341-349.

ANNEXES

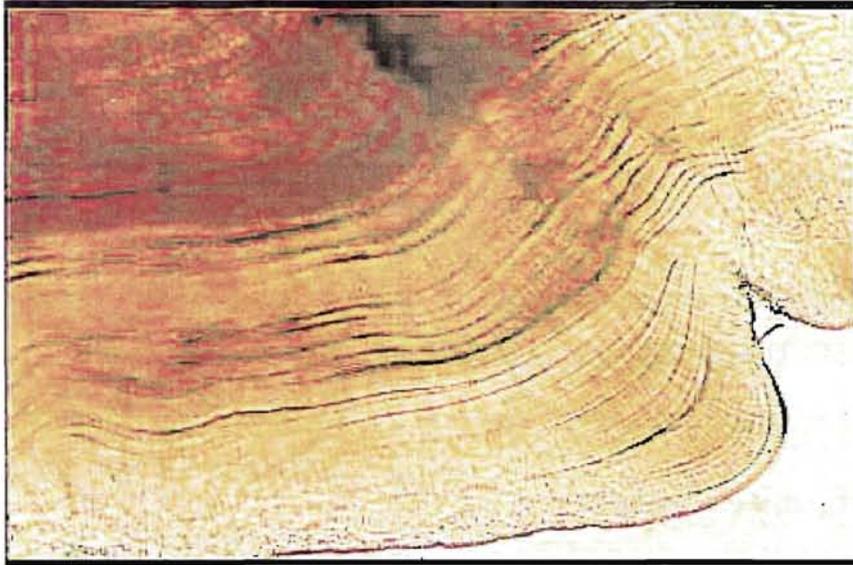


Figure 35 a : Coupe d'une sagitta gauche de turbot observée en lumière transmise. (Vue de l'antirostre).

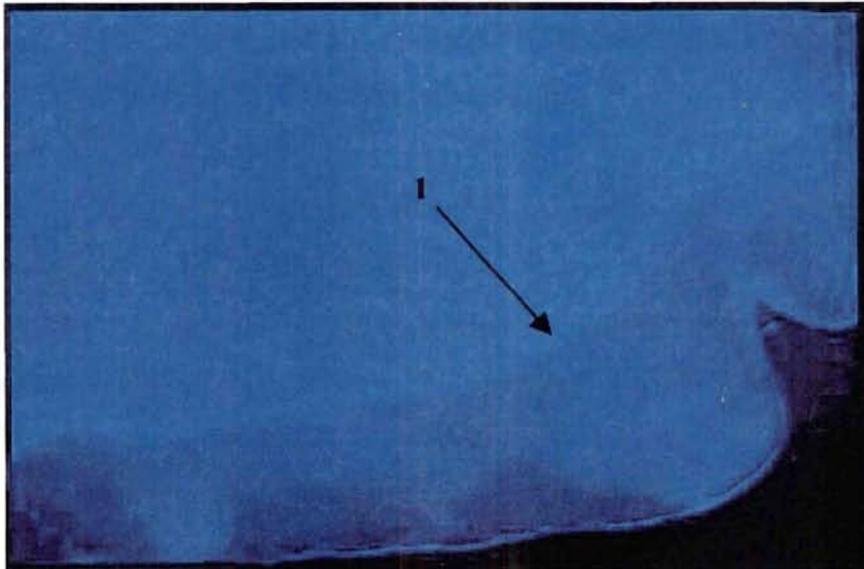


Figure 35 b : Coupe d'une sagitta gauche de turbot observée en lumière épifluorescente, vue de l'antirostre. (1- Marque de la tétracycline).

ANNEXE I : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel animal :

Toutes les expériences ont été menées sur le turbot (*Psetta maxima*), poisson dont l'élevage est très bien maîtrisé à l'IFREMER Brest et la truite (*Oncorhynchus mykiss*).

1.1. Marquage des poissons :

Afin de visualiser sur l'otolithe la zone à analyser, il est nécessaire, lors d'expérimentations de longue durée, de matérialiser le début de l'expérience sur les otolithes. La principale méthode est fondée sur la propriété de certains composés chimiques de se fixer sélectivement sur les surfaces calcifiées en voie de minéralisation. Plusieurs marqueurs sont connus : la tétracycline (Weber et Rigway, 1967 ; Meunier, 1974 ; Meunier et Boivin, 1974 ; Mc Farlane et Beamish, 1987 ; Ruhlé et Winecki-Kühn, 1992), la fluorescéine ou calcéine (Wilson et al., 1987 ; Tsukamoto, 1988 ; Beckman et al., 1990), l'orangé de xylénol (Meunier, 1974), l'alizarine (Meunier et Boivin, 1978 ; Tsukamoto, 1988 ; Takahashi, 1994 ; Umino et al., 1996). Tous ces composés ont la capacité d'émettre une fluorescence de couleur spécifique lorsqu'ils sont soumis à une lumière ultraviolette (de longueur d'onde allant de 390 à 490 nm), et sont donc repérables *a posteriori* : jaune pour la tétracycline (figure 35a et b), jaune - vert pour la fluorescéine, et rouge pour l'alizarine et l'orangé de xylénol. L'incorporation se fait à des doses variables.

La tétracycline est le marqueur interne le plus utilisé. C'est un antibiotique à spectre large qui est vendu sous les noms de "chlorhydrate de tétracycline" (CHTC) ou "oxytétracycline" (OTC). Son incorporation par l'organisme est réalisée suivant plusieurs voies :

1. Balnéation : Cette technique est surtout utilisée pour les jeunes poissons. On fait subir aux individus des bains plus ou moins prolongés dans des solutions de concentration précise. (Hettler, 1984 ; Schmitt, 1984 ; Dabrowski et Tsukamoto, 1986). Des concentrations trop importantes peuvent entraîner la mort des larves (Nagiec et al., 1988).

2. Incorporation dans l'aliment : Technique proposée par Weber et Rigway (1967) qui n'a pas trouvé de nombreux adeptes par la suite.

3. Injection intrapéritonéale ou intramusculaire : C'est la technique la plus répandue pour marquer les poissons juvéniles et adultes. Les injections à une concentration trop élevée entraînent la mort des poissons (Mc Farlane et Beamish, 1987). Les concentrations allant de 25 à 100 mg OTC/kg de poisson, et surtout de 50mg/kg, sont acceptables dans tous les cas pour des espèces variées (Babaluk et Campbell, 1987 ; Babaluk et Craig, 1990 ; Bumguardner, 1991 ; Murphy et Taylor, 1991).

Dans les expériences qui ont été réalisées, une injection intrapéritonéale d'oxytétracycline a été administrée à chaque poisson, à raison de 50mg/kg de poids corporel des poissons (dilution de l'OTC avec de l'eau physiologique).

