

N° ORDRE : 3148

THÈSE

Présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

Mention : Biologie

PAR

VILLENEUVE Laure

Equipe d'accueil : UMR 1067, Nutrition, Aquaculture et Génomique des Poissons,
IFREMER, Plouzané

Ecole Doctorale : Vie-Agronomie-Santé

Composante Universitaire : UFR SVE

**INFLUENCE NUTRITIONNELLE DE LA VITAMINE A ET DE LA
NATURE DES LIPIDES SUR LA MORPHOGENÈSE DE LA LARVE DE
BAR (*DICENTRARCHUS LABRAX*) : IMPLICATION DE LA VOIE DES
RÉTINOÏDES.**

SOUTENUE LE 09 février 2005 devant la commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY :

Jean-Noël FREUND	Directeur de Recherches INSERM-Strasbourg	Rapporteur
Jean-Max ROUANET	Maître de Conférences à l'Université Montpellier 2	Rapporteur
Isabelle LE HUERON-LURON	Chargée de Recherches INRA-Rennes	Examineur
Chantal CAHU	Directeur de Recherches IFREMER-Brest	Examineur
Jacques MALLARD	Professeur à l'ENSAR-Rennes	Président
Stéphane PANSERAT	Chargé de Recherches INRA-St Pée sur Nivelle	Examineur
José ZAMBONINO INFANTE	Directeur de Recherches IFREMER-Brest	Examineur

Je voudrais remercier Mr Freund et Mr Rouanet d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de l'intérêt qu'ils ont porté à ce manuscrit en tant que rapporteurs. Je remercie également les autres membres du jury, Mme Le Huërou-Luron, Mr Mallard et Mr Pansérat d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, directement ou indirectement, m'ont permis de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont tout particulièrement à Chantal CAHU et José ZAMBONINO INFANTE. Je vous remercie de m'avoir donné la chance d'intégrer votre laboratoire pendant ces trois années et de mener à bien ce sujet de thèse. Je vous suis extrêmement reconnaissante pour tout le savoir que vous m'avez transmis et qui m'a permis d'approfondir mes connaissances en biologie. Votre aide quotidienne m'a été très précieuse et enrichissante, aussi bien au niveau humain qu'au niveau scientifique. Le sujet que vous m'avez donné à explorer était très intéressant et n'a fait que confirmer mon souhait de poursuivre dans le domaine de la recherche. Veuillez recevoir toute ma reconnaissance et mon amitié sincère.

Je souhaite également remercier l'ensemble des personnes de l'Unité Mixte INRA-IFREMER et tout particulièrement Monsieur KAUSHIK qui la dirige et m'a offert l'opportunité de réaliser ce travail.

Cette étude m'a également permis de travailler avec Enric GISBERT qui a complété et enrichi ce travail par ses connaissances et sa présence. Je te remercie sincèrement pour ton aide et ton amitié.

Je tiens également à remercier Marie-Madeleine LE GALL, Patrick QUAZUGUEL et Hervé LE DELLIOU pour leur assistance technique précieuse et leur soutien moral. Mes remerciements vont également à Christine HUELVAN, Elisabeth DESBRUYERES et Jacques MORICEAU pour leur aide et leur présence à mes côtés pendant cette étude. Un merci tout particulier à Jacques pour la réalisation des posters et le traitement des photos. Merci à toute l'équipe de Brest avec qui j'ai partagé ces trois années et qui les a rendues inoubliables par sa bonne humeur et sa gentillesse.

Je remercie toutes les personnes des laboratoires de Biotechnologies et de Physiologie des Invertébrés de l'IFREMER de Brest ainsi que du laboratoire de Génomique et Physiologie des Poissons de Bordeaux pour leur aide matérielle et leur amitié.

Un immense merci à mes parents pour leur soutien, leur aide, leur patience et leur présence tout au long de mes études. Je n'y serais pas arrivée sans vous.

Merci à mes amis, surtout Hélène, pour avoir toujours été disponibles et à l'écoute ainsi que pour tous les moments que nous avons partagés.

Merci également à toutes les personnes que j'oublierais involontairement.

Cette thèse a été réalisée grâce à un cofinancement INRA et IFREMER.

Liste des publications.

Villeneuve, L., Gisbert, E., Cahu, C.L., Le Gall, M.M & Zambonino-Infante, J. (2004). Expression and localization of some retinoid receptors during European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture* 242, 537-551.

Villeneuve, L., Gisbert, E., Le Delliou, H., Cahu, C.L. & Zambonino-Infante, J. (2004). Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Sous presse dans Br. J. Nutr.*

Villeneuve, L., Gisbert, E., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P. & Cahu, C.L. (2004). Effect of nature of dietary lipids on European sea bass morphogenesis: implication of retinoid receptors. *Soumis.*

Marza, E., Barthe, C., André, M., Villeneuve, L., Hérou, C. & Babin, P. (2004). Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. *Sous presse dans Dev. Dyn.*

Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P. & Cahu, C.L. (2004). Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for HUFA supply in European sea bass larval development. *Soumis.*

Cahu, C., Zambonino-Infante, J., Villeneuve, L. & Gisbert, E. (2004). Nutrition, développement et morphogénèse chez les larves de poisson. *Aquafilia* 6, 5-9.

Communications pour colloques.

Villeneuve, L., Cahu, C., Zambonino, J.L., Le Gall, M.M. & Quazuguel, P.(2002). Effet de la vitamine A dans l'aliment sur le développement des larves de bar. Bordeaux aquaculture, 20 septembre 2002.

Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino, J. & Cahu, C. (2003). Effects of vitamin A and polyunsaturated fatty acids on *Dicentrarchus labrax* larval skeletal formation. Forum on Fishery Science and Technology, Sustainable Aquaculture, Resources, Environment and Quality. 22-25 Septembre 2003, Guangzhou, Chine. Book of abstract, p 42.

Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino Infante, J.L. & Cahu, C. (2003). Effet de la vitamine A et des acides gras polyinsaturés sur la qualité des larves de bar. Journée « Qualité des poissons » INRA-Bordeaux, 11 Septembre 2003.

Villeneuve, L., Gisbert, E., Le Gall, M.M., Zambonino Infante, J.L. & Cahu, C. (2003). Effet de la vitamine A sur l'expression de gènes impliqués dans le développement des larves de bar. Journée « Qualité des poissons » INRA-Bordeaux, 11 Septembre 2003.

Villeneuve, L., Gisbert, E., Le Gall, M.M., Zambonino Infante, J.L. & Cahu, C. (2004). Influence of vitamin A levels on malformations during sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. World Aquaculture Society Symposium, Honolulu, Hawaii, 1-5 Mars 2004. Book of abstract, p 612.

Cahu, C., Zambonino, J., Villeneuve, L. & Gisbert, E. (2004). Nutrition et morphogenèse chez les larves de poissons. Journée du Syndicat Français de l'Aquaculture Marine et Nouvelle, Montpellier, 18 Mars 2004.

Cahu, C., Zambonino, J., Villeneuve, L. & Gisbert, E. (2004). Nutrition, digestion and development in fish larvae. Australasian Aquaculture, Sydney, Australie, 26-29 Septembre 2004. Book abstract, p 85.

Villeneuve, L., Cahu, C., Zambonino, J. & Gisbert, E. (2004). Nutrition, digestion and development in fish larvae. The Second Hatchery Feeds and Technology Workshop, Sydney, Australie, 30 Septembre-1 Octobre 2004, p 43-45.

Posters

Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P. & Cahu, C. (2003). Marine vs. vegetal phospholipids in formulated diets for first feeding sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae: effects on the histological organization of the digestive system and swim bladder. World Aquaculture Society Symposium, Salvador, Brésil, 20-23 mai. Book of abstract, 312.

Villeneuve, L., Cahu, C., Zambonino, J. & Le Gall, M.M. (2003). Effect of vitamin A levels on malformations during sea bass larvae development. World Aquaculture Society Symposium, Salvador, Brésil, 20-23 mai. Book of abstract, 822.

LISTE DES ABREVIATIONS

aa : acide aminé

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

AGPI : Acides Gras Poly Insaturés

AGLPI : Acides Gras Longs Poly Insaturés

ANOVA : analyse des variances

AR : Acide Rétinoïque

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ARNt : Acide Ribonucléique de Transfert

BAPNA (ou BAPA) : N α -Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide

BB : Bordures en Brosse

BET : Bromure d'Ethidium

β -Gal : β -galactosidase

BHT : 2,6-Di-tert-butyl-4-méthylphénol

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BSA : Bovin Serum Albumin

CCK : cholecystokinine

Chaps : 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate

CIA : Chloroform Isoamyl Alcohol

CPSP : Concentré Protéique Soluble de Poissons

CRSR-«GREEN» : Chaotropic RNA Stabilizing Reagent

CT : Cycle Treshold

DHA : docohexaenoic acid

DIPS : DEPC-Treated/Isopropanol Precipitation Solution

DM : dry matter

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde

DO : Densité Optique

Dph : days post hatch

DTT : Dithiothreitol

E : Efficacité

E. Coli : Escherichia Coli
EDTA : Ethylène Diamine Tetra Acétate
EPA : eicosapentaenoic acid
ET : écart type
GAPDH : Glycéraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HUFA : Highly Unsaturated Fatty Acid
IGF : Insulin-like Growth Factor
IPTG : Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside
J : jour
LB : Luria Broth
LMP : Low Melting Point
Lys : lysine
MCS : Multi Cloning Site
MS : Matière Sèche
NRC : National Research Council
PAF : paraformaldéhyde
PAR : Phenol Acid Reagent
pb : paires de bases
PBS : Phosphate Buffer Salt
PBST : Phosphate Buffer Salt/Tween 20
PC : phosphatidylcholine
PCR : Polymerase Chain Reaction
PL : phospholipides
PNPP : p-nitrophényl phosphate
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
PPRE : PPAR Response Element
Prot. : protéines
PUFA : Polyunsaturated Fatty Acid
RAR : Retinoic Acid Receptor
RARE : Retinoic Acid Response Element
RIP : Retinoid-Inducible Protein
Rpm : rotations par minutes
RT-PCR : Real-Time Polymerase Chain Reaction

RXR : Retinoid X Receptor

RXRE : RXR Response Element

SEWS : Salt/Ethanol Wash Solution, Rnase-free

Shh : Sonic hedgehog

TGF : Transforming Growth Factor

TM : température de fusion

TN : Tris/NaCl

TNT : Tris/NaCl/Tween 20

UTP : Uridine Triphosphate

Val : valine

vs : versus

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

AVANT PROPOS	1
CHAPITRE I	7
INTRODUCTION.....	7
1 L'aquaculture de poissons.....	9
2. Les écloséries.....	11
3. Morphogenèse.....	13
3.1 Description des principales étapes.....	13
3.2 Gènes contrôlant la morphogenèse.....	15
4. Organogenèse du système digestif.....	19
4.1 Estomac.....	19
4.2 Pancréas.....	21
4.3 Intestin.....	23
4.5 Contrôle hormonal de la digestion.....	25
5. Nutrition des larves.....	27
5.1 Les lipides.....	27
5.2 Les protéines et les acides aminés.....	31
5.3 Les glucides.....	31
5.4 Les minéraux.....	33
5.5 Les vitamines.....	33
6. La vitamine A.....	35
6.1 Sources et synthèse.....	35
6.2 Fonctions.....	35
7. Les récepteurs de la vitamine A.....	37
7.1 Sous-familles et structure.....	39
7.2 Régulation des gènes par la vitamine A.....	41
8. Régulation des gènes par les acides gras.....	43
9. Interaction acide rétinoïque-acides gras.....	45
10. Objectifs de l'étude.....	45
CHAPITRE II.....	49
MATERIEL ET METHODES.....	49
1-Méthodologie générale.....	51
1.1 Animaux.....	51
1.2 Installations expérimentales.....	53
1.3 Aliments.....	55
2. Prélèvements et préparation des échantillons biologiques.....	57
2.1 Données zootechniques.....	57
2.2 Dosages enzymatiques.....	57
2.3 Dosage du rétinol et du rétinol palmitate.....	59
2.4 Dosages moléculaires.....	61
3. Analyses biochimiques.....	61
3.1 Dosages enzymatiques.....	61
3.2 Dosage du rétinol et du rétinol palmitate.....	65
3.3 Dosage des lipides.....	67
4 Détermination de la séquence des amorces utilisées lors des PCR.....	67
4.1.Criblage des banques de données.....	67
4.2. Détermination des amorces.....	67
5 PCR et sous-clonage des fragments géniques.....	69
5.1. Extraction des ARN.....	69
5.2. Transcription réverse des ARNm en ADNc.....	69
5.3. Amplification de l'ADNc.....	71
5.4. Sous-clonage des fragments géniques.....	71
6 PCR en temps réel (Fig 2 et 3).....	77
7. Hybridations.....	79
7.1 Hybridation <i>in situ</i> sur coupes.....	81
7.2 Hybridation <i>in situ</i> in toto.....	83
8. Histologie.....	85
9. Analyses statistiques.....	87
CHAPITRE III.....	89

Effet de différents taux alimentaires de rétinol <i>tout-trans</i> sur l'expression des récepteurs RARα, RARγ et RXRα et le développement des larves de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>)...	89
1. Introduction.....	91
2. Matériel et méthodes.....	93
3. Résultats.....	95
3.1 Croissance et survie.....	95
3.2 Malformations.....	95
Rétinol palmitate	96
P	96
3.3 Dosage du rétinol dans les aliments et dans les larves.....	97
3.4 Activités enzymatiques.....	97
3.5 Effet du développement sur l'expression des gènes.....	99
3.6 Effet des aliments expérimentaux sur l'expression des gènes.....	99
4. Discussion.....	99
CHAPITRE IV	111
Lieux et niveaux d'expression de trois récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque au cours du développement des larves de bar.....	111
1. Introduction.....	113
2. Matériel et méthodes.....	115
3. Résultats.....	115
3.1 Séquences nucléotidiques et protéiques de RAR α , RAR γ et RXR α	115
3.2 Hybridations <i>in situ</i> (Fig. 4).....	117
3.3 Expression de RAR α , RAR γ et RXR α au cours du développement des larves de bar (Fig. 5).....	117
4. Discussion.....	119
CHAPITRE V.....	145
Effet de la nature et de la concentration des lipides alimentaires sur le développement des larves de bar et implication des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque.....	145
1. Introduction.....	147
2. Matériel et méthodes.....	149
3. Résultats.....	151
3.1 Croissance et survie (Fig. 1).....	151
3.2 Microscopie optique.....	151
3.3 Malformations.....	153
3.4 Activités enzymatiques.....	153
3.5 Effet du développement sur l'expression des gènes (Fig. 9).....	155
3.6 Effet des aliments sur l'expression des gènes (Fig. 10).....	155
4. Discussion.....	157
CHAPITRE VI	171
Influence de la période de distribution d'un aliment contenant un excès de vitamine A ou un excès	171
d'AGPI sur le développement des larves de bar.	171
1. Introduction.....	173
2. Matériel et méthodes.....	177
3. Résultats.....	179
3.1 Croissance.....	179
3.2 Malformations squelettiques (Fig. 3).....	179
3.3 Activités et sécrétions enzymatiques.....	181
3.4 Profil d'expression des gènes.....	183
4. Discussion.....	185
CHAPITRE VII.....	197
DISCUSSION	197
1. Expression de gènes impliqués dans la voie des rétinoïdes au cours du développement des larves de bar.....	199
2. Influence des nutriments sur le développement des larves de bar.....	201
2.1 Effet de la vitamine A.....	201
2.2 Effets de l'EPA et du DHA.....	205
3. Influence de la composition de l'aliment sur le développement des larves en fonction de la fenêtre temporelle de distribution.....	207

4. Perspectives.....	211
4.1 Considérations techniques.....	211
4.2 Elargissement de cette approche à d'autres nutriments.	213
4.3 Intérêt du modèle animal utilisé.....	215
BIBLIOGRAPHIE	217

AVANT PROPOS

En aquaculture, l'élevage larvaire de poissons marins a longtemps été tributaire de proies vivantes dont le coût et la qualité étaient variables et dont l'utilisation nécessitait des structures adéquates ainsi que la présence d'un personnel qualifié. Les proies vivantes représentaient une part financière importante de ces élevages et ne garantissaient pas toujours une croissance harmonieuse des larves. Afin de s'affranchir de ces problèmes, les pisciculteurs ont donc essayé de substituer les proies par des aliments inertes composés dès la fin des années 70.

Cette étape ne put être franchie que vers la fin des années 90, lorsque les aliments ont été conçus en prenant en compte les spécificités et la maturation des fonctions digestives des larves, se basant sur les recherches menées par l'équipe de Brest du laboratoire mixte INRA-IFREMER de nutrition des poissons. L'aliment mis au point couvre les besoins des larves de bar et limite le nombre de poissons malformés. Néanmoins le taux de malformations du squelette reste significatif et fortement variable, soulignant la méconnaissance de l'impact des nutriments sur ces processus de morphogenèse et des mécanismes moléculaires sous-jacents à l'apparition des déformations osseuses.

Depuis quelques années, le développement de techniques de biologie moléculaire permet d'étudier plus finement ces mécanismes et les relations nutriments/malformations grâce au suivi de l'expression de gènes ayant un rôle primordial dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur des vertébrés..

Les travaux exposés ici et menés au sein de l'équipe de Brest, s'inscrivent dans un programme plus vaste visant à mettre au point un modèle expérimental d'étude de l'apparition des malformations squelettiques en relation avec l'alimentation, modèle qui pourrait s'adapter à l'étude de n'importe quel nutriment.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux nutriments :

- 1) la vitamine A, ayant un effet tératogène connu et décrit chez de nombreuses espèces de vertébrés et invertébrés
- 2) les phospholipides, dont l'influence sur la morphogenèse des larves de poisson marins a été récemment décrite.

En faisant varier leur taux dans l'aliment, nous avons suivi:

- d'une part, la maturation des fonctions digestives grâce à la mesure des activités enzymatiques des larves et,
- d'autre part, l'expression de certains gènes impliqués dans la morphogenèse du bar.

Nous avons également souhaité relier les variations d'expression génique aux types de malformations observées et déterminer la fenêtre de temps pendant laquelle les nutriments ont un impact sur le développement des larves de bar.

CHAPITRE I
INTRODUCTION

1 L'aquaculture de poissons.

Face à une augmentation de la consommation de poisson et à l'appauvrissement des ressources aquacoles, la production de poissons d'élevage à fort impact économique s'est accrue de manière importante. En effet, en 2001 l'aquaculture représentait 34 % de la production de la pêche totale alors qu'en 1970 elle n'en représentait que 5.3 % (Sweetman, 2004). L'aquaculture européenne couvre actuellement en volume 4.4 % de la production mondiale (142,1 millions de tonnes), ce qui correspond à 8.2 % de la valeur totale (61.5 milliards de dollars). De plus, sur les 210 espèces produites par l'aquaculture, 60 le sont en Europe. Les espèces marines les plus représentées sont les salmonidés, la daurade, le bar, le mullet et le turbot. L'élevage du saumon est le plus important et il représente 57 % de la production européenne totale qui est de 1,4 millions de tonnes (Sweetman, 2004). Il est important de noter qu'entre 2000 et 2004 la production de juvéniles de bar et de daurade a augmenté d'environ 30 % pour atteindre 650 millions de juvéniles et que la France produit la majeure partie de ces alevins en Europe.

Notre laboratoire a donc choisi de travailler sur le bar (*Dicentrarchus labrax*), d'une part, parce qu'il est économiquement intéressant et, d'autre part, parce que sa zootechnie est parfaitement maîtrisée et que son élevage est plus facile que celui d'espèces telles que la daurade ou le turbot. Pour le bar, le taux de survie en élevage est supérieur à 60 % alors que celui du turbot avoisine les 30 %. Par ailleurs, c'est une espèce des mers tempérées, présente en Méditerranée et dans le Golfe de Gascogne. Le bar peut également être trouvé dans les îles Britanniques. Les premiers géniteurs ont été prélevés en milieu naturel puis mis dans des fermes aquacoles afin de les faire pondre. Les géniteurs actuels sont issus de programmes de sélection génétique menés sur des animaux élevés et les pontes sont décalées par photopériode. Cela présente l'avantage de ne pas épuiser les ressources naturelles et de faire bénéficier les éleveurs de larves tout au long de l'année. En milieu naturel, la reproduction des bars est saisonnière, seule une ponte annuelle a lieu par individu et celle-ci est étalée sur quelques heures (Barnabé et Paris, 1984). La période de ponte s'échelonne sur deux mois selon une hiérarchie précise: les femelles les plus âgées pondent avant les plus jeunes. Selon les régions, cette période s'étale de mars à décembre car elle dépend des conditions du milieu: photopériode, salinité et température de l'eau.

2. Les écloséries.

L'étape de cycle de vie correspondant au développement larvaire reste la phase la plus délicate lors des élevages. Les techniques d'élevage et de nourrissage se sont optimisées, les proies vivantes (ou zooplancton ; *Brachionus plicatilis* et *Artemia salina*) sont progressivement remplacées par les aliments inertes, ce qui permet aux éleveurs de s'affranchir, d'une part, du coût élevé et fluctuant de ces proies vivantes et, d'autre part, de la qualité de ces proies. En effet, les *Artemias* sont une source importante de protéines (60 %) mais leur qualité nutritionnelle peut être très variable et il est nécessaire d'enrichir les proies afin de couvrir les besoins nutritionnels des larves, particulièrement en acides gras poly insaturés. De plus, les nauplii d'*Artemia*, qui constituent la plus grande partie de l'alimentation des larves proviennent d'une production sauvage et les stocks mondiaux (eaux du Groenland, d'Australie, d'Inde, d'Asie Centrale ; marais salants en Europe méridionale) sont très limités. La substitution des proies vivantes par des aliments composés répond donc à une nécessité économique et écologique.

Une bonne croissance et une bonne survie sont actuellement obtenues grâce à l'utilisation d'aliments inertes sur plusieurs espèces marines (bar, turbot). Néanmoins, **un des problèmes majeurs de l'aquaculture reste un pourcentage élevé de poissons malformés**, ce qui diminue le nombre de poissons commercialisables tout en donnant une image négative de l'aquaculture aux consommateurs. Plusieurs paramètres induisant des malformations squelettiques ont été identifiés dans les techniques d'élevage : mauvaise hydrodynamique des bassins (courant trop fort), température trop élevée, intensité lumineuse inadaptée ainsi qu'une alimentation inadaptée aux besoins nutritionnels des larves (Cahu et al., 2003a). Par exemple, les mélanges vitaminiques ajoutés dans les microparticules alimentaires contiennent souvent un excès de vitamines.

Or, certaines de ces vitamines, telle que la **vitamine A**, ont des effets néfastes sur le développement des larves lorsque leurs doses sont inadaptées aux besoins réels des poissons (Suzuki et al., 1998 ; Haga et al., 2002). D'autres facteurs nutritionnels, tels que les protéines (Zambonino et al., 1997) ou les **lipides** (Cahu et al., 2003b ; Sargent et al., 1999), peuvent aussi moduler fortement la croissance des larves. Sur le plan expérimental, les aliments composés offrent la possibilité de faire varier la composition des nutriments et donc de déterminer les besoins nutritionnels réels du poisson, ce qui représente un avantage par rapport aux proies vivantes.

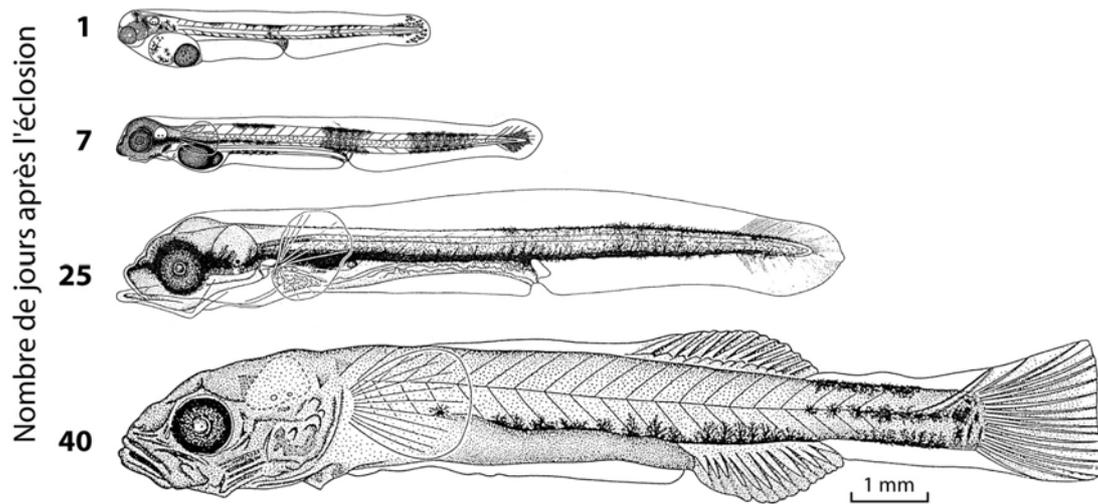


Figure 1. Larves de bar, *Dicentrarchus labrax*, âgées de 1, 7, 25 et 40 jours. Echelle : 1 mm.

Les malformations squelettiques induites affectent aussi bien la région céphalique que la région vertébrale et ont été décrites précédemment chez la daurade, *Sparus aurata* L. 1758 (Boglione et al., 2001). Elles comprennent des cas de lordose, cyphose, fusion ou malformation vertébrale, malformations (fusion, absence/ajout, déformation) des rayons des nageoires, anomalies au niveau de la vessie natatoire, dents et/ou mâchoires malformées, opercule anormal etc...

3. Morphogénèse.

3.1 Description des principales étapes.

Le développement embryonnaire et larvaire du bar a été décrit dès 1976 par Barnabé et al.

Les œufs de bar fécondés et viables commencent leur division cellulaire 1,5 h après fécondation.

Ces processus du développement embryonnaire se poursuivent et au bout de 40 h, l'ébauche de l'axe embryonnaire devient visible. L'œuf commence à se pigmenter après 69 h et la métamérisation de l'embryon s'amorce vers 80 h, petit à petit l'embryon s'individualise de l'œuf et s'allonge.

97 h après fécondation, les somites sont visibles, la nageoire primordiale s'ébauche et elle est formée à 104 h.

A 110 h, une enzyme sécrétée au niveau de glandes de la tête de l'embryon digère le chorion de l'œuf, l'éclosion a lieu et le développement larvaire débute (J0).

A J3, les larves de bar s'allongent et les réserves vitellines diminuent.

A J5, la pigmentation des yeux commence à apparaître, la bouche s'ouvre, les nageoires pectorales commencent à se former (Fig. 1).

Vers J15, le foie apparaît, les réserves vitellines disparaissent et la larve pigmentée s'alimente uniquement de façon exogène.

Les rayons de la nageoire caudale s'ébauchent puis au stade J20, les vertèbres sont visibles, la pigmentation continue à s'étendre. Les larves âgées de 28 jours présentent des rayons de la nageoire caudale dans la nageoire primordiale (Fig. 1).

A J32, l'ébauche de la nageoire caudale apparaît, la nageoire primordiale s'estompe. Trois jours après, les larves présentent trois ébauches de nageoires impaires : la caudale, l'anale et la dorsale.

Vers le quarantième jour, la queue, jusqu'alors hétérocerque, devient homocerque. Deux ou trois jours plus tard, les nageoires pelviennes apparaissent, la larve présente alors les caractéristiques morphologiques des adultes. Les écailles ne seront visibles qu'à partir de 75 à 80 jours.

3.2 Gènes contrôlant la morphogenèse.

Au cours de la morphogenèse, la mise en place des structures cartilagineuses et osseuses est sous le contrôle de nombreux gènes chez les vertébrés supérieurs comme chez les poissons. On compte parmi eux :

- des facteurs de croissance, tels que **IGF-I** et **BMP-4**,
- ainsi que les **gènes Hox** qui ont un rôle essentiel dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur.

3.2.1. IGF-I et BMP-4.

Les **BMP** appartiennent à la superfamille des TGF- β (Transforming growth factor), il en a été identifié une quinzaine chez les mammifères. Ils interviennent dans plusieurs processus dont l'**organogénèse**, la **synthèse osseuse**, la **régénération osseuse** lors de fractures (Solheim, 1998) et l'**apoptose** (Glozak & Rogers, 1998).

Il a en effet été démontré que plusieurs BMP, dont BMP-4, pouvaient orienter des cellules pluripotentes vers une différenciation en cellules cartilagineuses (chondroblastes) ou en cellules osseuses (ostéoblastes). BMP-4 est impliqué dans le développement des vertèbres (Watanabe & Le Douarin, 1996 ; Monsoro-Burq et al., 1996), des dents (Zhang et al., 2000 ; Li et al., 1998), de l'œil (Sasagawa et al., 2002).

En présence d'**acide rétinoïque**, certains BMP (dont BMP-2) peuvent induire la différenciation de préadipocytes en ostéoblastes. L'interaction de l'acide rétinoïque avec BMP-4, qu'elle soit agoniste ou antagoniste, a aussi été montrée dans la mise en place de l'oreille interne (Thompson et al., 2003) et dans le mécanisme d'apoptose cellulaire (Glozak & Rogers, 1998). Il apparaît également que la synthèse de BMP-2 et BMP-4 peut être sous le contrôle d'autres facteurs de croissance, tels que l'hormone de croissance (growth hormone) et IGF-I, lors de la formation des os et des dents *in vitro* (Li et al., 1998).

IGF-I augmente la **synthèse de collagène** dans les os et stimule la **prolifération des ostéoblastes** humains *in vitro* (Solheim, 1998). L'action d'IGF-I fait intervenir des protéines de liaison à IGF-I qui sont synthétisées par les ostéoblastes (Solheim, 1998).

La synthèse d'IGF-I peut être influencée par l'acide rétinoïque dans les ostéoblastes (Gabbitas & Canalis, 1997), cela se traduit essentiellement par une chute de l'expression d'IGF-I et de la synthèse de collagène.

3.2.2. Les gènes Hox.

Chez les vertébrés, les gènes Hox sont organisés en 4 groupes (a, b, c et d). Ils sont tous orientés de 5' vers 3' sur les chromosomes, ce qui correspond à leur sens de transcription (Krumlauf, 1994). Les gènes Hox situés en 5' s'expriment dans la partie postérieure du corps de façon tardive alors que ceux situés en 3' s'expriment dans la partie antérieure de façon précoce. Ce phénomène est appelé **colinéarité spatio-temporelle** (Krumlauf, 1994).

De plus, les gènes situés en 5' des clusters sont peu sensibles à l'acide rétinoïque, contrairement à ceux localisés en 3'. Les zones d'expression des gènes Hox déterminent chaque segment corporel et il existe une **dominance postérieure** : les gènes postérieurs inhibent l'expression des gènes antérieurs. La limite d'expression de chaque gène est donc déterminée par le gène qui le suit dans le groupe.

Les protéines codées par les gènes Hox possèdent un homéodomaine pouvant lier l'ADN, ce sont par conséquent des **facteurs de transcription**. Les gènes cibles de ces facteurs sont des gènes impliqués dans la **morphogenèse** et la **croissance cellulaire**.

Lors de la **mutation d'un gène Hox**, il apparaît des malformations appelées **transformations homéotiques** : lors d'une perte de fonction du gène, il y a antériorisation du segment corporel concerné alors que lors d'un gain de fonction, il y a postériorisation (Hunt & Krumlauf, 1992). Par exemple, lors d'une perte de fonction de Hoxa2, le second arc se transforme en premier arc branchial. Hoxa2 agit essentiellement pendant la période de différenciation des structures cartilagineuses des arcs branchiaux (Grammatopoulos et al., 2000).

La plupart des études portent sur des vertébrés supérieurs et ce n'est que récemment que des données sur la régulation de l'expression de ces gènes chez les poissons et les conséquences sur la morphogenèse sont apparues dans la littérature. Une équipe japonaise a mis en évidence chez le carrelet, *Paralichthys olivaceus*, que, lors d'un traitement à l'acide rétinoïque pendant les stades précoces de développement, Hoxd-4 était réprimé ce qui entraînait des malformations au niveau de la mâchoire des poissons (Suzuki et al., 1999) où ce gène est normalement exprimé.

Ces exemples soulignent l'importance du lieu et du moment d'expression des gènes Hox au cours du développement.

4. Organogenèse du système digestif.

Lors de l'éclosion des larves de bar, leur tractus digestif, rectiligne, reste indifférencié pendant trois ou quatre jours, période pendant laquelle la bouche n'est pas encore ouverte. La bouche s'ouvre vers le cinquième jour de développement, les larves commencent à s'alimenter vers le jour 7 où leur alimentation devient mixte (endogène et exogène).

Vers le jour 15, les larves ont épuisé leurs réserves vitellines, leur alimentation devient exclusivement exogène et leur tube digestif acquiert ses caractéristiques définitives. La morphogenèse s'achève vers le jour 30 où les larves ont acquis leurs caractères de juvéniles.

La digestion de nutriments se fait dans le tractus gastro-intestinal et fait intervenir des enzymes différentes produites par l'estomac, le pancréas exocrine et l'intestin. Les enzymes de ces trois structures ont des rôles complémentaires, elles permettent une digestion complète des nutriments qui seront ensuite absorbés ou transportés par les entérocytes. Au cours du temps, il existe une évolution des capacités digestives des larves qui acquièrent progressivement leurs facultés de digestion d'adulte. Une larve et un adulte n'assimilent pas un aliment de la même façon étant donné que ce ne sont pas les mêmes activités enzymatiques qui entrent en jeu.

Les **nutriments** peuvent influencer la mise en place de ces fonctions digestives, phénomène très étudié chez les mammifères (Henning, 1987). Par exemple, des aliments inadaptés peuvent freiner, voire stopper, les mécanismes de maturation des enzymes digestives. L'alimentation influence le niveau des activités enzymatiques de l'intestin et du pancréas mais n'affecte pas le moment de leur mise en place ou de leur chute d'activité qui sont déterminées génétiquement.

4.1 Estomac.

Les différents segments du tube digestif se différencient après l'ouverture de la bouche (Zambonino Infante & Cahu, 2001). Vers le jour 7 après éclosion, l'estomac se différencie de l'œsophage, en particulier par son épithélium non stratifié. Les cellules épithéliales s'allongent et les différenciations apicales deviennent visibles vers le trentième jour.

Vers le jour 15, le développement de l'estomac est quasiment complet et la différenciation des glandes gastriques a lieu vers le jour 25, moment où les premières activités pepsine ont été révélées (Zambonino Infante & Cahu, 2001). Chez la sole (*Solea senegalensis*), le développement de l'estomac a lieu vers J10 (Bouhlic & Gabaudan, 1992) et les glandes gastriques apparaissent vers le jour 22 mais les premières activités pepsine

apparaissent beaucoup plus tardivement (Clark et al., 1986). Pour l'ombrine (*Sciaenops ocellatus*), l'estomac est différencié au jour 7. Ces mécanismes de différenciation sont plus avancés ou retardés selon que le poisson vit dans une eau plus chaude ou plus froide que le bar.

L'estomac intervient dans la digestion des protéines principalement par une protéase fonctionnant à pH acide, la pepsine. Celle-ci est synthétisée à partir du pepsinogène, son précurseur.

Avant le jour 25, la digestion des protéines est assurée par les enzymes pancréatiques et intestinales (Cahu & Zambonino Infante, 2001).

4.2 Pancréas.

Le pancréas de tous les vertébrés comporte une partie endocrine synthétisant des hormones et une partie exocrine spécialisée dans la production des enzymes digestives.

Chez les larves de bar, la différenciation du pancréas exocrine et l'apparition de canaux excrétoires ont lieu vers le troisième jour après éclosion. Lors de l'ouverture de la bouche au jour 5, la sécrétion de zymogènes (précurseurs des enzymes) est détectable, cela correspond à la mise en place des activités enzymatiques pancréatiques (Zambonino Infante & Cahu, 2001). Chez la sole, des granules de zymogènes sont visibles lors de l'ouverture de la bouche qui a lieu à J2 (Bouhlic et Gabaudan, 1992).

Le pancréas exocrine synthétise et sécrète des enzymes dans la lumière intestinale, protéines impliquées dans la digestion des glucides, lipides et protéines. Bien que la synthèse des enzymes pancréatiques soit opérationnelle dès l'éclosion de la larve, le processus de sécrétion se met progressivement en place pour être pleinement fonctionnel vers le jour 25. Les protéases pancréatiques fonctionnent à pH alcalin et leurs précurseurs sont activés par la trypsine qui est détectable dès le jour 3 après éclosion chez les larves de bar (Zambonino Infante & Cahu, 2001). L'amylase pancréatique est décelée dès l'ouverture de la bouche des larves de bar. Chez la sole, les activités de l'amylase et de la trypsine sont fortes dès le jour 2 (Ribeiro et al., 1999).

Au cours des trois premières semaines de développement, les activités de la trypsine et de l'amylase augmentent puis, à partir de cette date, une chute de leurs activités apparaît (Cahu & Zambonino Infante, 2001). Cela est également vrai chez l'ombrine, alors que cette chute a lieu vers le jour 10 pour la sole (Martinez et al., 1999 ; Ribeiro et al., 1999) et vers le jour 20 pour le carrelet, *Pleuronectes americanus* (Douglas et al., 2000). Cette baisse

d'activité traduit une augmentation des protéines tissulaires provenant de changements anatomiques et physiologiques des larves. Chez le bar, la chute de l'activité de l'amylase est indépendante de la concentration de glucides alimentaires, ce qui suppose qu'elle est génétiquement programmée (Péres et al., 1996). Les activités enzymatiques pancréatiques restent ensuite constantes jusqu'à la fin de la période de développement larvaire qui s'étend sur un mois environ (Zambonino Infante & Cahu, 2001).

La **composition des aliments** peut jouer sur les activités enzymatiques pancréatiques. Si l'aliment contient un fort taux d'amidon, l'activité de l'amylase augmente, ce qui indique une adaptation de l'enzyme à son substrat. Cette régulation de l'activité semble se faire au niveau post-transcriptionnel (Péres et al., 1998) étant donné que la quantité des ARNm de l'amylase est constante quel que soit le taux d'incorporation d'amidon dans l'aliment. De la même façon, la trypsine réagit à la concentration de protéines alimentaires mais, à des stades de développement plus tardifs que dans le cas de l'amylase (jour 35 vs jour 18 ou 28) (Cahu & Zambonino Infante, 2001).

4.3 Intestin.

Dès le troisième jour après éclosion, l'épithélium intestinal des larves de bar présente une surface régulière et les entérocytes initient leur différenciation apicale lors de la mise en place de la bordure en brosse (Vu, 1976). Lors de l'éclosion, les deux tiers antérieurs de l'intestin des larves de sole sont réguliers alors que dans le tiers postérieur les entérocytes présentent déjà une différenciation apicale (Bouhlic & Gabaudan, 1992).

Vers le jour 7, l'épithélium devient plus fin et commence à former des villosités. Au jour 14, cet épithélium intestinal des larves de bar présente, au niveau du lumen, de nombreuses villosités formant la bordure en brosse (Walford & Lam, 1993). Les villosités apparaissent à J3 chez la sole (Ribeiro et al., 1999).

A partir du jour 25, les repliements de la muqueuse intestinale augmentent, ceci est accompagné d'une augmentation des activités enzymatiques de la bordure en brosse des entérocytes (Cahu & Zambonino Infante, 1994).

Il a été mis en évidence chez les larves de poisson, en général, que la partie antérieure de l'intestin était plutôt spécialisée dans l'absorption des lipides (Diaz et al., 1997) alors que la partie postérieure absorberait préférentiellement les protéines et les ions (Deplano et al., 1991).

Les aliments sont d'abord digérés par les enzymes pancréatiques puis, ce sont les enzymes intestinales qui entrent en jeu. Ces enzymes sont soit localisées dans le cytosol des entérocytes soit dans les membranes des bordures en brosse des entérocytes différenciés (Cahu & Zambonino Infante, 2001). Au cours des trois premières semaines de leur vie, les larves digèrent essentiellement les protéines grâce à des protéases cytosoliques, puis, ces activités enzymatiques chutent de façon concomitante à une augmentation de l'activité des bordures en brosse des entérocytes différenciés, reflétant le mode de digestion adulte des entérocytes. La phosphatase alcaline se trouve à 90% dans la bordure en brosse et est considérée comme un marqueur du développement de cette bordure en brosse. La leucine-alanine peptidase est essentiellement cytosolique.

Ces **processus de maturation intestinale** peuvent être perturbés par l'ingestion d'un aliment inadapté aux besoins des larves, cela peut retarder ou annuler la séquence de maturation **programmée génétiquement** et conduire à la mort des larves (Cahu & Zambonino Infante, 2001). Inversement, il a, par exemple, été démontré que l'incorporation de di ou tripeptides dans les aliments (Zambonino Infante et al., 1997) pouvait favoriser le développement des larves de bar et la maturation des entérocytes a alors lieu précocement.

4.5 Contrôle hormonal de la digestion.

De façon générale, beaucoup de facteurs influencent la mise en place des fonctions digestives dont la composition de l'aliment, la vue et le goût.

Ces sens provoquent une sécrétion pancréatique chez les mammifères (Solomon, 1987) via un relais nerveux. Les stimulations mécaniques (mastication, distension de l'estomac, transit intestinal...) agissent sur la régulation des sécrétions digestives. Par exemple, la distension de l'estomac stimule nerveusement la sécrétion pancréatique. Les modifications vasculaires suivant un repas ou un jeûne modifient les afflux sanguins au niveau du tractus digestif et jouent sur les phénomènes de sécrétion.

La régulation peut aussi emprunter la voie des hormones synthétisées par les cellules endocrines du pancréas ou de la muqueuse gastro-intestinale. Toutes les hormones et neurohormones du système gastro-entéro-pancréatiques sont regroupées sous le nom de peptides régulateurs digestifs.

Les nutriments alimentaires provoquent la libération de cholecystokinine (CCK), sécrétine et insuline. La CCK, sécrétée par le duodénum et le jéjunum, agit dans l'adaptation

des protéases au régime protéique (Wicker et al., 1985) alors que la sécrétine, hormone de l'intestin grêle, agit sur l'adaptation pancréatique aux lipides alimentaires (Rausch et al., 1985). L'insuline, hormone des îlots de Langerhans du pancréas endocrine, permet l'adaptation de la synthèse pancréatique aux glucides alimentaires (Korc et al., 1981).

Ces mécanismes sont bien connus chez les juvéniles mais moins chez les larves. Depuis quelques années, les travaux de l'équipe de Ronnestad se sont focalisés sur la mise en place de la régulation hormonale de la digestion larvaire.

5. Nutrition des larves.

Au cours de leur développement, les larves de bar subissent des changements dans leur tractus digestif et cela indique que les besoins nutritionnels sont différents pour une larve et un juvénile.

Un aliment composé permettant une croissance harmonieuse chez les juvéniles n'est pas adapté pour les larves. Les aliments pour larves doivent donc être adaptés à leur stade de développement. Précédemment, des travaux ont montré l'importance des **lipides** (Sargent et al., 1999) et de la **vitamine A** (Haga et al., 2002) dans la nutrition et le développement larvaire. Nous nous intéresserons surtout à ces deux nutriments au cours de ce travail.

5.1 Les lipides.

Beaucoup d'études se sont focalisées sur les besoins en lipides des poissons marins (Sargent et al., 1999). **Les lipides** (triglycérides et phospholipides) **apportent les acides gras essentiels et sont la source la plus importante d'énergie chez les larves de poissons marins.**

Les aliments composés contiennent, la plupart du temps, plusieurs sources de lipides :

- des huiles marines (huile de foie de morue, lécithine marine)
- des huiles végétales (huile et lécithine de soja).

L'huile de foie de morue apporte des triglycérides alors que la lécithine de soja apporte essentiellement des phospholipides (Cahu & Zambonino Infante, 2001). La farine de poisson est essentiellement une source de protéines mais elle apporte tout de même des lipides.

Les huiles végétales sont utilisées lors de la substitution partielle des huiles d'origine marine, qui sont disponibles en quantité limitée (provenant de la pêche minière). Dans les aliments utilisés pour le grossissement, les huiles sont fréquemment utilisées pour apporter

une grande quantité d'énergie et limiter ainsi l'incorporation de protéines dans l'aliment. Cela permet une accélération de la croissance tout en limitant le rejet de déchets azotés et phosphorés (provenant du métabolisme des protéines) dans l'environnement.

Dans les aliments pour larves, la lécithine de soja a d'abord été ajoutée pour son rôle émulsifiant permettant une bonne incorporation des phospholipides et une bonne tenue des aliments. Son rôle positif sur la survie des larves avait été également mis en avant (Kanazawa, 1993). Par la suite, le rôle des phospholipides sur la croissance et la survie des larves a été très étudié (Koven et al., 1993 ; Sargent et al., 1997, 1999 ; Cahu et al., 2003b). La meilleure croissance a été obtenue chez les larves de bar avec un aliment contenant 25 % de lipides dont 11 % de phospholipides (Cahu et al., 2003b).

Les **phospholipides** sont nécessaires pour les jeunes stades larvaires car, d'une part, les larves sont incapables d'en synthétiser de novo en quantité suffisante pour couvrir leurs besoins et, d'autre part, ces phospholipides sont mieux assimilés que les lipides neutres et représentent une meilleure source d'acides gras long polyinsaturés (AGLPI ; Cahu & Zambonino Infante, 2001). De plus, les phospholipides sont les constituants majeurs des membranes cellulaires.

Les **acides gras essentiels** pour les poissons marins sont les AGLPI n-3 car les voies métaboliques permettant la synthèse de ces acides gras sont absentes ou trop peu exprimées.

Cette famille d'acides gras comprend l'EPA (eicosapentaenoic, C20:5n-3) et le DHA (docosahexaenoic acid, C22:6n-3) qui sont très largement représentés dans les membranes cellulaires des poissons. Le ratio DHA:EPA le plus adapté à une bonne croissance des larves de poissons marins est de 2:1 (Sargent et al., 1999) et cela si ces deux acides gras sont apportés par la fraction phospholipidique de l'aliment dans une proportion de 2,3 % par kg de matière sèche (Cahu et al., 2003b).

Les acides gras possèdent leurs propres **récepteurs nucléaires**, appelés PPAR (peroxysome proliferator-activated receptor). Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones et existent sous trois formes (α , β et γ).

Ces récepteurs agissent au niveau de l'**adipogenèse**, la **différenciation cellulaire**, l'**apoptose** via des gènes cibles ayant parfois sur leur région régulatrice un élément de réponse (PPRE, peroxysome proliferator response element).

Les PPAR forment des **hétérodimères** avec les **récepteurs RXR de la vitamine A**, se fixent sur ces éléments de réponse et contrôlent la transcription de ces gènes cibles. Ce

mécanisme d'action sera plus développé dans la partie concernant les récepteurs de la vitamine A.

5.2 Les protéines et les acides aminés.

La source principale des **protéines** dans les aliments composés est la farine de poisson.

Les larves et juvéniles nécessitent un plus fort taux de protéines que les adultes car ils ont une croissance rapide et utilisent les protéines comme source principale d'énergie. Péres et al. (1996) ont montré que les larves de bar présentaient la meilleure croissance quand elles recevaient un aliment contenant 50 % de protéines, l'assimilation des protéines se fait d'autant mieux si elles sont apportées partiellement sous forme de di ou tripeptides ou d'hydrolysats (environ 20% de l'apport protéique).

Comme chez la plupart des animaux, il existe 10 **acides aminés** indispensables chez les poissons: méthionine, histidine, arginine, leucine, isoleucine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine.

Ces acides aminés peuvent servir à la synthèse de protéines ou de composés azotés (acides nucléiques, peptides, hormones...). Toute déficience en acides aminés entraîne un arrêt de la croissance des poissons ainsi qu'une diminution de la masse corporelle (Mambrini, 1996).

5.3 Les glucides.

Les glucides sont mal assimilés par les poissons, ce qui indique que c'est une mauvaise source d'énergie pour eux.

Cette faible utilisation du glucose alimentaire pourrait être due, d'une part, à une faible capacité des poissons à stocker, au niveau du foie, le glucose en excès (via la synthèse de glycogène ou la lipogénèse) et d'autre part, par une production élevée de glucose hépatique même en présence de glucides alimentaires (Pansérat et al., 2001). Ceci pourrait découler d'une mauvaise régulation nutritionnelle de certaines enzymes hépatiques de la glycolyse ou de la néoglucogénèse par les glucides alimentaires, comme cela a été montré chez la truite arc-en-ciel (Pansérat et al., 2001).

Néanmoins, l'incorporation de glucides dans les microparticules alimentaires permet une meilleure cohésion des granulés. D'autre part, les larves de poisson montrent une très

forte activité de l'amylase (Buddington, 1985) par rapport aux juvéniles, suggérant que les glucides sont mieux assimilés chez les larves que chez les juvéniles.

5.4 Les minéraux.

Les minéraux entrent dans la composition de certains tissus, ils servent aussi de cofacteurs enzymatiques, participent à l'équilibre ionique des cellules et à la régulation des fonctions endocrines. Le NRC (1993) a défini les besoins des poissons pour certains macro minéraux et oligo-éléments. Les minéraux nécessaires sont:

- le calcium, le phosphore, le potassium, le magnésium, le sodium, le chlore et le soufre alors que les oligo-éléments englobent le fer, le zinc, le manganèse, le cobalt, le cuivre, l'iode, le sélénium, le fluor, le nickel, le vanadium, le silicium, l'étain, le chrome et l'aluminium.

5.5 Les vitamines.

Toute formulation alimentaire pour les poissons marins comprend un mélange vitaminique couvrant les besoins des animaux d'élevage. Ce complexe vitaminique contient:

- des vitamines liposolubles (vitamine A, rétinol ; D, calciférol ; E, tocophérol ; K, ménadione) et
- des vitamines hydrosolubles (vitamines B, B1, thiamine, B2, riboflavine ; C, acide ascorbique).

Ce sont des éléments indispensables car l'animal est incapable d'en synthétiser.

Les besoins vitaminiques ont été étudiés surtout chez les salmonidés et la truite (NRC, 1993). Par contre, il n'existe que très peu d'études sur les besoins vitaminiques spécifiques des jeunes stades (Gouillou-Coustans & Guillaume, 2001). Le mélange vitaminique est généralement incorporé en large excès dans les aliments destinés aux larves.

Certaines vitamines ont été très étudiées car elles peuvent avoir des effets tératogènes lorsqu'elles sont présentes à des doses inadéquates dans les aliments, c'est le cas de la **vitamine A** chez les mammifères (Russell, 2000 ; Ross et al., 2000 ; White et al., 2000), les amphibiens (Minucci et al., 1996), les oiseaux (Uni et al., 2000 ; Lee et al., 2001) et les poissons (Suzuki et al., 1999 ; Haga et al., 2002 ; Ørnsrud et al., 2002). **Cette vitamine est celle à laquelle nous nous intéresserons tout au long de cette étude.**

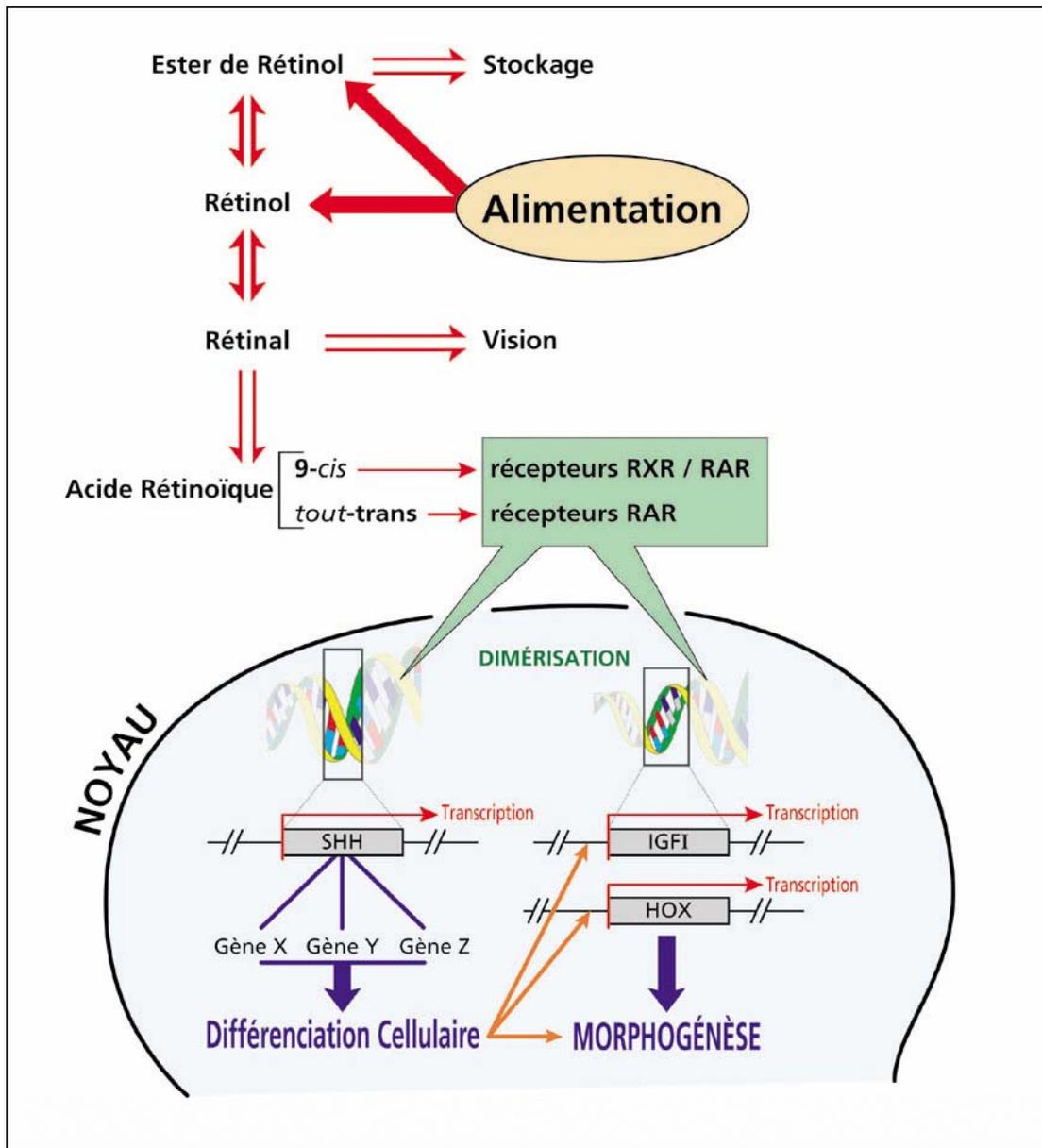


Figure 2. Oxydations successives du rétinol en acide rétinoïque et action de cet acide grâce à ses récepteurs nucléaires au niveau des noyaux cellulaires sur différents gènes.

6. La vitamine A.

6.1 Sources et synthèse.

La vitamine A (ou rétinol) est **l'unique vitamine** dont on trouve les précurseurs (provitamines) dans les plantes sous forme de β -carotènes et de lycopène, appartenant à la famille des caroténoïdes (Wolf, 1984). Les sources principales de caroténoïdes sont les légumes verts ou les légumes « orangés » tels que les carottes, les tomates, le melon etc...

Après ingestion, les caroténoïdes sont absorbés au niveau de l'intestin et stockés dans le tissu adipeux.

Les cellules de l'intestin transforment les β -carotènes en rétinol, qui est essentiel pour la vue, ou en rétinol (Wolf, 1984).

Le foie peut également produire du rétinol mais en quantités moindres. 70 à 90 % du rétinol total est stocké dans le foie sous forme d'esters de rétinol. Ces esters peuvent également être apportés par l'alimentation dans la viande ou le lait chez les mammifères (Wolf, 1984). Des oxydations successives du rétinol (rétinol \rightarrow rétinol \rightarrow acide rétinoïque) (Fig. 2) conduisent à la production d'acide rétinoïque, qui est un dérivé actif au niveau biologique de la vitamine A (Ross et al., 2000) dont le transport nécessite des protéines de liaison qui lui sont propres.

La vitamine A est amenée aux tissus cibles à partir du foie par la circulation sanguine, essentiellement par les chylomicrons (Levin, 1994).

Les niveaux de rétinol dans le plasma sont constants et soumis à un contrôle de l'homéostasie sauf dans des cas de déficience en vitamine A, stress, maladies ou changements hormonaux. Le niveau plasmatique de rétinol et son relargage par le foie semblent dépendre du besoin en vitamine A des tissus extrahépatiques (Wolf, 1984).

6.2 Fonctions.

Le premier rôle de la vitamine A implique son dérivé, le 11-cis rétinol, obtenu par déshydrogénation du rétinol par une alcool déshydrogénase impliqué dans la **vision**.

Ce rétinol fonctionne comme un **pigment absorbant la lumière** au niveau des cellules épithéliales de la rétine, aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés (Duester, 2000), il joue un rôle dans les événements de photoexcitation des photorécepteurs. Il a été mis en évidence, chez des patients souffrant de déficience en vitamine A, que leurs capacités

d'adaptation au noir étaient affectées. Après traitement avec du rétinol, ces personnes retrouvaient leurs facultés à discerner une faible luminosité (Russell, 2000).

La vitamine A, au travers de l'acide rétinoïque, est impliquée dans la différenciation cellulaire par son action au niveau des noyaux où elle va agir sur des gènes cibles. Son action passe par des **récepteurs nucléaires** liant l'acide rétinoïque (Ross et al., 2000) qui vont ensuite moduler la transcription de certains gènes. Ces mécanismes sont développés dans la partie concernant les récepteurs nucléaires.

La vitamine A joue également un rôle au niveau de la surface cellulaire et dans la glycosylation.

Concernant la surface cellulaire, la plupart des expériences menées portaient sur des cellules en culture et il a été démontré que l'acide rétinoïque :

- augmentait le nombre de « gap junctions » permettant aux cellules de communiquer,
- agissait sur l'adhésion cellulaire et l'inhibition de contact (Wolf, 1984).

L'acide rétinoïque et le rétinol jouent sur les sites de fixation cellulaires de certaines molécules impliquées dans l'adhésion, telle que la fibronectine, mais aussi sur la synthèse intracellulaire de ces molécules. Ces mécanismes au niveau de la surface cellulaire seraient liés au rôle de la vitamine A dans les processus de synthèse et de glycosylation des glycoprotéines qui sont les constituants majeurs des membranes de surface cellulaires. Les glycoprotéines contiennent une ou plusieurs chaînes de glucides liées à des résidus asparagine par des liaisons N-glycosidiques (entre le OH en 1 du sucre et le NH₂ du résidu asparagine). Il a en effet été mis en évidence une chute de la synthèse de certaines de ces glycoprotéines de surface (dont la fibronectine) dans des cas de déficience en vitamine A et une reprise de la synthèse de ces protéines lors de l'administration de la vitamine dans les cultures cellulaires. Les rétinoïdes agiraient aussi sur la glycosylation à travers certains de leurs dérivés contenant du mannose phosphorylé pouvant être transféré sur des glycoprotéines membranaires (Wolf, 1984).

7. Les récepteurs de la vitamine A.

7.1 Sous-familles et structure.

La **super-famille des récepteurs nucléaires** regroupe les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, stéroïdiennes, ceux de la vitamine D3 et de l'acide rétinoïque. Ces récepteurs ont la faculté d'aller **se fixer au niveau de l'ADN et de moduler la transcription de leur gènes cibles** (Green & Chambon, 1988).

Les récepteurs de l'acide rétinoïque regroupent deux familles de **récepteurs nucléaires**: les **RAR** et les **RXR** (Fig. 2).

Les RAR se lient à la forme *tout-trans* et à la forme *9-cis* de l'acide rétinoïque alors que les RXR ne lient que la forme *9-cis* de ce dérivé actif de la vitamine A (Heyman et al., 1992).

Ces récepteurs existent essentiellement sous trois isoformes (α , β et γ) chez les mammifères, oiseaux, amphibiens et poissons (Mangelsdorf, 1994 ; Ross et al., 2000). Néanmoins, deux autres isoformes des RXR (δ et ϵ) ont été trouvées chez le poisson-zèbre, *Danio rerio* (Jones et al., 1995), ni l'une ni l'autre ne lient la forme *9-cis* de la vitamine A. Ce cas particulier ne sera ni développé ni pris en compte dans ce mémoire.

Les récepteurs nucléaires sont des protéines formées de six domaines distincts (A, B, C, D, E et F) (Green & Chambon, 1988).

- Les **domaines A et B**, situés dans la partie NH₂-terminale de ces protéines, sont impliqués dans la **modulation de leur transcription**, cette régulation fait intervenir des protéines régulatrices ainsi que des nutriments, qui, après fixation sur ces domaines, vont réguler la synthèse des ARNm.
- Le **domaine C** permet la **reconnaissance spécifique** d'un élément de réponse situé sur l'ADN des gènes cibles, la **fixation du récepteur sur l'ADN** et la **dimérisation** de la protéine. Ce domaine, appelé **domaine de fixation à l'ADN**, contient une partie très conservée de 66 à 68 acides aminés riche en cystéines et acides aminés basiques qui correspond à deux motifs en doigts de zinc (Green et Chambon, 1988) (CI et CII) permettant de lier l'ADN.
- La **région D** est impliquée dans la **translocation** du récepteur dans le noyau cellulaire.
- Le **domaine E**, situé en partie COOH-terminale, joue un rôle essentiel dans la **fixation du ligand**, la **dimérisation**, la **localisation nucléaire** ainsi que dans l'**activation transcriptionnelle** dépendante du ligand (Ostrowski et al., 1998). Il est appelé **domaine de fixation du ligand** et contient beaucoup d'acides aminés

Implication de l'acide rétinoïque et de ses récepteurs sur l'expression génétique

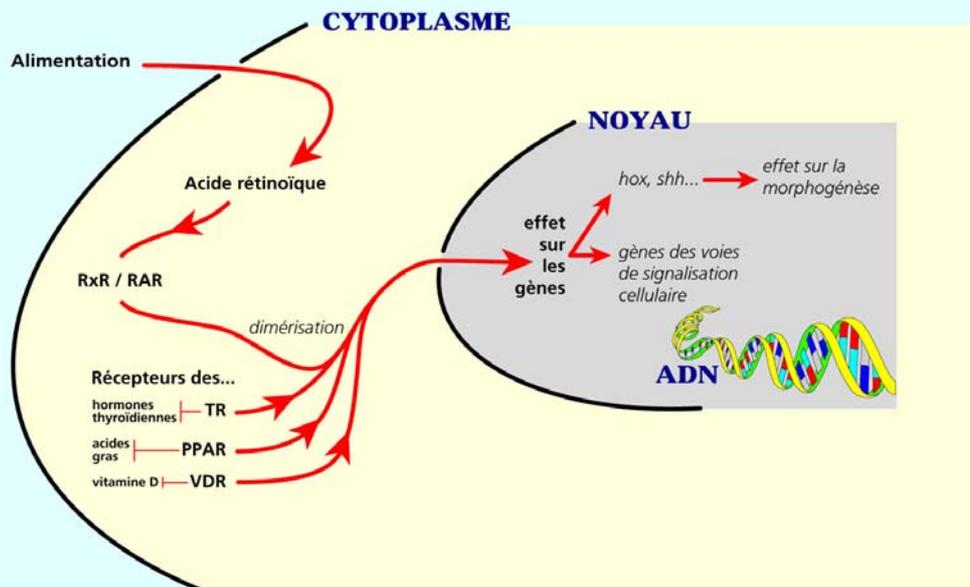


Figure 3. Schéma de la voie de signalisation cellulaire de l'acide rétinoïque apporté par l'alimentation aboutissant à la régulation de la transcription de gènes au niveau du noyau.

hydrophobes qui vont participer à la formation d'une poche hydrophobe pour le ligand.

Ce domaine comprend également une région impliquée dans la formation d'**homotétramères de RXR**. Ces tétramères seraient la **forme de stockage** de ces récepteurs, cela permettrait de réguler leur activité car ces oligomères sont considérés comme inactifs dans la transcription (Kersten et al., 1997). La fixation du ligand permet la dissociation de ces tétramères en monomères ou dimères et l'activation des voies de signalisation des RXR.

Les monomères peuvent aussi être déstabilisés par la liaison à des acides gras tels que l'acide oléique (Egea et al., 2001) et empêcher la formation de tétramères.

- Le rôle de la **région F** n'a pas été clairement déterminé.
- Les domaines C et E sont les plus conservés au cours de l'évolution.

7.2 Régulation des gènes par la vitamine A.

Les RAR ont la capacité de former des homodimères mais également des hétérodimères avec les RXR (Fig. 3). Ces derniers peuvent aussi se lier aux récepteurs de la vitamine D3, des hormones thyroïdiennes et des acides gras (les PPARs) (Ross et al., 2000 ; James et al., 2003). Cela leur confère un **rôle essentiel dans plusieurs voies de signalisation cellulaires** car, après fixation sur les éléments de réponse propres à ces voies situés sur des gènes, ils peuvent **moduler l'expression génique** (Fig. 3). Il a été démontré que la voie de l'acide rétinoïque pouvait contrôler directement ou indirectement plus de **500 gènes** (Balmer & Blomhoff, 2002).

Ces différents gènes englobent les gènes codant pour les RAR et les RXR, ce qui indique une autorégulation de la voie des rétinoïdes, ainsi que de nombreux gènes impliqués dans l'**organogénèse** tels que les **gènes Hox** (Krumlauf, 1994 ; Suzuki et al., 1999 ; Ogura & Evans, 1995), **IGF** (Gabbitas & Canalis, 1997 ; Fu et al., 2001), **BMP** (Thompson et al., 2003).

Beaucoup de travaux ont été menés chez les vertébrés supérieurs et en particulier chez le poulet. Il a par exemple été mis en évidence que lorsque de l'acide rétinoïque était appliqué dans la partie antérieure du bourgeon donnant naissance à l'aile chez l'embryon, l'aile présentait une duplication en miroir des doigts (Wedden et al., 1990). En fait, dans ce cas, l'acide mime l'effet de la zone d'activité polarisante orientant la formation du squelette de

l'aile, zone située dans la partie postérieure du bourgeon. L'application locale d'acide rétinoïque stimule directement l'expression des gènes du groupe Hoxd et indirectement shh, ce qui conduit à cette duplication en miroir.

Chez les poissons, la régulation de ces gènes par l'acide rétinoïque peut être illustré par l'exemple de Hox-d4 et shh. Ces deux gènes ont été étudiés par Suzuki et al.(1999) au niveau des arcs pharyngaux chez le carrelet (*Paralichthys olivaceus*). Ces arcs sont à l'origine des structures de la tête impliquées dans l'alimentation et la respiration et Hox-d4 et shh s'expriment au niveau des arcs pharyngaux et branchiaux. Cette équipe japonaise a démontré qu'un traitement à l'acide rétinoïque par balnéation réprimait l'expression des deux gènes et conduisait à l'apparition de malformations affectant la région céphalique, la direction de la croissance était perturbée ainsi que la taille des structures cartilagineuses céphaliques des larves (Suzuki et al., 1999).

Cela met en évidence le rôle prépondérant de l'acide rétinoïque dans les processus de morphogenèse et de différenciation cellulaire.

Ce rôle explique pourquoi des doses inadaptées de cet acide peuvent conduire à l'apparition de malformations squelettiques : **toute perturbation dans cette voie de signalisation affecte l'expression des gènes qu'elle contrôle et provoque une dérégulation du développement de l'organisme** (Suzuki et al., 1999 ; Lee et al., 2001 ; Haga et al., 2002).

8. Régulation des gènes par les acides gras.

Les acides gras peuvent rapidement moduler le niveau de transcription de gènes impliqués dans leur propre métabolisme. Cette modulation se fait au travers de récepteurs nucléaires : les PPAR. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de ces récepteurs : α , γ et δ alors que chez le xénope, *Xenopus laevis*, les trois isoformes sont PPAR α , β et γ (Kliwer et al., 1997). Les isoformes α et γ sont très conservées entre les espèces alors que les séquences des deux autres formes sont très variables. Les PPAR régulent l'expression de leurs gènes cibles en se liant à un élément de réponse aux PPAR (PPRE) situé dans la région régulatrice des gènes cibles impliqués aussi bien dans le métabolisme des lipides que dans l'homéostasie énergétique. Par exemple, PPAR α contrôlent des gènes participant à l'absorption intestinale des acides gras à longues chaînes, la β -oxydation mitochondriale et peroxisomale dans le foie et la synthèse hépatique d'acides gras. L'isoforme γ est plus impliquée dans la différenciation des adipocytes et dans la régulation de certaines cellules du système immunitaires, les macrophages. Quant à β , elle intervient dans la cicatrisation et la

différenciation des kératinocytes dans lesquels le métabolisme lipidique est très actif (Tan et al., 2002). Ces données montrent bien que les PPAR agissent au niveau de mécanismes très variés. Les ligands des PPAR sont les AGPI, certains écosanoïdes, prostaglandines ou leucotriènes. Les PPAR forment des hétérodimères avec les RXR afin d'aller moduler l'expression de leurs gènes cibles.

9. Interaction acide rétinoïque-acides gras.

Il a été montré chez le rat (Mata de Urquiza et al., 2000) que les RXRs pouvaient se lier à des molécules autres que les rétinoïdes, c'est le cas de certains **acides gras** tels que le DHA, l'acide oléique (Goldstein et al., 2003). Ces acides gras insaturés se lient avec une forte affinité aux RXR et entrent en compétition avec l'acide rétinoïque 9-cis lors de cette liaison (Goldstein et al., 2003).

Cela illustre la **complexité et l'imbrication des voies de signalisation cellulaire** car cet exemple montre que les acides gras peuvent jouer sur la voie de la vitamine A qui, elle-même, est liée à la voie des acides gras à travers les hétérodimères RXR/PPAR (Bonilla et al., 2000). Il existe également une régulation post-transcription de RXR α par les acides gras (acide arachidonique, acide oléique...) au niveau du foie de rat (Steineger et al., 1998).

Les effets tératogènes de la vitamine A ont été mis en évidence par balnéation sur de très jeunes stades chez les poissons et la plupart du temps par des traitements in utero chez les mammifères. Des études réalisées par les équipes japonaises (Takeuchi et al., 1998) ont montré que la vitamine A pouvaient avoir un effet sur des stades plus avancés du développement chez les poissons, et induire des malformations. Mais ces effets tératogènes pendant la phase d'alimentation exogène n'avaient pas été reliés à l'expression des gènes. Au cours de cette étude, nous avons choisi d'agir sur des stades plus avancés du développement par la nutrition et de nous focaliser sur l'impact des nutriments sur des gènes du développement.

10. Objectifs de l'étude.

Au vu des données bibliographiques existant sur l'acide rétinoïque et les acides gras, nous avons donc choisi d'étudier l'influence de ces deux nutriments sur le développement des

larves de bar et de déterminer leurs taux optimaux dans les aliments composés. Pour cela, nous avons réalisé successivement trois expériences complémentaires :

-l'**expérience A** portait sur la vitamine A et nous avons observé l'impact de doses croissantes de rétinol sur la morphogenèse du bar,

-l'**expérience B** mettait en œuvre des régimes incorporant des taux comparables de lipides mais ceux-ci différaient par leur source et leur forme d'apport. Comme précédemment, nous nous sommes attachés aux malformations induites.

-l'**expérience C** avait pour but de déterminer la période de développement pendant laquelle une très forte dose de rétinol ou de phospholipides marins influençait la morphogenèse des larves et conduisait à l'apparition de malformations.

Au cours de ces études, nous avons suivi différents **paramètres** :

- **zootecniques**: croissance, survie, malformations.
- **histologiques**: colorations sur coupes des inclusions lipidiques dans les cellules et colorations sur larves entières des structures cartilagineuses et osseuses.
- **biochimiques**: activités spécifiques des enzymes pancréatiques et intestinales, dosage du rétinol et/ou des lipides dans les larves et dans les aliments.
- **moléculaires**: quantification des ARNm codant pour $RAR\alpha$, $RAR\gamma$, $RXR\alpha$, IGF-I et BMP-4 après clonage des ADNc, hybridations de $RAR\alpha$, $RAR\gamma$ et $RXR\alpha$ sur coupes ou sur larves entières.

Le but de cette étude est 1) de comprendre comment les nutriments peuvent influencer certains gènes contrôlant le développement osseux des larves de bar et 2) de décrire les perturbations squelettiques et physiologiques qui en résultent.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1-Méthodologie générale.

1.1 Animaux.

Le modèle animal choisi pour ce travail est le bar: *Dicentrarchus labrax*.

Classification	Super classe	Poisson
	Classe	Ostéichthyen
	Sous classe	Actinoptérygien
	Super ordre	Téléostéen
	Ordre	Perciforme
	Sous ordre	Percoidé
	Famille	Moronidé

Les larves de bar utilisées lors des expériences proviennent de l'écloserie marine de Gravelines et lors de leur réception, leur stade de développement est prélarvaire: période comprise entre l'éclosion de l'œuf et l'ouverture de la bouche (J5 pour le bar). Les larves mesurent alors entre 3,5 et 4,5 mm et pèsent entre 0,3 et 0,5 mg.

En captivité, la saison de reproduction des géniteurs de bar peut être avancée ou retardée par des suppléments d'hormones et des modifications des facteurs environnementaux. Les écloseries disposent donc d'œufs fécondés toute l'année. La qualité des pontes fluctue d'un individu à l'autre et d'une ponte à l'autre. Afin de limiter la variabilité de la qualité des larves, chaque expérience menée comprenait des larves issues d'un mélange de pontes.

Dans la plupart des essais présentés dans ce rapport, les larves sont élevées pendant 40 jours dans une structure adaptée à leur bon développement et nourries dès l'ouverture de la bouche avec des aliments composés expérimentaux. Dans le cas où une expérience se poursuit au delà de J40, les quatre bacs de chaque régime sont réunis en un seul bassin d'une contenance de 700 litres et tous les poissons sont nourris avec le même aliment commercial.

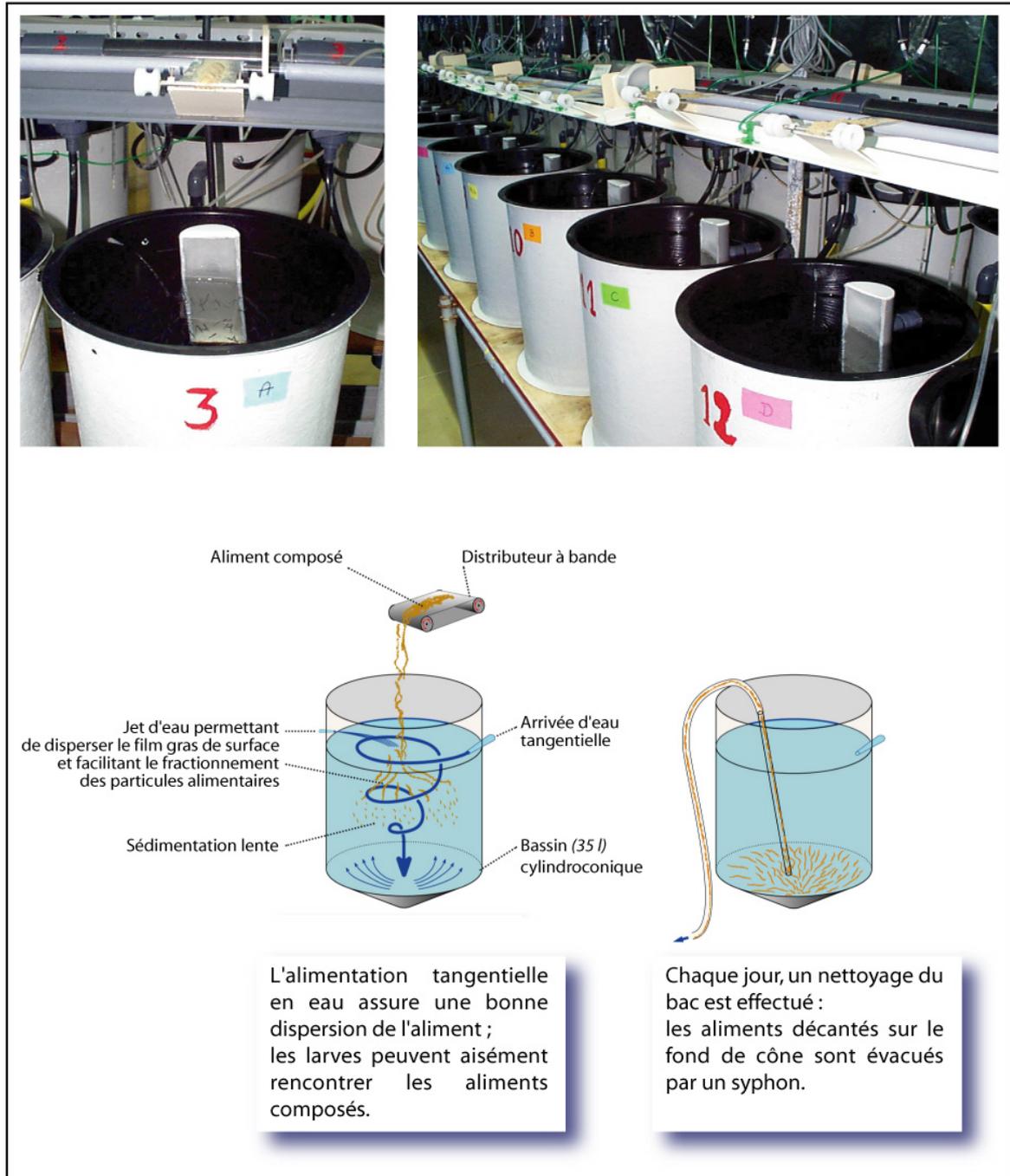


Figure 1. Photos et schémas des bacs d'élevage.

1.2 Installations expérimentales.

1.2.1 Bacs d'élevage.

L'élevage des larves est réalisé à l'IFREMER-Station de Brest dans des bacs en fibre de verre, de forme cylindro-conique (Fig. 1). Cela permet de concentrer les déchets au fond des bacs et la couleur noire des parois évite l'agglutination des larves sur les parois. La contenance des bacs est de 35 litres. L'eau de mer, pompée dans la rade de Brest, est continuellement renouvelée, avec un débit de une fois par heure, en formant un courant circulaire qui améliore la dynamique au sein des bacs. La densité moyenne dans les bacs est de 50 larves par litre soit environ 1750 larves par bac. Au préalable, l'eau est filtrée à travers un filtre à sable, elle passe ensuite dans un système de chauffage au tungstène et une colonne de dégazage garnie d'anneaux en plastique. Puis, elle chemine sous une lampe UV et à travers des pores de 10 µm de diamètre d'un filtre à cartouches en polypropylène.

La température de l'eau est de 14°C au début de l'expérience puis elle est augmentée graduellement pendant 8 jours jusqu'à 21°C, température qui est conservée pendant le reste de la manipulation. La salinité est de 35 g/l et le taux d'oxygène de 6 mg/l. L'éclairage, d'une intensité de 9 w/m², est délivré en continu par des tubes fluorescents. Tous les traitements sont testés en tétraplicats. Chaque bac dispose de structures individuelles et automatisées de distribution de l'aliment.

1.2.2. Distribution des aliments.

Les aliments sont distribués deux fois par jour dès l'ouverture de la bouche qui a lieu à J5 (cinquième jour après éclosion) grâce à un système automatisé de tapis roulants se trouvant au dessus de chaque bac et entraînés pendant 18 h par un moteur électrique (Fig. 1).

Les larves de bar, de même que les juvéniles et les adultes, chassent leurs proies et ne consomment les aliments que si ils sont en suspension dans l'eau. L'aliment doit donc être distribué en large excès et la distribution faite en continu, assure ainsi une meilleure disponibilité de l'aliment pour les larves. Une accumulation de nourriture non consommée et de fèces en résulte et nécessite la mise en place d'un dispositif adapté à l'élimination de ces déchets du fond des bacs.

1.2.3. Entretien des bacs d'élevage.

Chaque matin, avant la distribution des aliments, les bacs sont nettoyés grâce à un siphonnage des parois et du fond afin d'éliminer les déchets décantés (particules d'aliment non ingérées, fèces, animaux morts). Les déchets en suspension sont éliminés par le tuyau d'évacuation des eaux de renouvellement dont l'embout est protégé par une toile à plancton de maille supérieure au diamètre des particules alimentaires (450 μm).

1.3 Aliments.

Les aliments composés utilisés lors des différentes expériences ont une composition de base similaire, incorporant les mêmes ingrédients. A l'intérieur d'une expérience, les aliments sont isoprotéiniques, isolipidiques et isoénergétiques. Le nutriment dont on souhaite étudier l'effet y est incorporé à différentes concentrations. La composition de chaque aliment est détaillée dans les chapitres correspondants (chapitres III, V, VI).

Toutes les formules alimentaires contiennent une source protéique (essentiellement constituée de farine de poisson), une source glucidique (amidon et maltose), une source lipidique (lécithine de soja, lécithine marine, huile de foie de morue) et un mélange comprenant des minéraux, vitamines et liants.

Les aliments sont obtenus de la manière suivante. Tout d'abord, la farine de poisson est tamisée à 160 μm , les particules inférieures à cette taille sont alors mélangées avec le concentré protéique (CPSP) et la lécithine de soja. Les vitamines sont ajoutées, le tout est mélangé à nouveau, puis les minéraux sont incorporés. Les lipides ou les phospholipides sont ajoutés. Dans le cas des phospholipides marins qui se présentent sous la forme d'une pâte, ils sont mélangés à l'eau pour obtenir une émulsion pouvant être plus facilement incorporée dans l'amalgame précédent. Le dernier ingrédient à être ajouté est l'eau (sauf dans le cas des phospholipides marins). L'amalgame ainsi obtenu est alors homogénéisé puis passé dans un hachoir pour être transformé en spaghettis qui seront séchés à l'étuve à 50°C. Les spaghettis sont ensuite concassés puis tamisés manuellement pour obtenir des particules de différentes tailles. Les plus petites microparticules alimentaires (120 à 200 μm) sont donnés de J5 à J15 puis les larves sont nourries avec des microparticules de diamètre 200 et 400 μm jusqu'à la fin de l'expérience.

2. Prélèvements et préparation des échantillons biologiques.

2.1 Données zootechniques.

Tous les poissons prélevés lors des expériences sont anesthésiés avec du phénoxyéthanol à raison de 3 ml d'anesthésiant pour 20 litres d'eau.

2.1.1. Poids.

Au cours de chaque manipulation, des échantillons de trente larves sont prélevés à des intervalles de temps réguliers (une fois par semaine) dans chaque lot expérimental. Ils sont conservés dans une solution à 5% de formol pendant trois heures puis les larves sont pesées individuellement. Ces données de poids sont utilisées comme critère de croissance.

2.1.2. Malformations.

Au cours de chaque expérience, les régimes alimentaires ont induit des malformations squelettiques chez les larves de bar, des taux de malformations ont donc été calculés à la fin des expérimentations. Les malformations observées correspondent à des déformations affectant la colonne vertébrale (scoliose, lordose, nombre de vertèbres), la mâchoire (prognathisme) et le crâne. Les larves sont examinées sous binoculaire, les poissons les plus gros sont observés sans binoculaire et certaines malformations ont aussi été mises en évidence par coloration.

2.1.3. Survie.

Les poissons survivants sont comptés à la fin des expériences. Ce nombre, rapporté au nombre initial de larves mises en élevage, permet d'estimer le taux de survie. Ce taux tient compte des poissons prélevés pour les analyses et est exprimé en pourcentage.

La survie est obtenue par comptage des animaux vivants à la fin de l'élevage, elle prend en compte le nombre de larves prélevées après J20, il n'y a aucune mortalité naturelle après cette période. Les animaux prélevés ou morts avant cette date ne sont pas comptabilisés.

2.2 Dosages enzymatiques.

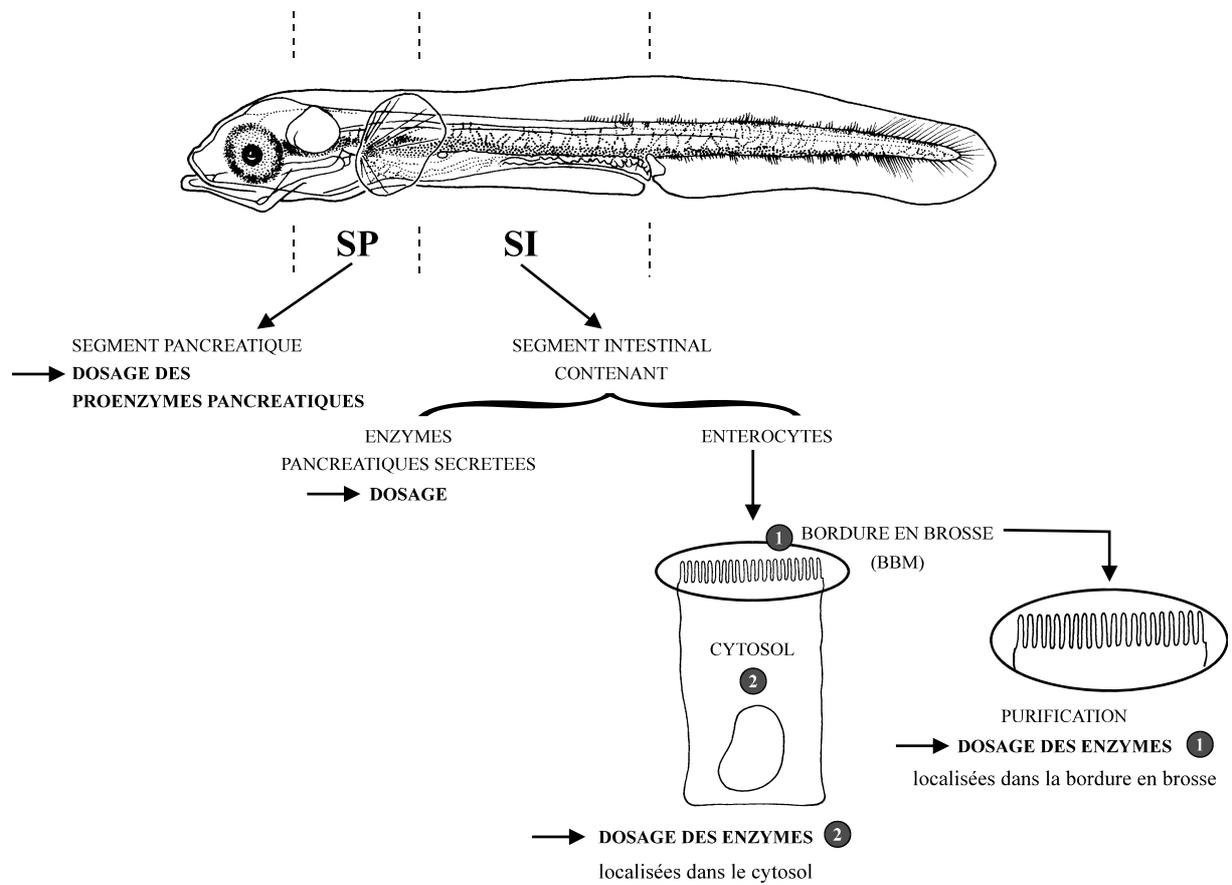


Figure 2. Dissection des larves de bar et localisation des enzymes dosées.

Des échantillons d'une cinquantaine de larves sont prélevés afin de procéder aux différents dosages enzymatiques. Les larves âgées de plus de 15 jours sont disséquées sous une loupe binoculaire, sur une plaque en verre reposant sur un lit de glace. La tête et la queue des larves sont retirées à l'aide de microciseaux de dissection. Le reste est alors disséqué afin d'obtenir un segment pancréatique et un segment intestinal (Fig.2).

Au niveau du segment intestinal, les enzymes, sont dosées d'une part dans la bordure en brosse purifiée (aminopeptidase N et phosphatase alcaline) et d'autre part dans les entérocytes entiers (leucine-alanine peptidase). Pour cela, les segments intestinaux obtenus après dissection sont pesés et l'extraction de la membrane des bordures en brosse est réalisée, avec 150 mg de tissu minimum. Les segments intestinaux sont broyés au polytron PT 2100 dans 30 volumes de tampon mannitol (50 mM) et tris (2 mM) à pH 7. Un millilitre de cet homogénat est prélevé et sert pour le dosage des enzymes dans les entérocytes. Le reste est centrifugé 10 min à 9000 g après ajout de CaCl₂ (concentration finale = 10 mM). Le surnageant est prélevé et subit une seconde centrifugation de 20 minutes à 34000 g, cela sépare les bordures en brosse des autres constituants des entérocytes. Le culot contenant ces bordures en brosse est repris dans 1 ml d'une solution KCl 0.1 M, DTT (Dithiothreitol) 1 mM, Tris HEPES 5 mM à pH 7.5.

Les segments pancréatiques des différentes larves d'un même échantillon sont réunis dans un seul tube puis broyés dans 1 ou 2 ml d'eau distillée en fonction de leur nombre. Après centrifugation à 3300 g pendant 3 min à 4°C, les surnageants sont prélevés, soumis aux ultrasons puis les enzymes (trypsine et amylase) sont dosées.

Le pourcentage d'amylase et de trypsine sécrétée est obtenu par le rapport (exprimé en %) de l'activité mesurée dans le segment intestinal sur l'activité totale mesurée dans les segments pancréatiques et intestinaux. L'activité enzymatique dans le segment pancréatique peut servir d'indice de la synthèse du pancréas et l'activité du segment intestinal reflète la sécrétion pancréatique de ces enzymes.

Les protéines sont dosées dans le segment pancréatique et le segment intestinal.

2.3 Dosage du rétinol et du rétinol palmitate.

Pour les expériences où les aliments composés contenaient des quantités différentes de *all-trans* rétinol, une cinquantaine de larves est prélevée dans chaque bac puis conservée à -20°C dans des tubes à hémolyse en attendant son traitement.

2.4 Dosages moléculaires.

Une cinquantaine de larves est prélevée par bac pour l'extraction des ARNm totaux et cette extraction est réalisée aussitôt après les prélèvements.

Des larves sont également prélevées en vue des hybridations ARN/ARN et conservées à -20°C avant leur traitement.

3. Analyses biochimiques.

3.1 Dosages enzymatiques.

3.1.1 Dosage des enzymes pancréatiques.

Dosage de la trypsine

La méthode pour le dosage de l'activité trypsique dans les homogénats consiste à mesurer la cinétique de l'hydrolyse du substrat standardisé (BAPNA) par la trypsine, en présence de tampon Tris HCl, CaCl₂. Le protocole de Holm et al. (1988) est basé sur le principe d'une quantification par spectrométrie de la coloration des produits de dégradation du substrat à une longueur d'onde de 407 nm et à 37°C. La longueur d'onde correspond au coefficient d'absorption du substrat. Une unité trypsique correspond à l'activité enzymatique hydrolysant 1 µmole de BAPA par minute et par ml de liquide biologique. Cette activité est donnée par la formule suivante:

$$U/ml = (\Delta DO/min / \epsilon) \times (V/v) \times d$$

ϵ = coefficient d'extinction µm⁻¹
V = volume réactionnel (ml)
v: volume de l'homogénat (ml)
d : facteur de dilution

Dosage de l'amylase

Le dosage de cette enzyme est effectué selon la méthode de Metais et Bieth (1968).

L'homogénat est incubé à 37°C pendant 5 minutes dans une solution tampon d'amidon et de NaH₂PO₄ (3 g/l, pH=7.4). L'amidon non dégradé est dosé par spectrophotométrie à 580

nm (coloration bleue en présence d'iode N/3000). L'activité de l'amylase est exprimée en unité Wollgemuth par ml, ce qui correspond à la masse d'amidon hydrolysé pendant 30 minutes à 37°C par le volume d'homogénat. L'activité est donnée par la formule suivante:

$$Uw/ml = (DO \text{ blanc} - DO \text{ réactif}) / DO \text{ blanc} \times Q \times R \times d$$

Q: quantité d'amidon de l'essai

R coefficient rapportant le volume d'homogénat prélevé à 1 ml

d: dilution de l'homogénat

Dosage des protéines

La méthode de Bradford (1976) est utilisée pour mesurer la quantité de protéines contenues dans chaque échantillon.

Le réactif de Bradford se compose de bleu de Coomassie, d'éthanol et d'acide phosphorique. Ce réactif se lie aux protéines et les colore d'une teinte bleue plus ou moins soutenue. Une gamme étalon est réalisée avec différentes concentrations connues de BSA en présence du réactif puis l'absorbance est mesurée à 595 nm. Les mesures ensuite obtenues avec les échantillons à doser seront comparées à la courbe étalon, ce qui donnera la quantité de protéines présente.

3.1.2 Dosage des enzymes de la bordure en brosse.

Dosage de la phosphatase alcaline

200 µl d'extrait enzymatique sont ajoutés à 2 ml de milieu réactionnel maintenu à 37°C et contenant du tampon carbonate-bicarbonate avec du p-nitrophényl phosphate (PNPP) qui est le substrat spécifique de la phosphatase alcaline. La cinétique de dégradation du substrat est suivie au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 407 nm. L'activité enzymatique, en U/ml, est donnée par la formule suivante:

$$U/ml = (\Delta DO / \text{min}) / \varepsilon \times 2,5 / v$$

ε = coefficient d'extinction molaire du PNPP

v = volume d'homogénat (ml)

Dosage de l' amino peptidase N

Ce dosage repose sur la mesure de la dégradation du substrat spécifique de l'aminopeptidase N qui est du L-Leucine p-nitroanilide (0,1 M dans du DMSO), en présence de tampon phosphate (80 mM, pH=7). L'hydrolyse est mesurée par spectrophotométrie à 410 nm.

$$U/ml = (\Delta DO/min) / \epsilon \times 2,5/v$$

ϵ = coefficient d'extinction μ molaire de la L-leucine p-nitroanilide
 v = volume d'homogénat (ml)

3.2 Dosage du rétinol et du rétinol palmitate.

Des dosages de rétinol ont été réalisés d'une part sur les aliments afin de connaître avec précision la quantité présente dans les régimes contenant des taux croissants de rétinol et, d'autre part, sur les larves afin de déterminer la concentration de rétinol et de rétinol palmitate présente dans les animaux.