1.2. Prélèvement et conservation du plasma, de l'endolymphe et des otolithes :

Dès la capture du poisson, une quantité maximale de sang est rapidement prélevée au niveau des vaisseaux caudaux à l'aide d'une seringue héparinée. Le pH est immédiatement mesuré, puis le sang est centrifugé, le plasma séparé et stocké sur de la glace jusqu'au moment des analyses ou congelé. Juste après la prise de sang, le poisson est tué par section de la moelle épinière, puis décapité. Le crâne est ouvert par incision frontale juste au-dessus des yeux. Après avoir enlevé le cerveau, les deux otosacs sont visibles (figure 36). La tête du poisson est alors posée sur de la glace. Pour éviter toute contamination de l'endolymphe par le sang ou des exsudats tissulaires, la surface des otosacs est rincée 4 à 5 fois avec une solution ne contenant pas d'ions, i.e. de la glycine 300 mM traitée à l'aide de résines échangeuses d'anions (Chelex 100 et Biorad AG50WX8) et ajustée à un pH de 7,2 avec du Tris. Avant le prélèvement, tout liquide restant à la surface des 2 cavités est éliminé avec un papier absorbant. L'endolymphe est ensuite prélevée sous une loupe binoculaire (Leica, grossissement x40), à l'aide d'un capillaire calibré (GC100TF-10, diamètre interne 0,78 mm) fixé sur un micromanipulateur (Leitz) et relié à une pompe péristaltique (Ismatec). Le capillaire est inséré dans l'otosac après incision avec un agitateur effilé et l'endolymphe lentement aspirée à l'aide de la pompe péristaltique (fig. 36).

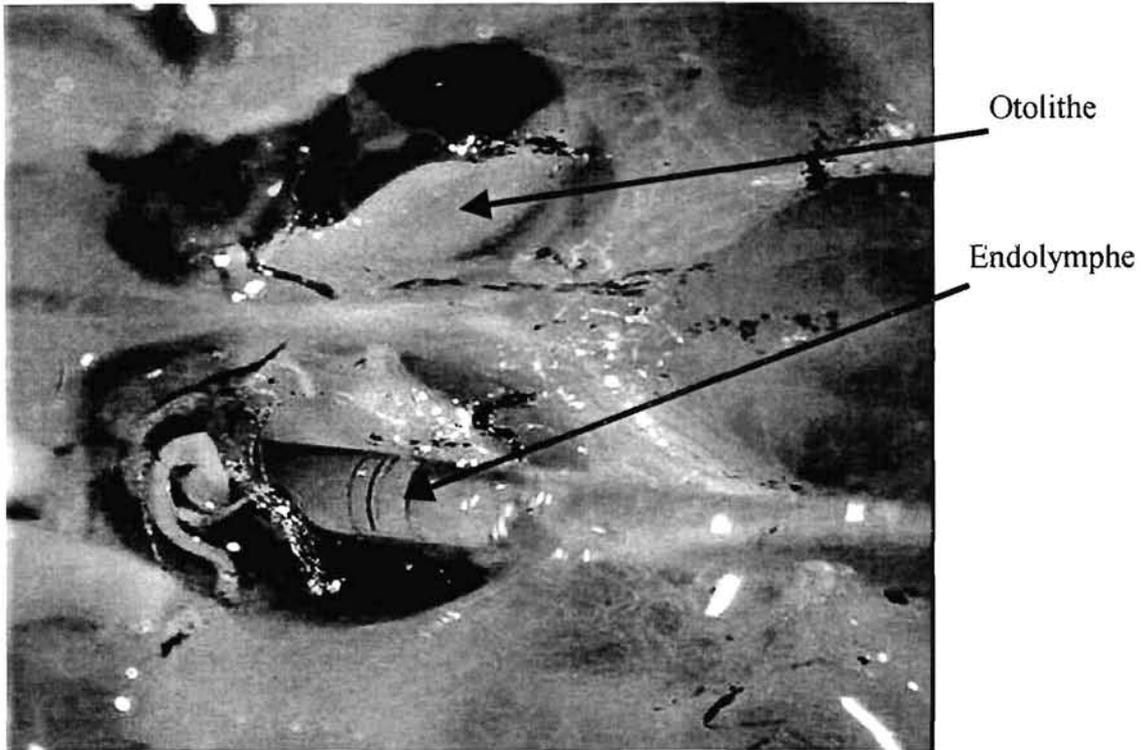


Figure 36 : Vue de dessus des cavités otolithaires. Prélèvement d'endolymphe à l'aide du capillaire.

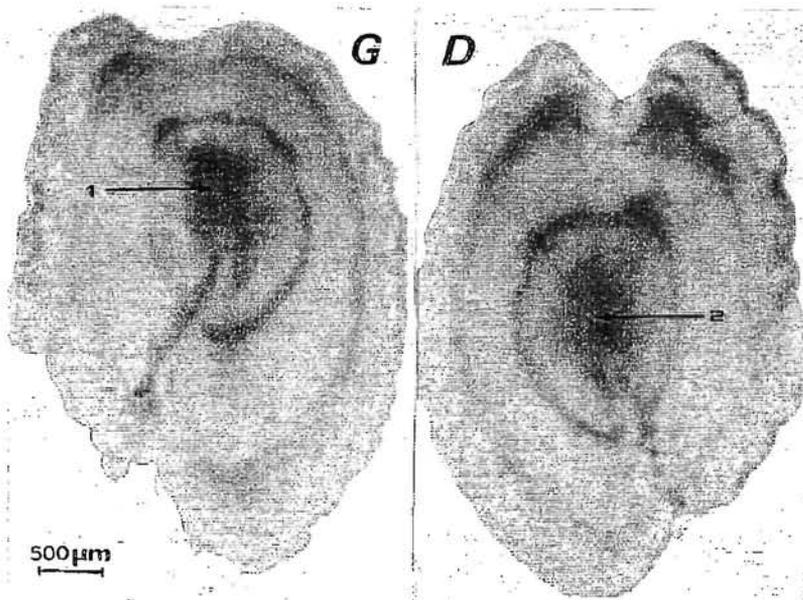


Figure 37 : Sagitta gauche (G) et droite (D) de turbot. (1- nucleus excentré ; 2- nucleus centré, vue en lumière transmise).

Le volume d'endolymphe prélevé est déterminé en mesurant la longueur de l'échantillon dans le capillaire avec un pied à coulisse électronique. Le volume de chaque échantillon est d'environ 4 à 5 μl i.e. 20-25% du volume total d'endolymphe (estimé à 15-20 μl pour un poisson pesant 200g). Les échantillons de lymphe sont ensuite conservés au froid jusqu'au moment des analyses ou congelés dans de l'eau milliQ pour des analyses ultérieures. Le temps nécessaire au prélèvement d'endolymphe est relativement court 4 à 5 min, ce qui permet de limiter les échanges aussi bien entre le plasma et l'endolymphe qu'entre l'atmosphère et l'endolymphe, minimisant ainsi un changement de la composition chimique de l'endolymphe.

Les otolithes sont collectés à l'aide d'une pince plastique, rincés avec de l'eau milliQ et stockés à sec dans des microtubes en polypropylène en attendant leur préparation. Tout contact des otolithes avec du métal ou les mains doit être évité pour ne pas contaminer les échantillons.