Les larves non disséquées et des échantillons des différents aliments sont broyés et homogénéisés dans du tampon PBS (7 ml de tampon pour 1 g de prise d'essais). Les larves sont broyées au Potter à 2000 tours/min pendant une minute au froid et les aliments avec un Polytron MR 2100 (Kinematica AG, Suisse) au froid également. Un millilitre de ces homogénats est ensuite transféré dans un tube marron opaque car le rétinol est photosensible. Sont alors ajoutés 1 ml d'éthanol (contenant 50 μ g/l 2,6-Di-tert-butyl-4-méthylphénol, BHT), le standard interne et 2 ml d'hexane (contenant 50 μ g/l BHT). Cette solution est alors mélangée pendant 1 min, la phase organique est séparée par centrifugation (5 min à 2000 g). Cette phase organique est ensuite collectée dans un autre tube opaque et évaporée à l'azote. Cette étape est réalisée deux fois, les résidus sont collectés dans le même tube et redissous dans une quantité connue de méthanol pour la détection du rétinol et du rétinol palmitate par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Le système d'HPLC est constitué d'un appareil Waters 600E (Waters, Milford, MA) avec détection d'ultraviolet à 325 nm (Waters 486, Tunable Absorbance Detector) et d'une colonne C18 novapack-30 cm (Waters, Milford, MA). Le rétinol et le rétinol palmitate sont quantifiés en utilisant un standard interne et un standard externe (rétinol acétate, Sigma-Aldrich).

3.3 Dosage des lipides.

Les lipides totaux ont été dosés dans les aliments et dans les larves par la méthode de Folch et al. (1957). Les lipides neutres et les phospholipides ont été séparés avec des colonnes Sep-pak Silica Cartridges (Waters) suivant la méthode de Juaneda et Roquelin (1985). Après saponification et méthylation, les esters méthyliques d'acides gras ont été déterminés par chromatographie gazeuse à l'aide d'une colonne capillaire BPX70 (30 m de longueur × 0,22 mm de diamètre × 0,25 µm d'épaisseur de phase). L'appareil (auto-système PERKIN-ELMER) est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur diviseur (split-splitless). Le débit de fuite est de 31 l/mi, et le gaz vecteur est de l'hélium à la pression constante de 14,8 psi. Chaque extrait (0,5 µl contenant environ 100 ng d'esters méthyliques d'acides gras) est injecté en mode splitless. La température de l'injecteur est de 220°C et celle du détecteur de 260°C. La température initiale du four est de 50°C puis elle augmente de 15°C par minute jusqu'à 180°C. Cette température est maintenue pendant 5 minutes puis elle augmente à nouveau de 3°C par minute jusqu'à 220°C. Les données sont directement enregistrées sur un intégrateur PE-Nelson. Les esters méthyliques sont identifiés par comparaison des temps de rétention avec ceux des extraits d'huile de foie de morue connue et d'un mélange standard (étalon 68A, Interchim). La composition en acides gras est exprimée en pourcentage par rapport à la matière sèche de l'aliment et en pourcentage par rapport aux acides gras totaux chez les larves.

4 Détermination de la séquence des amorces utilisées lors des PCR.

4.1. Criblage des banques de données.

Pour chaque gène candidat, une recherche a été effectuée dans la banque de données GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) afin d'identifier les séquences géniques annotées et déposées comme des ADNc partiels ou complets de ces gènes. Pour chaque gène, les séquences nucléotidiques et protéiques des ADNc de mammifères et de poissons ont été alignés ce qui a permis d'identifier des zones conservées au cours de l'évolution au sein de ces organismes.

4.2. Détermination des amorces.

Tableau 1: Séquences des amorces utilisées lors des PCR.

Gène	Amorce sens (5' → 3')	Amorce antisens (5' → 3')	Température d'hybridation
GAPDH	CACCACGCTCACCATCGC	CATCTTGGGGAACATGTG	54°C
RAR α	ACCACGCTCACCATCGC	ATCTTGGGGAACATGTG	56°C
RAR γ	GAGGTGGGCATGTCCAAG	ATCCATCTCCAGGGGCAG	58°C
RXR α	TGCCAGTACTGCCGCTAC	CAGCATCTCCATGAGGAA	56°C
IGF-1	CTTGGGTGCTCTTGGCAT	TTAGCCACACCCTCTCAC	56°C
BMP4	CCAGCCGAGCCAACA	CACAATCCAGTCATTCCA	54°C

Pour chaque gène, après alignement des séquences, deux zones conservées ont été choisies: une en 5' et une en 3'. Ces régions ont permis de définir un couple d'amorces pour chaque gène d'intérêt. Ces amorces ne doivent pas être complémentaires entre elles ni contenir de structures secondaires. En outre, elles doivent avoir un maximum de G et C dans leur séquence, l'idéal étant de 60%. Les séquences ainsi que les températures de fusions (TM) de chaque primer sont présentées dans le tableau 1. Le TM se calcule avec la formule suivante:

$$TM = 60.81 + 0.41 (\% GC) - (500/n)$$

n= nombre de bases de l'amorce
% GC= pourcentage en GC de l'amorce

Ces amorces ont été synthétisées par Eurogentec.

5 PCR et sous-clonage des fragments géniques.

5.1. Extraction des ARN.

Dans des tubes en TEFLON, 50 à 100 mg de tissus sont homogénéisés dans 1 ml de Trizol™ à l'aide d'un Polytron. L'homogénat est ensuite incubé 5 min à température ambiante puis 0,2 ml de chloroforme sont ajoutés, le tout est mélangé manuellement 15 secondes, incubé 2 à 3 min à température ambiante puis centrifugé 15 min à 12000 g. La phase supérieure est prélevée, transférée dans un nouveau tube, on y ajoute 0,5 ml d'alcool isopropylique. Le tout est incubé 10 min à température ambiante puis centrifugé 10 min à 12000 g à 4°C. L'ARN précipité forme alors un culot au fond du tube. Le surnageant est éliminé et le culot rincé avec 1 ml d'éthanol à 75 % et centrifugé 5 min à 12000 g à 4°C. Les culots sont ensuite séchés et dissous dans 0,5 ml d'H₂O-DEPC stérile.

5.2. Transcription réverse des ARNm en ADNc.

Le kit utilisé est «Ready To Go» d'Amersham Pharmacia Biotech.

5 µg d'ARN provenant de l'extraction précédente sont mis dans un eppendorf avec 33 µl d'eau DEPC et chauffés 5 min à 65°C puis laissés 5 min à 37°C en même temps que le tube du kit contenant le First-Strand Reaction Mix (solution tampon contenant du dATP, dCTP, dGTP, dTTP, du FLPCpure™, de la Reverse Transcriptase murine, du RNAGuard™ porcin, de la BSA RNase/DNase-Free et l'amorce Not I-d(T)₁₈):

(5'- d[AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAAT₁₈]- 3'). L'ARN est transféré dans le tube du kit sans le mélanger puis est laissé 5 min à 37°C, mélangé à la pipette, centrifugé rapidement et laissé 1 heure à 37°C.

5.3. Amplification de l'ADNc.

Cela se fait par PCR (Polymerase Chain Reaction) sur l'ADNc obtenu après transcription réverse. Pour un volume final de 50 µl on met: 1 µl d'ADNc, 5 µl de tampon 10X, 2 µl de dNTP, 1 µl de chaque amorce (sens et antisens) (tableau 1) spécifique de la bande à amplifier, 0.5 µl de Taq Polymérase et 39,5 µl d'H₂O puis 40 µl d'huile minérale au dessus du mélange. Toutes les PCR sont constituées de trois phases répétées 30 fois: une phase de dénaturation de 30 secondes à 94°C, une d'hybridation de 90 secondes dont la température dépend du couple d'amorces utilisé et une d'élongation de 2 minutes à 72°C. Il y a en plus une phase de dénaturation initiale de une minute à 94°C et une étape finale d'élongation de 7 minutes à 72°C. Un screening de température a été effectué pour tous les couples d'amorces pendant la phase d'hybridation de 90 secondes afin de déterminer la température idéale du couple.

Les fragments géniques obtenus par PCR sont visualisés sur un gel d'électrophorèse à 3% (2% agarose, 1% agarose LMP) pour repérer ceux correspondant à la taille attendue d'après les alignements nucléotidiques. Le marqueur de poids moléculaire employé est le BioMarker® Low (Eurogentec).

5.4. Sous-clonage des fragments géniques.

Après obtention par PCR de fragments de gènes, différentes étapes ont conduit à leur sous-clonage dans des bactéries One Shot qui sont des cellules E.Coli.

5.4.1. Purification de l'ADNc amplifié.

Le kit employé est le kit «GeneClean® Spin» de BIO 101.

Afin d'obtenir assez d'ADN après purification deux PCR de 50 µl chacune sont faites pour chaque bande d'intérêt puis le produit des PCR est poolé et la totalité est mise à migrer dans un gel d'agarose LMP (Low Melting Point) à 1% . La bande d'ADN est ensuite découpée, son poids doit être inférieur à 300 mg. Le morceau d'agarose est mis dans un eppendorf avec 400 µl de GC Spin Glassmilk et chauffé 5 min à 55°C pour que le gel fonde. La solution obtenue est ensuite pipetée et mise sur un Spin Filter sur lequel 500 µl de GC Spin New Wash sont ajoutés. L'ensemble est centrifugé 20 sec puis le filtre est transféré sur

un tube eppendorf. 10 µl de GC Spin Elution sont mis sur le filtre, laissés en contact 5 min puis le tout est centrifugé 30 sec. Cette étape d'élution est répétée une seconde fois en réunissant les éluats.

5.4.2. Sous-clonage.

Le kit de clonage «TOPO TA Cloning Kit» (Invitrogen n° K4550-01) est utilisé.

4 µl de produit récent de PCR sont mélangés doucement avec 1 µl de sels du kit et 1 µl de TOPO-Vector et laissés 5 minutes à température ambiante. Le tout est ensuite centrifugé brièvement et mis sur la glace. Immédiatement après, 2 µl de cette solution de clonage sont ajoutés et mélangés doucement à un tube de cellules One Shot décongelées au préalable. Les bactéries sont mises sur la glace pendant 15 minutes puis 30 secondes à 42°C et à nouveau sur la glace pendant 2 minutes. 250 µl de milieu SOC à température ambiante sont ajoutés aux cellules, le tube est agité horizontalement une heure à 37°C puis transféré sur de la glace. 75 µl de cellules transformées sont étalées sur une boîte de Petri préchauffée à 37°C et sur laquelle ont été étalés 40 µl de X-Gal (40 mg/ml) et 40 µl d'IPTG (100mM). La boîte est laissée une nuit à 37°C.

Le plasmide employé ici porte d'une part le gène de résistance à l'ampicilline et d'autre part celui de la β-galactosidase (β-gal) qui contient un MCS (Multi Cloning Site). Seules les bactéries contenant le vecteur pousseront sur ampicilline. L'IPTG est l'inducteur du gène de la β-gal et l'X-Gal est le substrat chromogène de cette enzyme. Si le gène *β-gal* est intact les colonies bactériennes seront bleues alors que celles contenant l'insert n'exprimeront pas une β-gal fonctionnelle et seront par conséquent blanches. Les colonies blanches sont mises en culture liquide (5 ml de milieu LB) pendant une nuit après vérification du contenu du vecteur de clonage par PCR avec d'une part les amorces spécifiques au vecteur et d'autre part avec les amorces spécifiques de l'insert puis par migration sur gel d'électrophorèse à 3% (2% agarose, 1% agarose LMP).

5.4.3. Extraction des plasmides.

Le kit employé ici est le «RPM Kit» de BIO 101.

Les cellules en culture liquide sont centrifugées pendant 30 sec à 10000 rpm, le surnageant est jeté. Le culot est resuspendu avec 50 µl de Pre-lysis Buffer et vortexé pour l'homogénéiser. Puis 100 µl d'Alkaline Lysis Solution sont ajoutés, les tubes sont retournés plusieurs fois pour mélanger leur contenu, puis laissés une minute sur la paillasse. 100 µl de Neutralizing Solution sont ajoutés, le tout est vortexé rapidement centrifugé 2 min. Le

surnageant est prélevé et mis sur un Spin Filter sur lequel ont été déposés 250 µl de Glassmilk Spin Buffer, l'ensemble est mélangé à la pipette, laissé au repos 1 min puis centrifugé 1 min. Le tube est vidé du liquide, 300 µl de Wash Solution sont mis sur le filtre, on centrifuge une minute puis le tube est vidé du liquide et recentrifugé une minute. Le filtre est alors transféré sur un nouveau tube, on y dépose 50 µl d'H₂O stérile puis le tube est brièvement vortexé puis après 5 min d'attente il est centrifugé 30 sec pour recueillir l'ADN.

L'ADN purifié est ensuite quantifié au spectrophotomètre, 5 µg minimum sont envoyés pour séquençage chez MilleGen (Labège, France) afin de déterminer si l'ADN isolé correspond bien aux fragments géniques d'intérêt.

5.5.4. Obtention des sondes ARN.

Les sondes ARN synthétisées sont utilisées lors des hybridations sur larves entières ou sur coupes. Les sondes antisens sont complémentaires des ARNm spécifiques de chacun des gènes étudiés, elles vont donc s'hybrider avec ces ARNm alors que les sondes sens qui ont la même séquence nucléotidique que les ARNm ne s'hybrideront pas. Le principe global des hybridations est expliqué dans la partie les concernant (cf. partie 7).

-Linéarisation des vecteurs bactériens.

Les bactéries contenant les plasmides avec les inserts des gènes sont remises en culture liquide et soumises à une miniprep pour extraire les plasmides. Ces plasmides sont ensuite linéarisés à 37°C pendant une nuit en vue de la polymérisation par des ARN polymérases [17 U/µl]. Les inserts géniques sont tous dans le vecteur pCR®II-TOPO. Le vecteur est digéré séparément par deux enzymes (EcoRV et SacI) dans un volume final de 100 µl: 35 µl ADN (200 ng/µl) + 10 µl tampon + 2 µl BSA + 3 µl d'enzymes de restriction [10 U/µl] + 50 µl H₂O. Les ARN polymérases nécessitent des bords francs pour fonctionner or l'enzyme EcoRV donne des bords cohésifs. Par conséquent, l'activité exonucléase du fragment Kleenow de la DNA polymérase Proméga [5 U/µl] est utilisée pour obtenir ces bords francs: 13 µl d'ADN digéré par EcoRV + 5 µl de Kleenow + 2 µl tampon10X sont mis 45 min à 22°C puis précipités à l'alcool, le culot obtenu est repris dans 20 µl d'H₂O.

-Précipitation des vecteurs linéarisés.

Les tubes contenant les vecteurs linéarisés sont mis 10 minutes à 66°C puis 5 µl de protéinase K (50 µg/ml) sont ajoutés et les tubes laissés 30 minutes à 37°C. Puis, un mélange phénol/chloroforme 50/50 préparé extemporanément est ajouté volume à volume aux tubes. Le tout est mixé 1 minute puis centrifugé 6 minutes. La phase aqueuse est prélevée et traitée au chloroforme selon le même procédé qu'avant. La phase aqueuse est à nouveau prélevée et retraitée au chloroforme. Les tubes sont vortexés, centrifugés 6 minutes et la phase aqueuse prélevée est ajoutée à la précédente. Le volume total de cette phase aqueuse est évalué puis un volume d'acétate de sodium égal au dixième de ce volume mesuré est ajouté aux eppendorfs. Trois volumes d'éthanol 100% (V/V) sont ensuite rajoutés et les tubes sont mis à -20°C pendant 20 minutes. Puis, ils sont centrifugés 20 minutes à 14000 g, rincés à l'éthanol 75% et les culots sont repris dans 20 µl d' H₂O.

-Polymérisation et précipitation des sondes ARN.

Tous les inserts géniques sont orientés dans le même sens dans le vecteur donc les sondes antisens sont obtenues à partir des plasmides linéarisés par EcoRV grâce à l'ARN polymérase synthétisant l'ARN à partir du promoteur Sp6 (=Sp6 polymérase [15 U/µl]). Les sondes sens sont obtenues par polymérisation de la T7 polymérase qui fonctionne sur l'ADN digéré par SacI. La polymérisation se fait dans le mélange réactionnel suivant en respectant l'ordre indiqué des produits: 8 µl tampon 5X + 4 µl de DTT + 1 µl Rnasine [40 U/µl] + 4 µl Dig Mix contenant de l'UTP marqué à la digoxygénine + 20 µl ADN (= 3µg) + 2.5 µl ARN polymérase. Les eppendorfs sont mis 1h 30 à 37°C puis 1 µl d'ARN polymérase est ajouté et les tubes sont remis une heure à 37°C. Ensuite, les tubes sont transférés 10 minutes à 65°C puis 3 µl de Dnase RQ1 de Proméga [1 U/µL] sont rajoutés et les tubes sont laissés à 37°C pendant 1 h. L'étape suivante consiste en une précipitation au chlorure de lithium (LiCl) : 157 µl H₂O puis 20 µl LiCl (1/10^{ième} du volume) et 600 µl d'éthanol 100 % (3V/V) sont rajoutés. Le tout est placé à -80°C pendant 30 minutes. Après une centrifugation de 20 minutes à 14000 g et deux rinçages à l'éthanol 75 % une nouvelle précipitation au LiCl, à l'éthanol 100 % et 75 % est réalisée. Les culots sont repris dans 49 µl d' H₂O + 1 µl RNasine + 2.5 µl SDS.

6 PCR en temps réel (Fig 2 et 3).

Les échantillons d'ADNc issus de la retro-transcription ont été traités à la DNase (SIGMA AMP-D1) et la PCR en temps réel a été réalisée sur un appareil iCycler iQTM (Bio-Rad). Pour

Tableau 2: Séquences des amorces utilisées lors des PCR en temps réel.

Gène	Amorce sens (5' → 3')	Amorce antisens (5' → 3')	Taille de l'amplicon (nt)
GAPDH	GAGGTCAAGGTTGAGGGTGA	CCAGTGGACTCAACCACGTA	125
RAR α	CTGGTAGAGTGGGCCAAGAG	GTTCTGTGAGCACCCCTGTCA	223
RAR γ	CGCTAAACCGAACCCAGA	CTTCTCGGCCTGTTCCAA	170
RXR α	GCAAAGCTCACCAAGAGACC	GCGTAGTGAAGCCTGGTAGC	180
IGF-I	GTCTTGGCAGGTGCACAGCA	ACACGCTGCAGTTTGTGTGT	157
BMP4	CTGCTCTCTCCGCTGAACT	GGCTCACATCAAAGCTCTCC	205

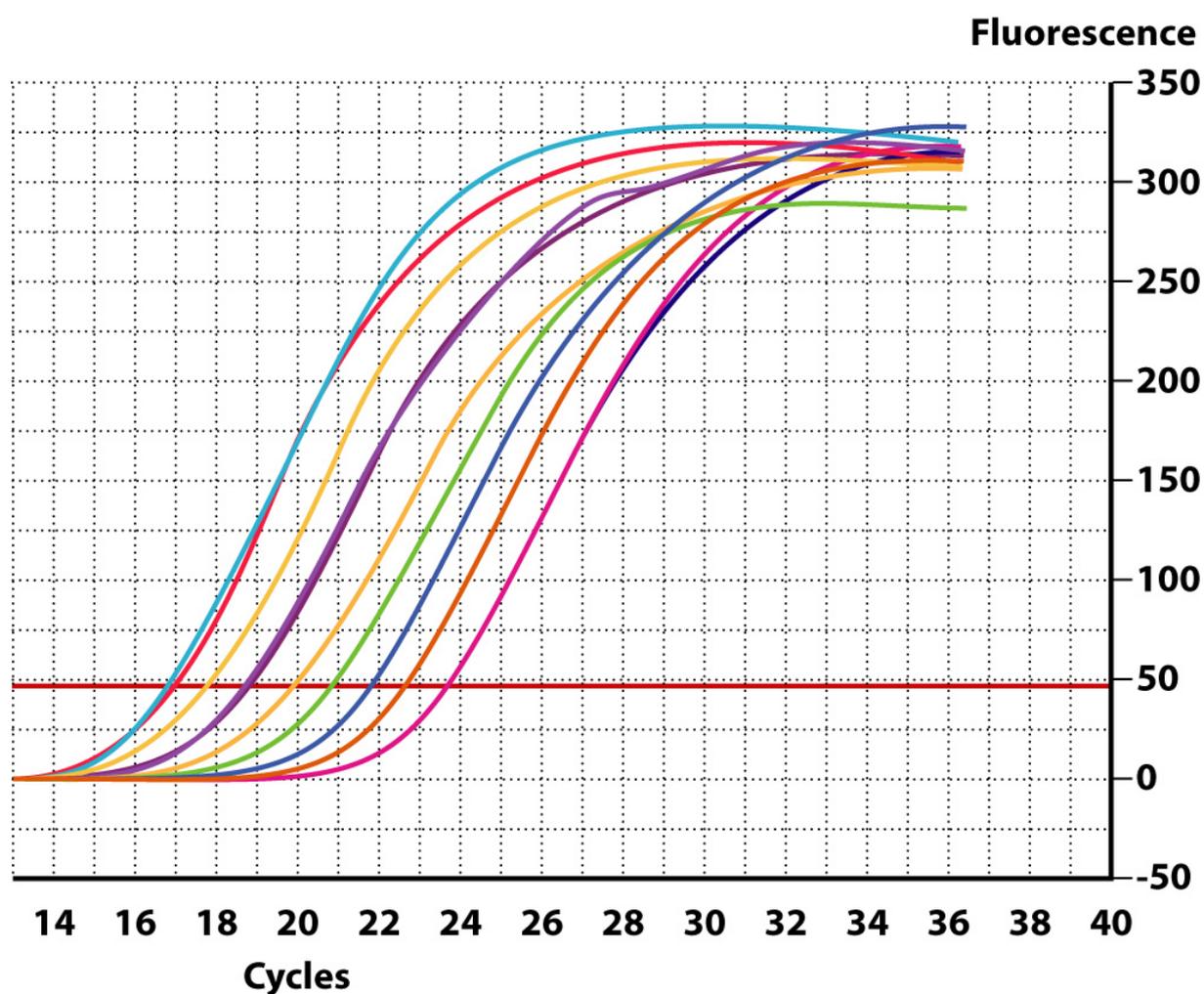


Figure 2. Courbes de PCR en temps réel.

chaque gène étudié, les analyses de PCR quantitative ont été faites dans un volume total de 15 μL contenant 5 μL ADNc (dilution: 10^{-3}), 1.5 μL fluorescéine (100 nmol/L, Bio-Rad), 0.5 μL amorces (10 $\mu\text{mol/L}$), 7.5 μL QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 2X (Qiagen GmbH, Allemagne). Les amorces sens et antisens spécifiques de chacun des gènes ont été déterminées dans les séquences précédemment clonées et séquencées, leur séquence est indiquée dans le tableau 2. L'étape initiale de la PCR en temps réel consiste à une incubation de 13.5 min à 95°C qui active l'ADN polymérase HotStartTaqTM. Cette incubation est suivie de 45 cycles de PCR. Chaque cycle comprend une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C et une phase d'hybridation/élongation de 1 minute à 60°C . Les valeurs de CT (cycle treshold, cycle seuil) correspondent au nombre de cycles où l'émission de fluorescence mesurée en temps réel dépasse la limite seuil. L'analyse des courbes de fusion et le séquençage des produits synthétisés au cours de la PCR (MilleGen, Labège, France) a permis de vérifier que seul un amplicon est amplifié. Les courbes standard de chaque gène ont été tracées en reliant les valeurs de CT au \log_{10} de 5 dilutions différentes (réalisées en triplicat) des échantillons d'ADNc. L'efficacité (E) de la PCR en temps réel pour chaque gène a été déterminée à partir de la pente des droites donnée par le logiciel BIORAD selon l'équation: $E = 10^{(-1/\text{pente})}$. Le rapport de l'expression relative des gènes a été calculé en utilisant le logiciel REST© (<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/>). Le rapport est basé sur l'efficacité de PCR et sur le CT d'un échantillon par rapport au contrôle et est exprimé par rapport au gène référence (GAPDH), selon le modèle mathématique de Pfaffl (Pfaffl, 2001): Ce rapport exprime le facteur d'expression du gène étudié.

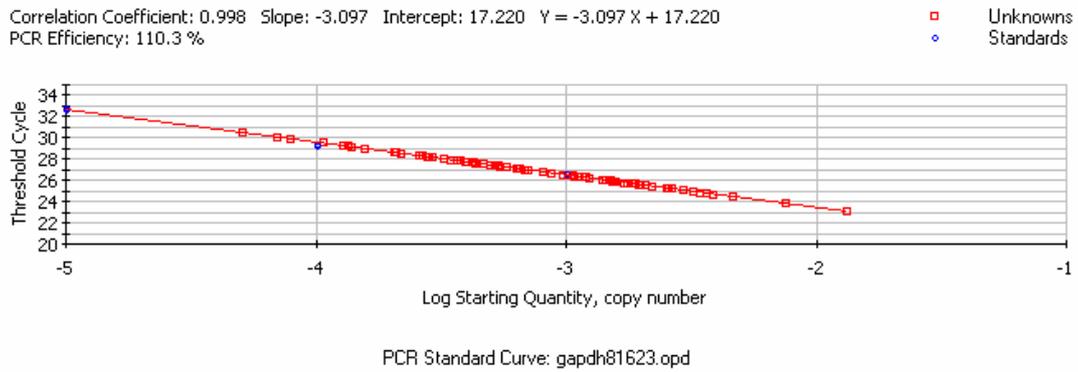
$$\text{Rapport} = \frac{[(E_{\text{gène}})^{\Delta\text{CTgène}(\text{contrôle-échantillon})}]}{[(E_{\text{GAPDH}})^{\Delta\text{CTGAPDH}(\text{contrôle-échantillon})}]}$$

La normalisation relative par rapport à la GAPDH permet de réaliser des études comparatives de l'expression des gènes étant donné que l'expression de ce gène référence est constante au cours de la différenciation et de la prolifération cellulaires (Gauze & Adamovicz, 1994).

7. Hybridations.

Les sondes ARN sont synthétisées en présence de dUTP marqué à la digoxygénine. Des anticorps anti-digoxygénine liés à une enzyme, la phosphatase alcaline, sont ajoutés au cours des hybridations et vont se fixer sur les ARN marqués. Le substrat de l'enzyme est alors mis au contact des coupes ou des larves entières et lors de sa dégradation par la phosphatase alcaline une coloration bleue apparaît. Seules les sondes hybridées seront révélées car les autres sont éliminées par lavage.

(a)



(b)

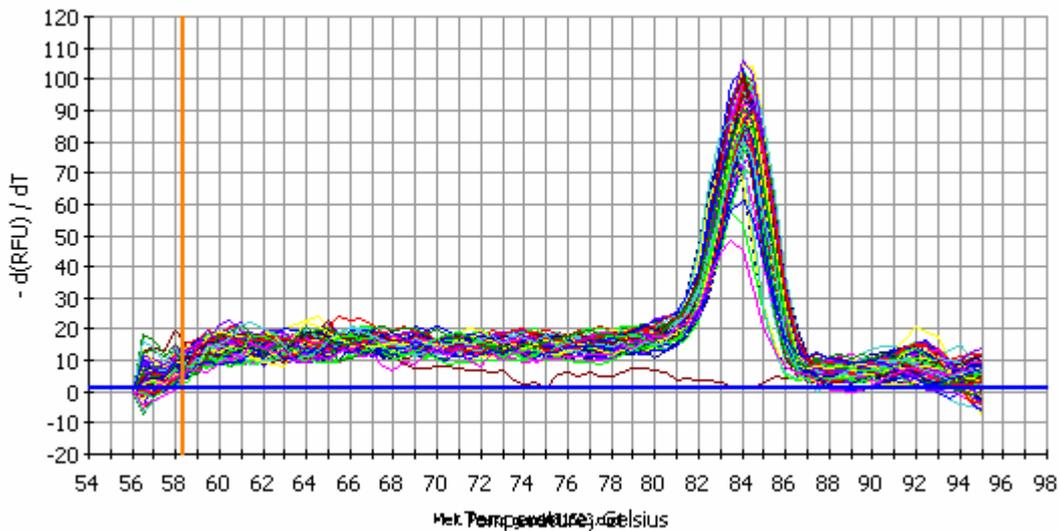


Figure 3. (a) Gamme étalon obtenue à partir de différentes dilutions (de 10^{-2} à 10^{-4}) d'ADNc pour le gène référence GAPDH. L'efficacité de PCR est de 99.8%. (b) Courbe de fusion après amplification de la GAPDH (40 cycles) sur différents échantillons d'ADNc. Les variations de fluorescence ont été exprimées en fonction de la température ($-dRFU/dT$).

7.1 Hybridation *in situ* sur coupes

La composition des solutions utilisées est donnée dans le tableau 3.

Les larves ont été fixées dans du PBS contenant du PAF 4%, rincées deux fois en PBS puis conservées à -20°C dans du méthanol. Elles ont ensuite été mises en éthanol puis dans du paraplast. Les coupes proviennent des blocs de paraplast et sont montées sur des lames super gold. Le séchage des coupes se fait dans une étuve à 37°C pendant 48h. La première étape est de déparaffiner les coupes et de les préparer pour l'hybridation. Elles sont placées 30 minutes à l'étuve à 60°C puis mises dans du toluène 3 x 3 minutes. Les bains suivants contiennent de l'éthanol en proportions décroissantes avec de l'eau stérile (éthanol 100 % puis 95 %, 70 %, 50 % et 30 %), chaque bain dure 3 minutes, les trois premiers étant faits deux fois. Les coupes sont ensuite laissées quelques minutes dans du NaCl 9 ‰ stérile et surfixées par paraformaldéhyde 4% en PBS 1X 20 minutes à température ambiante. Suivent deux rinçages en PBS 1X de 5 minutes et un bain de 7 minutes à 37°C dans du tampon Tris/ CaCl_2 (20 mM Tris/HCl à pH 7.4, 2 mM CaCl_2) contenant de la protéinase K (PK) [1 $\mu\text{g}/\text{ml}$]. On rince rapidement en H_2O à 4°C et on transfère dans un tampon triéthanolamine 5 minutes à température ambiante. Les coupes passent ensuite dans un bain de 5 minutes de tampon triéthanolamine contenant de l'anhydride acétique (1.25 $\mu\text{l}/1$ ml de tampon), le tout est placé sous agitation. Les lames sont rincées en PBS 5 minutes puis refixées 15 min dans du PAF 4% et à nouveau rincées en PBS trois fois 5 minutes. Le tampon de préhybridation HYBE contenant l'ARNt dénaturé [500 $\mu\text{g}/\text{ml}$] et le chaps [0.1 %] est préchauffé à 60°C . Le chaps (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) est un détergent non dénaturant qui casse les interactions protéines-protéines et solubilise les protéines membranaires. Les coupes sont mises à plat dans une boîte humide qui contient une solution SSC 5X de façon à ne pas tremper dans le liquide puis 150 μl de tampon de préhybridation sont déposés sur chacune d'elles, la boîte est alors placée à 60°C pendant 15 minutes. Puis, les lames sont égouttées et 40 à 50 μl de tampon d'hybridation contenant les sondes (100 ng/ ml de HYBE) sont déposés sur les lames, l'hybridation se fait alors à 60°C pendant une nuit. Le lendemain les lames sont mises brièvement dans une solution de SSC 2X + 0.1 % chaps à 60°C puis successivement dans du SSC 2X contenant 50 % de formamide + 0.1 % chaps pendant 30 min à 60°C , du SSC 2X + 0.1 % chaps pendant 30 min à 37°C et dans une solution SSC 0.2X + 0.1 % chaps de 30 minutes à 37°C . Ensuite, on réalise deux rinçages en SSC 0.2X puis deux autres en 50 % SSC 0.2X + 50 % TN et deux en TN à température

Tableau 3: Composition des solutions utilisées lors des hybridations.

Solution	Composition
Tampon d'hybridation HYBE	5 ml formamide, 2,5 ml SSC 20X, 200 µl Denhart 50X, 10 µl Tween 20, 5 µl héparine [100 mg/ml], 0,1% Chaps, 50 µl ARNt [100mg/ml], qsp H ₂ O
Blocking solution	200 µl sérum de mouton, 20 mg Bovin Serum Albumin, qsp TNT
TNT (Tris/ NaCl/ Tween 20)	100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20
Tampon chromogène	1 ml Tris-HCl 1M pH 9,5, 500 µl MgCl ₂ 1M, 1 ml NaCl 1M, 10 µl Tween 20, 10 µl lévamisol 1M
SSC 20X (1 l)	175 g NaCl 3M, 88 g citrate Na ₃ -2H ₂ O, le pH est ajusté à pH 7 avec du HCl 1M, qsp H ₂ O
SSCT 20X (1 l)	175 g NaCl 3M, 88 g citrate Na ₃ -2H ₂ O, le pH est ajusté à pH 7 avec du HCl 1M, 1 ml Tween 20, qsp H ₂ O
PBS 10X (1 l)	90 g NaCl, 23.88 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O, 5,2 g NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O, qsp H ₂ O, ajuster le pH à 7,3
PBST 10X (1 l)	80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O, 2 g KH ₂ PO ₄ , 1 ml Tween 20, qsp H ₂ O
Denhardt 100X (500 ml)	10 g Ficoll 400, 10 g polyvinylpyrrolidone, 10 g Bovin Serum Albumin, qsp H ₂ O

ambiante, chacun durant 5 min. Les lames sont égouttées et incubées en blocking solution 1 heure à température ambiante. Cette solution est remplacée par la blocking solution contenant l'anticorps dilué au 1/2500 et on incube 2 h. Une série de rinçages est ensuite réalisée: 3 x 5 min en TN, 45 min en TN + 1mM lévamisol, 2 x 5 min en tampon chromogène + 1 mM lévamisol. Les lames sont égouttées et 200 µl de BM Purple (Boehringer) + 1mM lévamisol sont déposés dessus, on laisse ensuite monter la coloration à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée avec du Tris HCl pH 7.5 10 mM + EDTA 10 mM en 15 min. Puis, deux rinçages en PBST de 5 min sont faits, les lames sont refixées avec du PAF 4 % dans du PBS pendant 2 heures à température ambiante et rincées en PBS 2 x 15 minutes. Elles sont ensuite passées progressivement en glycérol (glycérol 30 % /PBS 70 %, glycérol 50 %/ PBS 50 %, glycérol 70 %/ PBS 30 %, glycérol 90 %/ PBS 10 % et glycérol 100 %) en les laissant 30 min dans chaque bain , elles sont conservées à -20°C.

7.2 Hybridation *in situ* in toto.

Les larves utilisées étaient au stade J5. Les tampon PBS, TN et SSC contiennent parfois du tween (PBST, TNT, SSCT) qui permet de perméabiliser les larves et favorise la pénétration des sondes au sein des tissus. La composition des solutions utilisées est donnée dans le tableau 3.

Les larves conservées dans du méthanol pur sont d'abord réhydratées par différents bains. Les trois premiers bains, de 5 min chacun, contiennent du méthanol et du PBS 1X en quantités variables (75% MeOH + 25% PBS, 50% MeOH + 50% PBS, 25% MeOH + 75% PBS). Ils sont suivis de quatre lavages de 5 min dans du PBST. De la Protéinase K [10 mg/ml] favorisant l'accessibilité des sondes à leur cible par digestion des protéines environnantes est diluée dans du PBST pour l'obtenir à [10 µg/ml] et les larves sont mises dans ce bain pendant 1h. Elles sont ensuite rincées dans du PBST puis fixées pendant 20 min dans du paraformaldéhyde (PAF) 4% dans du PBS et rincées par deux bains de PBST de 10 min et un bain rapide d'eau. Par la suite, on procède à deux bains de 5 min : 1/du tampon triéthanolamine seul puis 2/additionné de 2,5 µl d'anhydride acétique par ml de tampon triéthanolamine et les larves subissent une agitation rapide pendant 10 min. Elles sont rincées deux fois 5 min dans une solution PBST. Les larves sont ensuite préhybridées en tampon HYBE + chaps [0,1%] + ARNt dénaturé [500 µg/ml] (dénaturation: 7 min à 100°C puis refroidissement sur glace) dans une étuve à 60°C pendant 2 à 4 h. Les ARNt permettent de bloquer les sites non spécifiques au niveau des nucléotides. Les sondes sont dénaturées 5 min

à 70°C puis transférées sur glace, cette dénaturation permettant d'éviter la formation de structures secondaires (repliement de la sonde). 100 ng de sonde sont utilisés pour 1 ml d'HYBE pour la phase d'hybridation. Les sondes sont mises à 60°C dans l'HYBE 10 à 15 min puis les larves sont ajoutées et laissées en hybridation pendant une nuit. Le lendemain, les larves subissent plusieurs rinçages stringents: un rinçage rapide en HYBE, un rinçage dans 50% HYBE + 50% SSCT 2X + 0,3% chaps pendant 15 min à 60°C, un rinçage en 50% formamide + 50% SSCT 2X + 0,3% chaps pendant 15 min à 60°C, un rinçage en SSCT 2X + 0,3% chaps pendant 2 × 15 min à 60°C, un rinçage en SSCT 0,2X + 0,3% chaps pendant 2 × 20 min à 55°C et un rinçage en SSCT 0,2X à température ambiante pendant 10 min. Les bains suivants, de 5 min chacun, se font en tampon TNT à température ambiante: le premier est en 50% SSCT 0,2X + 50% TNT et les deux derniers en TNT. Les larves sont ensuite pré-incubées dans la blocking solution à 4°C pendant au moins 1 h. Au préalable, une solution d'anticorps anti-digoxygénine a été préparée: 1 µl d'anticorps + 2,5 ml de blocking solution + une vingtaine de larves a été mise à 4°C pendant une nuit afin d'épuiser l'anticorps dilué au 1/500^{ième}. Après centrifugation courte à 14000g et à 4°C, le surnageant est prélevé et dilué au 1/2500^{ième}. Les larves sont alors transférées dans ce surnageant et mises sous agitation pendant 4 h. Les anticorps en excès sont éliminés par des rinçages dans la blocking solution à température ambiante et sous agitation. Le premier bain, rapide, est suivi de 6 bains de 30 min. Par la suite, les larves sont lavées 3 × 5 min dans le tampon chromogène. La dernière étape est la coloration des échantillons qui se fait dans du BM PURPLE (Boehringer) + lévamisole 1mM à l'abri de la lumière, sous agitation et à température ambiante. Le lévamisole inhibe les phosphatases alcalines endogènes. La révélation se fait après 24 h au moins et la réaction est stoppée avec du tris HCl pH 7,5 10 mM + EDTA 10 mM en 15 min. Deux rinçages de 5 min en PBST sont ensuite faits, les larves sont fixées à nouveau dans du PAF 4% dans du PBS pendant 2 h à température ambiante et rincées en PBS 2 × 15 min. Elles sont ensuite passées progressivement en glycérol (30% glycérol/70% PBS, 50% glycérol/50% PBS, 70% glycérol/30% PBS, 90% glycérol/10% PBS et 100% glycérol) en les laissant 30 min dans chaque bain et conservées à -20°C.

8. Histologie

Les larves sont déshydratées par une série de bains d'éthanol (70% EtOH/30% H₂O, 80% EtOH/20% H₂O, 90% EtOH/10% H₂O, 100% EtOH) et un bain de xylène. Elles sont ensuite incluses dans la paraffine et des coupes de 5 à 7 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome. Les coupes sont colorées avec de l'hématoxiline et de l'éosine. Le xylène éliminant les lipides dans les cellules, l'espace occupé par ces lipides reste vide et n'est pas coloré.

9. Analyses statistiques

Les résultats sont donnés avec la moyenne ± écart-type. L'homogénéité des variances a été vérifiée par le test de Barlett. La croissance, les activités spécifiques des enzymes et la sécrétion trypsique transformée par arcsinus ($x^{1/2}$) ont été comparées avec une analyse de variance ANOVA à une voie suivie d'un test de Newman Keuls quand des différences significatives apparaissaient ($P < 0.05$). Les différences statistiques dans l'expression des gènes entre le contrôle et les échantillons ont été évaluées par un test de permutations aléatoires du logiciel REST© dans lequel 2000 répartitions aléatoires sont faites et les différences significatives sont déterminées à $P = 0.05$ (Pfaffl et al, 2002).

CHAPITRE III

**Effet de différents taux alimentaires de
rétinol *tout-trans* sur l'expression des
récepteurs $RAR\alpha$, $RAR\gamma$ et $RXR\alpha$ et le
développement des larves de bar
(*Dicentrarchus labrax*).**

1. Introduction.

Au cours des premières semaines de leur vie, les poissons marins subissent des changements morphologiques et physiologiques pour acquérir leurs caractères d'adultes. Le développement normal des larves peut être affecté par différents facteurs, dont les nutriments (Cahu et al., 2003). L'ingestion d'un aliment inadapté aux besoins des larves peut retarder, voire empêcher, la séquence génétiquement programmée du développement, dont la mise en place du squelette et la maturation intestinale (Dedi et al., 1997 ; Zambonino et al., 1997 ; Reifen et al., 1998 ; Haga et al., 2003). Jusqu'à présent, en l'absence d'un aliment inerte composé, les larves étaient nourries avec des proies vivantes qui ne permettaient pas de déterminer les besoins nutritionnels des larves selon des approches nutritionnelles classiques. Le développement récent d'un aliment composé adapté permet d'étudier l'influence de la nature, de la forme moléculaire et du taux des nutriments.

Il existe une relation étroite entre la nutrition des très jeunes larves et l'apparition de malformations (Zambonino Infante et al., 1997, 1999) car, les gènes impliqués dans ces processus de morphogenèse peuvent être modulés par les nutriments (Krumlauf, 1994; Suzuki et al., 2000; Balmer & Blomhoff, 2002). D'une façon générale, les poissons marins éclosent à un stade de développement plus précoce que les autres vertébrés, suggérant que les séquences spatio-temporelles du développement squelettique des téléostéens diffèrent de celles des vertébrés supérieurs (Haga et al., 2002). Les poissons marins permettent donc d'étudier les mécanismes moléculaires influencés par la nutrition et impliqués dans l'apparition de malformations pendant les stades précoces de la morphogenèse.

Afin d'étudier cette relation entre nutriments et malformations, nous avons choisi de nous intéresser à la vitamine A (ou rétinol) dont les effets tératogènes sont connus chez les vertébrés (Ross et al., 2000). Cette vitamine et ses dérivés (les rétinoïdes) jouent un rôle important dans plusieurs processus biologiques, dont la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire et la morphogenèse (Wolf, 1984). Plusieurs études ont montré qu'un excès ou un manque de vitamine A interfère avec les processus normaux de développement, que ce soit chez les mammifères (Cohlan, 1953), les oiseaux (Lee et al., 2001), les amphibiens (Minucci et al., 1996) ou les poissons (Dedi et al., 1997). Les rétinoïdes agissent grâce à deux types de récepteurs: les RAR et les RXR, qui existent chacun sous trois isoformes (α , β et γ)

Tableau 1 : Composition des aliments (g/kg).

Ingrédients	RA0	RA10	RA50	RA250	RA1000
Farine de poisson ¹			579		
CPSP G ²			140		
Lécithine de soja ³			151		
Vitamines ⁴ (sans rétinol)			80		
Minéraux ⁵			40		
rétino (<i>tout-trans</i>) en %	0	0.016	0.080	0.400	1.600
Bétaïne			10		
			%		
Composition					
Protéines (Nx6.25)			53.0		
Lipides			18.1		
Cendres			11.5		
Matière sèche			90.0		
Energie (J/kg)			1567		

¹: 95,7% de matière sèche, 78,9% de protéines, 11,3% de lipides.

²: Concentré Protéique Soluble de Poissons Gras Sopropêche ; 97,4% de matière sèche, 72% de protéines, 14% de lipides.

³: 95,7% de matière sèche, 76% de phospholipides

⁴: par kg de mélange vitaminé: concentrat de choline 50% 200 g, vitamine E (500 UI/g) 10 g, vitamine D3 (500000 UI/g) 500 mg, vitamine B3 1 g, vitamine B5 2 g, vitamine B1 100 mg, vitamine B2 400 mg, vitamine B6 300 mg, vitamine C 20 g, vitamine B9 100 mg, concentrat de vitamine B12 (1g/kg) 1g, biotine 1 g, vitamine K3 1g, meso-inositol 30 g, cellulose 732.1 g.

⁵ par kg de mélange minéral : KCl 90 g, KI₄O 40 mg, CaHPO₄ 2H₂O 500 g, NaCl 40 g, CuSO₄ 5H₂O 3 g, ZnSO₄ 7H₂O 4 g, CoSO₄ 7H₂O 20 mg, FeSO₄ 7H₂O 20 g, MnSO₄ H₂O 3g, CaCO₃ 215 g, MgSO₄ 7H₂O 124 g, NaF 1g.

(Ross et al., 2000). Ces récepteurs contrôlent, de façon directe ou indirecte, environ 500 gènes (Balmer & Blomhoff, 2002) dont certains sont impliqués dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur, tels que les gènes Hox (Krumlauf, 1994). D'autres familles de gènes, dont les BMP et IGF-I, régissent l'ostéogenèse, la morphogenèse du squelette. Chez les vertébrés, les BMP régulent la prolifération, la détermination et la différenciation cellulaires ainsi que la morphogenèse et l'apoptose (Hogan, 1996). IGF-I est un agent mitogène agissant sur la croissance, la différenciation osseuse, musculaire et cartilagineuse (Zizola et al., 2002). Les voies de signalisation décrites ci-dessus sont bien connues chez les vertébrés supérieurs mais, chez les poissons marins, nous ne savons pas si ces voies sont fonctionnelles et si elles peuvent être modulées par la nutrition.

Le but de ce travail était :

- 1) d'évaluer les effets de différentes doses de vitamine A dans l'aliment sur la qualité des larves (croissance, maturation intestinale et incidence des malformations squelettiques),
- 2) d'affiner les besoins nutritionnels des larves pour ce nutriment,
- 3) d'étudier l'impact de la vitamine A sur l'expression de gènes du développement chez les larves de bar.

2. Matériel et méthodes.

Des larves de bar âgées de 3 jours ont été réparties dans 15 bacs cylindroconiques d'une contenance de 35 L avec une densité initiale de 60 larves/L. A partir de J7, elles ont été nourries avec 5 aliments (3 bacs par condition expérimentale ; tableau 1) contenant un gradient d'acétate de rétinol tout-trans (RA). Les aliments (RA0, RA10, RA50, RA250 et RA1000) contenaient respectivement 0, 0.01, 0.05, 0.25 et 1 g RA/kg de matière sèche (MS). Le lot nourri avec le régime RA50 était considéré comme le groupe contrôle. A J42, les larves ont été transférées dans des bacs de 700 L et nourries jusqu'à J87 avec un aliment commercial identique.

Au cours de cette étude nous avons suivi différents paramètres:

- zootechniques: croissance, survie relative, malformations,

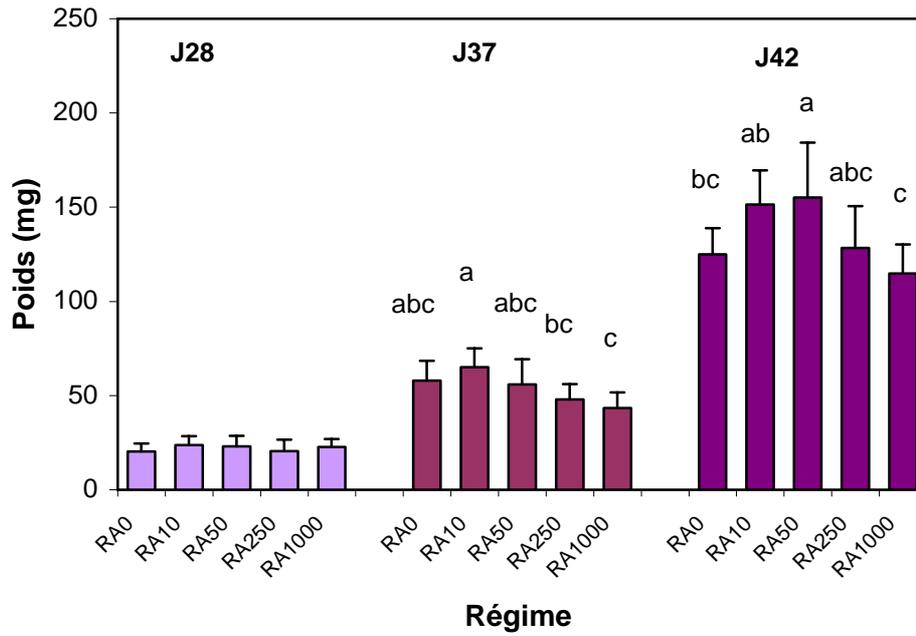


Figure 1. Poids des larves nourries avec les différents aliments expérimentaux à J28, J37 et J42. Les moyennes \pm ET (n=3) affectées de lettres différentes pour une même date sont significativement différentes ($P < 0.05$).

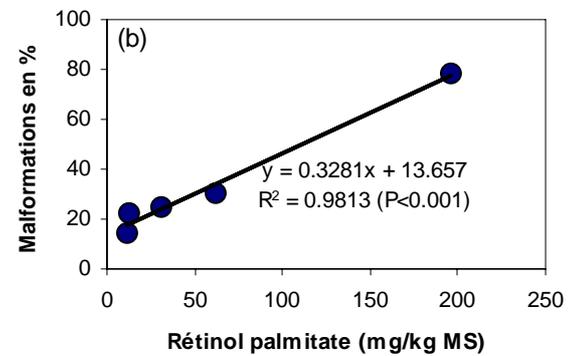
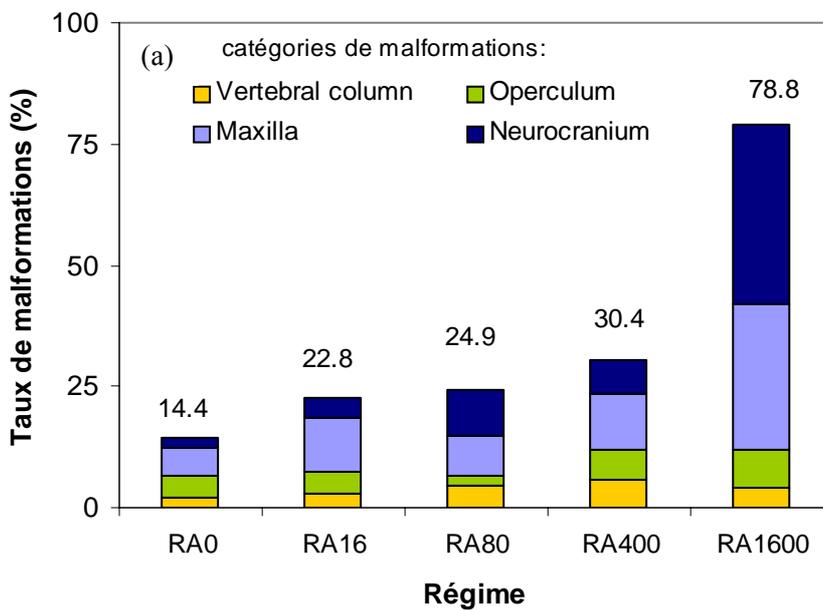


Figure 2. (a) Taux de malformations squelettiques en fonction du régime à J87. (b) Corrélation linéaire entre le taux de rétinol palmitate dans les larves de bar à J42 et le pourcentage de malformations.

- biochimiques: mesure du rétinol dans les larves et les aliments et du rétinol palmitate dans les larves,
- enzymatiques: mesure de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline, de l'aminopeptidase-N, de la maltase, mesure de la sécrétion trypsique,
- moléculaires: effet du développement sur l'expression des gènes d'intérêt dans le groupe contrôle et effet des aliments sur l'expression de ces mêmes gènes.

3. Résultats.

3.1 Croissance et survie.

Au début de la période d'alimentation exogène (J9), le poids moyen des larves était de 0.8 ± 0.05 mg. Les premières différences significatives de croissance ont été observées à J37. Les poissons nourris avec les aliments RA0, RA10 et RA50 présentaient les plus fortes croissances (Fig. 1) alors que le groupe nourri avec RA1000 avait significativement la plus faible croissance ($P < 0.05$). A J42, le groupe contrôle (RA50) avait le poids le plus élevé en comparaison avec les groupes nourris avec les doses extrêmes (RA0 et RA1000, $P < 0.05$).

Les survies relatives étaient de 64.6, 113.1, 64.8 et 73.9% pour les larves ayant reçu respectivement les aliments RA0, RA10, RA250 et RA1000 en comparaison avec le groupe contrôle (RA50).

3.2 Malformations.

L'incidence des déformations squelettiques dans les juvéniles de bar (âge : 87 jours ; poids moyen : 4.4 ± 0.41 g) est représentée dans les figures 2a et 3. A J87, les malformations les plus fréquentes étaient localisées dans la région céphalique (mâchoires, opercule, crâne) des juvéniles, le groupe le plus affecté était celui nourri avec RA1000. Dans ce groupe, 78.8% des poissons étaient malformés contre 24.9% dans le groupe RA50. Nous avons également mis en évidence une relation linéaire (Fig. 2b) entre le taux de malformations des mâchoires et de l'opercule et le taux de rétinol dans les larves. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le taux d'acétate de rétinol dans les larves et le nombre de malformations de la colonne vertébrale. Le coefficient de corrélation entre concentration du rétinol palmitate des larves et l'incidence des malformations dans le splanchnocranium, le neurocrane et la colonne vertébrale est représenté dans le tableau 2.

Tableau 2 : Corrélation (coefficient de Pearson) entre le taux de rétinol palmitate dosé dans les larves de bar et le taux des différentes malformations squelettiques observées à J87.

Variable	Rétinol palmitate	
	r	P
Rétinol palmitate	1.000	0.000
Neurocrâne	0.955	0.003
Splanchnocranium	0.951	0.005
Opercule	0.992	0.004
Colonne vertébrale	0.386	0.579

3.3 Dosage du rétinol dans les aliments et dans les larves.

Le rétinol incorporé dans les aliments a été dosé : les aliments RA0, RA10, RA50, RA250 et RA1000 contenaient respectivement 12, 13, 31, 62 et 196 mg/kg MS.

A J42, il n'y avait aucune différence significative de la teneur de rétinol dans la larve entière, nourrie avec les aliments RA0, RA10, RA50 et RA250 ($18.2 \pm 1.93 \mu\text{g}/100\text{g}$). Ces valeurs de rétinol étaient significativement plus faibles (Fig. 4a) que celle observée pour le groupe RA1000 ($26.4 \pm 6.90 \mu\text{g}/100 \text{g}$; $P < 0.05$).

L'accumulation du rétinol palmitate dans les larves était dose-dépendante et atteignait un plateau à J15 (Fig. 4b). A J42, l'accumulation de rétinol palmitate était significativement plus élevée dans le groupe RA1000 par rapport aux 4 autres groupes (109.4 ± 32.20 vs $37.2 \pm 14.02\% \text{ g}/100 \text{ g}$; $P < 0.05$).

3.4 Activités enzymatiques.

Le taux d'acétate de rétinol influençait significativement le taux de **sécrétion trypsique** à J42 (Fig. 5). La plus forte valeur était observée dans le groupe RA50 ($54.6 \pm 2.99\%$) et la plus faible dans le groupe RA1000 ($40.7 \pm 2.89\%$, $P < 0.05$). Des valeurs intermédiaires du taux de sécrétion trypsique étaient mesurées dans les groupes RA0, RA10 et RA250.

Les aliments affectaient également l'activité de la **phosphatase alcaline**. A J28, son activité était 40% plus forte dans le groupe contrôle RA50 et le groupe RA250 (respectivement : 1254 ± 153.1 et $1262 \pm 85.7 \text{ mU}/\text{mg prot.}$) en comparaison avec le groupe RA0 ($549 \pm 47.1 \text{ mU}/\text{mg prot.}$). Des valeurs intermédiaires étaient obtenues dans les autres groupes. A la fin de la période d'élevage larvaire, aucune différence significative n'apparaissait (Fig. 6a, $P > 0.05$).

Les activités de l'**aminopeptidase-N** et de la **maltase** suivaient la même tendance que la phosphatase alcaline. A J28, les activités spécifiques de l'aminopeptidase (Fig. 6b) et de la maltase (Fig. 6c) étaient 50% plus faibles dans le groupe RA0 que dans les larves nourries avec l'aliment contrôle (respectivement : 140 ± 41.9 vs $284 \pm 33.4 \text{ mU}/\text{mg prot.}$ et 102 ± 24.7 vs $207 \pm 35.6 \text{ mU}/\text{mg prot.}$; $P < 0.05$). Les autres groupes présentaient des valeurs intermédiaires. A J42, aucune différence significative n'apparaissait entre les lots de poissons nourris avec les différents régimes ($P > 0.05$).

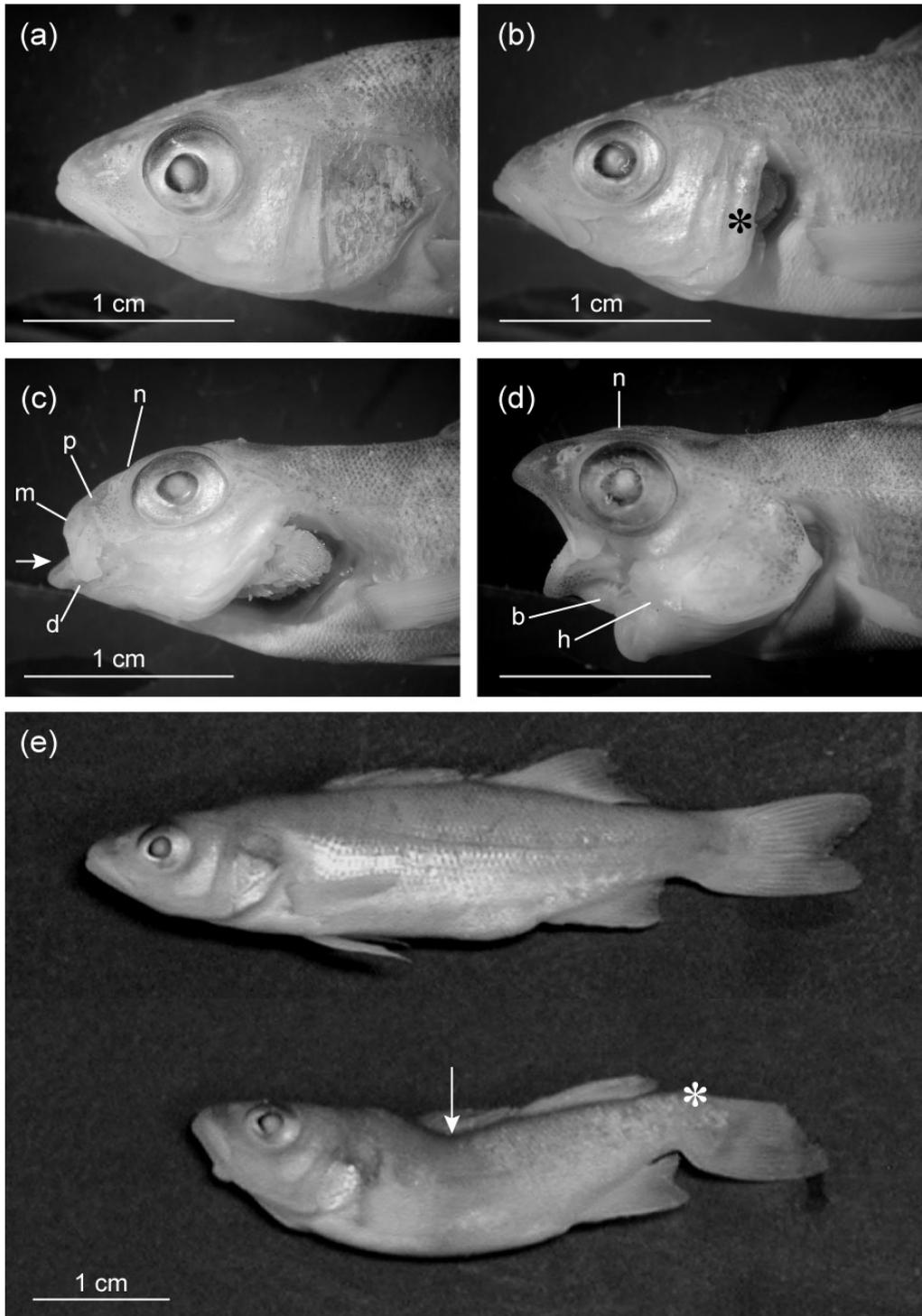


Figure 3. Malformations chez les juvéniles de bar. (a) Tête d'un poisson normal. (b) Poisson avec une malformation de l'opercule (astérisque). (c) Tête malformée avec un neurocrâne réduit (n) et des anomalies du splanchnocranium (prémaxillaire, pm ; maxillaire, m ; dentaire, d ; et opercule, o) provoquant une mâchoire prognathe (flèche). (d) Cartilages basibranchial (b) et hypohyal (h) déformé du splanchnocranium et neurocrâne malformé chez un poisson anormal. (e) Juvéniles de bar normal (en haut) et atteint de scoliose (en bas). La lordose et la cyphose sont respectivement indiquées par une flèche et un astérisque. Echelle : 1cm.

3.5 Effet du développement sur l'expression des gènes.

L'expression des gènes étudiés à J42 a été comparée à J10 pour les poissons nourris avec l'aliment RA50. A J42, l'expression de RAR α et RAR γ augmentait respectivement d'un facteur 7.27 (P<0.05) et 35.56 (P<0.05) alors que celle de RXR α diminuait d'un facteur 35.44 (P<0.05). L'expression de BMP4 et IGF-I ne variait pas au cours du temps.

3.6 Effet des aliments expérimentaux sur l'expression des gènes.

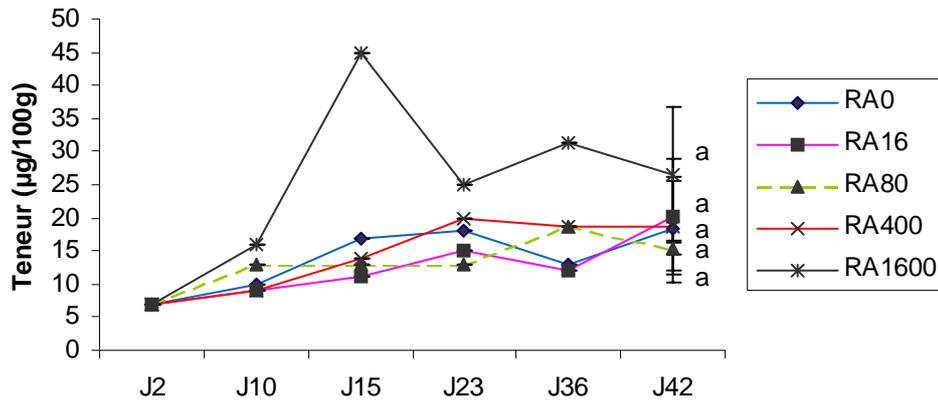
A J15, l'expression de IGF-I était plus faible (facteur d'expression: 1/5.6, P<0.01) dans le groupe RA0 par rapport au groupe contrôle alors qu'à J21, elle devenait plus forte (facteur d'expression: x5.8, P<0.05). A J21, cette augmentation était également observée pour RXR α (facteur d'expression: x4.4, P<0.05). A J42, seule l'expression de RAR γ était affectée dans les poissons nourris avec RA0, ce gène était régulé de façon positive avec un facteur 3 par rapport au groupe contrôle (P<0.01). Il est à noter que l'expression de RXR α était 5 fois plus forte dans le groupe RA0 par rapport au lot RA50, bien que cela ne soit pas significatif (P<0.07).

Dans le groupe RA1000, à J10, l'expression de RAR γ était 82.5 fois plus élevée que dans le groupe RA50. D'autres gènes étaient régulés de façon positive dans ce groupe, toujours en comparaison avec le groupe contrôle, à J15 (RAR α : x4.4, P<0.05), à J21 (IGF-I: x7.06, P<0.05) et à J42 (RXR α : x 8.26, P<0.05).

4. Discussion.

Les recommandations pour les besoins nutritionnels en vitamines des larves de poissons marins sont généralement basées sur des résultats obtenus chez des juvéniles d'espèces vivant en eau douce, telles que les salmonidés (NRC, 1993). La plupart du temps, ces besoins sont surestimés et ne conviennent pas aux larves de poissons marins, les aliments adaptés aux besoins des juvéniles induisant une forte mortalité et une faible croissance chez les larves (Cahu et al., 2003b). Les larves sont encore généralement nourries avec des proies vivantes, rotifères et *Artemia*, dans les éclosiers de poissons marins. Mais, la mise au point récente d'un aliment composé se substituant aux proies vivantes et assurant une bonne croissance et survie aux larves, permet d'étudier plus spécifiquement leurs besoins

Dosage du rétinol dans les larves



dosage du rétinol palmitate dans les larves

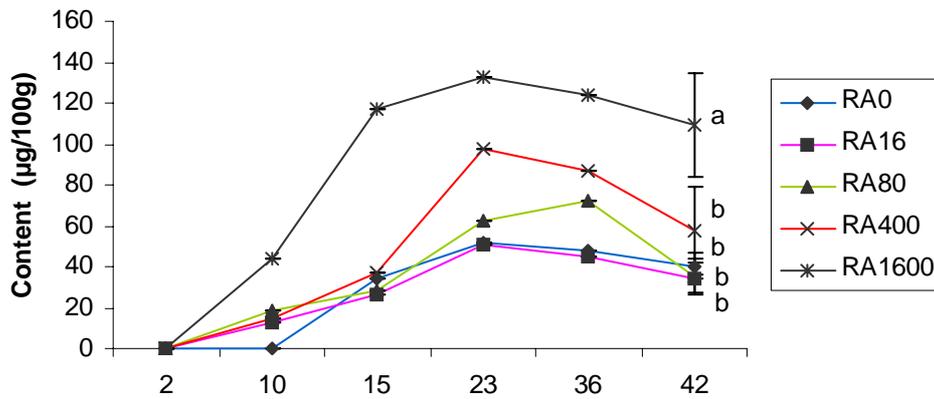


Figure 4. (a) Dosage du rétinol et (b) du rétinol palmitate dans les larves de bar à différentes dates. Les valeurs \pm ET (n=3) affectées de lettres différentes à J42 sont significativement différentes ($P < 0.05$).

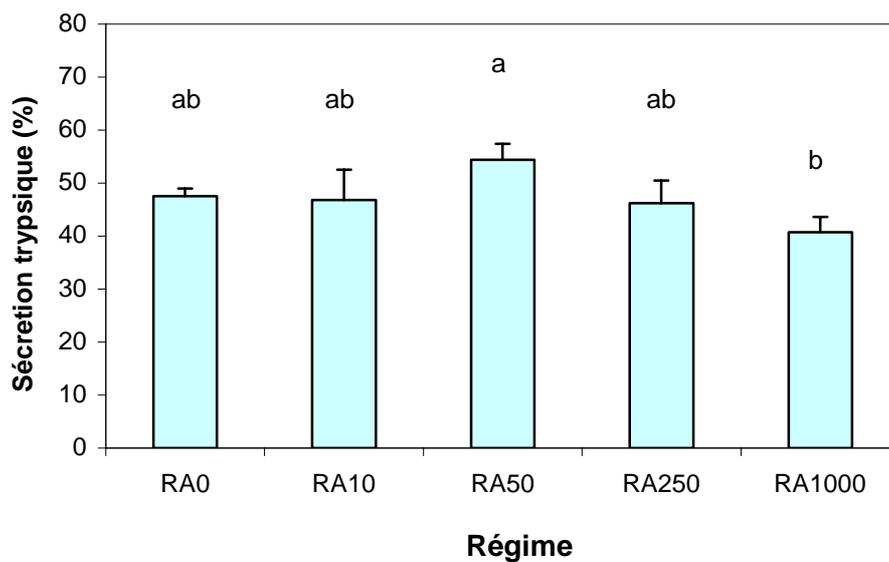


Figure 5. Dosage de la sécrétion de trypsine à J42 dans les larves de bar en fonction du régime. Les moyennes \pm ET (n=3) affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0.05$).

nutritionnels et en particulier les effets des nutriments pendant les très jeunes stades larvaires (les 3 premières semaines de vie).

Au cours de ce travail, nous avons considéré que l'aliment RA50 était un contrôle car sa composition était similaire à l'aliment qui permet une bonne croissance et une survie des larves (Cahu et al., 2003b). Les poissons nourris avec les aliments carencés (RA0) ou hypervitaminés (RA1000) avaient des poids 19 et 27% plus faibles que le groupe contrôle. Il a aussi été précédemment démontré chez le carrelet japonais (Dedi et al., 1997; Haga et al., 2003) et le saumon atlantique (Ørnsrud et al., 2002) que de très fortes doses de vitamine A diminuaient la croissance. Dans notre cas, le groupe RA1000 présentait un retard de croissance associé à une augmentation de la forme circulante (rétinol) et de la forme d'accumulation (rétinol palmitate) du rétinol, ce qui révélait probablement une hypervitaminose dans les larves de bar. Les poissons nourris avec l'aliment carencé présentaient aussi un retard de croissance. Normalement, une absence totale de vitamine A est létale mais cela n'a pas été observé dans notre expérience car une faible quantité de vitamine A a été apportée par la farine de poissons incorporée dans l'aliment. La survie relative des larves était également affectée par les aliments RA0 et RA1000.

Les enzymes pancréatiques et intestinales servent de marqueurs du développement des larves de poissons (Péres et al., 1998; Zambonino Infante et Cahu, 1999). Nous avons observé qu'un excès de rétinol (RA1000) diminuait la sécrétion trypsique. Cette diminution ne peut pas être attribuée aux aliments car ils étaient isoprotéiques et la nature des protéines était la même dans tous les aliments. Cette faible sécrétion trypsique pourrait être expliquée par un retard de maturation du pancréas (Cahu et Zambonino Infante, 2001). La différenciation du pancréas est sous le contrôle des hormones thyroïdiennes, dont les récepteurs peuvent former des dimères avec les RXR (Kobayashi et al., 2002). On peut donc supposer qu'un excès de vitamine A perturbe cette voie de signalisation cellulaire et affecte, par conséquent, la maturation du pancréas et ses fonctions sécrétoires.

Les larves de bar achèvent normalement le développement de leur tractus digestif vers la quatrième semaine de leur vie, ce qui se traduit par une activité importante au niveau de la bordure en brosse des entérocytes et par un déclin de la digestion cytosolique. Il a été démontré que la vitamine A peut interférer avec ce développement chez le poulet et le rat car elle joue sur la prolifération et la maturation des entérocytes (Reifen et al., 1998; Uni et al., 2000) en diminuant les activités des enzymes de la bordure en brosse. A J28, les poissons nourris avec RA0 présentaient la plus faible activité spécifique pour les trois enzymes de la bordure en brosse, ce qui traduit un retard de développement. La maturation de la bordure en

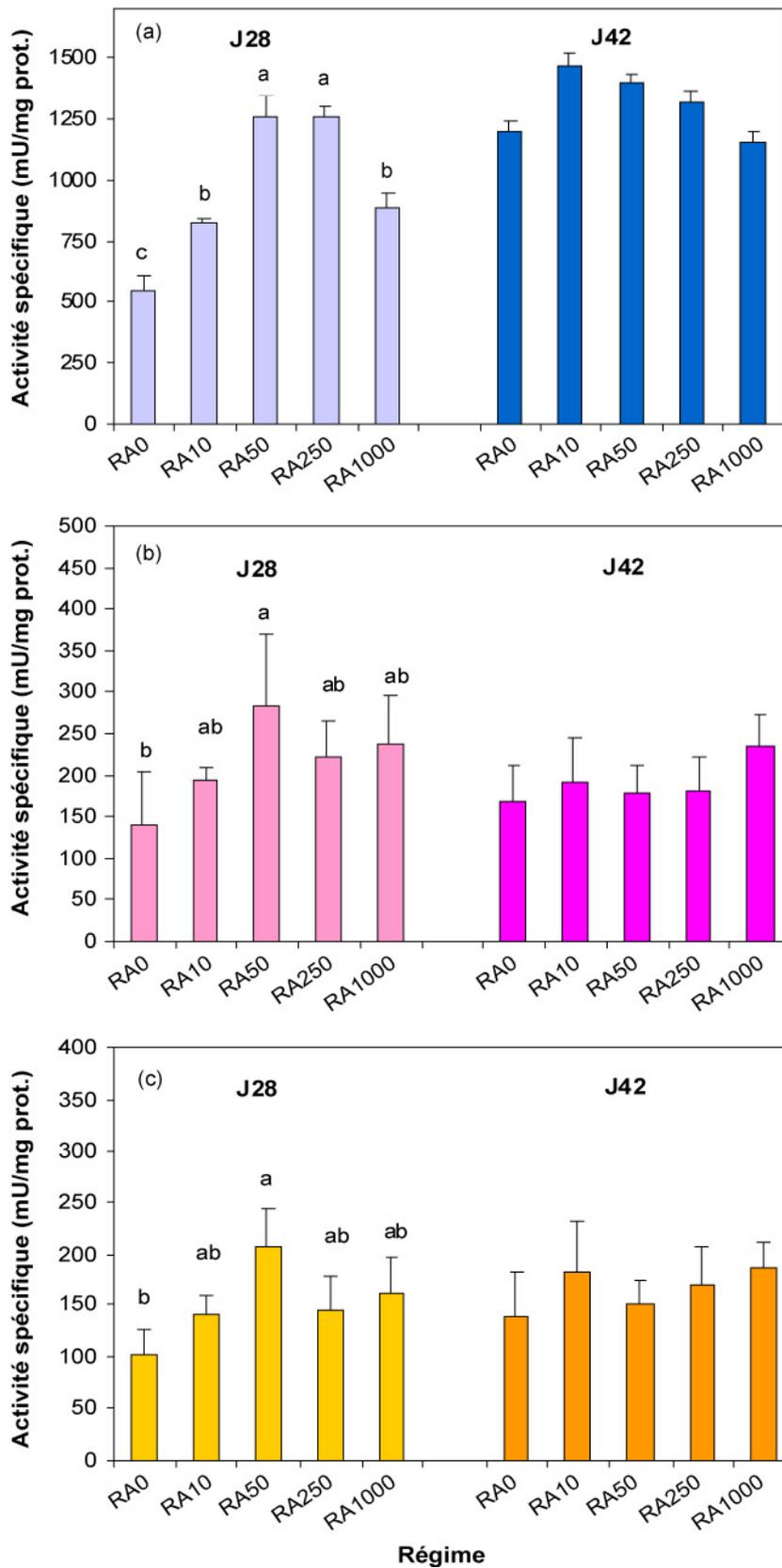


Figure 6. Activités spécifiques de la phosphatase alcaline (a), de l'aminopeptidase N (b) et de la maltase (c) de la bordure en brosse de l'intestin de larves de bat à J28 et J42. Les moyennes \pm ET (n=3) affectées de lettres différentes à une même date sont significativement différentes (P < 0.05).

brosse a normalement lieu entre J20 et J30 chez le bar et cette maturation est achevée à J42 (Zambonino Infante et Cahu, 1999). Si l'on considère les données obtenues pour la croissance et les activités enzymatiques, la dose optimale de vitamine A pour les larves de bar était d'environ 31 mg/kg MS. Cette dose est bien plus élevée que celle nécessaire aux juvéniles de salmonidés qui est de 0.75 mg/kg MS (NRC, 1993). Ce résultat semble donc indiquer que les besoins dépendent du stade de développement (Gouillou-Coustans et al., 1998), l'animal aurait des besoins importants en vitamine A pendant la période où les mécanismes de différenciation et de morphogenèse sont très intenses.

Les données bibliographiques indiquent que la vitamine A et ses dérivés sont essentiels pour le développement embryonnaire (Krumlauf, 1994) puisqu'ils contrôlent certains gènes impliqués dans la morphogenèse au travers de leurs récepteurs nucléaires, les RAR et les RXR. Ces gènes de la morphogenèse sont les gènes Hox (Joore et al., 1994 ; Krumlauf, 1994), shh (Helms et al., 1997), BMP (Yates et al., 2002) et IGF (Allan et al., 2003). Toute perturbation de ces voies géniques perturbe le développement normal et induit des anomalies telles que l'albinisme ou des déformations des mâchoires et de la colonne vertébrale (Haga et al., 2002, 2003). Il a été mis en évidence que les RAR, surtout l'isoforme γ , étaient plus impliqués que les RXR dans l'induction de ces malformations (Ross et al., 2000). Les RXR ont tout de même un rôle très important dans la voie de signalisation des rétinoïdes car les hétérodimères RAR/RXR sont les unités fonctionnelles de cette voie (Ross et al., 2000). Les larves nourries avec RA50 (groupe contrôle) présentaient une chute de l'expression de RXR α entre J10 et J42, suggérant un besoin important en récepteurs RXR α pendant les jeunes stades où les processus de différenciation sont intenses, puis, ce besoin chute lorsque les processus de différenciation cellulaire diminuent. Le groupe RA0 ne présentait pas de différence significative de l'expression des gènes par rapport au groupe RA50 jusqu'à J21. Ce résultat pourrait s'expliquer par la présence de rétinol d'origine maternelle dans le sac vitellin, qui atténuerait le manque de vitamine A pendant les jeunes stades de développement. A J21, l'expression de RXR α augmente de 6.75 fois, mais son rôle dans la médiation des effets tératogènes de la vitamine A est mineur, contrairement à RAR γ . Il est à noter que chez les larves du groupe RA0, l'expression de RAR γ ne varie pas avant J21, période après laquelle les larves ont déjà acquis la majeure partie de leurs caractères adultes. Ces résultats pourraient donc expliquer le faible pourcentage de poissons malformés dans le groupe RA0. Néanmoins, des variations significatives de l'expression d'IGF-I sont notées dans ce groupe à J15 (facteur d'expression: 1/5.6) et à J21 (facteur d'expression: x8.9). La variation d'IGF-I à J21 pourrait être liée à une déficience en vitamine A. Une chute

Expression normalisée des gènes: effet de l'âge (comparé à J21)

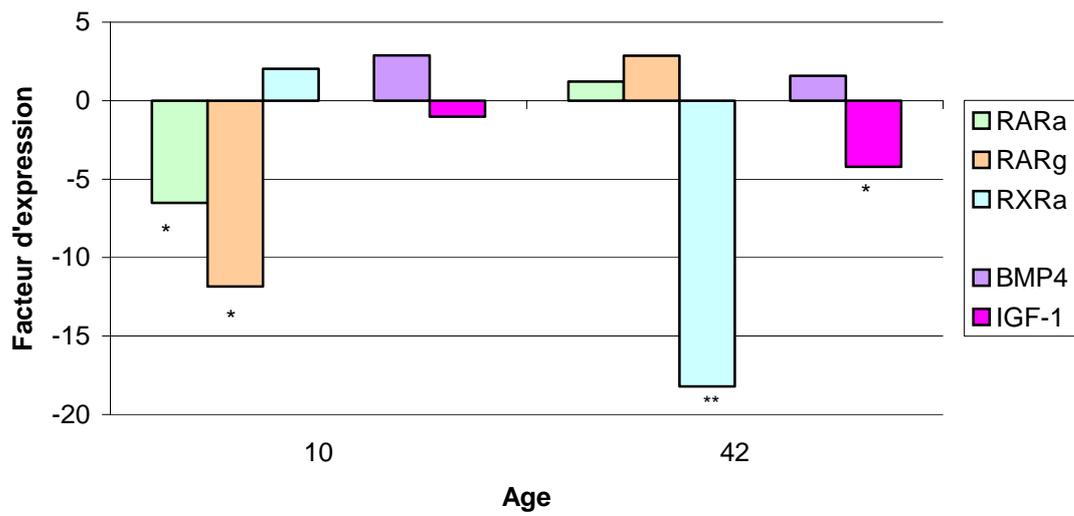
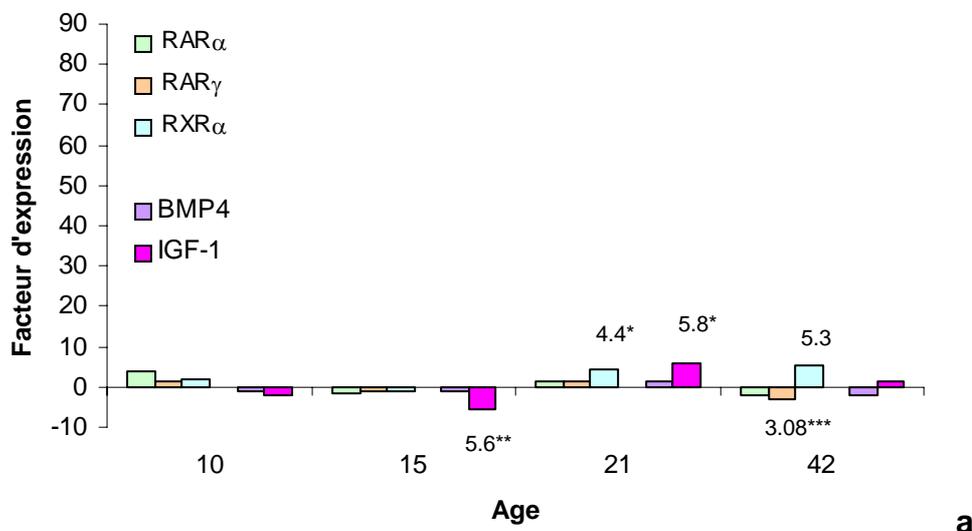


Figure 7. Influence de l'âge : comparaison de l'expression des gènes à J10 et à J42 par rapport à J21 dans le groupe contrôle. L'expression des gènes RAR α , RAR γ , RXR α , BMP4 et IGF-I a été normalisée en utilisant les valeurs des gènes correspondants obtenues à J21 dans le groupe contrôle. Les astérisques indiquent les différences significatives entre J10 et J21 ou entre J42 et J21 ($P < 0.05$, * ; $P < 0.001$, **).

d'expression d'IGF-I a été également observée dans le cas d'une carence en vitamine A chez la caille japonaise (Fu et al., 2001), chute associée à une augmentation de l'expression du récepteur d'IGF-I qui pourrait potentialiser les effets de cette molécule signal. Bien que nous n'ayons pas étudié ce récepteur, nous pouvons émettre l'hypothèse que la chute d'expression d'IGF-I à J15 était consécutive à une augmentation de l'expression de son récepteur ; dans un deuxième temps, ce récepteur stimulerait l'expression d'IGF-I par retrocontrôle positif et conduirait à l'augmentation de l'expression de la molécule signal observée à J21. Une seconde hypothèse peut également expliquer l'augmentation de l'expression d'IGF-I. IGF-I est un gène potentiellement inductible par l'acide rétinoïque car il a une forte probabilité d'avoir un RARE dans sa séquence promotrice (Balmer & Blomhoff, 2002). En absence, ou quasi absence d'acide rétinoïque, l'augmentation de l'expression d'IGF-I à J21 pourrait compenser, pendant une courte durée, une chute significative de cette molécule. De tels mécanismes transitoires de préservation ont été observés chez de jeunes animaux souffrant de malnutrition, cela a été particulièrement étudié pour les enzymes chez les mammifères (Raul et al., 1982) et chez les poissons (Cahu & Zambonino Infante, 1994). L'augmentation d'IGF-I, ainsi que la perturbation de l'expression de RXR α à J21 et J42 pourraient refléter un désordre des fonctions cellulaires de ces poissons. Le manque de vitamine A pourrait avoir été partiellement compensé par le rétinol maternel du sac vitellin pendant les plus jeunes stades et, après la résorption du sac vitellin, par une production endogène certainement insuffisante étant donné que les larves présentaient un retard de croissance.

L'étude de souris mutantes pour RAR γ a montré que cette isoforme jouait un rôle très important dans la médiation du signal tératogène de l'acide rétinoïque au niveau du tronc mais pas au niveau du squelette craniofacial. Ces souris étaient également résistantes à de très fortes doses d'acide rétinoïque, ce qui indique que les effets toxiques de cet acide font majoritairement intervenir ce récepteur (Ross et al., 2000). Au cours de notre étude, nous avons observé à J10 que l'expression de RAR γ augmentait d'un facteur 82 dans les larves nourries avec la dose maximale de rétinol et ceci était corrélé à un pourcentage très élevé de malformations squelettiques. Etant donné que ces déformations affectaient surtout les maxillaires et le crâne, nous pouvons supposer que soit les gènes impliqués dans ces malformations et contrôlés par RAR γ différent de ceux des souris soit les vertèbres étaient trop avancées dans leur développement pour être affectées. Une équipe japonaise (Haga et al., 2002) a montré chez le carrelet que l'expression des RAR, sans distinction des isoformes, augmentait après trois jours de traitement à l'acide rétinoïque. Cette augmentation était liée à l'apparition de malformations des mâchoires et l'expression des RXR ne semblait pas

Effet du régime RA0



Effet du régime RA1000

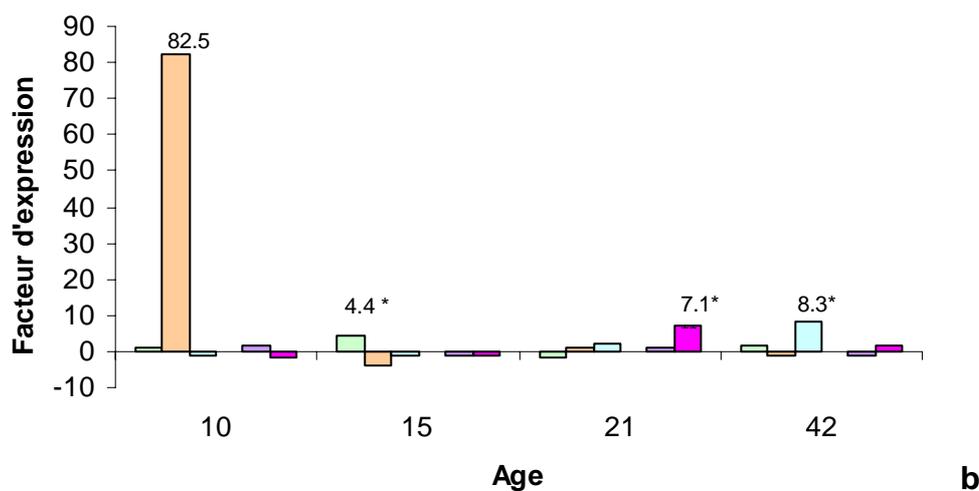


Figure 8. Effet des régimes RA0 (a) et RA1000 (b) sur l'expression de RAR α , RAR γ , RXR α , BMP4 et IGF-I chez les larves de bar à différentes dates. Les expressions des gènes à J10, J15, J21 et J42 ont été normalisées par rapport aux valeurs d'expression des gènes correspondants obtenues dans le groupe contrôle aux mêmes dates. Les nombres indiquent le ratio relatif de l'expression des gènes. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au groupe contrôle pour une même date ($P < 0.05$).

affectée. Ici, nous montrons que cette augmentation d'expression des RAR concerne essentiellement l'isoforme γ . De plus, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de RXR α à J42, que ce soit dans les larves nourries avec RA1000 ou dans les larves du groupe RA0 alors que cette même expression baisse chez les larves témoins au cours du développement. Ces résultats suggèrent encore une fois que les fonctions cellulaires des poissons des groupes RA0 et RA1000 étaient perturbées. Les malformations induites par des fortes doses alimentaires de vitamines A pourraient faire intervenir certains gènes Hox, tels que *hoxd4*, comme cela a été montré chez le carrelet japonais (Suzuki et al., 1998) mais également des gènes tels que BMP4 et IGF-I. En effet, l'acide rétinoïque peut stimuler l'expression d'IGF-I et affecter le développement des membres (Qin et al., 2002), alors que BMP4 agirait comme un des médiateurs de l'action ostéogénique de l'hormone de croissance et de IGF-I (Li et al., 1998) au niveau des dents et des os. Il a aussi été mentionné que l'acide rétinoïque pouvait coopérer avec les BMP pendant la différenciation des ostéoblastes bien que certains BMP, dont BMP4, n'aient pas d'élément RARE dans leur promoteur. Ceci expliquerait donc pourquoi nous n'avons pas observé de différence significative de l'expression de BMP4 au cours de cette étude. La corrélation linéaire observée entre les doses de vitamine A et les taux de malformations céphaliques indiquerait que la perturbation de la voie de signalisation des rétinoïdes aboutit à un dérèglement de la différenciation et du développement cellulaire, ce qui a pour conséquences majeures l'apparition de malformations squelettiques et un retard de la maturation intestinale.

Plusieurs études ont montré chez le carrelet japonais que les rétinoïdes peuvent affecter l'expression de *shh*, *Hoxd-4* et des RAR, ce qui perturbe le développement du squelette pharyngal et de la colonne vertébrale (Suzuki et al., 1998 ; Haga et al., 2002, 2003). Notre étude montre également que des taux inadaptés de rétinol tout-*trans* dans l'alimentation des bars altéraient la formation de la tête, se traduisant par un développement anormal des cartilages de l'opercule, du prémaxillaire, du maxillaire, de neurocrâne etc... Certains des poissons de notre étude présentaient aussi des malformations au niveau de la colonne vertébrale. L'implication des gènes *Hoxd-4* et *shh* dans les déformations induites par les fortes doses alimentaires de vitamine A mériterait d'être vérifiée dans des études futures.

Il est aussi important de noter que les espèces, telles que le poisson-zèbre (Joore et al., 1994), servant de modèle animal aux études de morphogenèse éclosent à un stade moins précoce du développement que les espèces de poissons marins. Par conséquent, les espèces de poissons marins ont la particularité de permettre l'étude des malformations induites par les voies nutritionnelles alors que ces malformations ne peuvent être induites qu'avant l'éclosion

par voie non-nutritionnelle chez les autres espèces. Par exemple, elles étaient provoquées par l'implantation de billes imprégnées d'acide rétinoïque chez le poulet (Lee et al., 2001). Chez le xénope (Minucci et al., 1996), les embryons étaient baignés dans un milieu contenant de l'acide rétinoïque dissous.

En conclusion, les résultats obtenus sur la croissance et la maturation du système digestif des larves de bar indiquent que le taux optimal de rétinol dans l'aliment était de 31 mg/kg de matière sèche. La corrélation linéaire entre les taux de vitamine A incorporé dans les larves et le taux de malformations résulte d'une modification de l'expression de $RAR\alpha$, $RAR\gamma$ et $RXR\alpha$, l'expression d'IGF-I et de BMP-4 n'étant pas affectée par les doses de rétinol. Notre étude démontre l'influence de la nutrition sur les voies de signalisation des rétinoïdes qui jouent un rôle primordial dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur et dans l'apparition de malformations chez la larve de bar.

Au cours de cette expérience, nous avons montré que des doses alimentaires inadaptées de rétinol entraînaient des malformations essentiellement localisées au niveau de la région céphalique. Nous nous sommes donc demandés si un autre composé de l'aliment tel que les phospholipides, interagissant par l'intermédiaire des acides gras avec la voie des rétinoïdes, aurait des conséquences similaires lorsque sa forme d'apport ou ses doses dans l'aliment ne seraient pas adaptées aux besoins des larves de bar. Nous avons donc réalisé une seconde expérience dans laquelle nous avons fait varier les quantités de phospholipides ainsi que la forme d'apport de ces phospholipides (source végétale ou source marine).

CHAPITRE IV

**Lieux et niveaux d'expression de trois
récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque
au cours du développement des larves de
bar.**

1. Introduction.

Les processus de morphogenèse et de différenciation cellulaire des vertébrés mettent en jeu plusieurs familles de gènes dont les récepteurs à l'acide rétinoïque. Ces récepteurs nucléaires ont été très étudiés chez les mammifères mais, chez les poissons, peu de données concernant leur séquence nucléotidique ou protéique sont disponibles dans les banques de données. Les quelques études réalisées concernent essentiellement le poisson-zèbre (Prince et al., 1998 ; Kimmel et al., 2001) et le carrelet japonais (Ogura et al., 1995 ; Suzuki et al., 1998, 1999).

La morphogenèse et la différenciation sont des processus rapides et complexes pendant l'ontogenèse précoce des poissons. Les larves subissent des changements radicaux dans leur aspect physique, la morphologie, le métabolisme, les capacités à nager et leur comportement avant de devenir des juvéniles, et ceci a lieu pendant une courte période. Les espèces marines sont un modèle intéressant car elles permettent l'étude de l'influence de la composition des aliments sur les mécanismes cités ci-dessus (Zambonino Infante et Cahu, 2001).

Nous avons montré précédemment au cours de ce travail que l'apparition de malformations squelettiques induites par des doses inadaptées d'acide rétinoïque ou de phospholipides étaient associées à des variations de l'expression des récepteurs nucléaires cités ci-dessous.