1.3. Préparation des otolithes :

La morphologie des otolithes droit et gauche du turbot est différente. Le nucleus de l'otolithe gauche est excentré par rapport à celui de l'otolithe droit (figure 37). Pour éliminer une éventuelle variabilité de la composition chimique entre les otolithes gauches et droits, il est indispensable de fixer ce paramètre. De part son nucleus excentré vers la partie postérieure, l'otolithe gauche présente un plus grand axe de croissance antérieure (stries plus larges). La sagitta étant l'otolithe le plus volumineux, son prélèvement et sa manipulation sont plus faciles. Ainsi, pour toutes les études, nous avons choisi de travailler sur la sagitta.

Lors des premières expériences (décrites dans le §3. de la 2^e partie), l'hétérogénéité de composition de l'otolithe entre les côtés distaux et proximaux n'était pas connue. Les otolithes ont été préparés selon le plan sagittal (axe dans lequel les allongements des micro - accroissements sont les plus grands mais qui ne donne accès qu'à un seul côté pour l'analyse chimique) (figure 38). Par la suite, nous avons décidé de travailler selon le plan transversal et/ou frontal (figure 38) qui permet l'analyse ultérieure des côtés distaux et proximaux.

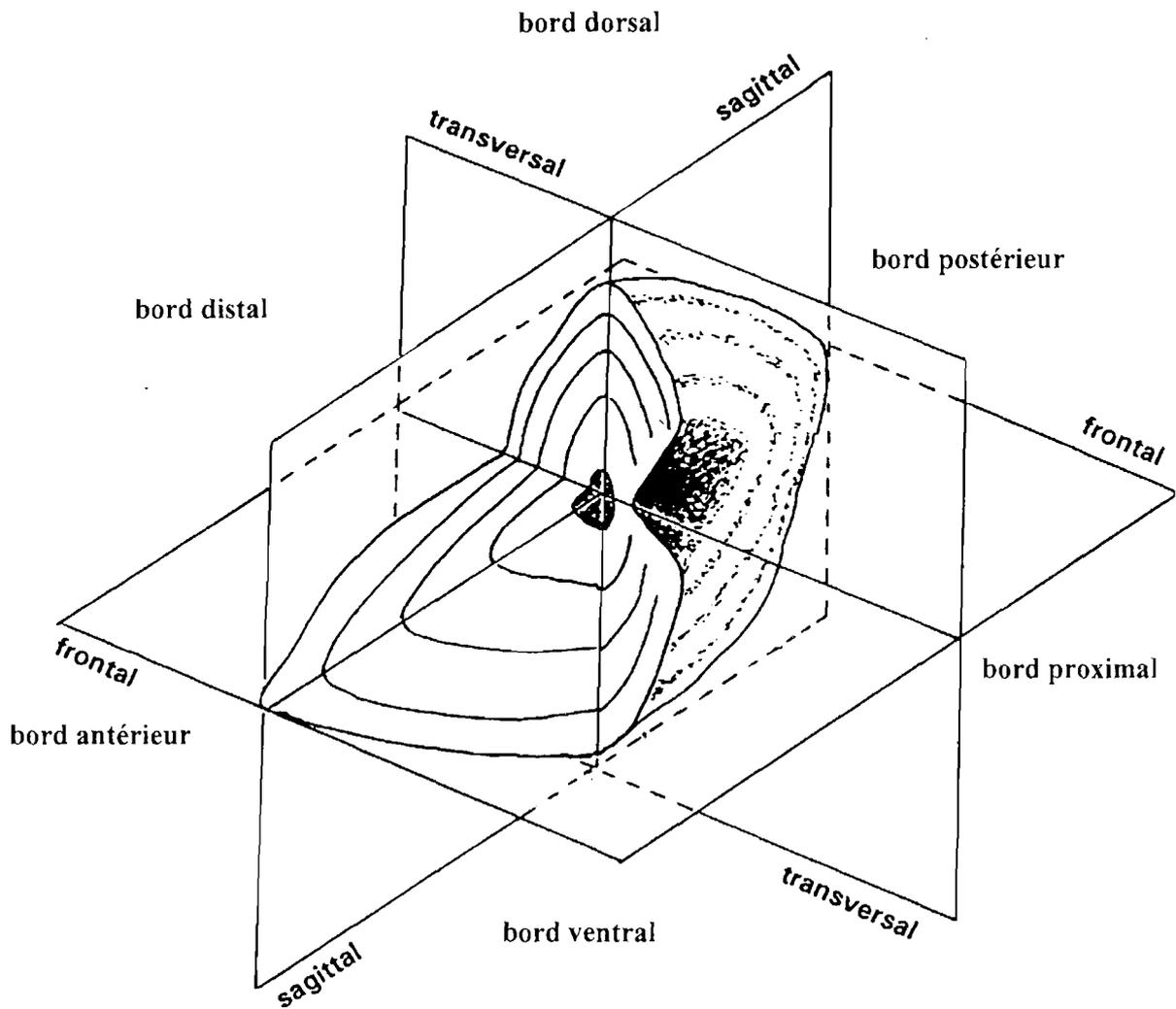


Figure 38 : Morphologie et plans de coupe d'une *sagitta* droite. La zone noire au centre de l'otolithe non sectionné représente le *sulcus acusticus*. La zone noire au centre de la coupe représente le *nucleus* (D'après Panfili, 1993).

1.3.2. Rodage et polissage :

Le rodage est l'étape nécessaire pour l'obtention de la planéité des préparations. Une rodeuse permet un rodage simultané de 8 lames avec du carbure de silicium F400 (grain $9\mu\text{m}$). L'appareil est en général réglé de façon à éliminer 75% de l'épaisseur de l'otolithe le plus épais pour les préparations sagittales, pour les transversales et frontales le réglage est ajusté à l'épaisseur de la coupe. Le temps de rodage est donc variable selon la taille de l'otolithe ; il faut en moyenne 1h pour enlever une couche de $400\mu\text{m}$. Lorsque l'épaisseur voulue est atteinte, les préparations sont parfaitement planes et la phase de polissage peut débiter.

Pour conserver la planéité des lames, le polissage des préparations nécessite l'utilisation d'un appareil : une polisseuse qui permet la préparation simultanée de 5 lames. Pour atteindre le plan d'analyse choisi (l'antirostre côté distal pour les préparations sagittales ; le plan du nucleus pour les transversales et frontales), 2 disques abrasifs au carbure de silicium sont utilisés successivement (grain 800 ($25\mu\text{m}$) puis 1200 ($16\mu\text{m}$)). L'état d'avancement des travaux est fréquemment vérifié au microscope à l'aide de la lumière transmise, de façon à ne pas "dépasser" le plan choisi pour l'analyse.

Les préparations sont ensuite polies à l'aide de suspensions diamantées aux grains $9\mu\text{m}$, $3\mu\text{m}$, $1\mu\text{m}$ et $\frac{1}{4}\mu\text{m}$. Les préparations sont alors observées en lumière réfléchie qui permet de bien visualiser l'état de surface du plan d'analyse. Cette méthode permet l'obtention d'un bon état de surface compatible avec les contraintes des techniques d'analyses microchimiques (en particulier la microsonde où l'absence de rayures est nécessaire) (Gunn et al., 1992). En effet les rayures, éventuellement présentes sur les préparations, provoquent d'importantes diffractions de rayons - X, entraînant ainsi des erreurs analytiques.

Après polissage ainsi qu'entre chaque changement de grain de polissage, les lames sont nettoyées dans une cuve à ultrasons avec de l'eau ultrapure (milliQ >18 Mohms) pour enlever toute trace de diamant qui s'incruste et éviter les pollutions des échantillons. Les préparations sont ensuite conservées dans un dessiccateur pour éliminer l'humidité. Durant toutes les étapes de la

Le plan de travail, choisi pour les otolithes préparés selon le plan sagittal, est la zone de l'antirostre (figure 3). L'antirostre, qui correspond au deuxième axe d'allongement, présente des accroissements très réguliers bien séparés les uns des autres (figure 35a), contrairement au rostre qui est l'axe d'allongement maximum mais où les stries du bord sont difficiles à observer en partie à cause de la courbure de l'otolithe. Pour les otolithes préparés selon le plan transversal ou frontal, le plan de travail choisi est celui du nucleus.

Il existe une très grande diversité de méthodes de préparation des otolithes qui dépendent des observations que l'on désire entreprendre. La technique décrite ci dessous est spécifique à l'analyse microchimique de l'otolithe et n'autorise le polissage que d'un seul côté de l'otolithe mais permet d'acquérir une bonne planéité des préparations nécessaire pour l'analyse à la WDS.

1.3.1. Inclusion :

Préparation selon le plan sagittal :

L'inclusion des otolithes s'effectue dans des moules en silicone. Des lames de verre face dépolie vers le haut sont placées dans ces moules, les otolithes nettoyés sont ensuite posés dessus en position sagittale (côté proximal contre la lame), puis inclus dans de la résine époxy (Araldite 2020). La polymérisation s'effectue dans une étuve, pendant 24h, en présence de cristaux de gel de silice pour diminuer le degré d'hygrométrie (l'humidité pouvant provoquer des défauts de polymérisation).

Préparation selon le plan transversal ou frontal :

Deux inclusions de l'otolithe sont nécessaires lors de cette préparation. La première consiste à inclure l'otolithe dans un pain de résine : l'otolithe est posé sur une couche de résine déjà polymérisée dans un moule en silicone, puis la résine fraîchement préparée est coulée sur l'otolithe de façon à le recouvrir complètement. Lorsque la polymérisation est terminée, une coupe transversale ou frontale de l'otolithe, contenant le nucleus et d'épaisseur de 200µm, est effectuée à l'aide d'une scie. Ces coupes sont ensuite nettoyées, posées sur une lame de verre dans les moules en silicone et incluses avec de la résine époxy (comme décrit précédemment).

préparation des lames, des précautions ont été prises pour éviter toute contamination des échantillons.

2. Techniques d'analyses microchimiques :

2.1. Analyses d'échantillons liquides : endolymphe et plasma

2.1.1. Spectrométrie de masse avec plasma inductif (ICPMS) :

L'ICPMS est une technique relativement récente (une dizaine d'années) qui permet une analyse multiélémentaire sur des échantillons de petits volumes, avec de faibles limites de détection (en général $< 0,1$ ng/l à part quelques éléments tels que le fer, le calcium, le potassium...). Les analyses ont été effectuées au BRGM d'Orléans.

2.1.1.1. Principe de fonctionnement de l'ICPMS :

L'échantillon, sous forme liquide, est transporté sous forme d'aérosol dans un courant d'argon. Ce brouillard est injecté au centre d'un plasma inductif. L'aérosol est alors rapidement désolvaté, les molécules sont dissociées et enfin les atomes excités et ionisés. Une fraction de la partie centrale du plasma est extraite, à travers un orifice d'échantillonnage, vers une enceinte sous basse pression, l'interface. Dans cette enceinte, les éléments sont transportés sous forme d'un jet supersonique dont une partie passe à travers un deuxième orifice dit d'écémage.

Les ions positifs sont extraits et transportés au moyen d'un assemblage de lentilles électromagnétiques puis filtrés, en fonction de leur rapport masse / charge (m/z), par le spectromètre quadripolaire. Les ions de même rapport m/z sont détectés par un système à multiplication d'électrons, le signal est enregistré dans une mémoire tampon. Les données sont, à la fin de l'analyse, transférées vers un système de traitement informatisé. (Houk, 1994)