Les récepteurs de la vitamine A sont de deux types: les RAR et les RXR et il existe trois isoformes (α , β et γ) pour chaque type (Ross et al., 2000). Chez la souris, des études par hybridations *in-situ* ont montré que les RAR et les RXR étaient exprimés dans des régions corporelles précises pendant des périodes déterminées, ce qui laissait penser que ces récepteurs étaient impliqués dans de nombreux processus pendant les stades précoces de l'ontogenèse (Giguère, 1994). Ces récepteurs sont également très exprimés chez les vertébrés adultes, ce qui signifie que la majorité des tissus est une cible potentielle de l'action de ces récepteurs nucléaires (Giguère, 1994). Les RAR lient l'acide rétinoïque tout-trans et 9-cis alors que les RXR lient uniquement la forme 9-cis (Heyman et al., 1992). Ils peuvent former

```

AAD05222      MASNSSSCPTPGGGHLNGYPVPPYAFFFFPMLGGLSPPGALTTLQHQLPVSGYSTPSPAT
CAA40749      MASNSSSCPTPGGGHLNGYPVPPYAFFFFPMLGGLSPPGALTSLQHQLPVSGYSTPSPAT
AAB32276      -----MYESVDVNPFLMMDYINQSRGCLIPDKMPHPFSSSIRHQHWSGSNHS
AJ496189      -----

AAD05222      IETQSSSSEEIVPSPSPPLPRIYKPCFVCQDKSSGYHYGVSACEGCKGFFRRSIQKNM
CAA40749      IETQSSSSEEIVPSPSPPLPRIYKPCFVCQDKSSGYHYGVSACEGCKGFFRRSIQKNM
AAB32276      IETQSTSSEEIVPSPSPPPPPRIYKPCFVCQDKSSGYHYGVSACEGCKGFFRRSIQKNM
AJ496189      -----

AAD05222      VYTCHRDKNCI INKVTRNRCQYRLQKCFEVMGSKESVRNDRNKKKKEVPKPECSESYTL
CAA40749      VYTCHRDKNCI INKVTRNRCQYRLQKCFDVMGSKESVRNDRNKKKKEAPKPECSESYTL
AAB32276      VYTCHREKNCI INKVTRNRCQYRLQKCLEVMGSKESVRNDRNKKKKEKKPECTENYTL
AJ496189      -----

AAD05222      TPEVGELIEKVRKAHQETFPALCQLGKYTTNNSSEQRVSLDIDLWDKFSELS TKCI IKTV
CAA40749      TPEVGELIEKVRKAHQETFPALCQLGKYTTNNSSEQRVSLDIDLWDKFSELS TKCI IKTV
AAB32276      SPDTEQMIDRVRKAHQETFP SLCQLGKYTTNS SERRVALDIDLWDKFSELS TKCI IKTV
AJ496189      -----

AAD05222      DFAKQLPGFTTLTIADQITLLKAAACLDILILRICTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQMHNA
CAA40749      EFAKQLPGFTTLTIADQITLLKAAACLDILILRICTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQMHNA
AAB32276      EFAKQLPGFTTLTIADQITLLKAAACLDILILRICTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQMHNA
AJ496189      -----TTLTIADQITLLKAAACLDILILRICTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQMHNA
                      *****

AAD05222      GFGPLTDLVFAFANQLLPLEMDDAETGLLSAICLICGDRQDLEQPDRVDMLQEPLLEALK
CAA40749      GFGPLTDLVFAFANQLLPLEMDDAETGLLSAICLICGDRQDLEQPKVDMLQEPLLEALK
AAB32276      GFGPLTDLVFAFANQLLPLEMDDAETGLLSAICLLCGDRQDLEQADKVDVLQEPLLEALK
AJ496189      GFGPLTDLVFAFANQLLPLEMDDAETGLLSAICLLCGDRQDLEQA EKVDILQEPLLEALK
                      ***** :***** . :*****

AAD05222      VYVRKRRPSRPHMFPKMLMKITDLRSISAKGAERVITLKMEIPGSMPLIQEMLENSEGL
CAA40749      VYVRKRRPSRPHMFPKMLMKITDLRSISAKA-----
AAB32276      IYVRNRRPHKPHMFPKMLMKITDLRSISAKGAERVITLKMEIPGSMPLIQEMLENSEGL
AJ496189      IYVRRRRPHKPHMFPK-----
                      :*** . *** :*****

AAD05222      DTLSGQPGGGGRDGGGLAPPPGSCSPSLSPSNRSSPATHSP
CAA40749      -----
AAB32276      E-----SSGAQGSRASATTPGSCSPSLSPNSAQSSPPTQSP
AJ496189      -----

```

Figure 1 : Alignement des séquences protéiques de RAR α pour l’homme (AAD05222), la souris (CAA40749), le poisson zèbre (AAB22276) et le bar (AJ496189). Les numéros d’accès sont ceux de la banque de données Genbank. Le domaine de liaison au ligand est surligné en gris et les trois acides aminés essentiels pour la liaison à l’ADN et les propriétés de dimérisation de la séquence humaine sont en rouge. Les astérisques indiquent les acides aminés conservés dans toutes les séquences alignées.

des dimères ensemble ou avec d'autres récepteurs tels que ceux de la vitamine D, des hormones thyroïdiennes ou des acides gras (Yu et al., 1991 ; James et al., 2003). Les dimères régulent l'expression de nombreux gènes contenant dans leur séquence régulatrice un élément de réponse à l'acide rétinoïque ; certains de ces gènes sont impliqués dans les processus de morphogénèse (Ogura et Evans, 1995 ; Balmer et Blomhoff, 2002). De plus, plusieurs études ont mis en avant qu'une perturbation de la voie des rétinoïdes induisait des malformations squelettiques (Uni et al., 2000 ; Haga et al., 2002, 2003). Les RXR peuvent interagir avec les PPAR (Yu et al., 1991 ; James et al., 2003), récepteurs qui sont régulés par différents nutriments dont les AGPI. Ceci met en exergue que beaucoup de nutriments agissent sur la morphogénèse à travers les gènes du développement ce qui montre l'importance de caractériser et d'étudier ces récepteurs chez les poissons.

Au cours de ce travail, nous nous sommes donc attachés à l'étude au cours du développement des larves de bar des séquences partielles de trois récepteurs clonés au sein du laboratoire: RAR α , RAR γ et RXR α . Nous avons également observé les tissus dans lesquels ils s'exprimaient et leur profil d'expression au cours du développement.

2. Matériel et méthodes.

Les larves de bar ont été élevées dans les mêmes installations et dans les mêmes conditions que pour les études précédentes. Elles ont été nourries avec un aliment commercial donnant de très bons résultats de croissance et de survie. L'aliment contenait la dose optimale de vitamine A déterminée dans la première publication.

Les séquences partielles de RAR α , RAR γ et RXR α ont été clonées puis leur profil d'expression a été déterminé par PCR en temps réel. Des sondes ARN ont ensuite été synthétisées pour les études par hybridations ARN/ARN sur larves entières ou sur coupes.

3. Résultats.

3.1 Séquences nucléotidiques et protéiques de RAR α , RAR γ et RXR α .

Les séquences clonées (ADNc) comprenaient respectivement 383, 522 et 822 nucléotides pour RAR α , RAR γ et RXR α . Ces séquences sont accessibles dans la banque de données EMBL sous les numéros d'accès suivants: AJ496189, AJ496181 et AJ567907. Nous

```

NM_000966      MATNKERLFAAGALGPGSGYPGAGFFAFPGALRGSPPFEMLSPSFRGLGQPDLPKEMAS
CAA33845      MATNKERLFAAGALGPGSGYPGAGFFAFPGALRGSPPFEMLSPSFRGLGQPDLPKEMAS
AAB32277      -----MFDCMEALGMGPRQLYDVTNRGACMLRKASPFYAGLDPPFAWTGTASV
AJ496181      -----

NM_000966      LSVETQSTSSEEMVPSSPSPPPPPRVYKPCFVCNDKSSGYHYGVSSCEGCKGFFRRSIQK
CAA33845      LSVETQSTSSEEMVPSSPSPPPPPRVYKPCFVCNDKSSGYHYGVSSCEGCKGFFRRSIQK
AAB32277      RSVETQSTSSEEMVPSSPSPPPPPRVYKPCFVCQDKSSGYHYGVSSCEGCKGFFRRSIQK
AJ496181      -----

NM_000966      NMVYTCHRDKNCI INKVTRNRCQYCR LQKCFE VGM SKEAVR NDRNKKKKEVKEEGS -PDS
CAA33845      NMVYTCHRDKNCI INKVTRNRCQYCR LQKCFE VGM SKEAVR NDRNKKKKEVKEEGS -PDS
AAB32277      NMVYTCHRDKNCQ INKVTRNRCQYCR LQKCFE VGM SKEAVR NDRNKKKKEVKEEGS -PDS
AJ496181      -----E VGM SKEAVR NDRNKKKKEVKEEGS -PDS
                        ***** . ** : * : * : *      * : *

NM_000966      YELSPQLEELITKVSKAHQETFP SLCQLGKYT TNSSADHRVQLDLGLWDFSELATKCI I
CAA33845      YELSPQLEELITKVSKAHQETFP SLCQLGKYT TNSSADHRVQLDLGLWDFSELATKCI I
AAB32277      YELSGELEELVNKVSKAHQETFP SLCQLGKYT TNSSADHRVQLDLGLWDFSELSTKCI I
AJ496181      YELSGELEELVNKVSKAHQETFP SLCQLGKYT TNSSADHRVQLDLGLWDFSELSTKCI I
                        **** : **** : . ***** : ***** : **** : ***** : *****

NM_000966      KIVEFAKRLPGFTGLSIADQITLLKAA CLDILMLR I CTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQM
CAA33845      KIVEFAKRLPGFTGLSIADQITLLKAA CLDILMLR I CTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQM
AAB32277      KIVEFAKRLPGFTTTLTIADQITLLKSA CLDILMLR I CTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQM
AJ496181      KIVESAKRLPGFTTTLTIADQITLLKSA CLDILMLR I CTRYTPEQDTMTFSDGLTLNRTQM
                        ***** * : ***** : ***** : ***** : *****

NM_000966      HNAGFGPLTDLVFAFAGQLLPLEMDDTETGLLSAICLICGDRMDLEEPEKVDKLEPILLE
CAA33845      HNAGFGPLTDLVFAFAGQLLPLEMDDTETGLLSAICLICGDRMDLEEPEKVDKLEPILLE
AAB32277      HNAGFGPLTDLVFAFAGQLLPLEMDDTETGLLSAICLICGDRMDLEEPERVDRLQEPILLE
AJ496181      HNAGFGPLTDLVFAFAGQLLPLEMD-----
                        *****

NM_000966      ALRLYARRRRPSQPYMFPRMLMKITDLRGISTKGAERAITLKMEIPGMPPLIREMLENP
CAA33845      ALRLYARRRRPSQPYMFPRMLMKITDLRGISTKGAERAITLKMEIPGMPPLIREMLENP
AAB32277      ALKIYARRRRPNKPHMFPRLMKITDLRGISTKGAERAITLKMEIPGMPPLIREMLENP
AJ496181      -----

NM_000966      EMFEDDSSQPGPHPNASSEDEVPGGQKGLKSPA-----
CAA33845      EMFEDDSSKPGPHPKASSEDEAPGGQKRGQSPQPDQGP-----
AAB32277      EAFEDQSEATEKKPEPEPPAPPPALLTMKKEQEDEDSDSWATENGSEPSPEEEDDDDEDG
AJ496181      -----

NM_000966      -----
CAA33845      -----
AAB32277      EEERGTSDSDEAWGGQEPNADVSRKSHGGRAQ
AJ496181      -----

```

Figure 2 : Aligment des séquences protéiques de RAR γ pour l’homme (NM_000966), la souris (CAA33845), le poisson zèbre (AAB32277) et le bar (AJ496181). Les numéros d’accès sont ceux de la banque de données Genbank. Le domaine de liaison au ligand est surligné en gris et la méthionine en position 272 de la poche de liaison au ligand de la séquence humaine est en rouge. Les astérisques indiquent les acides aminés conservés dans toutes les séquences alignées.

avons également cloné une séquence de 529 nucléotides correspondant à la GAPDH (AJ567450) qui est le gène référence pour la PCR en temps réel.

La séquence clonée et la séquence protéique déduite pour RAR α (Fig. 1) présentaient une très forte homologie avec les séquences correspondantes de poisson-zèbre (97%), de souris (93%) et humaines (92%). La séquence protéique correspondant à RAR γ (Fig. 2) présentait également une très forte homologie avec les séquences hétérologues du poisson-zèbre (83%), de la souris (79%) et de l'homme (79%). Les séquences clonées des deux RAR correspondaient au domaine de liaison du ligand des protéines correspondantes, ce domaine est en hélice. Pour RAR α , il couvre la séquence nucléotidique de l'acide aminé (aa) 1 à l'aa 28 et pour RAR γ il s'étend de l'aa 87 à l'aa 176. La séquence protéique déduite de RXR α (Fig. 3) avait un fort pourcentage d'homologie avec la séquence murine (92%), humaine (91%) et du poisson-zèbre (89%). Le fragment génique cloné comprenait un motif partiel en doigt de zinc qui correspond au domaine de liaison à l'ADN de ce récepteur. Il contenait également le domaine de liaison au ligand qui avait 93% d'homologie avec le domaine correspondant chez l'homme. Le domaine de liaison à l'ADN couvrait la séquence protéique de l'aa 1 à l'aa 22 alors que le domaine de liaison au ligand la couvrait de l'aa 92 à l'aa 273.

3.2 Hybridations in situ (Fig. 4).

Les hybridations sur larves entières âgées de 5 jours révélèrent uniquement la présence d'ARNm pour le récepteur RAR α au niveau des mâchoires. Des hybridations sur coupes de larves de 37 jours montraient que RAR α s'exprimait dans les mâchoires, les vertèbres, le foie, les muscles, les nageoires pectorales, le cerveau, les tissus neuraux, les yeux et les arcs branchiaux. Au même stade, RAR γ s'exprimait dans le cartilage, les yeux et l'opercule alors que RXR α était présent dans le pancréas exocrine, le foie, la thyroïde, les reins, le cœur, les mâchoires et les dents.

3.3 Expression de RAR α , RAR γ et RXR α au cours du développement des larves de bar (Fig. 5).

Entre le jour 10 et le jour 42, les expressions de RAR α et de RAR γ augmentaient d'un facteur 7 et 35, respectivement ($P < 0.05$), alors que celle de RXR α diminuait d'un facteur 35 ($P < 0.05$). Les mêmes tendances étaient observées entre le jour 10 et le jour 21 mais aucune différence significative n'a été mise en évidence ($P > 0.05$).

```

NP_002948      MDTKHFLPLDFSTQVN--SSLTSPTRGRSMAAPSLHPSLGPFGIGS----PGQLHSPISTLS
CAA46962      MDTKHFLPLDFSTQVNSSSLNSPTGRGSMVPSLHPSLGPFGIGSPLGSPGQLHSPISTLS
NP_571228      -----
AJ567907      -----

NP_002948      SPINGMGPPFSVISSPMGPHSMSVPTTPTLGFSTGSPQLSSPMNPVSSSEDIKPLGLNG
CAA46962      SPINGMGPPFSVISSPMGPHSMSVPTTPTLGFSTGSPQLNSPMNPVSSSTEDIKPLGLNG
NP_571228      -----MPVPEQKQTVQLSSPMNAVSSSEDIKPLGLNG
AJ567907      -----

NP_002948      VLKVPAPHPSGNMAS-FTKHICAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYTCRDN
CAA46962      VLKVPAPHPSGNMAS-FTKHICAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYTCRDN
NP_571228      VMKVPAPHRIGTLSLSTKHICAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYTCRDN
AJ567907      -----

NP_002948      KDCLIDKRQNRNCQYCRYQKCLAMGMKRE-----AVQEERQRGKDRNENEVESTSSANED
CAA46962      KDCLIDKRQNRNCQYCRYQKCLAMGMKRE-----AVQEERQRGKDRNENEVESTSSANED
NP_571228      KDCMIDKRQNRNCQYCRYQKCLAMGMKRE-----AVQEERQRAKERSEAEFG--GCANED
AJ567907      -----CQYCRYQKCLAMGMKREVLLHAAVQEERQRAKDRNENEVESTSCANED
                      *****      *****.*:*.*.*. .****

NP_002948      MPVERILEAELAVEPKTETYVEANMGLNPNSSPNDPVTNICQAADKQLFTLVEWAKRIPHF
CAA46962      MPVEKILEAELAVEPKTETYVEANMGLNPNSSPNDPVTNICQAADKQLFTLVEWAKRIPHF
NP_571228      MPVEKILEAELAVEPKTETYVEANLSPSANSNPDPVTNICQAADKQLFTLVEWAKRIPHF
AJ567907      MPVEKILEAEQAVEPKTETYIETNLGVPSNPNDPVTNICQAADKQLFTLVEWAKRIPHF
                      *****      *****.*:*.*.*. .****

NP_002948      SELPLDDQVILLRAGWNELLIASFSHRSIAVKDGILLATGLHVHRNSAHSAGVGAIFDRV
CAA46962      SELPLDDQVILLRAGWNELLIASFSHRSIAVKDGILLATGLHVHRNSAHSAGVGAIFDRV
NP_571228      SDLPLDDQVILLRAGWNELLIASFSHRSIAVKDGILLATGLHVHRNSAHTAGVGAIFDRV
AJ567907      SELQLDDQVTLRAGWNELLIASFSHRSIAIKDGILLATGLHVHRNSAHSAGVGAIFDRV
                      *:* *****      *****.*:*.*.*. .****

NP_002948      LTELVSKMRDMQMDKTELGLCLRAIVLFPNPSKGLSNPAEVEALREKVYASLEAYCKHKYP
CAA46962      LTELVSKMRDMQMDKTELGLCLRAIVLFPNPSKGLSNPAEVEALREKVYASLEAYCKHKYP
NP_571228      LTELVSKMRDMQMDKTELGLCLRAIVLFPNPSKGLSNPSEVEALRERVYASLEAYCKHKYP
AJ567907      LTELVSKMRDMQMDKTELGLCLRAIVLFPNPSKGLSNPSEVEALREKVYASLEAYCKQKYP
                      *****      *****.*:*.*.*. .****

NP_002948      EQPGRFAKLLLRPALRSIGLKCLEHLFFFKLIQDTPIDTFLMEMLEAPHQMT
CAA46962      EQPGRFAKLLLRPALRSIGLKCLEHLFFFKLIQDTPIDTFLMEMLEAPHQAT
NP_571228      DQPGRFAKLLLRPALRSIGLKCLEHLFFFKLIQDTPIDTFLMEMLEAPHQIT
AJ567907      EQPGRFAKLLLRPALRSIGLKQEHLFFFKLIQDTPIDTFLMEML-----
                      :*****      *****.*:*.*.*. .****

```

Figure 3 : Alignement des séquences protéiques de RXR α pour l'homme (NP_002948), la souris (CAA46962), le poisson zèbre (NP_571228) et le bar (AJ567907). Les numéros d'accès sont ceux de la banque de données Genbank. Le domaine de liaison au ligand est surligné en gris et les acides aminés du domaine de liaison à l'ADN sont en bleu. Les astérisques indiquent les acides aminés conservés dans toutes les séquences alignées.

4. Discussion.

Au cours de ce travail, nous avons décrit les séquences partielles de RAR α , RAR γ et RXR α chez le bar. Les séquences protéiques qui en ont été déduites présentaient une très forte homologie (respectivement, >92%, >79% et >89%) avec les séquences hétérologues du poisson-zèbre, de la souris et de l'homme.

Comme dans toutes les espèces, les trois séquences de bar comportaient un domaine de liaison au ligand que l'on retrouve dans la quasi totalité des récepteurs nucléaires des hormones (stéroïdes, hormones thyroïdiennes ; Green et Chambon, 1988; Tanenbaum et al., 1998). Dans la séquence humaine ou murine de RAR α , ce domaine contient trois acides aminés (Lys³⁶⁰, Val³⁶¹ et Lys³⁶⁵) essentiels pour la liaison à l'ADN et les propriétés de dimérisation du récepteur (Rachez et al., 1996). Chez le bar, la Lys³⁶⁰ était conservée alors que la Val³⁶¹ et la Lys³⁶⁵ étaient substituées respectivement par une isoleucine et une arginine. La substitution de la valine par l'isoleucine est aussi présente dans la séquence du poisson-zèbre. Ces substitutions conservatives pourraient refléter l'importance des propriétés physico-chimiques de ces acides aminés pour le récepteur RAR α du bar, comme cela est le cas chez l'homme. Nous avons également observé la conservation dans notre espèce de la méthionine en position 272 de la protéine humaine de RAR γ . Cette méthionine, présente dans la poche de liaison du ligand, joue un rôle crucial dans la reconnaissance des analogues du ligand (Ostrowski et al, 1998). Cet acide aminé étant conservé dans toutes les séquences que nous avons alignées, nous pouvons supposer que son rôle est crucial chez les vertébrés. La séquence de RXR α contenait un domaine partiel en doigt de zinc, région qui correspond au domaine de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires (Green et Chambon, 1988). La séquence protéique déduite de RXR α présentait aussi une insertion de 5 acides aminés dans le domaine de liaison à l'ADN, insertion absente des autres séquences de poisson présentes dans les banques de données (*Danio rerio*, *Paralichthys olivaceus* et *Oryzias latipes*). Des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour déterminer si ces 5 aa jouent un rôle dans ce domaine.

Les RXR ont la capacité à former des dimères avec les RAR, les récepteurs de la vitamine D, des hormones thyroïdiennes et des acides gras (Ross et al., 2000), ce qui les place au cœur de plusieurs voies de signalisation cellulaire. Les RXR se lient aussi aux RAR afin d'optimiser les effets des RAR sur leurs gènes cibles (Yu et al., 1991). Certains gènes cibles

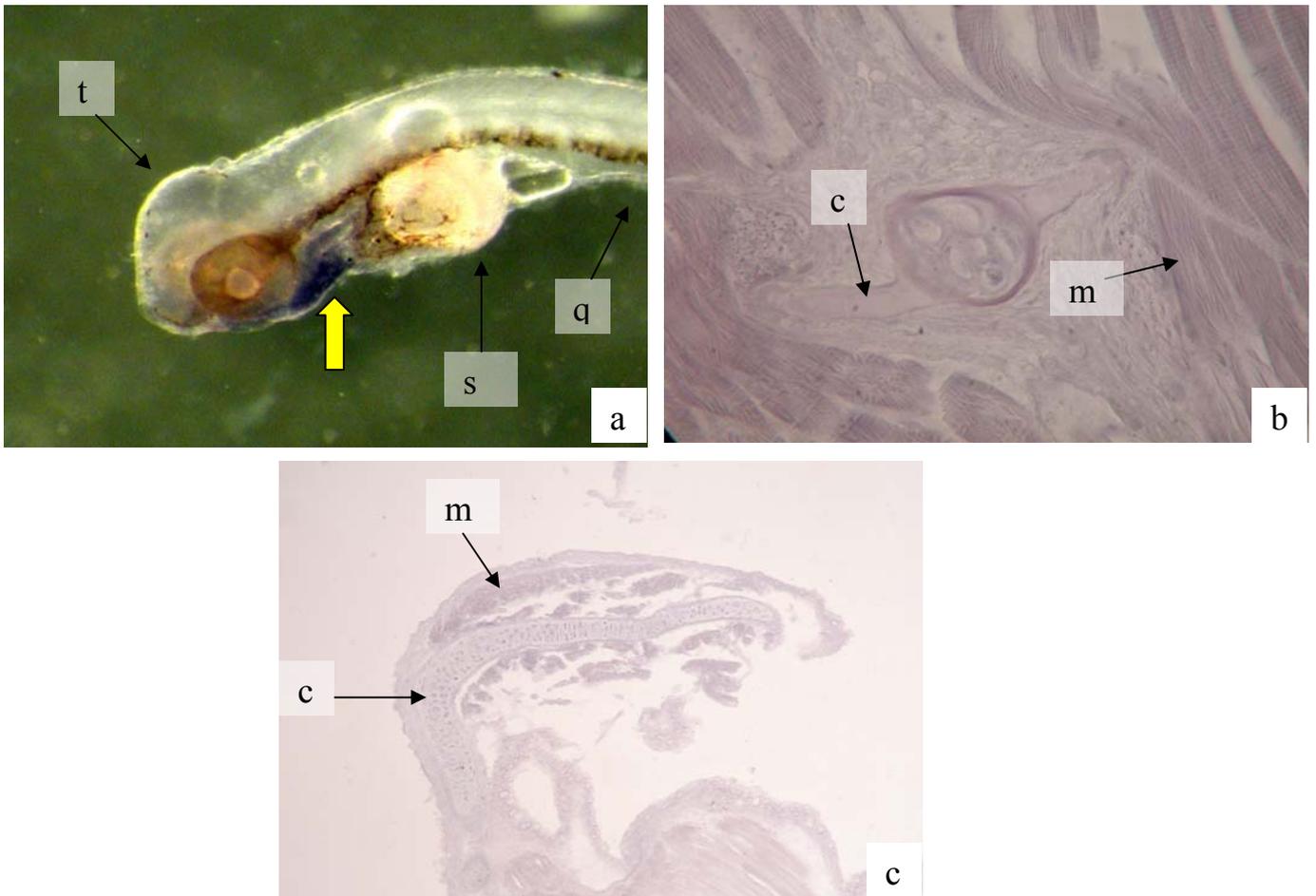
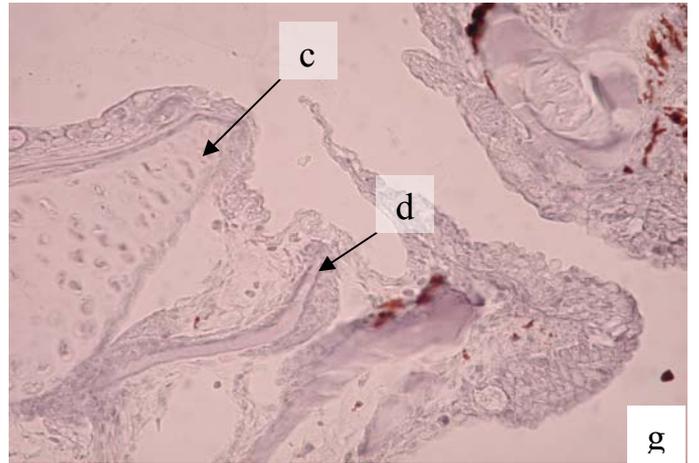
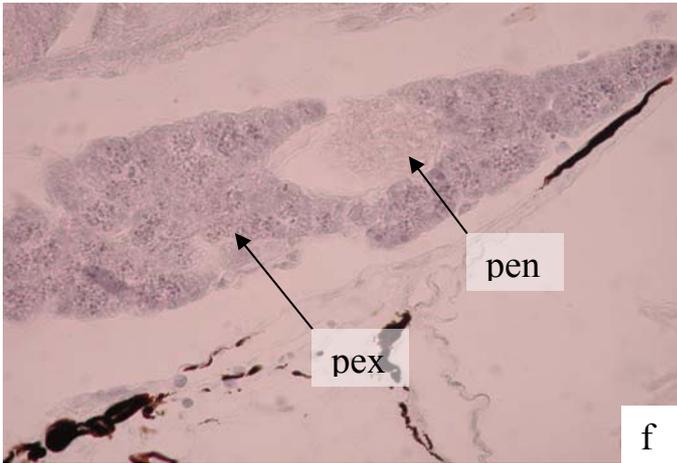
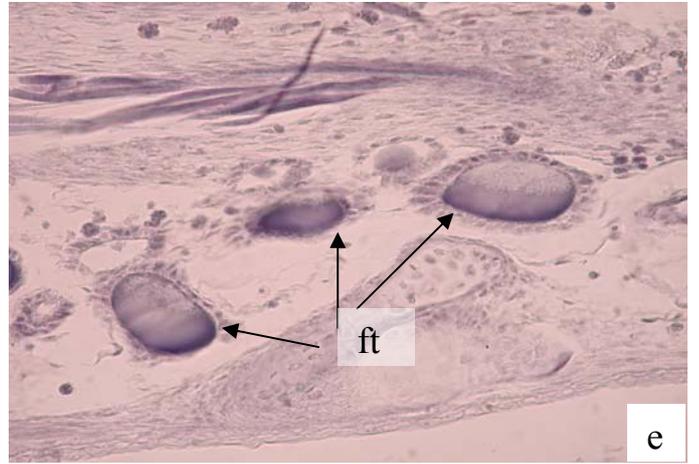
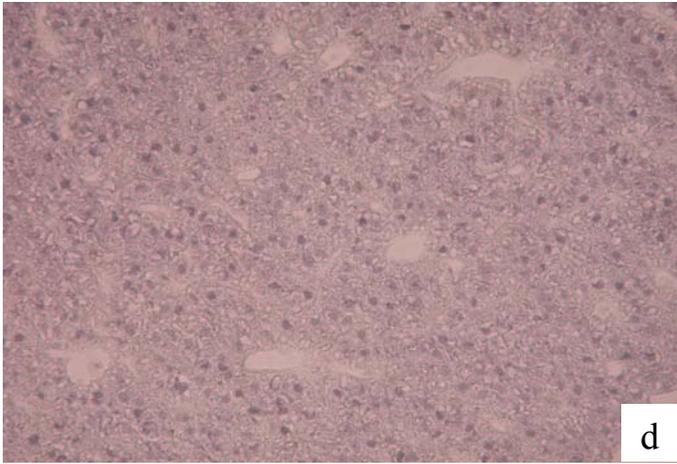


Figure 4 : Localisation par hybridations *in situ* des ARNm de RAR α , RAR γ et RXR α pendant le développement larvaire du bar. (a) Hybridation avec la sonde antisens de RAR α à J5 dans la mâchoire (flèche jaune) ; t = tête, q = queue, s = sac vitellin. (b-c) Hybridations avec la sonde antisens de RAR γ à J37, respectivement dans une vertèbre et une nageoire pectorale ; c = cartilage, m = musculature. (d-g) Hybridations avec la sonde antisens de RXR α à J37, respectivement dans le foie, la thyroïde, le pancréas et une dent, c = cartilage, d = dent, ft = follicule thyroïdien, pen = pancréas endocrine, pex = pancréas exocrine.



de ces dimères ont un rôle important dans la morphogenèse (Ross et al., 2000 ; Balmer et Blomhoff, 2002), ce qui permet de comprendre pourquoi la vitamine A est considérée comme une molécule morphogène à travers l'action de ses récepteurs. Les larves de bar utilisées au cours de cette expérience étaient nourries avec un aliment contenant une dose optimale de vitamine A et permettant d'obtenir une bonne croissance et un bon développement des larves. Nous avons donc considéré que les résultats des hybridations et de l'expression des gènes correspondaient à des résultats obtenus dans des conditions d'élevage normales. Ici, nous avons observé que RXR α était très exprimé pendant les stades précoces du développement du bar et cela pourrait refléter un besoin important de ce récepteur pendant cette période, période pendant laquelle les processus de différenciation sont intenses. La chute du niveau d'expression d'un facteur 35 de RXR α entre le jour 10 et le jour 42 pourrait s'expliquer par une différenciation moins importante et donc un besoin moindre de ces récepteurs. Les expressions de RAR α et de RAR γ augmentaient respectivement d'un facteur 7 et d'un facteur 36 entre le jour 10 et le jour 42. Dans notre étude sur les effets de doses inadéquates de vitamine A dans l'aliment, nous avons mis en évidence que, lors d'une hypervitaminose, l'expression de RAR γ était 83 fois plus forte à J10 et que cela était associé à un très fort pourcentage (80%) de malformations squelettiques touchant essentiellement la région céphalique. Ces résultats indiquent donc que ces deux récepteurs RAR sont importants pour le développement du bar et que c'est surtout l'isoforme γ qui est impliquée dans la morphogenèse de la région céphalique.

Chez les embryons de vertébrés, plusieurs régions (rétine, cœur, somites et foie) synthétisent de l'acide rétinoïque et les récepteurs à la vitamine A (Ross et al, 2000). La vitamine A est également présente au niveau des yeux où elle est transformée en rétinol nécessaire à la vision (Duester, 2000). Ces résultats sont en accord avec nos observations puisque nous avons démontré la présence de RAR α dans le foie, le système nerveux et les yeux, alors que RAR γ s'exprime dans les yeux et RXR α dans le foie et le cœur. Ces lieux d'expression pourraient indiquer que ces récepteurs sont impliqués dans le développement de ces tissus. Chez la souris, les mutants homozygotes pour RXR α présentaient des problèmes d'yeux et mourraient in utero à cause de problèmes cardiaques. Chez le bar, RXR α est également présent dans les yeux et le cœur, ce qui laisse supposer que, comme chez les mammifères, ce récepteur est impliqué dans la différenciation de ces organes. D'autre part, RXR forme des hétérodimères avec les récepteurs des hormones thyroïdiennes et ces dimères contrôlent la transcription de gènes sous la dépendance de ces hormones. Cette interaction

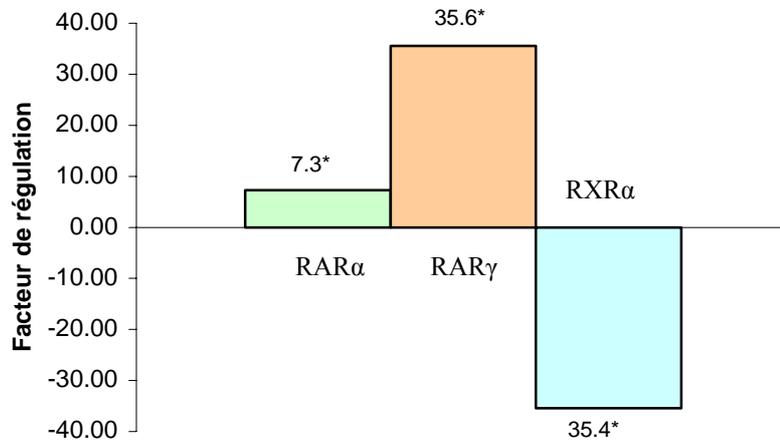


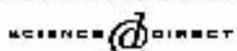
Figure 5 : Expression normalisée de RAR α , RAR γ et RXR α dans les larves de bar : effet de l'âge entre J10 et J42. Les nombres indiquent le ration relatif de l'expression des gènes et les astérisques la présence de différences significatives (P<0.05).

semble également être vraie chez le bar, car, dans les larves de 37 jours, nous avons révélé la présence de RXR α dans les follicules thyroïdiens.

La vitamine A est impliquée dans la morphogenèse et toute perturbation de son homéostasie conduit à un développement anormal chez les mammifères (Malpel et al., 2000 ; Ross et al., 2000), les oiseaux (Lee et al., 2001), les amphibiens (Minucci et al., 1996) et les poissons (Haga et al., 2002, 2003). Son rôle passe par ses récepteurs nucléaires qui modulent l'expression de très nombreux gènes dont certains sont impliqués dans la différenciation de l'axe antéro-postérieur (Balmer et Blomhoff, 2002). La localisation intracellulaire ainsi que l'expression de ces récepteurs pourraient fournir des informations sur les sites d'action de la vitamine A. Au jour 5, RAR α était détecté dans les mâchoires et les arcs branchiaux des larves, ce qui pourrait indiquer que cette isoforme intervient dans le développement de la tête pendant les très jeunes stades. A J37, ce récepteur était exprimé dans les cellules des nageoires pectorales, des vertèbres et des muscles alors que RAR α était réparti de façon beaucoup plus ubiquitaire dans le cartilage. Cela indique que les zones d'expression de RAR α sont plus restreintes que celles de RAR γ . Il est important de noter que, comme cela a été dit précédemment, dans le cas d'une hypervitaminose l'augmentation anormale de l'expression de RAR γ s'accompagnait d'un pourcentage élevé de malformations céphaliques. Cela peut être partiellement expliqué par la présence de RAR γ dans le tissu cartilagineux du squelette craniofacial et par sa capacité à être modulé par de fort taux de rétinol pendant les stades précoces de développement. Haga et al. (2003) ont montré qu'une perturbation de la voie de signalisation des RAR régulant l'activité des ostéoblastes induisait des malformations au niveau des mâchoires du carrelet (*Paralichthys olivaceus*) alors que notre équipe a mis en évidence que la principale isoforme impliquée était γ . Etant donné que le rôle de ces récepteurs est redondant, nous pouvons supposer que le squelette de la colonne vertébrale et des nageoires était moins affecté à cause de la présence potentielle des isoformes α et β . Cela suggère que RAR γ n'est pas le récepteur majoritairement impliqué dans la mise en place de ces régions corporelles. Nous avons également localisé RXR α dans les dents des larves de bar, cela indique donc que la vitamine A est impliquée dans la formation des dents et des os, comme le sont d'autres gènes tels que shh, les gènes Hox, les BMP qui jouent un rôle dans la morphogenèse craniofaciale dont la formation des os et des dents (Helms et al., 1997 ; Li et al., 1998). Etant donné que les gènes shh et Hox peuvent être régulés par l'acide rétinoïque et que shh et les BMP interagissent, nous pouvons imaginer que ces gènes sont des cibles pour les RAR et les RXR dans les tissus où ils sont exprimés.

En résumé, nous avons cloné les séquences partielles de RAR α , RAR γ et RXR α chez le bar, séquences présentant un très fort taux d'homologie avec les séquences correspondantes humaines, murines et du poisson-zèbre. L'étude de leur profil d'expression a montré que l'expression des deux isoformes de RAR augmentait pendant le développement du bar alors que RXR α diminuait. Les hybridations ont, quant à elles, révélé une distribution ubiquitaire des récepteurs dans les tissus, distribution reflétant probablement leur implication dans de multiples voies métaboliques.

Ce travail, associé aux deux expériences précédentes, nous a permis, d'une part, d'établir le profil normal d'expression au cours du développement des trois récepteurs étudiés et, d'autre part, de mieux percevoir le lien entre type de récepteurs et type de malformations induites. Néanmoins, la fenêtre de temps pendant laquelle les nutriments influencent ces gènes restait toujours inconnue. Nous avons donc choisi de nourrir les larves de bar avec des aliments inadaptés du point de vue vitamine A ou phospholipides pendant trois périodes différentes afin de déterminer quelle fenêtre de temps avait le plus d'impact sur la morphogenèse des larves.

Available online at www.sciencedirect.com

Aquaculture

Aquaculture xx (2004) xxx–xxx

www.elsevier.com/locate/aqua-online

Expression and localization of some retinoid receptors during European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development

Laure Villeneuve^{a,*}, Enric Gisbert^{a,b}, Chantal L. Cahu^a,
Marie-Madeleine Le Gall^a, Jose L. Zambonino-Infante^a

^aUnité Mixte de Nutrition des Poissons IFREMER-INRA, IFREMER, 29280 Plouzané, France

^bCentre d'Aquicultura, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Aptat. Correu 200, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain

Received 16 June 2004; received in revised form 31 August 2004; accepted 31 August 2004

Abstract

In the present study, we report the characterization in European sea bass of the partial cDNA sequences of three nuclear receptors, retinoic acid receptor (RAR) α , RAR γ , retinoid X receptor (RXR) α , involved in retinoid pathways. These pathways participate to vertebrates morphogenesis processes and may be responsible for the appearance of skeletal malformations. The predicted polypeptide encoded by each cDNA sequence contains the ligand-binding domain (LBD) characteristic of nuclear hormone receptors, and the RXR α cDNA sequence also includes a partial zinc finger domain corresponding to the DNA-binding domain (DBD) of this receptor. The relative expression levels of the three receptors were determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in European sea bass larvae. Between 10 and 42 days posthatch (dph), the expression of RAR α and RAR γ increased 7.3- and 35.6-fold, respectively, while RXR α expression was down-regulated with a factor of 35.4. The same trend was observed between 10 and 21 dph but was not statistically different. Using RNA/RNA hybridizations, RAR α antisense probes were revealed in jaws at 5 dph, and, at 37 dph, they were detected in jaws, vertebra, liver, muscle, pectoral fins, brain, neural tissues, eyes, and branchial arches. At 37 dph, RAR γ expression was found in the cartilage, eyes, and operculum, while the presence of RXR α mRNA was localised in the exocrine pancreas, liver, thyroid, kidney, heart, jaws, and teeth. These results suggested that RAR α and RAR γ were

* Corresponding author. Tel.: +33 2 9822 4386; fax: +33 2 9822 4366.
E-mail address: lvillene@ifremer.fr (L. Villeneuve).

used for European sea bass development. RAR γ would play a key role in the morphogenesis of the cephalic region, while RXR α would be essential during the early stages of development in European sea bass larvae when an intense process of differentiation occurred.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: RAR α ; RAR γ ; RXR α ; Hybridization; Gene expression; Sea bass larvae

1. Introduction

Many families of genes are involved in fish larvae development and morphogenesis as in all vertebrates (Krumlauf, 1994). Although the number of nucleotide sequences from different fish species is continuously increasing in international databases, few studies have been focused on the abovementioned gene families in fish, and they are only restricted to a reduced number of species [zebrafish (Prince et al., 1998; Kimmel et al., 2001) and Japanese flounder (Ogura and Evans, 1995; Suzuki et al., 1998, 1999)].

Morphogenesis and differentiation are rapid and complex processes during early ontogeny of fishes. Indeed, newly hatched larvae undergo dramatic changes in their body shape, morphology, metabolism, swimming abilities, and behavior as they transform into a juvenile, usually over a relatively short-time period. Consequently, marine species constitute an interesting and original biological model inasmuch as they allow one to study the influence of diet composition on above mentioned processes (Zambonino-Infante and Cahu, 2001; Villeneuve et al., submitted for publication). Recent studies have shown that skeletal malformations in fish larvae, induced by nutrients such as vitamin A and/or highly unsaturated fatty acids, are associated with changes in the expression level of genes implicated in retinoid pathways (Villeneuve et al., submitted for publication; Gisbert et al., unpublished data). These retinoid pathways include two kinds of nuclear receptors, the retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR), which usually can be found under three subtypes (α , β , and γ ; Ross et al., 2000). In situ hybridization analyses showed the spatially and temporally restricted distribution patterns of RARs and RXRs during embryogenesis in mouse, which have led to the hypothesis on the role of these receptors in a variety of developmental processes during the early ontogeny of vertebrates (Giguère, 1994). However, these nuclear receptors are widely expressed in adult tissues even if each kind of receptors can be more abundant in some regions, which indicates that most tissues are potential targets of the retinoid action (Giguère, 1994). RARs bind to *9-cis* and *all-trans* retinoic acid, while RXRs bind to the *9-cis* form (Heyman et al., 1992). These receptors can form homo- or heterodimers together, and RXRs can also dimerize with receptors involved in different pathways, such as vitamin D, thyroid hormones, or fatty acids receptors (Yu et al., 1991; James et al., 2003). Then, the resulting dimers regulate the expression of many genes containing retinoic acid response elements, and some of these target genes are implicated in morphogenesis (Ogura and Evans, 1995; Balmer and Blomhoff, 2002). Furthermore, several studies have shown that a disruption of retinoid pathways led to an increase of the skeletal malformations rate (Uni et al., 2000; Haga et al., 2002, 2003; Villeneuve et al., submitted for publication), which emphasizes the

importance of these pathways during vertebrate early development. Retinoid pathway receptors interact with other nuclear receptors, such as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs; Yu et al., 1991; James et al., 2003), which are influenced by different nutrients, including polyunsaturated fatty acids (PUFAs). This indicates that many nutrients can act as morphogenetic signaling molecules, regulating those genes involved in early development through the retinoid pathways, and clearly shows the importance of characterizing the genes encoding these receptors in fish.

The aim of the present study was to determine the structure of the partially cloned RAR α , RAR γ , and RXR α in European sea bass in order to compare it to other species and evaluate their expression patterns and spatial distribution during European sea bass development.

2. Materials and methods

2.1. Rearing of larvae

Three-day old European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae were obtained from the Ecloserie Marine de Gravelines (Gravelines, France) and shipped to the Fish Nutrition Laboratory at the Ifremer (Centre de Brest). Fish were acclimated and divided into 15 35-l cylindroconical fiber glass tanks (2100 larvae/tank) at an initial density of 60 larvae/l. Tanks were supplied with running seawater, which had been previously filtered through a sand filter, then passed successively through a tungsten heater and a degassing column packed with plastic rings. Throughout the experiment, the water temperature and salinity were 20 °C and 35‰, respectively, and the oxygen level was maintained above 6 mg/l by setting the water exchange of the tank up to 30% per hour (flow rate=0.18 l/min). Photoperiod was 24 L:D, and light intensity was 9 W/m² maximum at the water surface. All animal procedures and handling were conducted in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal (National Research Council, 1985). The feeding regime consisted of a patented compound microdiet containing 0.05 g retinyl acetate/kg dry matter. This diet was distributed by a belt feeder 20 h per day and supported good survival (55%) and growth [average body weight at 42 days posthatch (dph)=150 mg].

2.2. RNA isolation, cDNA synthesis and amplification

Fifty larvae were randomly collected at 10, 21, and 42 dph, and total RNA immediately extracted. Total RNA was extracted using the TRIzol[®] reagent kit procedure (Life Technologies, Grand Island, NY) and treated with DNase. For synthesis of cDNA, 5 µg of total RNA was treated with FPLCpure Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase using the Ready-To-Go T-Primed First-Strand Kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

PCR was carried out by an initial denaturation at 94 °C for 1 min followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, specific annealing temperatures for 1.5 min (Table 1) and 72 °C for 1 min; the final extension was conducted at 72 °C for 7 min. PCR mixture contained 0.8 µl

Table 1
Oligonucleotide primers used in PCR reactions

Gene	Forward primers (5' → 3')	Reverse primers (5' → 3')	Annealing temperatures (°C)
GAPDH	CACCACGCTCACCATCGC	CATCTTGGGGAACATGTG	54
RAR α	ACCACGCTCACCATCGC	ATCTTGGGGAACATGTG	56
RAR γ	GAGGTGGGCATGTCCAAG	ATCCATCTCCAGGGGCGAG	58
RXR α	TGCCAGTACTGCCGCTAC	CAGCATCTCCATGAGGAA	56

of the cDNA, 0.2 units Taq polymerase (Appligene, Gaithersburg, MD), 100 μ mol/l dNTP, 50 μ mol of each primer, and 1 \times reaction buffer (Appligene) in a final volume of 50 μ l. Sequences and annealing temperatures for the forward and reverse oligonucleotides are indicated in Table 1.

These primers have been selected after alignment of different species sequences of selected mRNA obtained using the Sequence Retrieval System WWW server at EMBL-EBI (Cambridge, UK). Alignments of cDNA sequence of species from different phyla were necessary as fish cDNA sequences were scarce compared to other vertebrates. The resulting PCR products with the expected sizes have been cloned in pCR[®]II-TOPO vector using the TOPO-TA cloning kit (Invitrogen, Leek, The Netherlands) and sequenced by MilleGen (Labège, France). Alignments and similarity matrices were calculated using ClustalW.