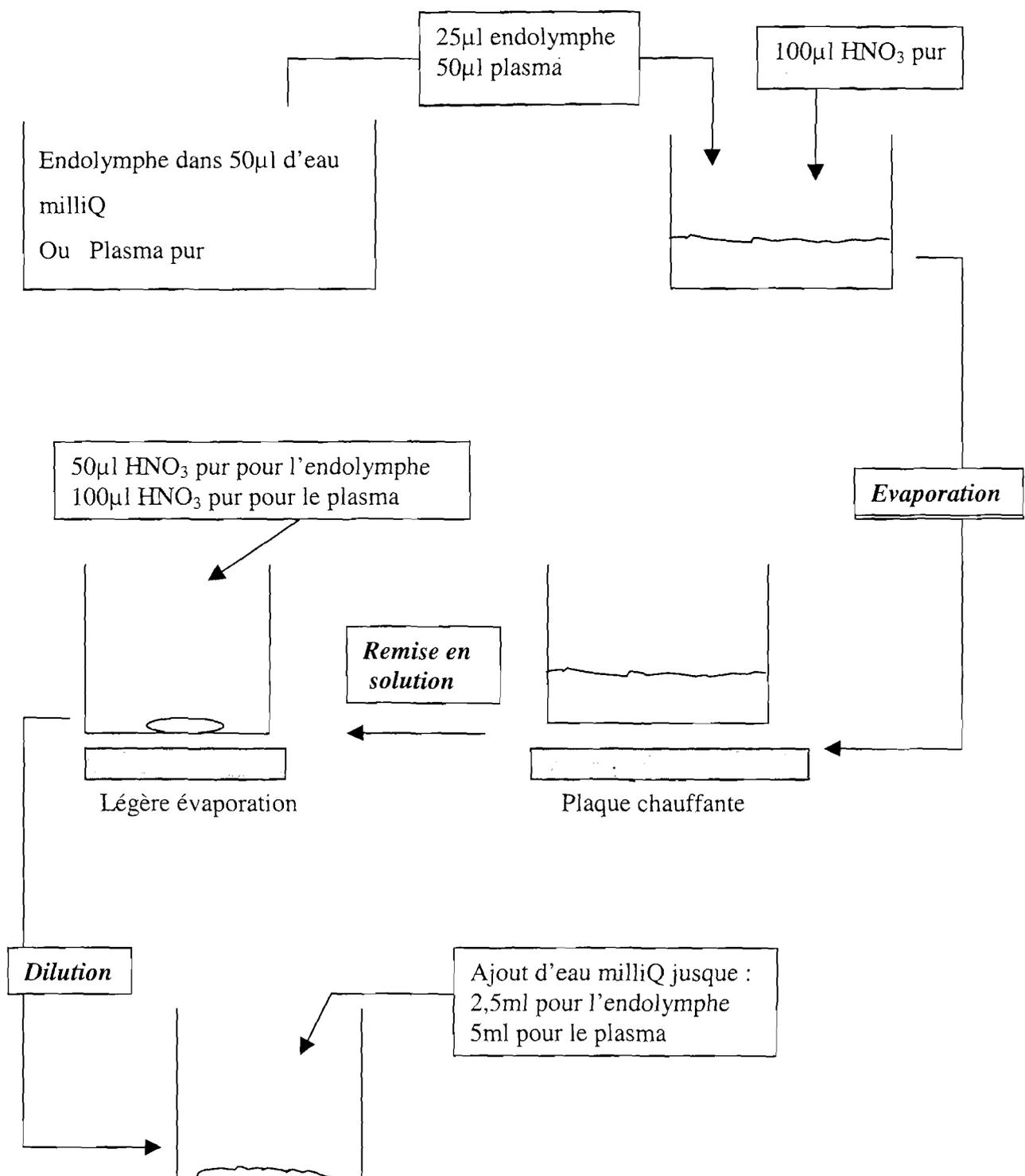


Figure 39 : Schématisation de la minéralisation des échantillons d'endolymph et de plasma avant l'analyse à l'ICPMS.

2.1.1.2. Analyses :

Minéralisation :

Les échantillons de plasma et d'endolymphe étant riches en protéines (respectivement 33 et 5 g/l environ), une minéralisation est nécessaire pour enlever les matières organiques présentes et éviter ainsi un dépôt à l'intérieur du spectromètre de masse. Cette minéralisation est faite dans une salle blanche afin de limiter toute contamination des échantillons par l'environnement du laboratoire.

Les différentes étapes de la minéralisation sont schématisées dans la figure 39. Une attaque des échantillons par de l'acide nitrique (HNO_3) suprapur est effectuée, les préparations sont ensuite asséchées sur plaque chauffante, puis remises en solution avec de l'eau milliQ (dilution au $1/100^e$) contenant 2% d'acide nitrique ultrapur. Les interférences spectrales affectent principalement les masses inférieures à 80 ; il faut donc dans la mesure du possible rester en milieu nitrique et modérer la concentration en sels afin de restreindre la formation des ions polyatomiques (à partir des isotopes de Ar, O, N et H).

Préparation des solutions :

L'analyse des éléments de forte concentration (Na, K de l'ordre de 110 et 70 mmol/l respectivement dans l'endolymphe et 160 et 4mM dans le plasma) nécessite au préalable une dilution au dixième des échantillons avec de l'eau milliQ ($> 18 \text{ Mohms}$), afin d'éviter une saturation de l'appareil. Pour le dosage des éléments de faible concentration, la solution obtenue après minéralisation est passée directement dans le spectromètre de masse. Un étalon interne (Co 20 ppb) est ajouté à chaque échantillon. Ceci permet de corriger les valeurs des concentrations d'une dérive éventuelle de l'appareil au cours du temps.

Deux types de solutions étalons contenant les éléments à doser, l'étalon interne (Co) et 2% d' HNO_3 pur, sont préparés avec de l'eau milliQ : celle correspondant à l'analyse des éléments traces (Li, Mg, Al, Ca, Fe, Zn, Sr) et celle correspondant à l'analyse des mineurs (Na, K). Les solutions étalons ont des concentrations différentes selon s'il s'agit d'analyser du plasma ou de l'endolymphe (tableau 5).

Solution étalon	Endolymphe					Plasma				
	traces		mineurs			traces		mineurs		
	1	2	1	2	3	1	2	1	2	3
⁷ Li	2	1				200	100			
²⁴ Mg	20	10				200	100			
²⁷ Al	4	2				5	2,5			
⁴⁴ Ca	150	75				1500	750			
⁵⁶ Fe	10	5				10	5			
⁶⁶ Zn	50	25				200	100			
⁸⁸ Sr	2	1				10	5			
⁵⁹ Co	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
²³ Na			500	200	100			500	200	100
³⁹ K			500	200	100			500	200	100

Tableau 5 : Composition des solutions étalons utilisées pour les analyses d'endolymphe et de plasma en ppb.

Une solution permettant l'analyse du bruit de fond et le calcul des limites de détection est également préparée avec Co 20ppb, de l'eau milliQ et 2% d'HNO₃.

Optimisation, réglages de l'instrument et analyse :

Avant l'analyse des échantillons, l'optimisation de l'appareil est effectuée à partir de la solution utilisée pour mesurer le bruit de fond (Co 20ppb). Le signal émis par l'isotope ⁵⁹Co est optimisé par réglages des lentilles, du débit du nébuliseur et du flux d'argon.

Les volumes des échantillons étant faibles, une acquisition en comptage de pic à pic et non en mode balayage a été privilégiée. Elle permet d'obtenir de meilleures limites de détection. La séquence choisie pour l'analyse des éléments mineurs correspond à 40 sec de prélèvement (le débit de la pompe est de 45µl/s), 30 sec d'acquisition des données et 1 min de rinçage ; pour les majeurs (Na, K) : 50 sec de prélèvement, 10 sec d'acquisition et 1 min de rinçage. La durée du temps de rinçage est importante pour éviter un effet mémoire i.e. une influence de la solution précédente sur la solution en cours d'analyse.

Les dosages sont effectués en automatique à l'aide d'un passeur. Les séries d'échantillons sont intercalées avec les solutions mesurant le bruit de fond (les "blancs") et les solutions étalons.

Les courbes d'étalonnages (intensités brutes en fonction des concentrations connues des étalons) sont tracées pour chaque élément dosé. Elles permettent de calculer les concentrations des éléments correspondant dans les échantillons.

Calcul des limites de détection :

Le calcul des limites de détection est nécessaire pour connaître la validité des résultats. Au début de la série d'analyses, 10 échantillons de la solution de Co 20ppb ("blancs") sont analysés par l'ICPMS. Pour chaque élément dosé, l'écart type est calculé, puis la limite de détection qui est égale à $3 * \text{écart type}$.

Pour tous les échantillons de plasma et d'endolymphe, les résultats sont comparés à ces limites de détection (LD) : les valeurs inférieures aux LD sont mises à zéro, et les autres sont conservées.

2.1.2. Photométrie de flamme :

Cette technique d'émission atomique de flamme est monoélémentaire. Elle nécessite une excitation des atomes par la chaleur. L'électron, éjecté sur un niveau énergétique supérieur lors de l'excitation, revient ensuite sur l'orbitale de départ (phénomène de relaxation). Il s'en suit l'émission d'une raie dont la fréquence est caractéristique de l'atome considéré. Les radiations émises n'étant pas monochromatiques, des filtres à bandes passantes (largeur du spectre lumineux que laisse passer le monochromateur) centrés sur la fréquence considérée ($\nu \pm \delta\nu$) sont utilisés.

Après des dilutions appropriées des échantillons de plasma et d'endolymphe à l'aide d'eau milliQ, les absorbances du sodium et du potassium sont mesurées par cette technique, respectivement au longueur d'onde 589 nm et 767 nm, (± 5 à 10 nm). Les concentrations sont

ensuite calculées à l'aide d'un étalon de chaque élément. La précision de l'appareil est de l'ordre de 1%.

Les dosages ont été effectués au laboratoire de physiologie et toxicologie environnementale de l'université de Nice.

2.1.3. Spectrophotométrie à l'aide de kits sigma :

Le principe de la spectrophotométrie, aussi appelée absorptiométrie, est le suivant : un faisceau de lumière de longueur d'onde donnée traverse la solution à analyser ; de la proportion d'intensité lumineuse absorbée par la solution, on en déduit la concentration de la substance absorbante.

Plusieurs éléments contenus dans le plasma et l'endolymphe sont dosés par cette méthode en utilisant des kits de réactifs sigmas spécifiques : CO₂ total (340nm), Ca total (575nm), Mg²⁺ (520nm), PO₄³⁻ (340nm), Cl⁻ (460nm) et protéines (595nm).

Les concentrations des échantillons sont calculées à partir d'une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant les étalons fournis dans le kit ; la mesure du blanc est effectuée sur de l'eau milliQ fraîchement tirée, utilisée pour la reconstitution des réactifs.

2.2. Analyses d'échantillons solides : otolithes

Différentes techniques sont utilisées pour l'analyse des otolithes, leur choix est déterminé en fonction du type d'étude réalisé. Pour des travaux sur la composition chimique globale de l'otolithe, une mise en solution de l'otolithe est requise pour une analyse du liquide par ICPMS. S'il s'agit d'études sur la caractérisation d'événements du cycle vital, une analyse sur différents accroissements de l'otolithe est nécessaire et réalisée à l'aide d'une microsonde électronique ou d'un ICPMS couplé avec un laser. Dans nos travaux, nous avons besoin d'une technique d'analyse de surface de l'otolithe, d'où l'utilisation de la microsonde de l'IFREMER Brest pour

la détermination des concentrations des éléments majeurs et mineurs et de l'ICPMS à ablation laser du BRGM d'Orléans pour les éléments mineurs et traces.

2.2.1. ICPMS à ablation laser :

Le principe d'analyse est le même que pour les échantillons liquides, la seule différence correspond au système d'introduction de l'échantillon. Un Nd YAG laser relié au spectromètre de masse est positionné sur un microscope. Après avoir fait la mise au point de la zone d'attaque sur l'otolithe, une ablation laser est réalisée. La matière est alors entraînée par un flux d'argon vers le spectromètre de masse. (Pearce et al., 1992)

Les analyses ont également été effectuées au BRGM d'Orléans.

L'optimisation du signal est effectuée sur du ^{139}La contenu dans du verre dopé (NBS). Cet isotope étant situé au milieu du spectre, une bonne réponse de l'appareil est obtenue sur la plupart des éléments de la gamme.

Les conditions analytiques utilisées pour le laser sont les suivantes : tension 720V, 10 sec d'acquisition à raison de 3 coups par seconde, mode balayage, résolution spatiale (dimension minimale du volume à l'intérieur duquel un élément peut être analysé) de l'ordre de 20 μm .

Les calculs des concentrations diffèrent légèrement par rapport aux échantillons liquides car pour l'instant, il n'existe pas d'étalons correspondant aux otolithes. Une courbe de réponse de l'appareil est établie à l'aide du verre dopé (NBS) contenant quelques éléments de concentrations connues, répartis sur toute la gamme. Certains éléments ne sont pas ionisés à 100% et le signal qu'ils produisent, à concentration identique à celle des éléments de référence, est plus faible. Il faut donc tenir compte des différents coefficients d'ionisation des éléments pour calculer les concentrations dans les échantillons. L'intensité du calcium de chaque échantillon est également utilisée pour corriger les calculs de concentration en fonction de la quantité de matière analysée (en l'absence d'étalon interne la variation de l'intensité du calcium est considérée comme étant due à la quantité de matière ablatée).

En raison de l'absence d'étalon interne, une dérive éventuelle de l'appareil ne peut pas être corrigée comme lors d'analyses d'échantillons liquides. Pour éviter d'obtenir un "effet temps d'analyse" sur les mesures, il faut intercaler les différents lots d'échantillons à analyser (Campana et al., 1994).

Le bruit de fond de l'appareil est mesuré sur le plasma sec sans ablation du laser pour chaque isotope. Il permet ensuite le calcul des limites de détection (LD) pour chaque élément (égale à $3 * \text{écart type des mesures}$). De même que pour les échantillons liquides, les résultats dont les valeurs sont inférieures aux LD sont mis à zéro, par contre les autres sont conservés.

2.2.2. Microsonde à dispersion de longueur d'onde (Wavelength - dispersive X-ray spectroscopy, WDS) :

L'appareil utilisé est une microsonde électronique de Castaing à dispersion de longueur d'onde (WDS) de type Cameca SX50. Ce type de microsonde a une résolution spatiale de l'ordre du micron et permet de doser les éléments présents à une concentration >100 ppm.

La microsonde est composée d'un microscope sur lequel est fixé un spectromètre. Le principe consiste à bombarder l'échantillon sous vide (10^{-7} Pa) avec un faisceau d'électrons. Il en résulte une émission de rayons X dont la longueur d'onde est spécifique de chaque élément. Le spectromètre enregistre sélectivement les rayons X en fonction de leur longueur d'onde. L'utilisation de plusieurs spectromètres permet d'analyser simultanément plusieurs éléments. Le spectromètre, très sensible aux variations de planéité (Landron, 1989), comprend un cristal monochromateur et un détecteur qui sont maintenus sous un vide de 10^{-2} Pa pour diminuer l'absorption des photons. Le rayonnement X émis par la cible est analysé par le monochromateur. Si ce rayonnement comporte des photons de longueur d'onde satisfaisant la condition de diffraction du cristal, ces photons sont réfléchis sélectivement sur le détecteur. Le détecteur a comme rôle de convertir en une impulsion électrique chaque photon qui a satisfait la condition de diffraction du monochromateur. (Figure 40). L'exploitation de toute la gamme de rayonnement utile pour la microanalyse nécessite l'utilisation de plusieurs cristaux avec différentes régions analytiques (tableau 6).