2.3. Real-time RT-PCR

Samples were DNase treated, and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using the iCycler iQTM (Bio-Rad Laboratories). Quantitative PCR analyses for each gene were performed in a total volume of 15 μ l containing 5 μ l cDNA (dilution=10⁻⁵), 1.5 μ l fluorescein (100 nmol/l, Bio-Rad), 0.5 μ l primers (10 μ mol/l), 7.5 Wl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 2 \times (QIAGEN GmbH, Germany). For each target gene, forward and reverse primers (Table 2) were chosen in the sequences previously cloned. Thermal cycling was initiated with incubation at 95 °C for 13.5 min for activation of HotStarTaq™ DNA polymerase. After this initial step, 45 cycles of PCR were performed. Each PCR cycle consisted in heating at 95 °C for 30 s for denaturing and at 60 °C for 1 min for annealing and extension. Cycle threshold (CT) values corresponded to the number of cycles at which the fluorescence emission monitored in real time exceeded the threshold limit. Melting curve analysis was performed to confirm production

Table 2
Nucleotide sequences of the PCR primers used to assay gene expression by real-time quantitative PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	PCR product length (nt)
GAPDH	GAGGTCAAGGTTGAGGGTGA	CCAGTGGACTCAACCACGTA	125
RXR α	CTGGTAGAGTGGGCCAAGAG	GTTCTGTGAGCACCCGTGCA	223
RAR α	CGCTAAACCGAACCAGAG	CTTCTCGGCTGTCCAA	170
RAR γ	GCAAAGCTCACCAAGAGACC	GCGTAGTGAAGCCTGGTAGC	180

of a single product in these reactions, and these products were sequenced by MilleGen. Standard curves were established for each gene by plotting the CT values against the log₁₀ of five different dilutions (in triplicate) of cDNA sample solutions.

Real-time PCR efficiency was determined for each gene from the given slopes in Bio-Rad software, according to the equation $E=10^{(-1/\text{slope})}$. We calculated the relative expression ratio of each gene using REST© software (<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/>). Relative expression ratio of a considered gene is based on the PCR efficiency E and the CT of a sample versus the control and expressed in comparison to the reference gene (GAPDH) according Pfaffl's mathematical model (Pfaffl, 2001): $\text{ratio}=[(E_{\text{gene}})^{\Delta CT_{\text{gene}}(\text{control-sample})}]/[(E_{\text{GAPDH}})^{\Delta CT_{\text{GAPDH}}(\text{control-sample})}]$. Normalization relative to GAPDH provided a widely applicable value for comparative studies of gene expression at the mRNA level inasmuch as its expression is constant during activation and proliferation of cells (Gause and Adamovicz, 1994).

2.4. *In situ* hybridization

pCR®II-TOPO vectors were digested, *EcoRV* and antisense-digoxigenin-labeled probes of RAR α , RAR γ , and RXR α were generated by using the Sp6 RNA polymerase. As a control, sense probes were synthesised by using T7 RNA polymerase after linearization by *SacI*. The 3' overhangs were blunted prior to transcription by treatment with Klenow DNA polymerase.

Larvae were fixed overnight with 4% paraformaldehyde in PBS and embedded in paraffin. Larvae aged 5 dph (stage of mouth opening) were not sectioned, while 37-dph larvae (stage of European sea bass larval development ending) were cut in 7- μm sections and mounted in slides. Paraffin was removed from slides by dewaxing and rehydration steps. The slides were immersed into a solution of 4% paraformaldehyde in PBS and fixed at room temperature for 20 min. Samples were digested by incubating the slides in 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K in 2 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2 mM CaCl₂ at 37 °C for 7 min. Acetylation was performed by immersion of the slide in a beaker containing 0.1 M triethanolamine-HCl (pH 8.0). While stirring was performed, acetic anhydride was added to 0.25% (v/v) and incubated for 5 min. The slides were washed in PBS, 0.1% Tween-20 in PBS and postfixed with 4% paraformaldehyde in PBT (1 \times PBS, 0.1% Tween-20) for 15 min at room temperature. After washing in 0.1% Tween-20 in PBS, slides were soaked in hybridization solution (50% formamide, 5 \times SSC [1 \times SSC is 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0], 2% blocking reagent [Boehringer Mannheim], 1 \times Denhardt's solution [0.02% mass/v each of Ficoll 400, polyvinylpyrrolidone, and bovine serum albumin (BSA), fraction V], 3% dextran sulfate, 0.1% Tween-20, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin, 0.1% (3-[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propane-sulfonate [CHAPS]), 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured tRNA) and prehybridized for 15 min at 65 °C. Hybridization was carried out overnight at 55 °C by using 1 ng/ μl of denatured (at 65 °C for 10 min) RNA probe per slide in hybridization solution. Slides were washed with 50% formamide, 2 \times SSC, 0.3% CHAPS at 65 °C for 30 min, twice in 2 \times SSC, 0.3% CHAPS for 30 min at 37 °C each wash, and then twice in 0.2 \times SSC, 0.3% CHAPS at 37 °C for 30 min each. Digoxigenin-labeled RNA probes were detected by enzyme-linked immunoassay by using an anti-digoxigenin alkaline phosphatase

conjugate and a subsequent enzyme-catalyzed color reaction with BM purple alkaline phosphatase substrate (Roche Diagnostics). Sense probes did not give any staining and were considered as negative controls.

2.5. Statistical analyses

The effect of the stage of development on the expression pattern of RAR α , RAR γ , and RXR α was investigated with a one way ANOVA. Statistical differences in gene expression between control and samples were evaluated in groups means by randomization tests (Pfaffl et al., 2002) using REST $\text{\textcircled{C}}$ software. Two thousand random allocations were performed, and significant differences were considered at $P=0.05$.

3. Results

3.1. Nucleotide and amino acid sequences of RAR α , RAR γ , and RXR α

Using specific primers for each gene, fragments of 383, 522, 822, and 529 nucleotides were obtained for RAR α , RAR γ , RXR α , and GAPDH genes and have been registered in EMBL under AJ496189, AJ496181, AJ567907, and AJ567450 accession numbers, respectively. The deduced amino acid sequence of the cloned portion of RAR α showed a high amino acid identity compared to the RAR α of zebrafish (97%), mouse (93%), and human (92%) (Fig. 1).

Similarly, the protein sequence of RAR γ presented high percentages of homology with the RAR γ sequences of zebrafish (83%), mouse (79%), and human (79%) (Fig. 2). The cloned fragment of both RARs corresponded to the ligand-binding domain (LBD) of their corresponding proteins, which is a helical domain. For RAR α and RAR γ , this helical domain overlaps the translated amino acid (aa) sequences from aa 1–128 and from aa 87–176, respectively. The RXR α deduced amino acid sequence showed a high homology with the RXR α protein sequences of mouse (92%), human (91%), and zebrafish (89%) (Fig. 3). The cloned fragment included a partial zinc finger motive, corresponding to the DNA-binding domain (DBD) and the ligand-binding domain, which presented 93% of homology with the human RXR α ligand-binding domain of the receptor. The DNA binding domain overlaps from the aa 1–22, while the ligand-binding domain is extended between the aa 92–273 of the deduced protein sequence.

3.2. *In situ* hybridizations

At 5 dph, RAR α antisense probes were revealed in jaws (Fig. 4a). No coloration was seen at this stage of development for RAR γ and RXR α antisense probes maybe due to the weakness of the coloration or its localisation in internal tissues. At 37 dph, hybridizations with RAR α antisense probes showed the presence of this nuclear receptor in jaws, vertebra, liver, muscle, pectoral fins, brain, neural tissues, eyes, and

ARTICLE IN PRESS

L. Vileneuve et al. / Aquaculture xx (2004) xxx–xxx

7

```

Human      MASNSSCPTPGGGHNGYVPPYAFPPFPMLOGLSPGALTTLQHQLFVSGYSTPSPAT
Mouse      MASNSSCPTPGGGHNGYVPPYAFPPFPMLOGLSPGALTSLQHQLFVSGYSTPSPAT
Zebrafish  -----MYESVDVNPFLMMDYVNSRQCLIPDKMPHPFSSSIRHQHWSGSHS
Sea bass  -----

Human      IETQSSSEIIVSPSPPLPRIYKPCFVCQDKSSGYHYGVSACBGCKGFRRSIQKMM
Mouse      IETQSSSEIIVSPSPPLPRIYKPCFVCQDKSSGYHYGVSACBGCKGFRRSIQKMM
Zebrafish  IETQSTSEIIVSPSPPLPRIYKPCFVCQDKSSGYHYGVSACBGCKGFRRSIQKMM
Sea bass  -----

Human      VYTCHRDKNCCIINKVTRNRQYCRLLQKCFEVMGSKESVRNDRNKKKKEVPKPCSESYTL
Mouse      VYTCHRDKNCCIINKVTRNRQYCRLLQKCFDVMGSKESVRNDRNKKKKEAPKPCSESYTL
Zebrafish  VYTCHREKNCCIINKVTRNRQYCRLLQKCLEVMGSKESVRNDRNKKKKEEKDPECTENYTL
Sea bass  -----

Human      TFEVGELIEKVRKAHQETFPALCQLGKYTTNNSSEQRVSLDIDLMDKPSSELSTKCIIKTV
Mouse      TFEVGELIEKVRKAHQETFPALCQLGKYTTNNSSEQRVSLDIDLMDKPSSELSTKCIIKTV
Zebrafish  SPDTRQMIKVRKAHQETFPALCQLGKYTTNNSSERRVALDIDLMDKPSSELSTKCIIKTV
Sea bass  -----

Human      DFAKQLPGFTTLTIADQITLLKAAACLDILILRICTRYTFFQD/TMTFSDGLTLNRTQMHA
Mouse      DFAKQLPGFTTLTIADQITLLKAAACLDILILRICTRYTFFQD/TMTFSDGLTLNRTQMHA
Zebrafish  DFAKQLPGFTTLTIADQITLLKAAACLDILILRICTRYTFFQD/TMTFSDGLTLNRTQMHA
Sea bass  -----TLTIADQITLLKAAACLDILILRICTRYTFFQD/TMTFSDGLTLNRTQMHA
*****

Human      GFGLTDLVFAFANQLPLEMEDASTGLLSAICLICGDRQDLEQFDRVDMLOEPLLEALK
Mouse      GFGLTDLVFAFANQLPLEMEDASTGLLSAICLICGDRQDLEQFDRVDMLOEPLLEALK
Zebrafish  GFGLTDLVFAFANQLPLEMEDASTGLLSAICLICGDRQDLEQADKVDVLEPLLEALK
Sea bass  GFGLTDLVFAFANQLPLEMEDASTGLLSAICLICGDRQDLEQAEKVDVLEPLLEALK
*****

Human      VYVRRRPPHPPHPPHMLMKITDLRSISAKGAERVITLMEIPGSMPLIQEMLNSEGL
Mouse      VYVRRRPPHPPHPPHMLMKITDLRSISAKA-----
Zebrafish  IYVRRRPPHPPHPPHMLMKITDLRSISAKGAERVITLMEIPGSMPLIQEMLNSEGL
Sea bass  IYVRRRPPHPPHPPH-----
:***.***.*****

Human      DTLSGQEGGGGRDGGGLAPPPGSCSPSLSPSSNRSSPATHSP
Mouse      -----
Zebrafish  E-----SSSGAQGSRASATTPGSCSPSLSPNSAQSSPPTQSP
Sea bass  -----

```

Fig. 1. Amino acid alignment of RAR α from human (AAD05222), mouse (CAA40749), zebrafish (AAB32276) and European sea bass (AJ496189). Accession numbers are from GenBank database. The ligand-binding domain is highlighted in grey, and the three amino acids essential for DNA binding and dimerization properties of the human RAR α are in bold. Asterisks indicate the amino acids which are conserved in all the aligned protein sequences.

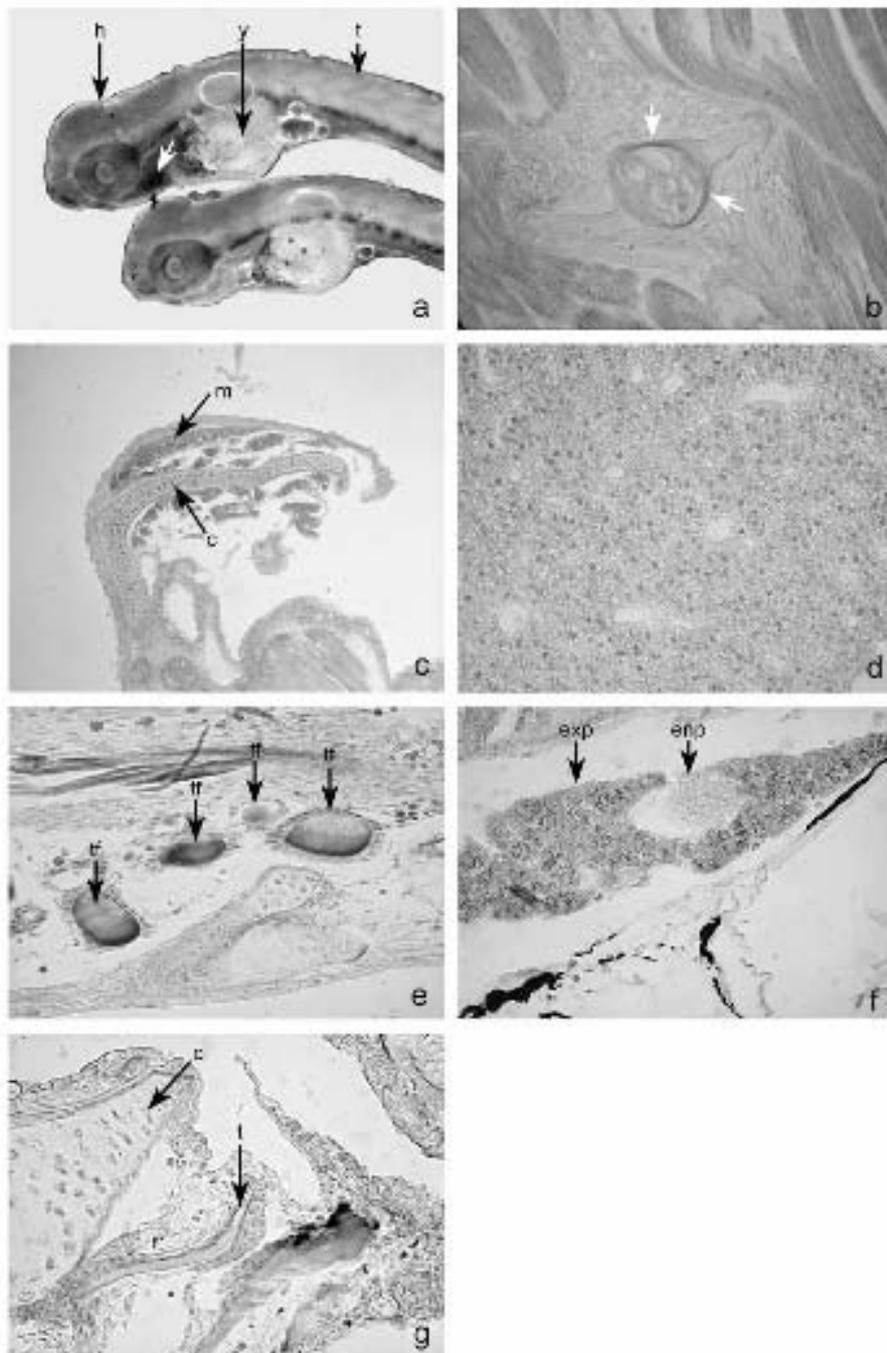
branchial arches, while the RAR γ expression was detected in the cartilage, eyes, and operculum at 37 dph. Hybridizations with the RXR α antisense probes revealed the presence of RXR α in the exocrine pancreas, liver, thyroid, kidney, heart, jaws, and teeth at 37 dph.

Human	MDTKHPLPLDFSTQVN-SSLTSPTGRGSMAPSLHPSLGGPGIGS----PQQLHSPISTLS
Mouse	MDTKHPLPLDFSTQVNSSLSLNSFTGRGSMVPSLHPSLGGPGIGSPLGSSPQLHSPISTLS
Zebrafish	-----
Sea bass	-----
Human	SPINGMGPPFVSVISSPMGPHSMVPTTPTLGFSTGSPQLSSPMNPFVSSSEDIKPLGLNG
Mouse	SPINGMGPPFVSVISSPMGPHSMVPTTPTLGFSTGSPQLSSPMNPFVSSSEDIKPLGLNG
Zebrafish	-----MPVFRQKQTVQLSSPMNAVSSSEDIKPLGLNG
Sea bass	-----
Human	VLKVPFHPFGNMS-FTKHICAI CGDRSSGKHVGVYSCBQCKGPFKRTVRKDLTYTCRDN
Mouse	VLKVPFHPFGNMS-FTKHICAI CGDRSSGKHVGVYSCBQCKGPFKRTVRKDLTYTCRDN
Zebrafish	VNKVPFHRIGTLLSLTKHICAI CGDRSSGKHVGVYSCBQCKGPFKRTVRKDLTYTCRDN
Sea bass	-----
Human	KDCLIDKQRNRCCYCRYQKCLAMGMKRE-----A VQERRQRGKDRNENEVESTSSANED
Mouse	KDCLIDKQRNRCCYCRYQKCLAMGMKRE-----A VQERRQRGKDRNENEVESTSSANED
Zebrafish	KDCMIDKQRNRCCYCRYQKCLAMGMKRE-----A VQERRQRAKERSEAEFG--GCANED
Sea bass	----- CQYCRYQKCLAMGMKREVLLHAA VQERRQRAKDRNENEVESTSSANED ***** * : * * * * *
Human	MPVERILEAELAVEPKTETTYVEANMGLNPSNPDPVTNICQAADKQLFTLVEMAKRIIPHE
Mouse	MPVEKILEAELAVEPKTETTYVEANMGLNPSNPDPVTNICQAADKQLFTLVEMAKRIIPHE
Zebrafish	MPVEKILEAELAVEPKTETTYVEANLSPSANSNPDPVTNICQAADKQLFTLVEMAKRIIPHE
Sea bass	MPVEKILEAEQAVEPKTETTYIETNLGVPSNSNPDPVTNICQAADKQLFTLVEMAKRIIPHE * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
Human	SELPLDQVILLRAGWNELLIASFSHRSIAVKDGILLATGLHVHNSAHSAGVGAIFDRV
Mouse	SELPLDQVILLRAGWNELLIASFSHRSIAVKDGILLATGLHVHNSAHSAGVGAIFDRV
Zebrafish	EDLPLDQVILLRAGWNELLIASFSHRSIAVKDGILLATGLHVHNSAHTAGVGAIFDRV
Sea bass	SELQLDQVILLRAGWNELLIASFSHRSIAIKDGILLATGLHVHNSAHSAGVGAIFDRV * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
Human	LTELVSXMRDMQMDTELGLCLRAIVLPNPDGKGLSNPSEVEALREKVYASLEAYCKKQYF
Mouse	LTELVSXMRDMQMDTELGLCLRAIVLPNPDGKGLSNPSEVEALREKVYASLEAYCKKQYF
Zebrafish	LTELVSXMRDMQMDTELGLCLRAIVLPNPDGKGLSNPSEVEALREKVYASLEAYCKKQYF
Sea bass	LTELVSXMRDMQMDTELGLCLRAIVLPNPDGKGLSNPSEVEALREKVYASLEAYCKKQYF ***** : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
Human	EQPGRPAKLLLRPALRSIGLKCLEHLFFPRLIGDTPIDTFLMEMLEADPHQMT
Mouse	EQPGRPAKLLLRPALRSIGLKCLEHLFFPRLIGDTPIDTFLMEMLEADPHQAT
Zebrafish	DQPGRPAKLLLRPALRSIGLKCLEHLFFPRLIGDTPIDTFLMEMLEADPHQIT
Sea bass	EQPGRPAKLLLRPALRSIGLKCLEHLFFPRLIGDTPIDTFLMEMLEADPHQIT ***** : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

Fig. 3. Amino acid alignment of RXR α from human (NP_002948), mouse (CAA46962), zebrafish (NP_571228), and European sea bass (AJ567907). Accession numbers are from GenBank database. The DNA-binding domain is in heavy type, and the ligand-binding domain is highlighted in grey. Asterisks indicate the amino acids which are conserved in all the aligned protein sequences.

3.3. Expression pattern of RAR α , RAR γ , and RXR α during sea bass morphogenesis

No amplification products were obtained in the negative control reactions. Between 10 and 42 dph, the expression of RAR α and RAR γ increased 7.3- and 35.6-fold, respectively



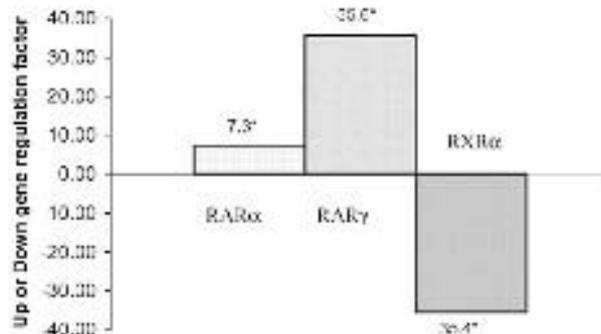


Fig. 5. Normalized gene expression of RAR γ , RAR α , and RXR α in European sea bass larvae: effect of age between 10 and 42 dph. The numbers indicate the relative gene expression ratio. The asterisk denotes the presence of statistical significant differences ($P < 0.05$).

($P < 0.05$), while RXR α expression was down-regulated with a factor of 35.4 ($P < 0.05$) (Fig. 5). The same trend was observed between 10 and 21 dph but there were no statistical differences ($P > 0.05$).

4. Discussion

In this study, we report a partial sequence for RAR α , RAR γ , and RXR α in European sea bass.

The partial deduced amino sequences of these three genes presented high levels of amino acid identity (>92%, >79%, and >89%, respectively) with zebrafish, mouse, and human corresponding sequences. As in these species, European sea bass RAR α , RAR γ , and RXR α sequences include a ligand-binding domain (LBD) which is a helical domain involved in binding the retinoic acid. This LBD is found in many nuclear hormone receptors, such as steroids and thyroid hormones receptors (Green and Chambon, 1988; Tanenbaum et al., 1998). The existence of three amino acids (Lys³⁶⁰, Val³⁶¹, and Lys³⁶⁵) in this domain is essential for DNA binding and dimerization properties of the human RAR α (Rachez et al., 1996), and the same amino acids are also present in the mouse sequence of this nuclear receptor. However, in the present study, we have found that Lys³⁶⁰ was conserved, while conserved substitutions of Val³⁶¹ and Lys³⁶⁵ occurred to isoleucine and arginine, respectively.

Fig. 4. Localization of RAR α , RAR γ , and RXR α mRNA during larval development of European sea bass using in situ hybridization. (a) Hybridization with RAR α antisense (larva from above) and sense riboprobe (larva from below) in European sea bass larvae at 5 dph. The white arrow indicates RAR α expression in the jaw region. h—head, t—tail, y—yolk sac. (b–c) Hybridization with RAR α antisense riboprobe in European sea bass at 37 dph in a vertebra and pectoral fin, respectively. c—cartilaginous tissue, m—musculature. (d–g) Hybridization with RXR α antisense riboprobe in European sea bass at 37 dph in the liver, thyroid, pancreas, and teeth, respectively. c—cartilaginous tissue, enp—endocrine pancreas (Islet of Langerhans), exp—exocrine pancreas, t—tooth, tf—thyroid follicles.

In the zebrafish, Lys³⁶⁰ is present and Val³⁶⁵ is also substituted by isoleucine. These conservations or substitutions may indicate that these amino acids play an important role in the RAR α European sea bass protein like in the human one. In the human RAR γ protein, Met272, present in the ligand-binding pocket, was a critical residue for the recognition of the receptor-selective analogs (Ostrowski et al., 1998). This amino acid being preserved in the aligned sequences in this study, we might assume it plays a crucial role in vertebrates. The RXR α sequence also contains a partial zinc finger domain, this region is, in nearly all cases, the DNA-binding domain (DBD) of nuclear hormone receptors (Green and Chambon, 1988).

In comparison to the other sequences, it appeared that our deduced amino acid sequence contained an insertion of 5 aa just before the last amino acid of this predicted DNA-binding domain. Interestingly, this insertion is absent in all the RXR α fish sequences found in the libraries (*Danio rerio*, *Paralichthys olivaceus*, and *Oryzias latipes*). Further studies would be necessary to determine if this insertion plays any role in this DBD.

It is well known that RXRs form heterodimers with several nuclear receptors such as vitamin D, PUFAs, or thyroid hormone receptors (TR), indicating a convergence of these pathways and the importance of RXRs in these cellular pathways (Ross et al., 2000). RXRs also bind RARs and maximize RARs effects on their target genes (Yu et al., 1991). Some of the genes under control of these different kinds of dimers are involved in morphogenesis (Ross et al., 2000; Balmer and Blomhoff, 2002), explaining why vitamin A is known as a morphogenetic molecule through the actions of its receptors. In this work, European sea bass larvae were fed a compound diet containing an optimal level of vitamin A and allowing a good growth and a harmonious development of the larvae. Thus, we have considered that the gene expression levels and localizations observed correspond to those obtained under normal conditions of rearing. In the present study, the variation in expression of RXR α was determined between 10 and 42 dph, and it appeared that the expression was lowered 35 times between these two dates.

These data may indicate that RXR α are essential during the early stages of development in European sea bass larvae when an intense process of differentiation occurs. At older stages, the lowering in their expression reflected a poorer need of these receptors. Concerning RAR α and RAR γ , we observed that their expression increased 7 and 36 times between 10 and 42 dph, respectively. It has been previously demonstrated (Villeneuve et al., submitted for publication) that, in case of hypervitaminosis A in European sea bass larvae, there was an 83-times increase of RAR γ expression at 10 dph, which was associated to a high percentage of skeletal malformations (80%) affecting the head region of a young fish. These results suggested that RAR α and RAR γ were determining for European sea bass development and that the γ isoform plays a key role in the morphogenesis of the cephalic region.

Several regions of vertebrate embryos, such as retina, spinal cord, heart, somites, and liver exhibit localized RA synthesis (Ross et al., 2000), the liver being the main organ for vitamin A storage (Giguère, 1994). The presence of vitamin A receptors has also been demonstrated in these tissues (Ross et al., 2000). In addition, vitamin A is also present in the eyes (retinal epithelium) where it is transformed in retinaldehyde necessary for light absorption in the vision (Duester, 2000). In the present study, RAR α expression was localized in the liver, nervous system, and eyes, while RAR γ was detected in the eyes, and

RXR α was detected in the liver and in the heart. The different sites of expression of these receptors may reflect their implication in the development of these tissues. It has been demonstrated that homozygous RXR α mutant mice presented abnormalities of the eyes and died in utero because of heart defects. In the present paper, we have localized RXR α in the heart and in the eye at 37 dph so we may assume that, as in mammals, RXR α plays a role in eye and heart development. As described above, RXRs are well known to interact with thyroid hormone receptors (TR), and these heterodimers control the transcription of genes involved in activation processes dependant on thyroid hormones. This interaction RXR α /TR is suggested by the presence of RXR α in the thyroid follicles in European sea bass larvae at 37 dph.

Vitamin A is also involved in the embryogenesis, and any perturbation of its homeostasis leads to an abnormal development in mammals (Malpel et al., 2000; Ross et al., 2000), birds (Lee et al., 2001), amphibians (Minucci et al., 1996), and fishes (Haga et al., 2002, 2003). Its morphogenetic role is mediated by its receptors which modulate the expression levels of numerous genes, some of them being involved in antero–posterior axis differentiation (Balmer and Blomhoff, 2002). The intracellular localization and expression of these receptors may give information about sites of vitamin A action. At 5 dph, RAR γ was detected in the jaws and branchial arches of European sea bass larvae. This may indicate that this isoform is essential for the head development during the early stages of development. At 37 dph, it was revealed in the nuclei of the cells of pectoral fins, vertebra, and muscle, while RAR α was detected in a more ubiquitous manner in all the cartilaginous tissue. This suggests that RAR α role is more restricted than the one of RAR γ in the body patterning. It is interesting to note that, as it has been indicated above, an abnormal increase of RAR γ during hypervitaminosis A was associated to a high rate of malformations affecting the cephalic region. This observation can partially be explained by the presence of RAR γ in the cartilaginous tissue of the craniofacial skeleton and by its capacity to be modulated by a high dietary level of vitamin A during early stages of development. Haga et al. (2003) reported that any disturbance of the RAR signaling pathways regulating the osteoblast activity was mainly responsible for severe jaw deformities in Japanese flounder, while we have demonstrated (Villeneuve et al., submitted for publication) that the RAR γ was the isoform of RARs mainly implicated in these kinds of skeletal malformations. As the role of these receptors are redundant, we can hypothesize that the skeleton of the vertebral column and fins was less affected because of the potential presence of the isoforms α and β , suggesting that RAR γ was not the major nuclear receptor involved in skeletal malformations in these parts of body. This group of receptors was not only observed in the vertebral column, skull, and appendicular skeleton inasmuch as RXR α expression was also revealed in the dentine of teeth in European sea bass larvae. Considering all these results, it seems that vitamin A pathways are involved in bone and teeth formation, similarly to some other gene families, such as sonic hedgehog (shh), Hox, or bone morphogenetic proteins (BMP), which are involved in craniofacial morphogenesis, including teeth and bone formation (Helms et al., 1997; Li et al., 1998). As shh and Hox can be regulated by retinoic acid, and inasmuch as shh interacts with BMPs, we can imagine that these genes are targets for RARs and RXRs in the tissues where we revealed their expression. However, further investigations would be necessary to describe the molecular interactions between all these molecules.

In summary, the European sea bass sequences of RAR α , RAR γ , and RXR α are quite similar to the corresponding sequences of mouse, human, and zebrafish. The study of their expression patterns showed that RAR α and RAR γ expressions increased during European sea bass development, while RXR α expression decreased. In situ hybridizations revealed a ubiquitous spatial distribution of these nuclear receptors which may reflect their implication in many metabolic pathways.

Acknowledgements

The authors wish to thank P. Quazuguel and H. Le Delliou for their excellent technical assistance during larval rearing and sample analysis. L. Villeneuve and E. Gisbert were supported by an IFREMER-INRA grant and EC Marie Curie Individual Fellowship (QLKCT-2001-52009), respectively.

References

- Balmer, J.E., Blomhoff, R., 2002. Gene expression regulation by retinoic acid. *J. Lipid Res.* 43, 1775–1808.
- Doester, G., 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267, 4315–4324.
- Gause, W.C., Adamowicz, J., 1994. The use of the PCR to quantitate gene expression. *PCR Methods Appl.* 3, 123–135.
- Giguère, V., 1994. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr. Rev.* 15 (1), 61–79.
- Green, S., Chambon, P., 1988. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* 4 (11), 309–314.
- Haga, Y., Suzuki, T., Takeuchi, T., 2002. Retinoic acid isomers produce malformations in postembryonic development of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zool. Sci.* 19, 1105–1112.
- Haga, Y., Suzuki, T., Kagechika, H., Takeuchi, T., 2003. A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 221, 381–392.
- Helms, J.A., Kim, C.H., Hu, D., Minkoff, R., Thaller, C., Eichele, G., 1997. Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. *Dev. Biol.* 187, 25–35.
- Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., Stein, R.B., Eichele, G., Evans, R.M., Thaller, C., 1992. 9-*cis* retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397–406.
- James, S.Y., Lin, F., Kolluri, S.K., Dawson, M.I., Zhang, X.K., 2003. Regulation of retinoic acid receptor β expression by peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands in cancer cells. *Cancer Res.* 63, 3531–3538.
- Kimmel, C.B., Miller, C.T., Moens, C.B., 2001. Specification and morphogenesis of the zebrafish larval head skeleton. *Dev. Biol.* 233, 239–257.
- Krumlauf, R., 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191–201.
- Lee, S.H., Fu, K.K., Hui, J.N., Richman, J.M., 2001. Noggin and retinoic acid transform the identity of avian facial prominences. *Nature* 414, 909–912.
- Li, H., Bartold, P.M., Zhang, C.Z., Clarkson, R.W., Young, W.G., Waters, M.J., 1998. Growth hormone and insulin-like growth factor I induce bone morphogenetic proteins 2 and 4: a mediator role in bone and tooth formation? *Endocrinology* 139, 3855–3862.
- Malpel, S., Mendelsohn, C., Cardoso, W.V., 2000. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 127, 3057–3067.
- Minucci, S., Saint-Jemmet, J.P., Toyama, R., Scita, G., De Luca, L.M., Taim, M., Levin, A.A., Ozato, K., Dravid, L.B., 1996. Retinoic X receptor-selective ligands produce malformations in *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 1803–1807.

- National Research Council, 1985. Guide for the care and use of the laboratory animals. Publication no 85-23 (rev.), National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- Ogura, T., Evans, R.M., 1995. A retinoic acid-triggered cascade of HOXB1 gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 387–391.
- Ostrowski, J., Roalsvig, T., Hammer, L., Marinier, A., Starrett, J.E., Yu, K.L., Reczek, P.R., 1998. Serine 232 and methionine 272 define the ligand binding pocket in retinoic acid receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* 273 (6), 3490–3495.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002–2007.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, 9–16.
- Prince, V.E., Joly, L., Ekker, M., Ho, R.K., 1998. Zebrafish hox genes: genomic organization and modified colinear expression patterns in the trunk. *Development* 125, 407–420.
- Rachez, C., Sautières, P., Formstecher, P., Lefebvre, P., 1996. Identification of amino acids critical for the DNA binding and dimerization properties of the human retinoic acid receptor α . *J. Biol. Chem.* 271 (30), 17996–18006.
- Ross, S.A., Mc Caffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M., 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80, 1021–1054.
- Suzuki, T., Oohara, I., Kurokawa, T., 1998. Hoxd-4 expression during pharyngeal arch development in flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos and effects of retinoic acid on expression. *Zool. Sci.* 15, 57–67.
- Suzuki, T., Oohara, I., Kurokawa, T., 1999. Retinoic acid given at late embryonic stage depresses sonic hedgehog and Hoxd-4 expression in the pharyngeal area and induces skeletal malformation in flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Devel. Growth Differ.* 41, 143–152.
- Tanenbaum, D.M., Wang, Y., Williams, S.P., Sigler, P.B., 1998. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 5998–6003.
- Uni, Z., Zaiger, G., Gal-Garber, O., Pines, M., Rozenboim, I., Reifen, R., 2000. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chicken small intestine. *Br. Poult. Sci.* 41, 410–415.
- Villeneuve, L., Gisbert, E., Cahu, C. L., Le Delliou H., Zambonino Infante, J., (submitted for publication). Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Br. J. Nutr.*
- Yu, V.C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J.M., Devary, O.V., Nair, A.M., Kim, S.Y., Boutin, J.M., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 1991. RXR β : a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67, 1251–1266.
- Zambonino-Infante, J., Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol., C* 130 (4), 477–487.

CHAPITRE V

Effet de la nature et de la concentration des lipides alimentaires sur le développement des larves de bar et implication des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque.

1. Introduction.

Dans les écloséries, environ 30% des poissons présentent des malformations (Andrades et al., 1994 ; Boglione et al., 2001) ce qui constitue une perte importante pour les pisciculteurs et nuit à l'image de l'aquaculture. Plusieurs facteurs, environnementaux et/ou génétiques, sont impliqués dans la morphogénèse et peuvent être responsables de l'apparition de ces malformations. De nombreuses études ont, en effet, démontré que certains nutriments, apportés à une concentration ou sous une forme inadaptée, provoquent des déformations squelettiques (Takeushi et al, 2003; Villeneuve et al, non publié). Ces perturbations du développement sont liées à l'action des nutriments sur des gènes cibles via des récepteurs nucléaires. Par exemple, un excès de vitamine A perturbe l'expression normale de gènes de la morphogénèse induisant des effets tératogènes chez les vertébrés (Ogura et Evans, 1995 ; Suzuki et al., 1998 ; Ross et al., 2000). De même, les taux alimentaires et la forme d'apport des lipides affectent la croissance et le taux de malformation des larves de poissons marins (Cahu et al., 2003b).

Les lipides sont la source majeure d'énergie pour les larves et les besoins en lipides des larves de poissons marins ont été très étudiés. Une attention plus particulière a été portée aux phospholipides et aux acides gras poly insaturés (AGPI) (Sargent et al., 1999). Récemment, une étude a montré qu'un aliment contenant 19% de lipides, dont 9% de phospholipides, permettait une bonne croissance chez les larves de bar (Cahu et al., 2003b). Les mêmes auteurs ont également observé que l'apparition de malformations chez ces larves était majoritairement due au rapport phospholipides/lipides neutres dans l'aliment. Il a été suggéré que les larves de poissons marins utilisaient les phospholipides beaucoup plus efficacement que les lipides neutres du fait de certaines caractéristiques de leurs enzymes digestives respectives, phospholipase A2 et triglycéride lipase (Morais et al., 2004). En effet, la transcription de la lipase est peu induite par la quantité alimentaire de lipides neutres alors

Tableau 1. Composition des aliments (g/kg).

Ingrédients	PL1	PL3	PL5	NL1	NL3
Farine de poissons délipidée ¹			510		
CPSP 90 ²			140		
Huile de foie de morue	0	0	0	7	14
Lécithine marine ³	21	14	7	0	0
Lécithine de soja ⁴	0	7	14	14	7
Vitamines ⁵			80		
Minéraux ⁶			40		
Bétaine			20		
Composition			%		
Protéines	59.9	61.6	60.4	58.7	59.6
Lipides	16.4	16.7	16.7	17.1	18.2
Phospholipides (PL)	13.2	13.0	12.1	11.1	8.1
EPA + DHA dans PL	1.1	2.3	4.8	0.3	0.4
Lipides neutres (NL)	4.8	3.8	3.0	6.2	11.0
EPA + DHA dans NL	0.3	0.3	0.3	1.3	2.6
Cendres	17.4	17.0	16.8	15.6	15.6
Matières sèche	93.2	93.7	92.6	93.5	93.6
Energie (J/kg)	1618	1658	1638	1624	1681

¹: 95% de matière sèche, 86.7% de protéines, 2.9% de lipides.

² : Concentré Protéique Soluble de Poissons non gras Sopropêche, 97% de matière sèche, 85% de protéines, 3% de lipides.

³: Lécithine naturelle marine LC60: phosphominsTM, Phosphotech ; 60% de phospholipides.

⁴: Etablissement Louis François ; 95,7% de matière sèche, 60% de phospholipides.

⁵ par kg de mélange vitaminé: concentrat de choline 50% 200 g, rétinyl acétate 340 mg, vitamine E (500 UI/g) 10 g, vitamine D3 (500000 UI/g) 500 mg, vitamine B3 1 g, vitamine B5 2 g, vitamine B1 100 mg, vitamine B2 400 mg, vitamine B6 300 mg, vitamine C 20 g, vitamine B9 100 mg, concentrat de vitamine B12 (1g/kg) 1g, biotine 1 g, vitamine K3 1g, meso-inositol 30 g, cellulose 732.1 g.

⁶: par kg de mélange minéral: KCl 90 g, KI₄O 40 mg, CaHPO₄ 2H₂O 500 g, NaCl 40 g, CuSO₄ 5H₂O 3 g, ZnSO₄ 7H₂O 4 g, CoSO₄ 7H₂O 20 mg, FeSO₄ 7H₂O 20 g, MnSO₄ H₂O 3g, CaCO₃ 215 g, MgSO₄ 7H₂O 124 g, NaF 1g.

que le niveau de transcription de la phospholipase A2 suit graduellement le taux de phospholipides alimentaires.

Les poissons marins sont incapables de synthétiser des AGPI n-3, tels que l'acide eicosapentanoïque (EPA) et l'acide docosahexanoïque (DHA). Or ce sont des acides gras essentiels qui sont très représentés dans les membranes cellulaires des poissons. Le taux optimal d'EPA + DHA est d'environ 3% de la matière sèche (MS) de l'aliment pour les poissons marins (Sargent et al., 1999).

Les acides gras peuvent également réguler la transcription de gènes de leur propre métabolisme grâce à leurs récepteurs nucléaires (Kliewer et al., 1997), les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors). Chez de nombreuses espèces, ces PPAR ont la faculté de former des dimères avec les RXR, récepteurs de l'acide rétinoïque (Bonilla et al., 2000 ; Ross et al., 2000). Cette interaction indique que la voie de signalisation cellulaire des acides gras et celle des rétinoïdes sont étroitement liées et peuvent agir de concert sur de nombreux gènes. Ces gènes possèdent soit un élément RARE (retinoic acid receptors response element) soit un élément PPRE (PPAR response element) dans leur séquence promotrice et sont impliqués dans le métabolisme lipidique, le maintien de l'équilibre énergétique (Keller et al., 1993) ou la morphogénèse (Balmer & Blomhoff, 2002). Une modification de l'équilibre entre les RXR et les PPAR, par exemple une augmentation des PPAR, perturbe le nombre de récepteurs engagés dans les voies de signalisation des rétinoïdes (Bonilla et al., 2000). La nature et le taux de lipides alimentaires peuvent donc modifier l'expression de récepteurs impliqués dans la croissance, la différenciation et l'homéostasie cellulaire (Bonilla et al., 2000).

Le but de ce travail était d'évaluer les effets de la nature (phospholipides vs lipides neutres) et le taux des AGPI n-3 alimentaires sur 1) l'apparition des malformations squelettiques et 2) la régulation de plusieurs gènes directement ou indirectement impliqués dans la voie de signalisation des rétinoïdes chez les larves de bar.

2. Matériel et méthodes.

Des larves de bar âgées de 3 jours ont été élevées dans des conditions et des structures comparables à celles de l'expérience précédente. A partir de J7, elles ont été nourries avec 5 aliments composés différant par la forme d'apport des lipides (lipides neutres, NL ou phospholipides, PL) ou leur origine (marine ou végétale, induisant des différences dans la quantité d'AGPI). Les 5 aliments testés en triplicat sont: PL1, PL3, PL5, NL1 et NL5 (Tableau 1). Dans les régimes PL la fraction phospholipidique d'origine marine variait en

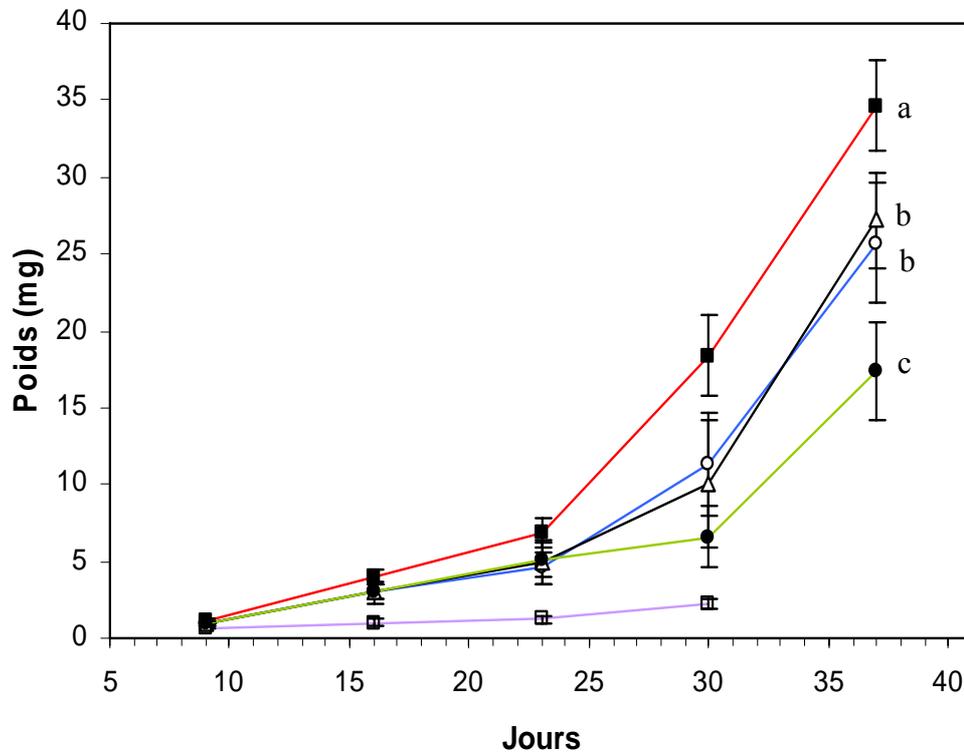


Figure 1. Croissance des larves de bar à différentes dates. La courbe de croissance des larves nourries avec PL5 est en bleu, celle du groupe PL3 en rouge, celle du groupe PL1 en noir, celle du groupe NL3 en mauve et celle du groupe NL1 en vert. Les moyennes \pm ET (n=3) affectées de lettres différentes à J42 sont significativement différentes ($P < 0.05$).

relation inverse avec celle d'origine végétale (lécithine de soja) ; dans les régimes NL, la lécithine de soja variait en relation inverse avec les lipides neutre d'origine marine (huile de foie de morue). La formulation de l'aliment PL1 était très proche de celle d'un aliment déjà utilisé dans le laboratoire qui donnait de bonnes valeurs de croissance et de survie, il a donc servi de contrôle (Cahu et al., 2003). A J37, les poissons de chaque régime ont été regroupés dans des bacs de 700 L et nourris jusqu'à la fin de l'expérience (J71) avec un aliment commercial.

Au cours de cette étude, nous avons suivi les paramètres suivants:

- zootechniques: croissance, survie relative, malformations,
- histologiques: observation de coupes de foie, d'intestin et de vessie natatoire par microscopie optique,
- enzymatiques: mesure des activités spécifiques de la lipase, de la phosphatase alcaline, de l'aminopeptidase N, de la sécrétion de la trypsine et de l'amylase,
- moléculaires: effet du développement et effet des aliments composés sur l'expression (niveaux de messagers) de RAR α , RAR γ , RXR α , BMP4 et IGF-I.

3. Résultats.

3.1 Croissance et survie (Fig. 1).

L'observation des larves sous loupe binoculaire quelques minutes après le début de la distribution des aliments révélait par transparence des intestins remplis, indiquant que tous les aliments avaient été correctement ingérés. A J37, les larves nourries avec l'aliment PL3 avaient une croissance significativement plus élevée de 21.4% par rapport au groupe contrôle (PL1; $P < 0.05$) et de 25.7 et 49.7% par rapport aux larves alimentées avec PL5 et NL1 ($P < 0.05$). Les larves du groupe NL3 étant mortes avant J37, nous n'avons pas pu comparer leur poids à celui des autres groupes bien qu'il ait été significativement plus faible à J23 et J30.

Par rapport au groupe contrôle (PL1), les survies relatives respectives des groupes PL3, PL5 et NL1 étaient de 226.1, 31.5 et 128.7%. La meilleure survie était observée dans le groupe PL3 ($n = 710$).