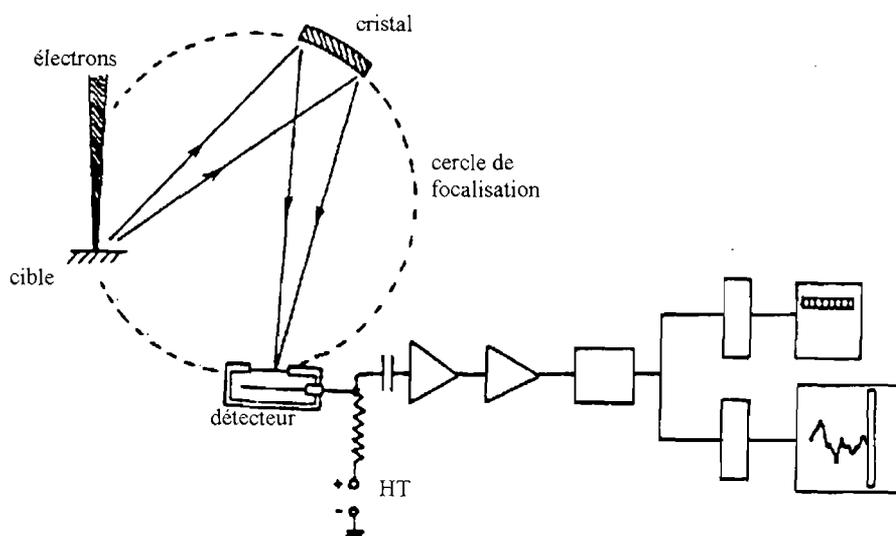


Figure 40 : Schéma de principe des spectromètres à dispersion angulaire de longueur d'onde (WDS).

Avant le passage à la microsonde, les préparations sont métallisées par pulvérisation sous vide d'une couche de 300 à 400 Å de carbone sous forme de graphite pur, élément léger choisi pour minimiser la perte d'intensité. Cette couche assure la conductivité permettant l'écoulement des charges pour éviter un échauffement local et un claquage des échantillons isolants (Maurice, 1993).

Dans les otolithes de turbot, seuls les 4 éléments les plus abondants peuvent être dosés précisément avec la microsonde : Ca, Na, K, Sr. Les concentrations de ces éléments sont calculées à l'aide de standards spécifiques pour chaque élément à doser (tableau 6).

Le choix des conditions d'expérimentation porte sur divers facteurs : la tension d'accélération, l'intensité du courant et la durée d'acquisition (Maurice, 1989 ; Molins, 1989). La valeur de la tension d'accélération ne doit pas être abaissée au-dessous du seuil d'ionisation. La tension appropriée d'excitation correspond à la valeur seuil multipliée par 2,7. Lors du dosage simultané de plusieurs éléments, une seule tension est applicable ; il faut donc trouver un compromis. Dans notre cas, c'est le calcium qui impose une tension minimale d'environ 10 kV (tableau 6).

Elément	Numéro atomique	Longueur d'onde de mesure (nm)	Standard	Monochromateur	Domaine d'analyse du monochromateur (nm)	Raie électronique	Etat stable (kV)	Etat d'excitation (kV)
Na	11	1.191	albite Na(AlSi ₃ O ₈)	TAP	0,536 - 2,110	Kα	1,07	2,89
K	19	0.374	orthose K(AlSi ₃ O ₈)	PET	0,182 - 0,716	Kα	3,59	9,69
Ca	20	0.335	wollastonite Ca ₃ (Si ₃ O ₉)	PET	0,182 - 0,716	Kα	4,03	10,88
Sr	38	0.686	sulfate de strontium Sr(SO ₄)	TAP	0,536 - 2,110	Lα	2,2	5,94

Tableau 6 : Caractéristiques des standards utilisés pour chaque élément, longueur d'onde de mesures et tensions minimales de détection des éléments. TAP : Phtalate acide de thallium C₈H₅O₄Tl ; PET : Pentaérythritol C₅H₁₂O₄.

Diverses analyses préliminaires ont été réalisées par H. de Pontual et H. Troadec pour déterminer le choix des conditions d'analyses optimales définies comme suit : intensité du courant 15 nA, tension 10 kV, temps d'intégration 120 secondes sur Na, K, Sr et 40 secondes sur Ca. Les analyses ont été effectuées à l'aide de la microsonde située à l'IFREMER Brest.

Le spectre de rayons X émis est la superposition d'un bruit de fond continu dû à l'appareillage et des raies caractéristiques des éléments. Pour chaque analyse effectuée, une mesure est réalisée sur la longueur d'onde de la raie caractéristique de l'élément à doser. Puis une seconde mesure est faite au voisinage de la raie d'un seul côté ou des 2 côtés pour les éléments plus délicats (Na) : c'est la mesure du bruit de fond dont la durée correspond à la moitié du temps de mesure à la raie caractéristique de l'élément. Ainsi, l'intensité du rayonnement caractéristique s'obtient en retranchant l'intensité du fond continu à l'intensité mesurée.

Pour déterminer les limites de détection, l'écart type de toutes les valeurs du bruit de fond mesurées, ainsi que la pente de la droite concentration / intensité nette du pic, sont calculés pour chaque élément dosé. Les limites de détection sont égales à $3 * \text{écart type} * \text{pente de la droite}$. Les données inférieures aux LD sont mises à zéro.

ANNEXE II : TABLEAU DE CONVERSION (PPM EN mM)

Eléments	ppm	mmol/l ou mM
<i>Na</i>	1	0,0435
<i>K</i>	1	0,0255
<i>Ca</i>	1	0,0249
<i>Mg</i>	1	0,0411
<i>Sr</i>	1	0,0114
<i>Al</i>	1	0,0371
<i>Fe</i>	1	0,0179
<i>Zn</i>	1	0,0153
<i>Li</i>	1	0,1441

ANNEXE III : PARTICIPATION AUX COLLOQUES

Premières Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés, 22-23 Janvier 1998, Lyon.

Poster : Pisam M., Payan P., Boeuf G., Edeyer A. & Mayer-Gostan N. Structure et ultrastructure des ionocytes de l'épithélium sacculaire de l'oreille interne de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de turbot (*Scophthalmus maximus*).

Poster : Edeyer A. & de Pontual H. Microchimie de l'otolithe: méthodes et applications.

Communication orale (présentée par P. Payan) : Borelli G., Edeyer A., Mayer-Gostan N., de Pontual H., Troadec H. & Payan P. La biocalcification de l'otolithe chez la truite : des polyanions pour orienter la croissance?

Second International Symposium on Fish Otolith Research and Application, 20-25 June 1998, Bergen, Norway.

Communication orale : Edeyer A., de Pontual H., Payan P., Troadec H. & Mayer-Gostan N. Daily variations of saccular endolymph and plasma composition on turbot *Psetta maxima*.

Communication orale (présentée par P. Payan) : Payan P., Edeyer A., Borelli G., de Pontual H., Boeuf G. & N. Mayer-Gostan. Heterogeneity of endolymph chemistry in the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*) : relation to otolith growth?

Communication orale (présentée par N. Mayer-Gostan) : Mayer-Gostan N., Le Moal C., Pisam M., Rambourg A., Edeyer A., Boeuf G. & P. Payan. Structure and Ultrastructure of the saccular epithelium in two teleosts: *Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*.

Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés, 18-19 Mars 1999, Versailles.