3.2 Microscopie optique.

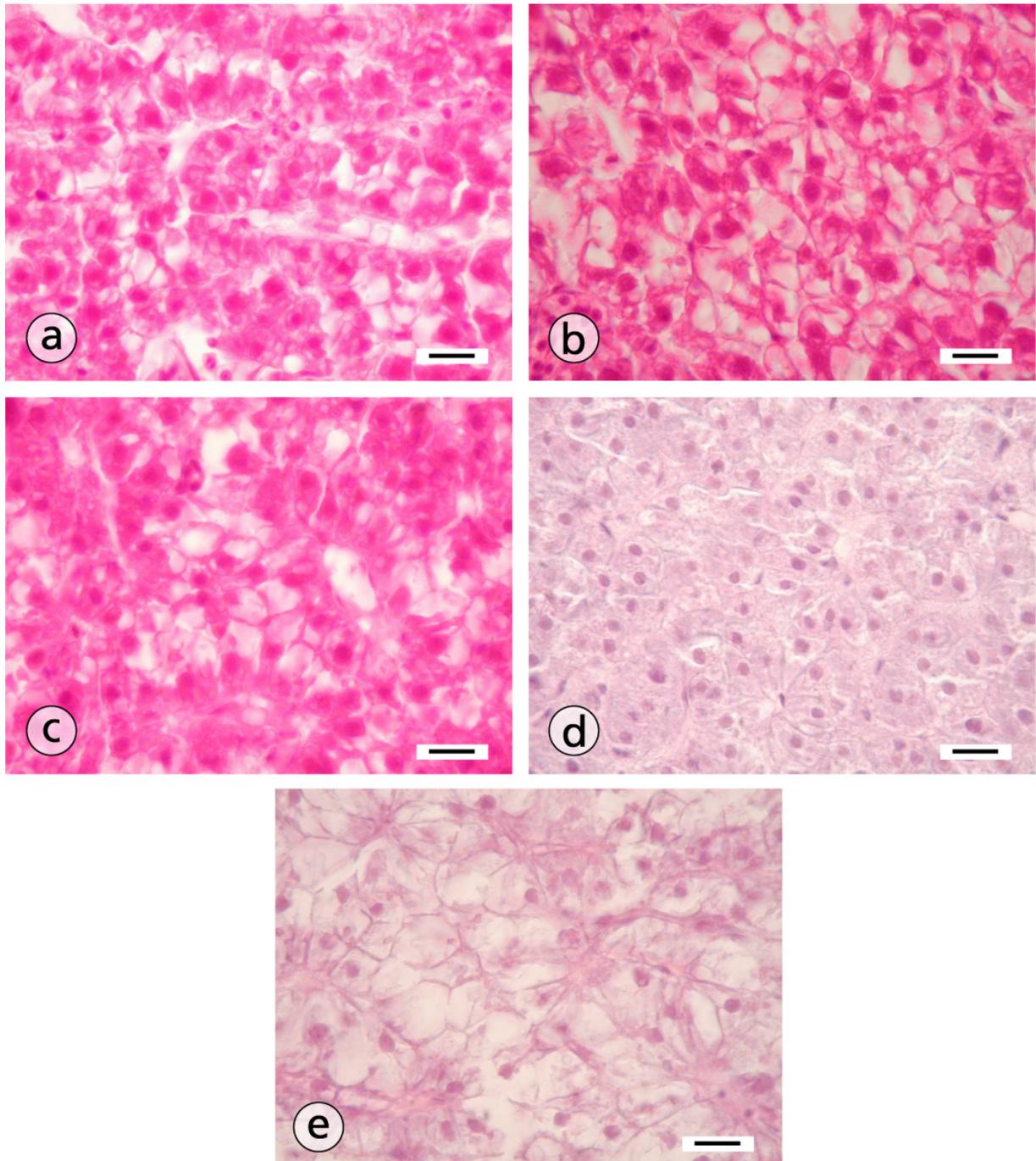


Figure 2. Coupes histologiques de foie de larves de bar nourries avec différents taux d'EPA et de DHA. Foie de poissons nourris avec PL1 (a) et NL1 (d) montrant des hépatocytes avec très peu d'inclusions lipidiques. Foies de poissons nourris avec PL3 et PL5 avec une accumulation lipidique forte (b) et intermédiaire (c) dans le cytoplasme des hépatocytes. Foie des poissons nourris avec NL3 montrant le déplacement des noyaux en périphérie des hépatocytes et la présence de nombreuses vacuoles lipidiques de différentes tailles (e). Les coupes des larves nourries avec les régimes PL et NL1 ont été faites sur des animaux âgés de 37 jours et celles du groupe NL3 sur des larves de 30 jours. Echelle : 25 μ m.

Les **hépatocytes** ayant peu d'inclusions lipidiques (groupes PL1, PL3, PL5 et NL1) présentaient de larges noyaux en position centrale alors que le foie des animaux nourris avec NL3 présentait des noyaux périphériques et une très forte accumulation de lipides (Fig.2).

La muqueuse de l'**intestin** est constituée d'un épithélium colonnaire simple avec des bordures en brosse acidophiles et des noyaux en position centrale (Fig. 3a-b, 4). La région antérieure de l'intestin présente des villosités plus longues et nombreuses que la partie postérieure. Seules les larves du régime NL3 présentaient des modifications de l'organisation histologique de la partie antérieure de l'intestin qui contenait une accumulation très importante de gouttelettes lipidiques poussant le noyau en position basale (Fig. 3c-d). Les poissons nourris avec les aliments PL, contenant l'EPA et le DHA surtout dans la fraction phospholipidique, présentaient de nombreuses vacuoles lipidiques (Fig 4a-d) dans les entérocytes de la partie postérieure de l'intestin. Ce phénomène est appelé, sans aucune connotation pathologique, stéatose. Les poissons des groupes NL accumulaient moins de lipides dans cette région par rapport aux groupes PL (Fig 4e-f).

Les poissons nourris avec les aliments PL et NL1 avaient une **vessie natatoire** normale, remplie d'air, organisée en un épithélium cuboïde stratifié (Fig. 3e). 90% des larves nourries avec NL3 ne présentaient pas d'air dans leur vessie natatoire et des cellules hypertrophiées occupaient le lumen de la vessie (Fig. 3f).

3.3 Malformations.

Le taux de malformation a été déterminé à J71 (Fig. 5), le poids moyen des juvéniles était de 2.4 ± 0.59 g. Environ 50% des poissons nourris avec l'aliment PL5 (4.8% d'EPA + DHA dans la fraction phospholipidique) étaient malformés alors l'aliment ne contenant que 1.1% d'EPA + DHA (PL1) dans la même fraction n'induisait que 6.6% de malformations. Les groupes PL5 et PL3 présentaient des malformations affectant majoritairement la colonne vertébrale (respectivement, 35.3 et 10.2%) alors que, les poissons nourris avec NL1 présentaient un pourcentage équivalent pour les malformation de la colonne et de l'opercule (7.9 et 8.2%).

3.4 Activités enzymatiques.

A J37, les taux d'EPA + DHA dans les aliments affectaient significativement la **sécrétion de la trypsine et de l'amylase**. Les larves nourries avec les plus faibles taux d'EPA

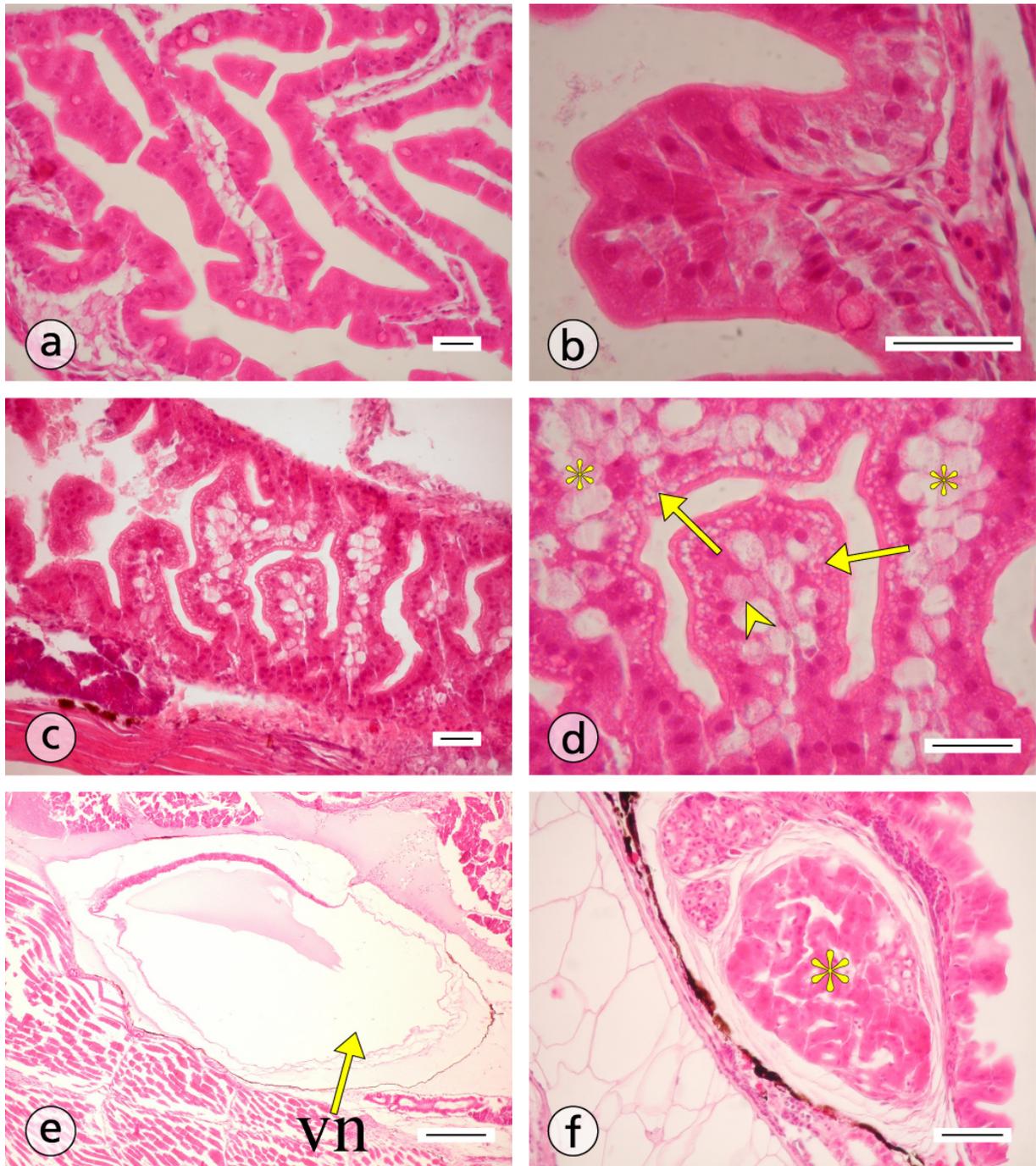


Figure 4. Coupes histologiques de l'intestin antérieur et de la vessie natatoire des larves de bar en fonction du régime. Intestin antérieur de larves à J37 nourries avec PL1 montrant un épithélium simple colonnaire avec des noyaux en position centrale et sans accumulation lipidique (a, b). Intestin antérieur de larves à J30 nourries avec PL3 montrant la présence de petites gouttelettes lipidiques apicales (astérisque), le déplacement du noyau en position basale (tête de flèche) et de larges vacuoles lipidiques entre les entérocytes (flèche) (c, d). Vessie natatoire normale de larves nourries avec PL1 (e). Vessie natatoire anormale de poissons nourris avec PL3 (f ; vn = vessie natatoire). Echelle : 100 μ m.

+ DHA (PL1 et NL1) avaient les taux les plus élevés de sécrétion trypsique (Fig. 6 ; $P < 0.05$), alors que ceux nourris avec PL3 et PL5 avaient les plus faibles. Le groupe PL5 (nourris avec le plus fort taux d'EPA et de DHA) avait une sécrétion d'amylase 8.2% plus faible que celle des autres lots de poissons (Fig. 6).

L'activité de la **lipase** était également affectée par les régimes (Fig. 7). A J30, son activité spécifique était deux fois plus élevée dans le groupe NL1 par rapport aux autres larves. A J37, dans le lot PL5, cette activité était plus élevée de 37, 54 et 45% par rapport aux activités mesurées dans les poissons nourris respectivement avec les aliments PL1, PL3 et NL1.

Les aliments influençaient aussi les activités spécifiques des enzymes de la bordure en brosse (Fig. 8 ; $P < 0.05$). A J30 et J37, l'activité spécifique la plus forte de la **phosphatase alcaline** était mesurée dans le groupe PL3 alors qu'aucune différence significative n'apparaissait entre les autres groupes (PL1, PL5 et NL1). A J30, les valeurs de l'activité spécifique de l'**aminopeptidase N** n'étaient pas significativement différentes alors qu'à J37, l'activité était 30% plus faible dans les larves du lot PL1 par rapport aux autres groupes.

3.5 Effet du développement sur l'expression des gènes (Fig. 9).

Seules les valeurs obtenues dans le groupe contrôle (PL1) ont été prises en considération. L'expression de tous les gènes, sauf celle de $RAR\alpha$, tendait à décroître entre J16 et J37 mais aucune différence significative n'est apparue.

3.6 Effet des aliments sur l'expression des gènes (Fig. 10).

A J16, les poissons nourris avec NL3 présentaient une expression plus forte de $RXR\alpha$ (facteur de régulation: $\times 3.06$, $P < 0.001$) par rapport au groupe contrôle (PL1) alors qu'à J23, l'expression de $RAR\alpha$ ($P < 0.001$), $RAR\gamma$ ($P < 0.001$), $RXR\alpha$ ($P < 0.01$) et BMP4 ($P < 0.001$) était diminuée respectivement de 2.9, 3.1, 3 et 2 dans ce même groupe. Chez les larves du groupe NL1 l'expression des gènes était significativement différente du groupe contrôle, à J16 uniquement, avec des facteurs d'expression de $\times 6.8$ ($P < 0.001$) pour $RAR\alpha$, $\times 2.6$ ($P < 0.01$) pour $RXR\alpha$, et $\times 3.8$ ($P < 0.001$) pour BMP4. Des différences significatives étaient également observées pour le lot PL5 uniquement à J16: l'expression de $RAR\alpha$ ($P < 0.01$), $RXR\alpha$ ($P < 0.001$) et IGF-I ($P < 0.001$) était respectivement 3.5, 3.5 et 4.5 fois plus faibles que dans le

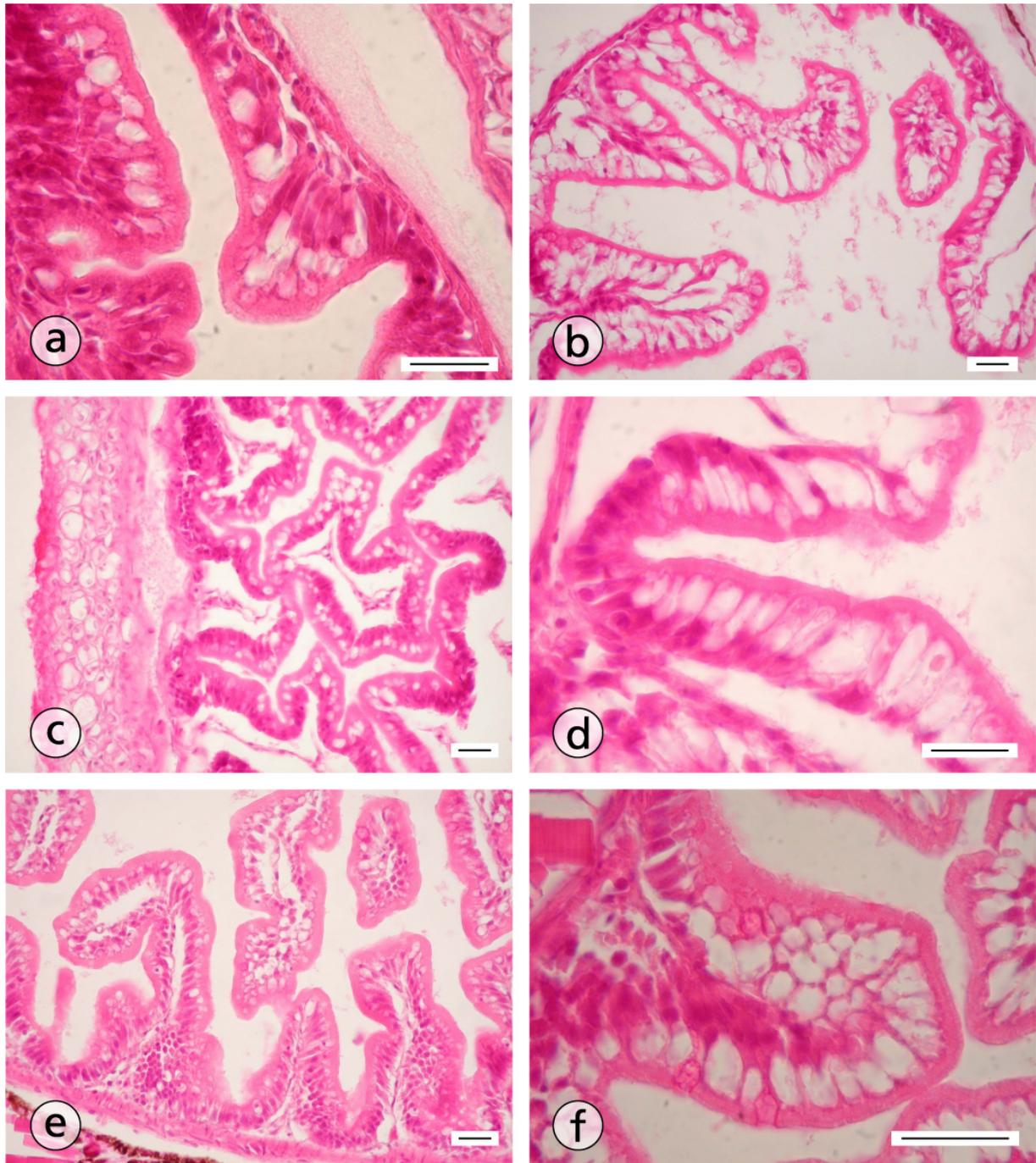


Figure 4. Coupes histologiques d'intestin postérieur des larves de bar en fonction du régime montrant différents degrés de stéatose intestinale : PL1 (a), PL3 (b), PL5 (c-d), NL1 (e) et NL3 (f). Il est à noter que les entérocytes des poissons nourris avec NL3 présentent une accumulation de lipides plus faible que ceux des larves nourries avec PL3. Echelle : 100 μ m.

groupe contrôle. L'aliment PL3 ne paraissait pas avoir d'effet sur l'expression des gènes par rapport à PL1.

4. Discussion.

Depuis plusieurs années, de nombreux laboratoires de recherche en nutrition essaient de formuler un aliment composé pour larves de poisson marins donnant de bons résultats en terme de croissance, survie et développement. Au cours de ces recherches, il a été montré que certains nutriments pouvaient avoir un impact sur la croissance larvaire et la morphogénèse. En particulier, il avait été observé que le ratio phospholipides/lipides neutres et la nature des phospholipides influençaient le développement des larves de bar (Cahu et al., 2003b). Pour mieux cerner l'effet des lipides sur le développement des larves, nous nous sommes intéressés à l'effet de différentes doses alimentaires d'AGPI ainsi qu'à l'influence de la forme d'apport (phospholipides ou lipides neutres). Nous avons aussi pris en compte la possible interaction entre les voies de signalisation cellulaire des AGPI et des rétinoïdes.

Cahu et al. (2003b) ont montré qu'une bonne croissance et une bonne survie pouvaient être obtenues avec un aliment contenant 11% de phospholipides, valeur qui a été utilisée pour la formulation des aliments PL5, PL3, PL1 et NL1. Bien que le pourcentage de phospholipides ait été plus faible (8%) dans l'aliment NL3, ce pourcentage suffisait pour avoir des taux de croissance et de survie acceptables (Cahu et al., 2003b). Peu d'études portent sur le ratio DHA/EPA optimal pour la première alimentation des larves de poissons marins et il a été suggéré que la composition lipidique des œufs de poissons pouvait constituer un indicateur des besoins nutritionnels des larves nouvellement écloses. Pour les espèces marines, le ratio proposé est de 2:1 et a été retenu pour la nutrition larvaire (Sargent et al., 1999). Sargent et al. (1997) indiquent en particulier qu'un rapport DHA/EPA inférieur ou égal à 1 est inadapté car soit l'apport en DHA est insuffisant, soit il y a un excès d'EPA. Dans nos aliments PL, le ratio de DHA/EPA total étaient similaires (respectivement 1.9:1, 2.2:1 et 2.4:1 dans PL1, PL3 et PL5) et plus forts que dans les régimes NL (1.8:1 dans NL1 et NL3). Par conséquent, les différences observées au cours de notre étude ne peuvent pas être imputées à un ratio DHA/EPA inadapté.

Les aliments testés ici, différant uniquement par la quantité et la source d'AGPI, affectaient la croissance et la survie des larves de bar. L'aliment contenant une quantité modérée d'EPA et de DHA dans la fraction phospholipidique (PL3) donnait les meilleurs résultats de croissance et de survie alors que, la même quantité d'EPA et de DHA apportée

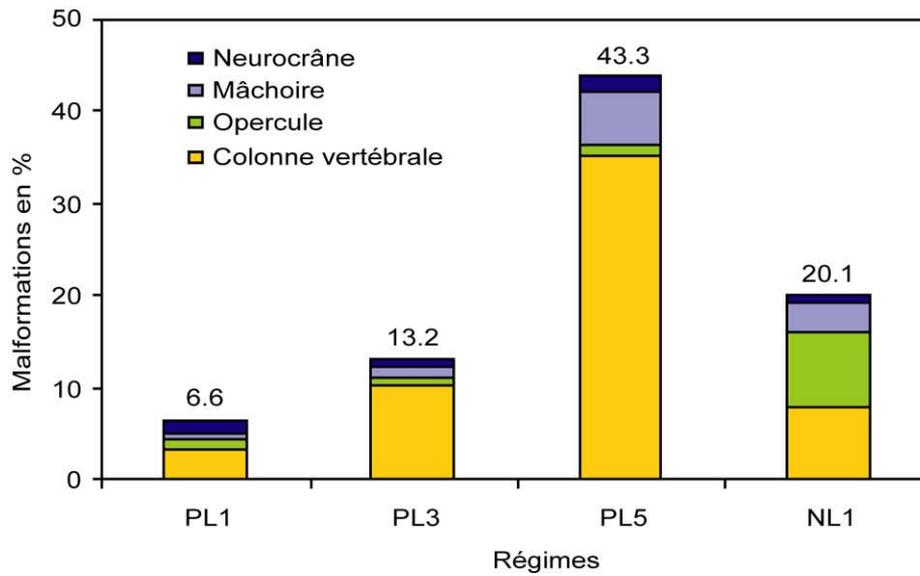


Figure 5. Pourcentage de malformations à J71 chez les juvéniles de bar en fonction des régimes.

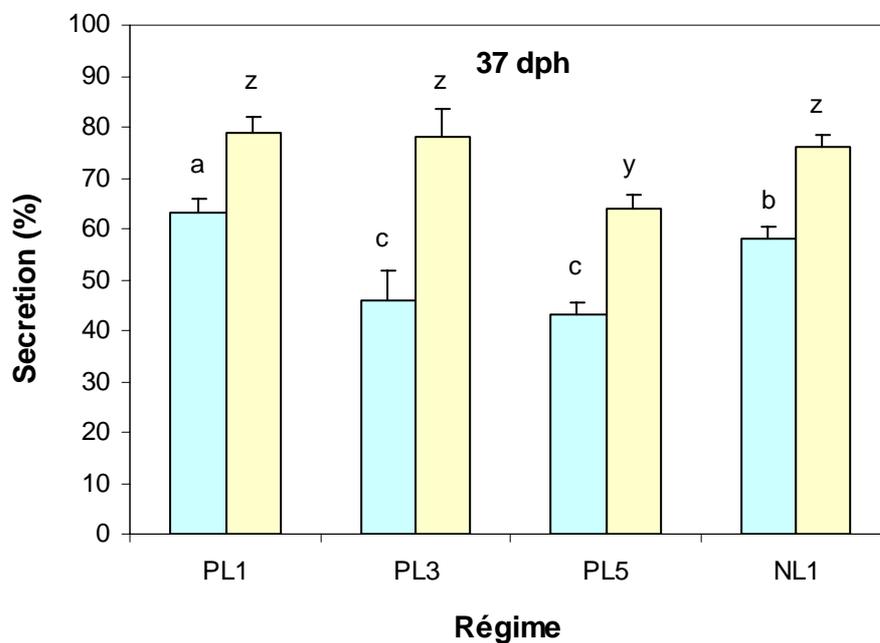


Figure 6. Sécrétion de la trypsine (bleu) et de l'amylase (jaune) à J37 dans les larves de bar en fonction du régime. Les moyennes \pm ET (n=3) affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0.05$).

par la fraction lipides neutres (NL3) était létale pour les larves. Un pourcentage plus fort d'EPA et de DHA dans la fraction phospholipidique (PL5) affectait négativement la croissance, la survie et le taux de malformation. Les différences de croissance observées entre les larves ayant reçu de faibles doses d'EPA et de DHA dépendaient de la forme d'apport de ces deux acides gras essentiels: lorsqu'ils étaient apportés par la fraction phospholipidique (PL1), la croissance était bonne alors que, lorsqu'ils étaient fournis par la fraction lipides neutres (NL1), la croissance était affectée négativement. Ces résultats indiquent donc que le ratio DHA/EPA le plus approprié pour les larves de bar est de 2.2:1, que le taux optimal d'EPA + DHA est de 2.3% et que la fraction utilisée le plus efficacement par ces larves est la phospholipidique. Nous pouvons remarquer que le ratio optimal de DHA/EPA pour les larves de bar trouvé dans notre étude entre dans la gamme des valeurs proposées pour la daurade (2:1) (Rodriguez et al., 1998) et l'ombrine (>2.5:1) (Brinkmeyer et Holt, 1998), ce qui indique que ces espèces ont des besoins nutritionnels comparables pour les acides gras essentiels.

Récemment, Cahu et al. (2003b) ont montré que l'incidence des déformations squelettiques était plus liée au ratio phospholipides:lipides neutres qu'à la quantité totale de lipides dans l'aliment. Dans notre étude, de forts taux alimentaires d'EPA et DHA induisaient des malformations affectant la croissance, la survie et la qualité du poisson. Les AGPI, et plus particulièrement l'EPA et le DHA, sont des constituants des membranes cellulaires et peuvent subir des attaques par l'oxygène ou d'autres radicaux. Ces attaques dégradent les AGPI membranaires, affectent la structure et la fluidité membranaires et causent des effets qui peuvent être pathologiques au niveau des cellules et des tissus. Les conséquences sur les poissons sont la perte d'appétit, une croissance limitée et une forte mortalité (Sargent et al., 2002). Les différences observées en croissance, survie et malformations au cours de ce travail ne peuvent pas être dues à des phénomènes d'oxydation des lipides car aucune des lésions histologiques normalement associées à ces phénomènes n'a été observée. De plus, conformément aux recommandations du NRC (1993), les aliments utilisés ici contenaient des antioxydants tels que les vitamines E et C.

Les niveaux de sécrétion des enzymes pancréatiques (trypsine, amylase et lipase) sont fréquemment utilisés comme indicateurs de la maturation intestinale chez le bar (Cahu et Zambonino Infante, 2001). Pour un même stade de développement, les sécrétions pancréatiques sont plus fortes chez une larve en bonne santé que chez celle ayant un retard de croissance. Dans cette étude, tous les groupes de larves présentaient de bons niveaux de sécrétion pancréatique pour l'amylase et la trypsine, ce qui reflétait un bon développement. Néanmoins, les larves nourries avec PL1 et NL1 avaient les valeurs les plus fortes de

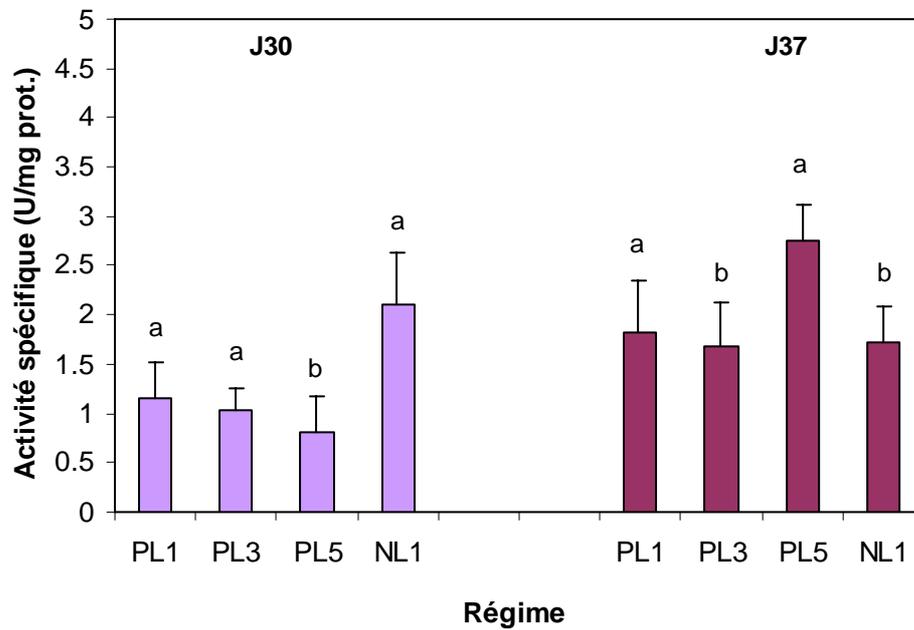


Figure 7. Activité spécifique de la lipase à J30 et J37 dans les larves de bar en fonction du régime. Les moyennes \pm ET (n=3) affectées de lettres différentes à une même date sont significativement différentes ($P < 0.05$).

sécrétion (respectivement 63 et 58%). Cet effet était certainement dû aux pourcentages élevés en acide linoléique des deux aliments (44.2 pour PL1 et 51.3 % pour NL1) car les acides gras à longues chaînes, comme l'acide linoléique et oléique, interviennent dans la régulation de la sécrétion pancréatique. Des expériences *in vitro* ont en effet montré que ces acides gras augmentent le taux de calcium intracellulaire des entérocytes, ce qui stimule la libération de deux hormones gastro-intestinales, la cholecystokinine (CCK) et la sécrétine, qui régulent la sécrétion pancréatique de l'amylase, de la trypsine et de la lipase (Shintani et al, 1995).

La capacité à digérer les lipides est liée à la sécrétion pancréatique de lipase et à la production de sels biliaires par le foie, mécanismes régulés par les niveaux alimentaires de triglycérides et par le taux d'absorption intestinale des lipides (Tso, 1994). Bien que nous n'ayons pas pu doser l'activité de la lipase dans les larves ayant reçu les plus fortes doses de lipides neutres (NL3) à cause de leur mort précoce, nous avons néanmoins observé que l'activité spécifique de la lipase à J30 était plus forte dans les larves nourries avec des doses intermédiaires de lipides neutres (6.2% ; NL1) que dans celles nourries avec les aliments PL. A J37, le lot NL1 avait les valeurs les plus faibles d'activité pour cette enzyme. Ces différences d'activité pourraient être liées à la forte accumulation de lipides dans les entérocytes qui perturberait la capacité de l'intestin à digérer et absorber les lipides. Ces observations suggèrent que les grandes quantités de lipides accumulés dans la muqueuse intestinale ont induit une baisse de la sécrétion de CCK pour réduire la sécrétion de lipase par le pancréas afin de mieux réguler la digestion et l'accumulation des lipides dans les entérocytes (Shintani et al., 1995).

Il est normalement admis, chez les poissons, que la partie antérieure de l'intestin est spécialisée dans l'absorption des lipides alors que la partie postérieure absorbe les protéines (Kjørsvik et al., 1991 ; Diaz et al., 1997). Mais, il a été montré que l'absorption et la digestion des lipides pouvaient se poursuivre au niveau des régions postérieures et rectales de l'intestin, particulièrement chez les poissons carnivores ayant un tractus digestif court comme le bar (Smith, 1989). Les entérocytes des régions intestinales pré- et postvalvulaires montraient ainsi une plus forte accumulation de lipides par rapport à celle précédemment observée par d'autres auteurs (Garcia-Hernández et al., 2001). L'explication tient certainement au type d'aliment utilisé dans ces expériences, i.e ; microparticules contre proies vivantes, qui diffèrent par les de la fraction lipidique. Au cours de notre étude, nous avons observé que les larves de bar présentaient des schémas d'absorption et d'accumulation des lipides dans la muqueuse intestinale qui dépendaient du taux et de la nature des lipides alimentaires. En effet, les larves nourries avec de fortes doses de lipides neutres (11% ; NL3) avaient une importante

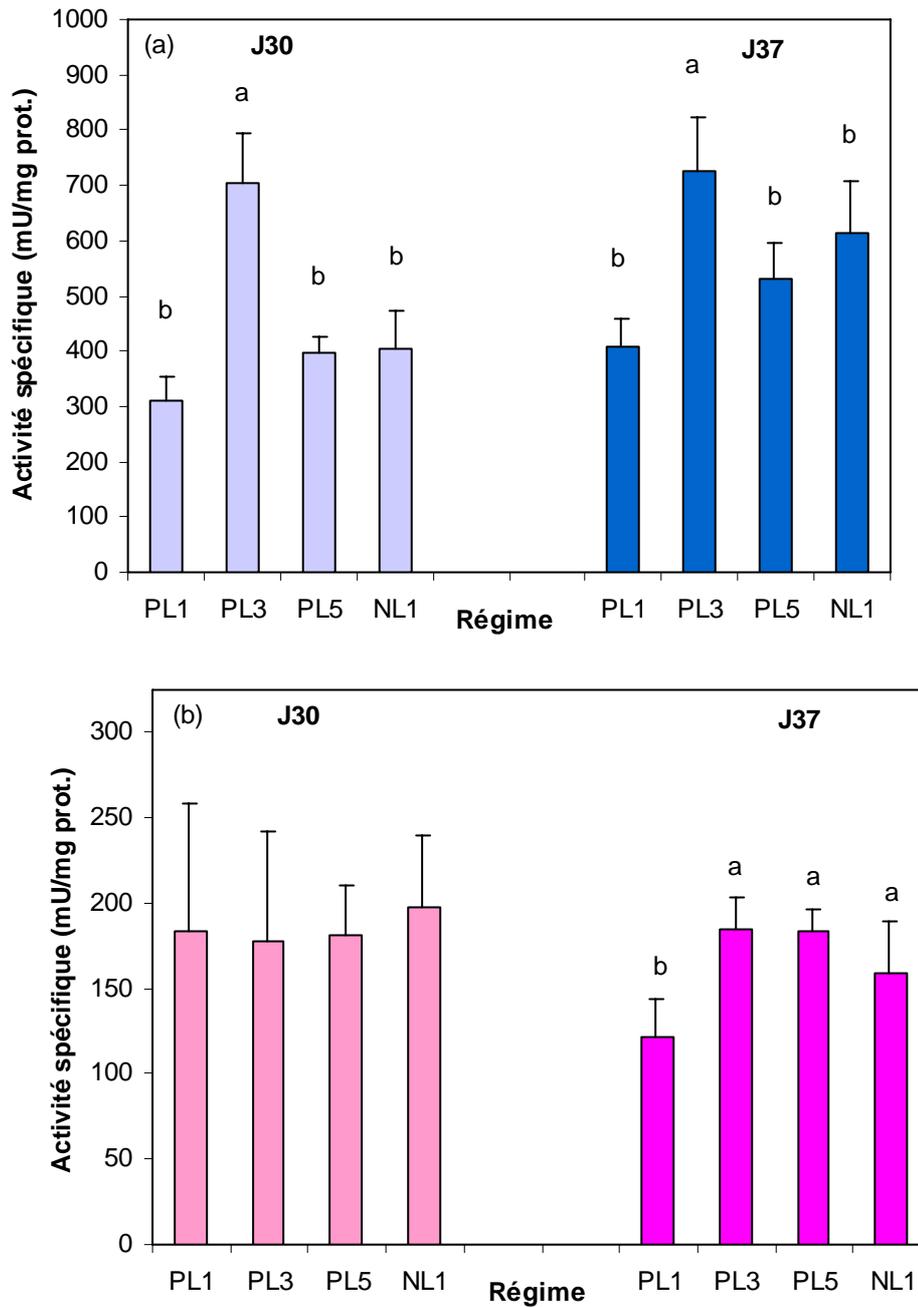


Figure 8. Activités spécifiques de la phosphatase alcaline (a) et de l'aminopeptidase N (b) dans les bordures en brosse d'intestin de larves de bar à J30 et J37 en fonction du régime. Les moyennes \pm Et ($n=3$) affectées de lettres différentes à une même date sont significativement différentes ($P < 0.05$).

accumulation intra et extra cellulaire de lipides au niveau de l'intestin antérieur, contrairement aux larves nourries avec des taux faibles ou modérés de lipides neutres (aliments PL et NL1). La présence de grosses vacuoles lipidiques dans l'intestin postvalvulaire des larves semblait être inversement proportionnelle au taux de lipides neutres des aliments, étant donné que le taux de phospholipides était constant dans tous les aliments, sauf dans NL3. Les différents ratios des AGPI de la famille linoléique (n-6) par rapport à ceux de la famille linoléique (n-3) des aliments pourraient aussi avoir influencé l'accumulation des lipides dans les entérocytes (Olsen et al., 1999 ; Caballero et al., 2002). Ainsi, une forte accumulation de lipides dans l'intestin (stéatose) pouvant être considérée comme pathologique a été observée chez des larves lorsque l'apport lipidique de l'aliment est inadapté (Deplano et al., 1989 ; Segner et al., 1993). Dans notre étude, les observations histologiques de la muqueuse intestinale n'ont révélé aucun signe d'abrasion épithéliale, de nécrose cellulaire et/ou de réactions inflammatoires, ce qui indique que les fortes accumulations lipidiques observées dans l'intestin postérieur des larves de bar ne peuvent pas être considérées comme pathologiques.

Le foie peut être considéré comme un indicateur de l'état nutritionnel des poissons ; en effet, certains travaux ont montré que les altérations structurelles du foie provoquées par des déséquilibres nutritionnels pouvaient fournir des informations sur la qualité des aliments et le métabolisme en complément des études sur la croissance. Dans notre étude, l'accumulation lipidique dans le foie des larves nourries avec de forts taux en AGPI était plus importante lorsque les AGPI sont apportés par la fraction lipides neutres (NL3) que par la fraction phospholipidique (PL3 et PL5). Ceci indique que la forme d'apport des AGPI a un effet direct sur le stockage des graisses dans le foie qui pourrait être lié à un afflux plus important de chylomicrons et/ou de lipoprotéines à très faible densité (VLDL) de l'intestin si l'on prend en compte les différences mentionnées au-dessus des capacités d'exportation de la muqueuse intestinale.

Les observations histologiques à J37 ont mis en évidence un effet de l'aliment sur l'inflation de la vessie natatoire des larves de bar pendant les stades précoces de développement. Le très fort pourcentage des larves n'ayant pas de vessie natatoire fonctionnelle dans le lot NL3 contrastait avec celui des autres groupes expérimentaux. L'inflation de la vessie natatoire se fait pendant une période limitée de la morphogenèse où l'accès des larves à l'interface air/eau est déterminante (Chatain et Ounais-Guschernor, 1990). Ici, les conditions d'élevage étaient identiques pour tous les groupes expérimentaux et le fort pourcentage de larves dépourvues de vessie natatoire fonctionnelle dans le groupe NL3 ne

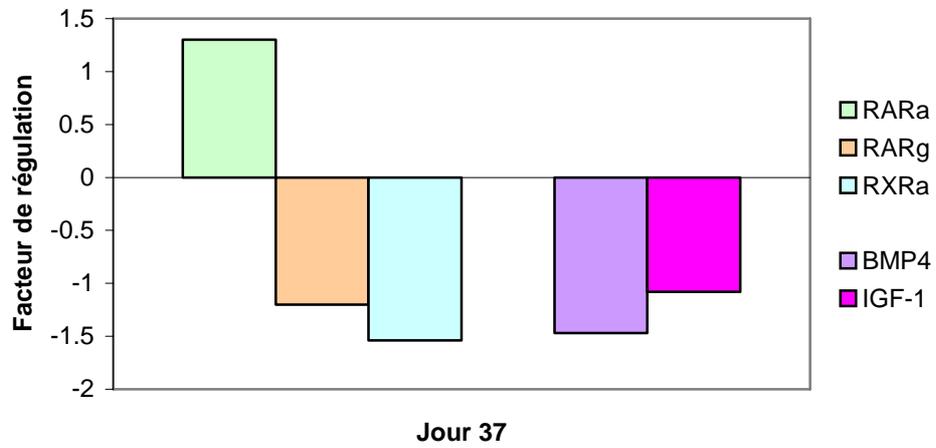


Figure 9. Influence de l'âge : comparaison de l'expression des gènes à J37 par rapport à J16 dans le groupe contrôle. L'expression des gènes RAR α , RAR γ , RXR α , BMP4 et IGF-I a été normalisée en utilisant les valeurs des gènes correspondants obtenues à J16 dans le groupe contrôle.

peut, par conséquent, être imputé aux paramètres d'élevage mais plutôt à la qualité de l'aliment NL3. Le fort taux de lipides neutres de cet aliment pourrait avoir retardé ou perturbé le développement normal des larves, comme l'indiquaient les résultats de croissance, aboutissant à l'incapacité à dilater le lumen de la vessie natatoire et à l'atrophie de cet organe (Chatain, 1986).

Il a été précédemment démontré (Villeneuve et al., non publié) que des malformations induites chez des larves de bar par des doses inadaptées de vitamine A étaient associées à des variations de l'expression de gènes impliqués dans la morphogenèse, tels que $RAR\alpha$, $RAR\gamma$ et $RXR\alpha$. Au cours notre étude, l'expression de $RXR\alpha$ était significativement plus forte dans les larves du lot NL3 à J16, larves qui présentaient une forte accumulation de lipides dans les entérocytes et contenaient des chaînes plus ou moins hydrolysées de glycérol ainsi que des AGPI libres, dont l'EPA et le DHA. Il a été mis en évidence, chez le rat, que plusieurs AGPI pouvaient activer l'expression de $RXR\alpha$, la plus forte activation étant obtenue avec le DHA (Urquiza, 2000). Cette activation peut d'ailleurs être directe (Steiniger et al., 1998). On peut donc supposer que le fort taux d'AGPI du régime NL3 activait directement la transcription de $RXR\alpha$.

Les poissons nourris avec l'aliment NL1 présentaient également une régulation positive de $RXR\alpha$ à J16. Les récepteurs $RXR\alpha$ se lient préférentiellement aux $RAR\alpha$ (Ross et al., 2000 ; Egea et al., 2001) donc, une augmentation des $RXR\alpha$ peut induire une régulation positive des $RAR\alpha$ afin de former des dimères actifs. L'augmentation des messagers $RAR\alpha$ n'a certainement pas été observée dans le groupe NL3 du fait de leur piètre état physiologique. La voie de signalisation des rétinoïdes peut interagir avec BMP4 pour induire l'apoptose cellulaire (Glozak et Rogers, 1998) via un activateur spécifique toujours inconnu (Thompson et al., 2003) car BMP4 n'a pas de RARE dans sa séquence régulatrice (Balmer et Blomhoff, 2002). Il est donc envisageable que la forme inappropriée d'apport des lipides ait induit un phénomène d'apoptose interférant avec le développement normal des larves et conduisant à un fort pourcentage de malformations touchant l'opercule et la colonne vertébrale pour le lot NL1 et à la mort pour le groupe NL3. Les larves du groupe NL3 étaient en condition de stress et proches de la mort, ce qui pourrait expliquer une répression significative à J23 de $RAR\alpha$, $RXR\alpha$ et BMP4. Le régime NL5 a induit à J16 un effet opposé sur les gènes à celui du régime NL1 : $RAR\alpha$, $RXR\alpha$ et IGF-I étaient réprimés mais le profil d'expression de $RAR\alpha$ suivait toujours celui de $RXR\alpha$. L'aliment PL5 contenait une forte proportion d'AGPI n-3 dans la fraction phospholipidique et les larves nourries avec cet aliment présentaient un retard de croissance et un taux de survie assez faible, indiquant que le

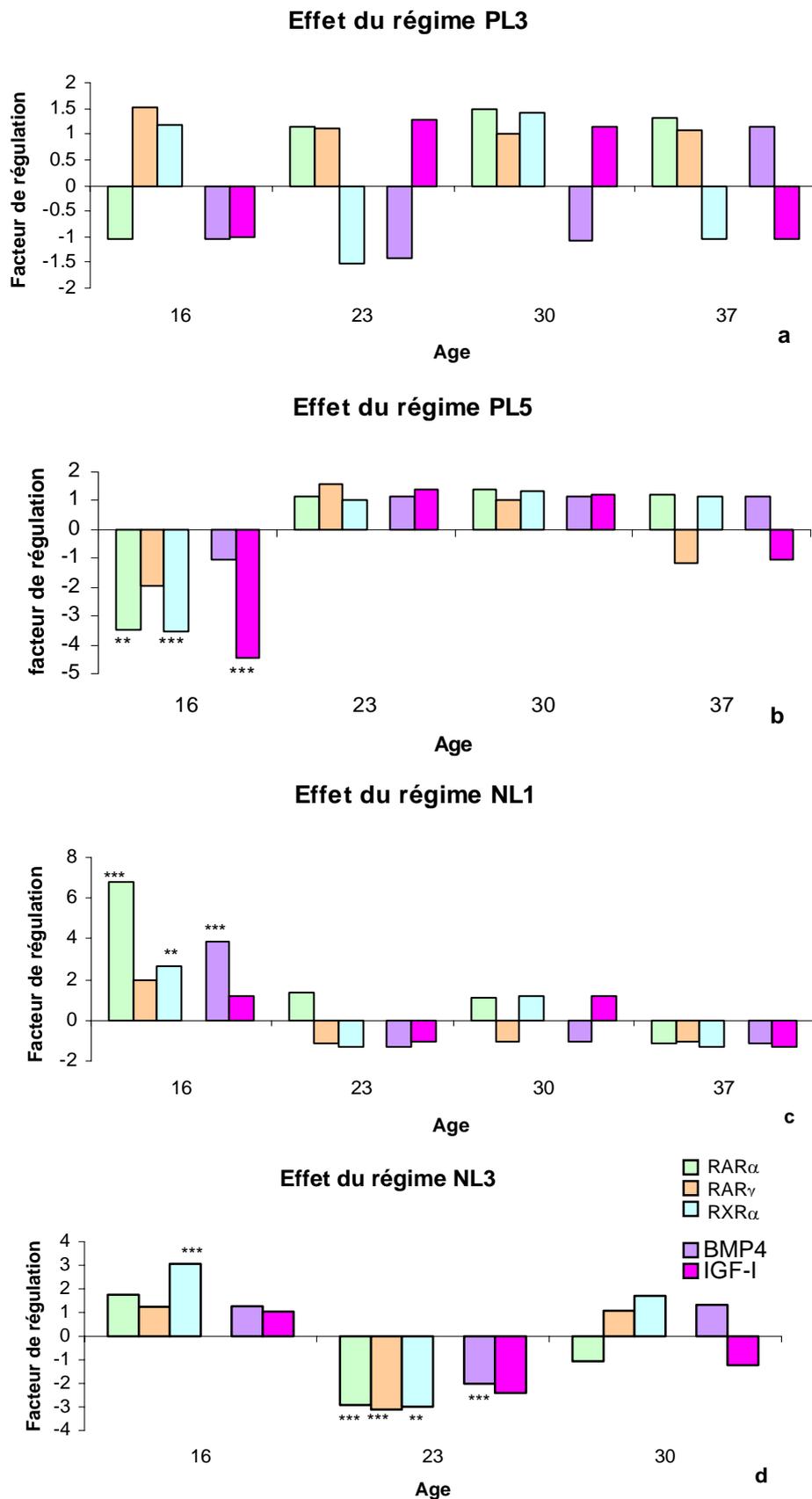


Figure 10. Effet des régimes PL3 (a), PL5 (b), NL1 (c) et NL3 (d) sur l'expression de RAR α , RAR γ , RXR α , BMP4 et IGF-I chez les larves de bar à différents stades de développement. Les expressions des gènes à J16, J23, J30 et J37 ont été normalisées par rapport aux valeurs d'expression des gènes correspondants obtenues dans le groupe contrôle aux mêmes dates. Les nombres indiquent le ratio relatif de l'expression des gènes. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au groupe contrôle pour une même date (** : P < 0.05 ; *** : P < 0.001).

taux d'AGPI n-3 dans l'aliment était excessif. Cela a conduit à une forte concentration cellulaire d'AGPI ce qui a eu certainement pour conséquence d'activer leurs récepteurs nucléaires (les PPAR) qui se lient aux RXR. La formation de hétérodimères PPAR/RXR dans les cellules peut affecter l'expression de certains gènes du développement (Bonilla et al. 2000). L'expression des PPAR est aussi activée dans les états de stress par les glucocorticoïdes, hormones synthétisées avec un rythme circadien et impliquées dans la réponse au stress (Lemberger, 1996). Ces glucocorticoïdes peuvent également stimuler la transcription des RXR α mais cette stimulation diminue lorsque les glucocorticoïdes sont associés à un traitement avec des AGPI (Steineger et al., 1998). En cas de stress, les glucocorticoïdes stimulent les PPAR qui régulent ensuite des gènes impliqués dans la β -oxydation afin de mobiliser les acides gras et de maintenir l'homéostasie énergétique (Lemberger et al., 1996). Nous pouvons donc supposer que, dans notre étude, les forts taux d'AGPI n-3 apportés par l'aliment PL5 ont stimulé la transcription des PPAR et créé un état de stress nutritionnel. Ce stress a engendré une forte synthèse de glucocorticoïdes qui, avec les teneurs d'AGPI élevées dans l'entérocyte, ont réprimé RXR α à J16. La répression de RXR α à J16 peut aussi résulter d'un rétro-contrôle négatif exercé par le grand nombre de dimères PPAR/ RXR α dans les larves du lot PL5. De plus, cette répression de RXR α était observée de façon concomitante avec celle de son partenaire RAR α . IGF-I a une très forte probabilité d'avoir un élément RARE dans son promoteur (Balmer et Blomhoff, 2002) et plusieurs études ont montré que l'acide rétinoïque pouvait moduler sa transcription (Gabbitas et al., 1997 ; Fu et al., 2000). Si l'on considère l'ensemble de ces résultats, on peut penser que la régulation négative de RXR α a conduit indirectement à celle d'IGF-I via RAR α et que cela a induit l'apparition d'un fort pourcentage de poissons avec des malformations (43.3%) affectant surtout la colonne vertébrale. Il est intéressant de noter que les malformations induites par la vitamine A touchaient la région céphalique des poissons alors que celles induites ici touchent la colonne. Cela indique que la voie de signalisation des rétinoïdes et celle des acides gras font intervenir des gènes différents.