Poster : Payan P., Edeyer A., Borelli G., de Pontual H., Boeuf G. & Mayer-Gostan N. Stress environnemental et chimie de l'endolymphe de l'oreille interne de poissons.

ANNEXE IV : GLOSSAIRE

Ce glossaire ne comprend que les définitions des termes employés dans ce manuscrit. Certaines définitions proviennent de Panfili (1993) et Kalish et al. (1995).

Accrétion : augmentation de la quantité de tissu déposé par adjonction périphérique de matériel.

Accroissement : Résultat de l'accrétion i.e. quantité de tissu déposé.

Accroissement journalier : Accroissement formé sur une période de 24h. Dans sa forme générale, l'accroissement journalier est composé d'une zone L et une zone D.

Antirostrum : Projection antérieure et dorsale de la sagitta, généralement plus courte que le rostrum.

Asteriscus (pl. asterisci) : Une des trois paires d'otolithes trouvées dans le labyrinthe membraneux de l'oreille interne des poissons téléostéens. Il est contenu dans une enveloppe de la pars inferior appelée lagena. Chez les poissons non ostariophysaires, l'asteriscus est petit et a une forme d'hémisphère aplatie ou de quartier de lune. Chez les ostariophyses, l'asteriscus est généralement circulaire et compressé latéralement et est considérablement plus gros que la sagitta.

Calcification : Processus du dépôt des cristaux de carbonate de calcium sur les otolithes.

Discontinuité : Discontinuité dans une zone de l'otolithe, ou dans un groupe de zones opaques et translucides, ou dans les microstructures. Discontinuité de structure dans l'arrangement des marques de croissance d'une pièce calcifiée.

Lagena : Enveloppe du labyrinthe membraneux de l'oreille interne contenant l'asteriscus.

Lapillus (pl. lapilli) : Une des trois paires d'otolithes trouvées dans le labyrinthe membraneux de l'oreille interne des poissons téléostéens. Il est contenu dans une enveloppe de la pars superior appelée utriculus. Chez la plupart des poissons, cet otolithe a la forme d'une sphère aplatie et est plus petit que la sagitta.

Macrostructure : Accroissement qui est supérieur à 50µm en largeur. Souvent utilisé pour décrire les accroissements saisonniers.

Macula : Zone sensorielle de l'épithélium sacculaire reliée au système nerveux central par une tresse nerveuse.

Microstructure : Accroissement qui est inférieur à 50µm en largeur. Souvent utilisé pour décrire les accroissements journaliers et sous journaliers.

Minéralisation : Processus biologique de déposition de matériel minéral cristallin ou amorphe dans ou sur une matrice organique.

Nucleus : Terme utilisé pour indiquer les primordia et le centre de l'otolithe.

Otolithométrie : Méthode d'estimation de l'âge à partir des marques enregistrées sur les otolithes des poissons téléostéens.

pH : Opposé du logarithme décimal de la concentration de l'ion hydronium dans une solution : $\text{pH} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+]$. Une solution acide a un $\text{pH} < 7$, une solution neutre a un $\text{pH} = 7$ et une solution basique a un $\text{pH} > 7$.

Dans le plasma, $\text{pH} = \text{pK}(\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-) + \log [(\text{CO}_2 \text{ total} - \text{CO}_2 \text{ dissous}) / \text{CO}_2 \text{ dissous}]$ avec $\text{CO}_2 \text{ dissous} = \text{coefficient de solubilité de CO}_2 \times \text{pCO}_2$. Le coefficient de solubilité de CO_2 et le $\text{pK}(\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-)$ varie en fonction de la température : à 17°C, $\text{pK} = 5,88$ coefficient = 0,052, à 10°C, $\text{pK} = 5,83$ coefficient = 0,064

pK : Opposé du logarithme décimal de la constante d'ionisation d'un acide ou d'une base : $pK = -\log K$. Par exemple dans notre cas : $CO_2 + H_2O \rightarrow HCO_3^- + H^+$ d'où $pK(CO_2-HCO_3^-) = -\log [([HCO_3^-] \times [H^+]) / [CO_2]]$.

Primordium (pl. primordia) : Structure complexe initiale d'un otolithe. Il est constitué de matériel granuleux ou fibrillaire entourant un ou plusieurs nuclei optiquement dense de 0,5µm à 1,0µm en diamètre. Dans les premiers stades de croissance de l'otolithe, si plusieurs primordia sont présents, généralement ils fusionnent pour former le centre de l'otolithe.

Résorption : Une partie du matériel original d'une structure calcifiée est résorbée (i.e. enlevée de sa place d'origine).

Rostrum : Projection antérieure et ventrale de la sagitta, généralement plus longue que l'antirostrum.

Sacculus : Enveloppe du labyrinthe membraneux de l'oreille interne contenant la sagitta.

Sagitta (pl. sagittae) : Une des trois paires d'otolithes trouvées dans le labyrinthe membraneux de l'oreille interne des poissons téléostéens. Elle est contenue dans une enveloppe de la pars inferior appelée sacculus. Elle est généralement comprimée latéralement et a une forme elliptique ; cependant sa forme varie énormément selon les espèces. Chez les poissons non ostariophysaires, la sagitta est beaucoup plus volumineuse que l'asteriscus et le lapillus. La sagitta est l'otolithe le plus fréquemment utilisé dans les études d'otolithes.

Schlérochronologie : Méthode d'estimation du temps, en particulier de l'âge, à partir des marques enregistrées et conservées dans les tissus durs.

Sulcus acusticus (généralement appelé sulcus) : Sillon longitudinal observé sur la face proximale de la sagitta.

Ultrastructure : Structure d'un tissu observée à fort grossissement en microscopie électronique à balayage.

Utriculus : Enveloppe du labyrinthe membraneux de l'oreille interne contenant le lapillus.

Zone : Région de structure ou de densité optique similaire.

Zone D : La portion de l'accroissement journalier qui apparaît sombre lors d'une vision en lumière transmise. Cette partie contient une quantité plus forte de matières organiques et plus faible de carbonate de calcium que la zone L.

Zone hyaline : Zone qui permet le passage d'une quantité plus importante de lumière que la zone opaque. Le terme translucide est préféré à hyalin. Voir zone translucide.

Zone L : La portion de l'accroissement journalier qui apparaît claire lors d'une vision en lumière transmise. Cette partie contient une quantité plus faible de matières organiques et plus forte de carbonate de calcium que la zone D.

Zone opaque : Zone qui limite le passage de la lumière par comparaison à la zone translucide. Sur les otolithes non traités, sous lumière transmise, la zone opaque apparaît sombre et la zone translucide claire. Sous lumière réfléchie, la zone opaque apparaît claire et la zone translucide sombre.

Zone translucide : Zone qui permet le passage d'une quantité plus importante de lumière que la zone opaque. Sur les otolithes non traités, sous lumière transmise, la zone translucide apparaît claire et la zone opaque sombre. Sous lumière réfléchie, la zone translucide apparaît sombre et la zone opaque claire.