En conclusion, la quantité et la forme d'apport de l'EPA et du DHA dans les aliments sont essentiels pour le développement des larves de bar. Les larves utilisent plus efficacement l'EPA et le DHA lorsqu'ils sont apportés par la fraction phospholipidique: un apport de 1.1% EPA + DHA (correspondant à un rapport DHA/EPA de 1.9:1) apparaît comme optimal car il induit un faible taux de malformations. La survie et la croissance des larves peut être améliorée par une teneur plus élevée en EPA+DHA dans l'aliment mais au détriment de la morphogénèse. De forts taux de malformations et une chute de la croissance et de la survie

étaient associés à une répression de l'expression de $RXR\alpha$, $RAR\alpha$, $RAR\gamma$ et BMP-4. Un fort taux élevé de triglycérides (NL3) stimulait l'expression de $RXR\alpha$ pendant les stades précoces du développement (J16) ce qui entraînait une perturbation des processus de morphogenèse des larves et diminuait la survie de celles-ci..

Au cours de ce travail, tout comme au cours de celui sur la vitamine A, nous avons mis en évidence l'influence d'un nutriment, ici les lipides alimentaires, sur le développement des larves de bar. Nous avons également montré que ces deux nutriments, vitamine A et lipides, interagissent mais nous n'avons que peu d'éléments sur la fenêtre de temps pendant laquelle ces nutriments agissent sur les gènes de la morphogenèse et provoquent l'apparition de malformations. La quatrième expérience nous a donc permis de déterminer cette fenêtre temporelle.

CHAPITRE VI

**Influence de la période de
distribution d'un aliment contenant
un excès de vitamine A ou un excès
d'AGPI sur le développement des
larves de bar.**

1. Introduction.

Les larves de poissons marins subissent des changements fonctionnels et morphologiques importants pendant les trois premières semaines de leur vie afin d'acquérir leurs caractéristiques d'adultes. De l'éclosion jusqu'au jour 7, les larves de bar ont une alimentation uniquement endogène puis cette alimentation devient mixte jusqu'à environ le jour 13 où a lieu la résorption du sac vitellin. A ce stade, la fonction de sécrétion du pancréas exocrine n'est pas totalement opérationnelle ; elle le deviendra vers le jour 18-20. D'un point de vue enzymatique, l'activité amylase décroît fortement entre le jour 13 et 20. Les activités enzymatiques du cytosol des enterocytes décroissent fortement entre le jour 18 et 25, date à laquelle les activités enzymatiques de la bordure en brosse augmentent fortement. Ce changement caractérise la différenciation de la cellule intestinale. Au niveau morphologique, les vertèbres sont visibles vers le jour 20, les nageoires caractéristiques des adultes commencent à se mettre en place entre le jour 27 et le jour 40. Avant ce stade de développement, le processus de maturation du tube digestif des larves de poissons marins peut être influencé par l'aliment. De plus, des travaux récents (Haga et al., 2002 ; Cahu et al., 2003b) ont décrit que certains apports nutritionnels en vitamine A et acides gras poly insaturés pouvaient influencer le développement squelettique des larves de poissons marins. Dans les chapitres précédents de cette thèse, il a été mis en évidence que la vitamine A et les acides gras pouvaient induire des malformations squelettiques dans des zones corporelles différentes chez les larves de bar. Dans le cas d'une hypervitaminose A, nous avons démontré que l'expression de RAR γ augmentait fortement et cela était lié à un fort taux de malformations céphaliques (Villeneuve et al., en soumission). Une autre étude avait montré que de forts taux de phospholipides marins contenant un taux élevé d'EPA et de DHA affectaient négativement l'expression de RXR α dans les larves de bar et cette répression était associée à une forte proportion de déformations squelettiques au niveau de la colonne vertébrale (Villeneuve et al., en soumission). Ces résultats suggéraient que la voie de signalisation des rétinoïdes impliquait majoritairement les RAR alors que celle des acides gras mettait en jeu les RXR. Cela indiquait également que ces deux voies de signalisation cellulaires agissaient dans des régions morphologiques différentes et cela par le biais de récepteurs nucléaires.

La vitamine A et ses dérivés, les rétinoïdes, jouent un rôle primordial dans les processus de morphogenèse et de différenciation au cours du développement des vertébrés (Ross et al., 2000). Le dérivé le plus important de la vitamine A est l'acide rétinoïque et ses actions passent par des récepteurs nucléaires de deux types : les RXR et les RAR (Ross et al., 2000). Ces deux types de récepteurs peuvent former des homo ou des hétérodimères entre eux et les RXR ont également la capacité à dimériser avec d'autres récepteurs appartenant à leur superfamille, tels que les récepteurs des hormones thyroïdiennes, de la vitamine D ou des acides gras (les PPAR ; Yu et al., 1991). Tous ces dimères peuvent ensuite aller réguler l'expression de leurs gènes cibles. Les rétinoïdes régulent de façon directe ou indirecte plus de 500 gènes (Balmer & Blomhoff, 2002) dont les gènes Hox (Suzuki et al., 1999), les BMP (Thompson et al., 2003) ou IGF-I (Gabbitas & Canalis, 1997). Beaucoup d'études ont montré qu'un taux inadéquat dans l'aliment d'acide rétinoïque conduisait à l'apparition de malformations squelettiques (Minucci et al., 1996 ; Ross et al., 2000 ; Haga et al., 2002, 2003).

Dans la nutrition des poissons, les lipides sont la source majeure d'énergie (Sargent et al., 1999) et ils jouent un rôle crucial dans la nutrition et la santé. Etant donné que les poissons sont incapables de synthétiser de novo les AGPI n-3, ils doivent les trouver dans leur alimentation. Il a été également démontré que ces AGPI n-3, et plus particulièrement l'EPA et le DHA, sont plus efficacement utilisés lorsqu'ils sont apportés dans la fraction phospholipidique de l'aliment (Villeneuve et al., en soumission ; Gisbert et al., en soumission). Les acides gras sont les ligands des PPAR qui ont un rôle très important dans le métabolisme des lipides et dans l'homéostasie énergétique. Comme cela a été indiqué au-dessus, les RXR peuvent lier les PPAR et réguler l'expression des gènes cibles de ces voies cellulaires (Keller et al., 1993). Ceci souligne le rôle prépondérant des RXR au sein de leur superfamille et des voies de signalisation qui y sont reliées. Par conséquent, toute perturbation des RXR pourrait avoir des répercussions dans plusieurs voies cellulaires.

Beaucoup de gènes du développement, dont les gènes Hox, ont été très étudiés et il est apparu que ces gènes s'expriment pendant des fenêtres spatio-temporelles définies (Krumlauf, 1994). Par exemple, un traitement à l'acide rétinoïque perturbe l'expression des gènes Hox et provoque l'apparition de transformations homéotiques (Suzuki et al., 1999 ; Ross et al., 2000). Lors des expériences décrites dans les chapitres précédents, nous avons vu que des aliments avec un excès de vitamine A ou de phospholipides marins, amenant une forte concentration d'AGPI, affectaient le développement des larves de bar lorsqu'ils étaient distribués de J7 à J40.

Tableau 1: Composition des aliments de l'expérience C (g/kg).

Ingrédients	C	RA	PL
Farine de poisson ¹		555	
CPSP 90 ²		140	
Lécithine de soja ³	175	175	0
Lécithine marine ⁴	0	0	175
Vitamines (sans rétinol) ⁵		80	
Minéraux ⁶		40	
Bétaine		10	
Rétinol (<i>all-trans</i>)	0.08	32	0.08
Composition		%	
Protéines	56	56	59
Lipides	19	19	17
Cendres	15	15	15
Matière sèche	94	94	94
Energie (J/kg)	1651	1651	1626

¹: 95,7% de matière sèche, 78,9% de protéines, 11,3% de lipides

²: Concentré Protéique Soluble de Poissons non gras Sopropêche ; 95,7% de matière sèche, 78,9% de protéines, 11,3% de lipides

³: Etablissement Louis François ; 95,7% de matière sèche, 60% de phospholipides.

⁴: Lécithine naturelle marine LC60: phosphominsTM, Phosphotech ; 60% de phospholipides.

⁵: par kg de mélange vitaminé: concentrat de choline 50% 200 g, vitamine E (500 UI/g) 10 g, vitamine D3 (500000 UI/g) 500 mg, vitamine B3 1 g, vitamine B5 2 g, vitamine B1 100 mg, vitamine B2 400 mg, vitamine B6 300 mg, vitamine C 20 g, vitamine B9 100 mg, concentrat de vitamine B12 (1g/kg) 1g, biotine 1 g, vitamine K3 1g, meso-inositol 30 g, cellulose 732.1 g.

⁶: par kg de mélange minéral: KCl 90 g, K₂O 40 mg, CaHPO₄ 2H₂O 500 g, NaCl 40 g, CuSO₄ 5H₂O 3 g, ZnSO₄ 7H₂O 4 g, CoSO₄ 7H₂O 20 mg, FeSO₄ 7H₂O 20 g, MnSO₄ H₂O 3g, CaCO₃ 215 g, MgSO₄ 7H₂O 124 g, NaF 1g.

Dans cette étude, nous avons donc voulu déterminer pendant quelle fenêtre de temps les larves étaient les plus sensibles à ces nutriments apportés à des doses inadéquates dans l'aliment.

2. Matériel et méthodes.

Des larves de bar âgées de 3 jours ont été élevées dans des conditions et des structures comparables à celles de l'expérience précédente. A partir de J8, elles ont été nourries avec 3 aliments : un aliment contrôle (C ; 0.08 g/kg MS de rétinol et 17.5 g/kg MS de lécithine de soja), un aliment contenant une forte dose de rétinol (RA ; 32 g/kg MS de rétinol et 17.5 g/kg MS de lécithine de soja) et un aliment avec un taux élevé de phospholipides marins (PL ; 0.08 g/kg MS de rétinol et 17.5 g/kg MS de lécithine marine). La composition des aliments est donnée dans le tableau 1.

Les séquences de distribution des microparticules sont données dans la figure 1. Les larves ayant reçu les aliments RA ou PL du jour 8 au jour 13 correspondaient aux groupes RA-A et PL-A, celles nourries avec ces aliments du jour 13 au jour 18 aux groupes RA-B et PL-B et celles nourries avec ces deux aliments du jour 18 au jour 23 aux groupes RA-C et PL-C. Le groupe contrôle recevait l'aliment C pendant toute la durée de l'expérience (de J8 à J40) alors que les lots nourris avec les aliments RA ou PL pendant les 3 périodes de nourrissage recevaient cet aliment contrôle à partir de la fin de chacune des périodes. Chaque condition expérimentale a été testée en triplicat.

Au cours de cette étude, nous avons suivi les paramètres suivants:

- zootechniques: croissance et malformations,
- enzymatiques: mesure des activités spécifiques de la phosphatase alcaline, de la sécrétion de la trypsine et de l'amylase,
- moléculaires: effet du développement et effet des aliments composés sur l'expression de RAR α , RAR γ , RXR α , BMP4 et IGF-I.

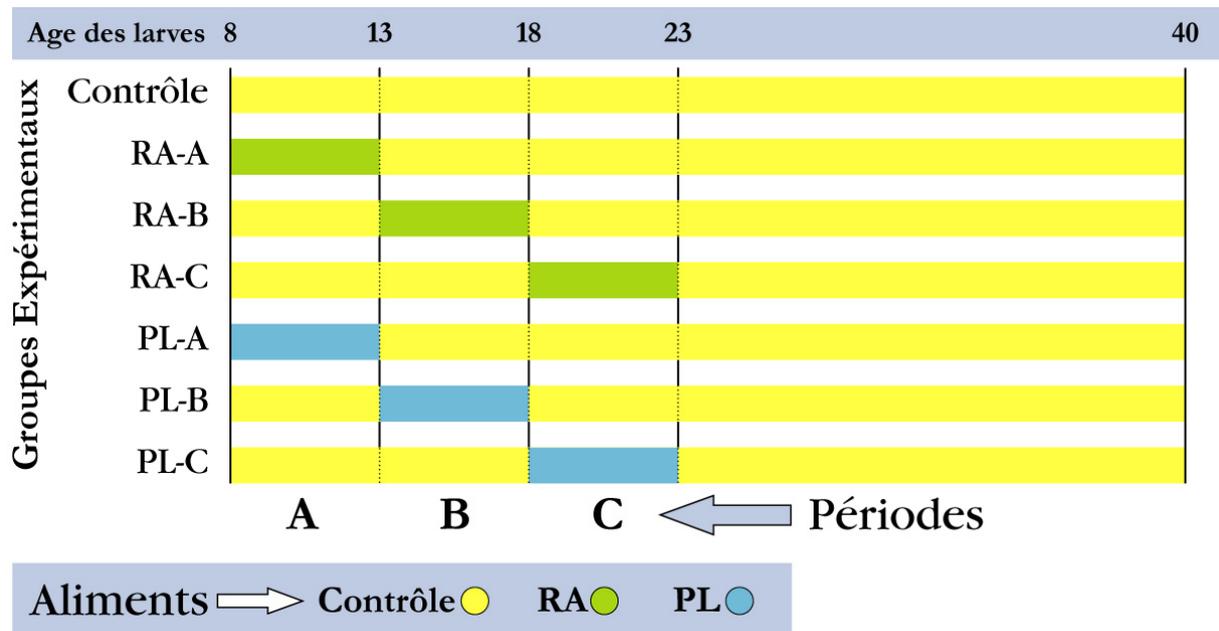


Figure 1. Schéma de distribution des aliments.

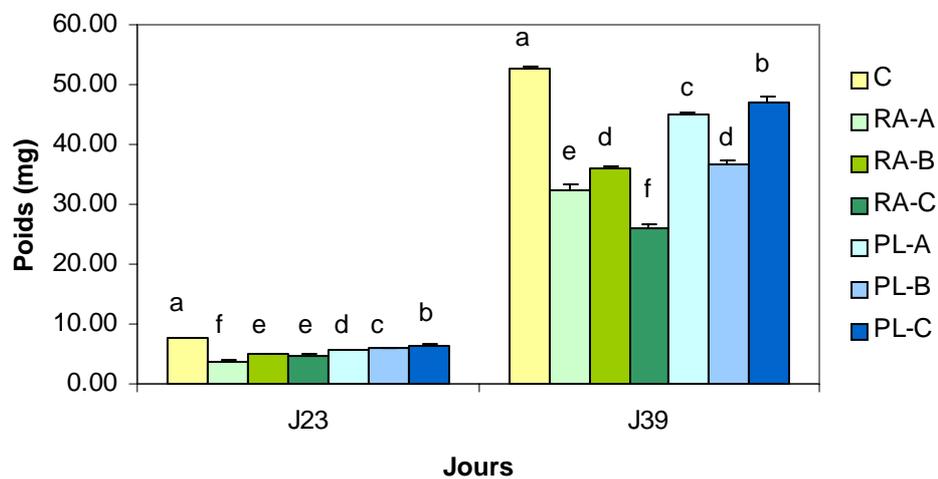


Figure 2. Poids des larves nourries avec les différents aliments expérimentaux à J23 et J37. Les moyennes \pm ET (n=3) affectées de lettres différentes pour une même date sont significativement différentes ($P < 0.05$).

3. Résultats.

3.1 Croissance.

A J23, les larves nourries avec l'aliment contrôle (C) avaient le poids le plus élevé (Fig. 2). Le poids des larves nourries avec PL était significativement plus élevé que celui des larves du groupe RA quelle que soit la période de distribution des aliments. Globalement, la croissance dans les groupes était d'autant plus faible que la période de nourrissage avec l'un ou l'autre des aliments expérimentaux était précoce (PL-C > PL-B > PL-A).

A J39, le groupe contrôle présentait toujours le poids le plus élevé (Fig. 2) et les larves nourries avec les aliments PL avaient des poids significativement supérieurs à celles nourries avec les aliments RA. Dans les groupes ayant reçu l'aliment RA, la meilleure croissance était obtenue dans le lot B, la plus basse dans le lot C alors que le lot A présentait une croissance intermédiaire ($P < 0.05$). Parmi les groupes PL, la plus forte croissance était observée dans le groupe PL-C, la plus faible dans le groupe PL-B et le groupe PL-A présentait une valeur intermédiaire ($P < 0.05$).

3.2 Malformations squelettiques (Fig. 3).

Le nombre de vertèbres le plus fréquemment observé chez les larves des différents groupes était de 25.

Les groupes ayant reçu les régimes expérimentaux lors d'une des 3 périodes de nourrissage présentaient un pourcentage d'individus ayant une vertèbre en plus (26) ou en moins (24).

Dans le groupe PL-A, nous avons observé un faible pourcentage d'animaux (3%), non significatif ($P = 0.413$), ne présentant que 23 vertèbres.

Pour les larves n'ayant que 24 vertèbres, nous avons mis en évidence un effet du régime ($F = 21.12$, $P = 0.001$) et un effet de la fenêtre d'application des aliments ($F = 8.76$, $P = 0.006$). Le régime RA ingéré pendant la période A induit la perte d'une vertèbre ($P < 0.05$). Aucune différence significative n'a été observée lorsque cet aliment est appliqué pendant les périodes B et C.

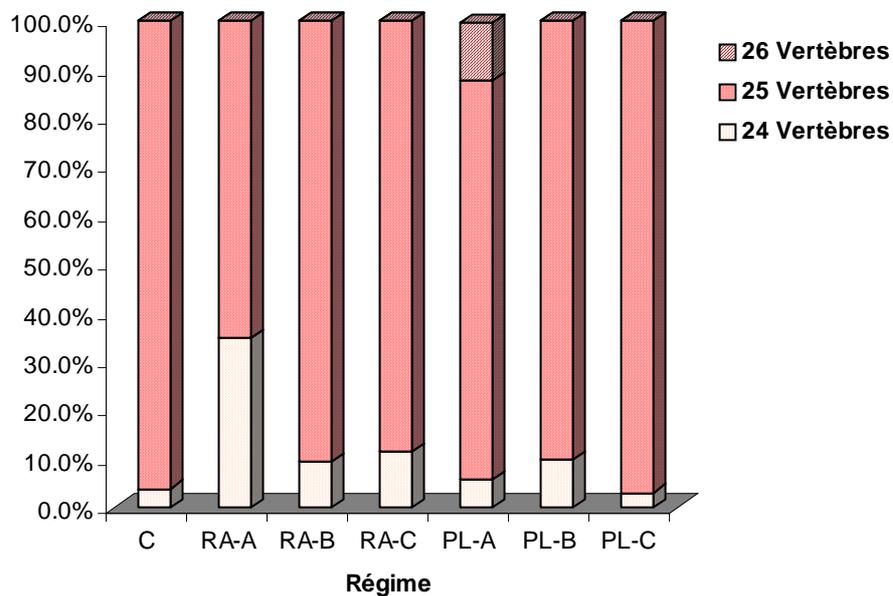


Figure 3. Pourcentage de bars ayant 24, 25 ou 26 vertèbres en fonction du régime.

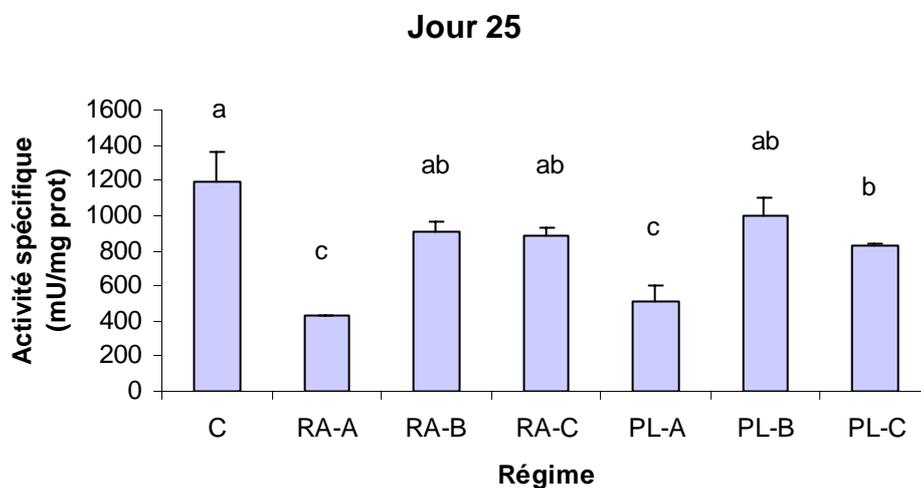


Figure 4. Activité spécifique de la phosphatase alcaline à J25 dans les larves de bar en fonction du régime. Les moyennes \pm ET (n=3) affectées de lettres différentes pour une même date sont significativement différentes ($P < 0.05$).

Pour les larves ayant 26 vertèbres, un effet significatif du régime a été observé ($F = 17.79$, $P = 0.002$) ainsi qu'un effet de la période ($F = 17.25$, $P = 0.0006$). Le nombre de vertèbres est significativement augmenté par le régime PL ($P < 0.005$). De plus, cet effet n'apparaît que lorsque l'aliment est distribué aux larves pendant la période A ($P \leq 0.0001$).

Le nombre de poissons présentant des malformations de la mâchoire dépendait du régime ($F = 16.96$, $P = 0.003$) mais pas de la fenêtre de distribution de l'aliment. Ces malformations étaient significativement plus élevées dans les lots de poissons nourris avec l'aliment RA ($P < 0.05$) quelque soit la période.

Le taux de malformations de la colonne vertébrale (scoliose, lordose, fusion de vertèbres, etc...) était à la fois lié à l'aliment ($F = 40.83$, $P = 0.0001$) et à la fenêtre de distribution de l'aliment ($F = 15.54$, $P = 0.001$). En effet, ce taux était significativement plus fort dans les lots ayant reçu l'aliment PL ($P = 0.0003$) pendant la période A ($P < 0.02$) et B ($P < 0.009$).

3.3 Activités et sécrétions enzymatiques.

Les activités spécifiques ainsi que les taux de sécrétions ont été mesurés à J25.

L'activité spécifique de la **phosphatase alcaline** la plus élevée a été relevée dans le groupe contrôle C (1192 ± 170.2 mU/mg prot ; Fig. 4). Aucune différence statistique n'a été mise en évidence entre ce groupe contrôle, les groupes RA-B et C et le groupe PL-B. Cette activité était plus faible de 64% dans le groupe RA-A (429 ± 5.7 mU/mg prot) et de 57% dans le groupe PL-A (512 ± 88.4 mU/mg prot).

L'activité spécifique de l'**amylase** mesurée à J25 n'était pas significativement différente du contrôle pour les groupes nourris avec l'un ou l'autre des deux régimes expérimentaux lors de la troisième période (J18-J23). Par contre, cette activité était plus élevée dans les 4 autres groupes, c'est à dire ceux ayant reçu les aliments expérimentaux dans les phases plus précoces (Fig 5).

Les valeurs les plus fortes de la sécrétion d'**amylase** étaient obtenues dans le groupe contrôle (Fig. 6) et les groupes PL-A, PL-C et RA-C (respectivement : 77.5 ± 6.36 , 75.3 ± 2.52 , 77 ± 4.24 et 84.3 ± 4.04 %). Les valeurs les plus faibles ont été mesurées dans les lots de poissons PL-B et RA-A (respectivement : 50.7 ± 4.73 et 53.5 ± 0.71 %, $P < 0.05$). Le groupe RA-B présentait une valeur intermédiaire. Le profil de sécrétion de la **trypsine** était globalement comparable à celui de l'amylase (Fig. 6).

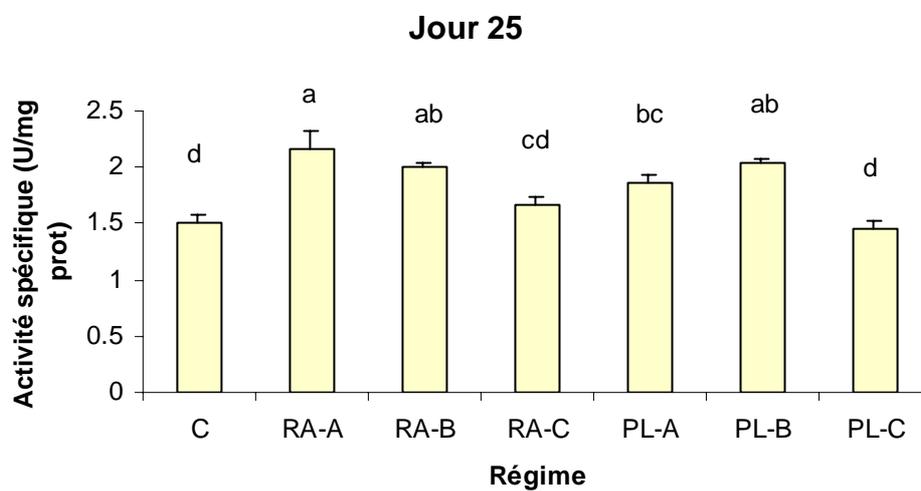


Figure 5. Activités spécifiques de l'amylase à J25 dans les larves de bar en fonction du régime. Les moyennes \pm ET (n=3) affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0.05$).

3.4 Profil d'expression des gènes.

A J13, dans le groupe RA-A, l'expression de RAR γ et de BMP4 était significativement plus forte (facteurs d'expression respectifs : x2.77, P<0.03 et x2.84, P<0.003) que dans le groupe contrôle. L'expression de BMP4 était également stimulée dans le groupe PL-A (facteur d'expression : x2.34, P<0.03). Dans ce groupe, l'expression de RAR γ n'était pas significativement modifiée (P=0.08) (Fig.7).

A J18, l'expression de RXR α était stimulée dans les groupes RA-A et PL-A (facteurs d'expression respectifs : x2.88 et x1.85, P<0.001). Dans le lot RA-B, l'expression de RXR α était 3.5 fois plus élevée par rapport au groupe contrôle. Les niveaux d'expression de BMP4 étaient 1.8 fois plus bas chez les larves nourries avec l'aliment PL pendant la période A (P<0.001). L'expression de RAR α , BMP4 et IGF-I était abaissée dans le groupe PL-C (facteurs d'expression respectifs : 1/3.51, 1/1.26 et 1/3.43, P<0.001) (Fig.7).

A J23, dans le groupe RA-A, l'expression de BMP4 était 1.5 fois supérieure à celle du groupe contrôle C (Fig.7). Dans le groupe RA-B l'expression de RAR γ , RXR α et BMP4 était diminuée respectivement 1.96, 1.94 et 2.64 fois (P<0.001) par rapport au groupe témoin. Dans le lot PL-B, seule l'expression de BMP4 baissait d'un facteur 2.1 (P<0.001). Dans le groupe PL-C, l'expression de RAR γ augmentait (facteur d'expression : x1.96, P<0.03) alors que celle de RXR α diminuait d'un facteur 2.3 (P<0.03). A J23 aucun effet de l'aliment PL n'a été mis en évidence chez les animaux nourris avec les aliments expérimentaux pendant la période A.

A la fin de la période d'élevage (J40 ; Fig.7), l'expression de RAR α , RAR γ et BMP4 était plus forte dans le groupe RA-A (facteurs d'expression respectifs : x3.39, P<0.002 ; x3.25, P<0.001 ; x2.08, P<0.02) en comparaison avec le groupe contrôle. Le niveau de transcription de RAR α était respectivement multiplié par 2.42, 2.99, 3.82 et 7.89 dans les groupes PL-A (P<0.001), RA-B (P<0.001), RA-C (P<0.001) et PL-B (P<0.001) par rapport au groupe témoin. Dans le groupe PL-B, une élévation de l'expression de RAR γ , RXR α et BMP4 était également observée (facteurs d'expression respectifs : x3.15, x3.58 et x3.44, P<0.001). Aucune modification de l'expression des gènes étudiés n'a été mise en évidence à cette date dans le lot PL-C.

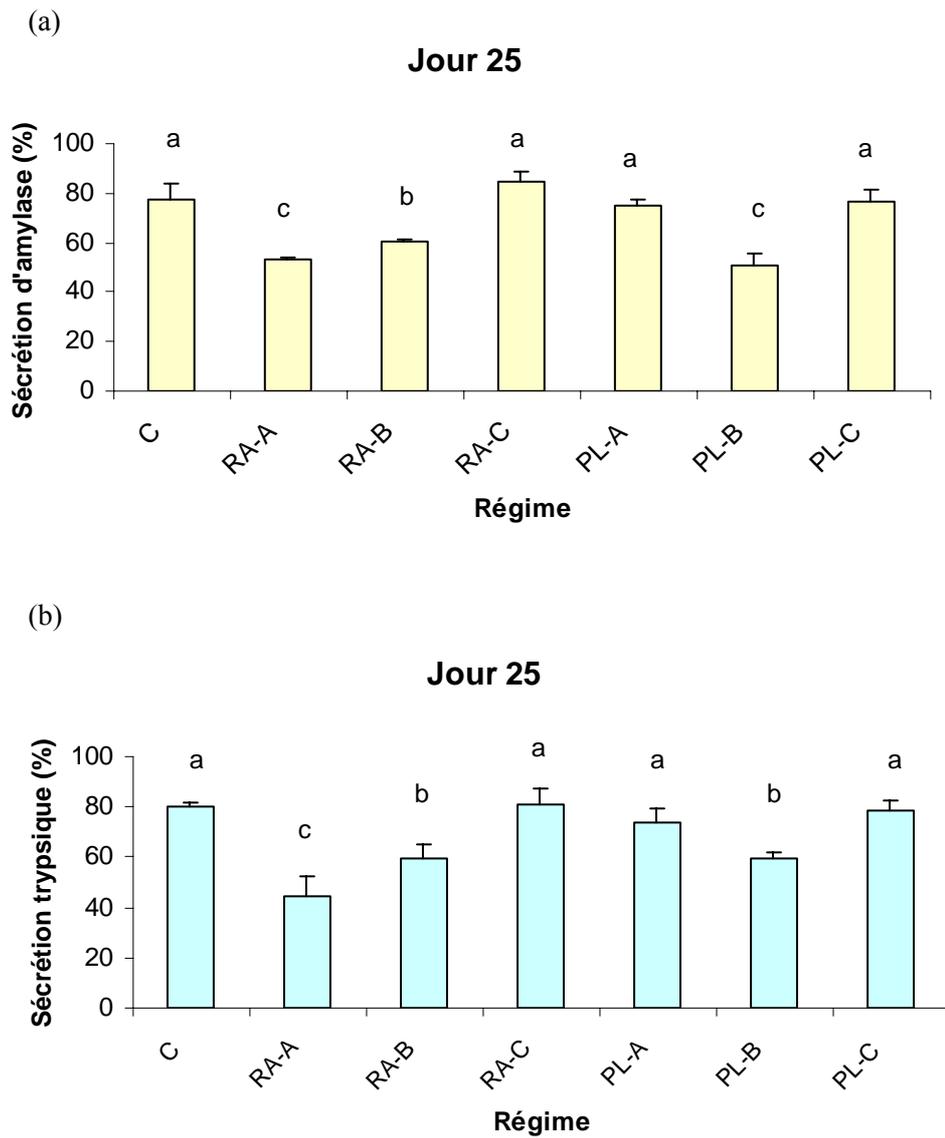


Figure 6. Sécrétion de l'amylase (a) et de la trypsine (b) en fonction des régimes à J25 dans les larves de bar. Les moyennes \pm ET (n=3) affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0.05$).

4. Discussion.

L'action des nutriments sur la morphogénèse est encore méconnue chez les poissons. Cette action devrait avoir lieu pendant une période prédéterminée si l'on prend en compte les études faites chez les mammifères sur certains gènes clés du développement, tels que les gènes Hox (Krumlauf, 1994). Chez les mammifères, l'étude de ces fenêtres d'action est complexe car les processus de la morphogénèse se font *in-utero* alors que, chez les larves de poissons marins, il est possible d'agir sur ces mécanismes après éclosion.

A J23, le groupe contrôle (C) présentait la meilleure croissance alors que les larves nourries avec l'aliment PL étaient d'autant plus grosses que l'aliment avait été appliqué tard. Nous avons effectivement démontré précédemment que cet aliment contenant une forte proportion d'EPA et de DHA dans la fraction phospholipidique (4.8%) ne permettait pas une croissance optimale des larves de bar. Nos résultats actuels confirment cette donnée et permettent de dire que l'aliment agit d'autant plus négativement sur la croissance que les larves l'ingèrent tôt. Par contre, l'aliment contenant une très forte dose de rétinol, RA, ralentissait la croissance des larves quand il était ingéré pendant les périodes A ou C. A J40, les tendances observées pour la croissance suivaient globalement celles observées à J23. La faible croissance que nous avons observée dans le lot RA-C ne pouvait pas être uniquement expliquée par les conditions nutritionnelles et elle était certainement liée à d'autres paramètres que nous n'avons pas pu mettre en évidence ici. La phosphatase alcaline est considérée comme un marqueur du développement de la bordure en brosse des larves, plus son activité spécifique est élevée et plus le développement intestinal est avancé (Zambonino Infante & Cahu, 2001). La maturation du tractus gastro-intestinal des larves de bar s'achève vers le jour 25, que ce soit au niveau intestinal ou au niveau pancréatique, ce qui explique pourquoi les quantifications des activités enzymatiques ou de la sécrétion pancréatique ont été faites à cette date (Zambonino Infante & Cahu, 2001). Ici, l'activité spécifique de la phosphatase alcaline la plus élevée était mesurée dans le groupe contrôle, ce qui confirmait que ce groupe présentait le meilleur développement. De plus, cette activité suivait aussi les tendances de croissance dans les autres lots. Ceci était également vérifié pour le taux de sécrétion pancréatique de la trypsine et de l'amylase à J25. L'activité spécifique de l'amylase chute normalement au cours du développement des larves de bar (Zambonino Infante & Cahu, 2001), comme cela était le cas pour les groupes C et PL-C. Tous les autres lots

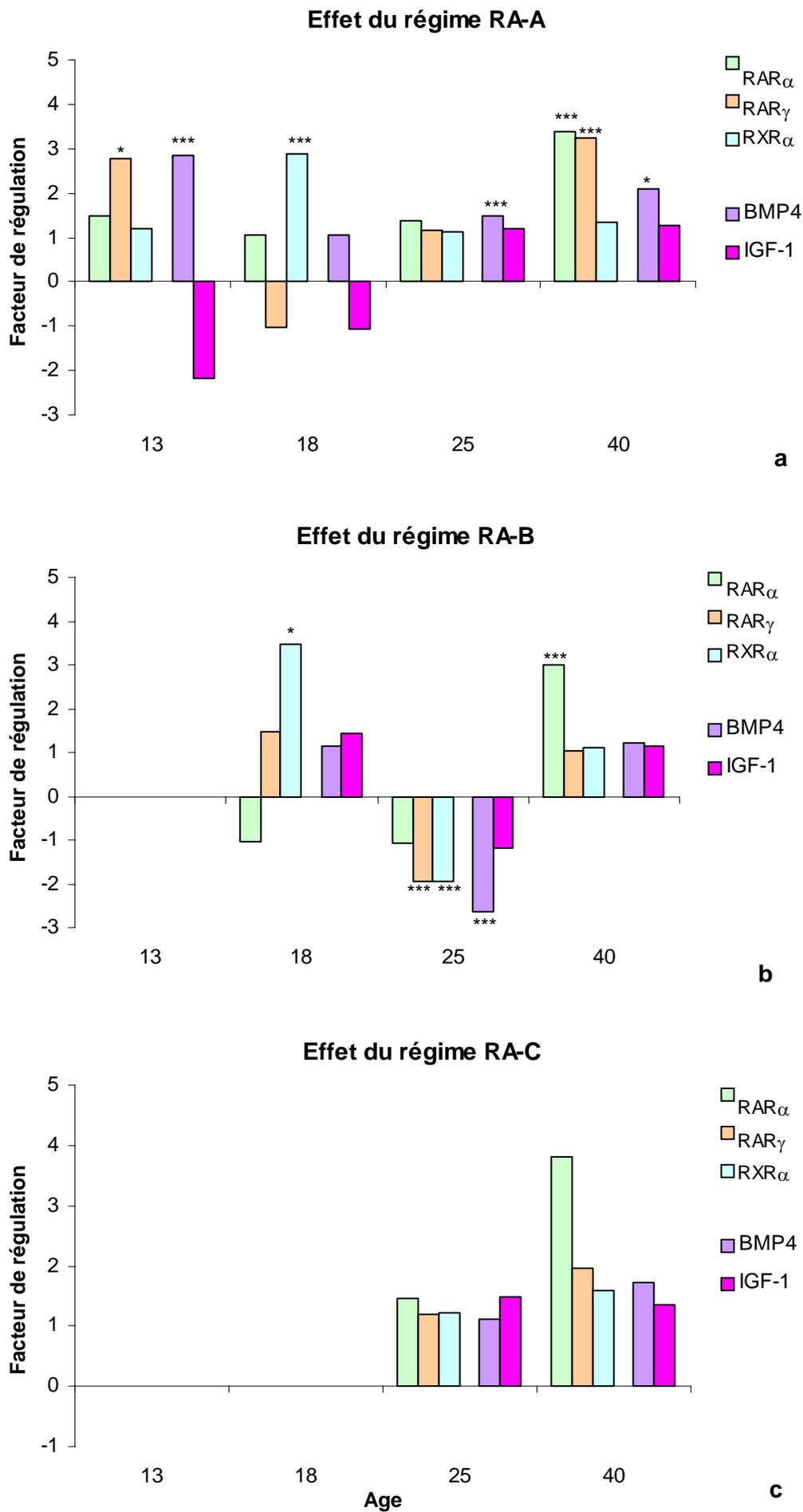
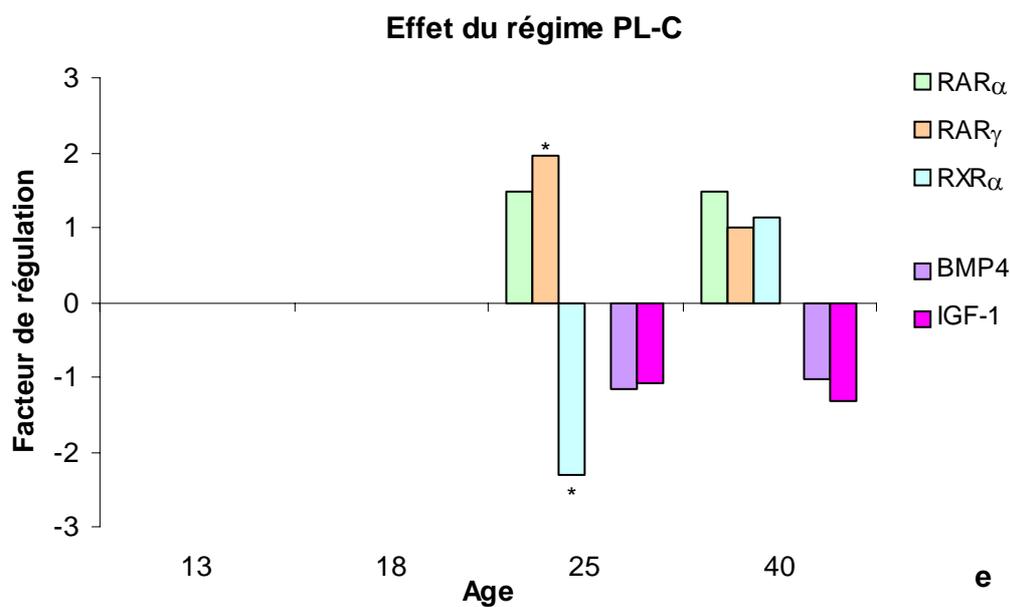
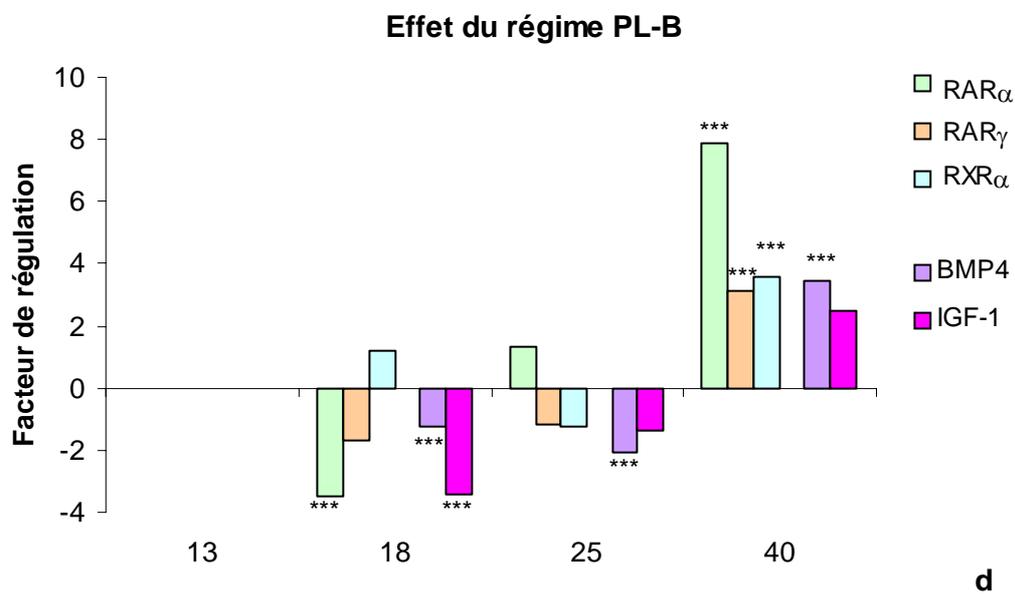
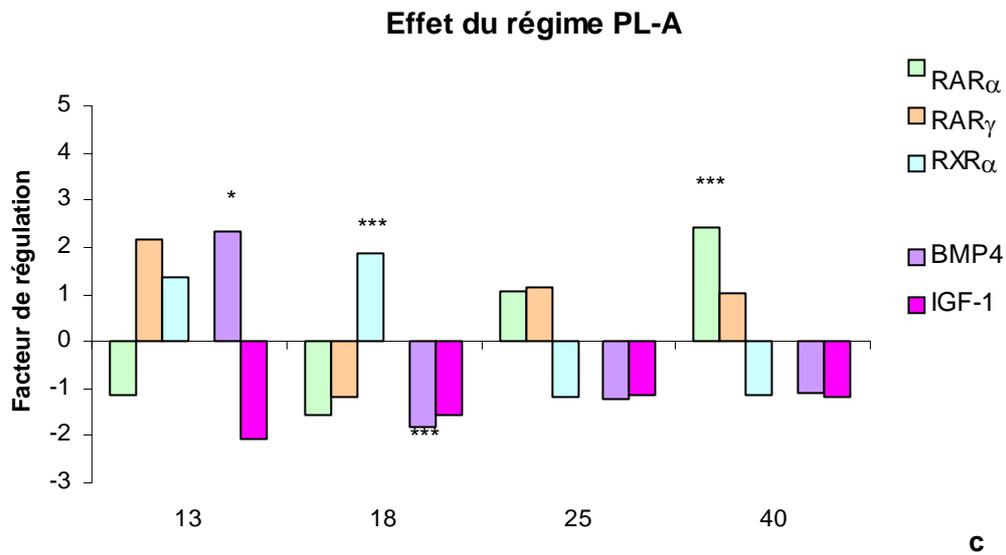


Figure 7. Effet des régimes RA (a, b, c) et PL (d, e, f) sur l'expression de RAR α , RAR γ , RXR α , BMP4 et IGF-1 chez les larves de bar à différentes dates et selon les périodes de nourrissage. Les expressions des gènes à J13, J18, J25 et J40 ont été normalisées par rapport aux valeurs d'expression des gènes correspondants obtenues dans le groupe contrôle aux mêmes dates. Les nombres indiquent le



ratio relatif de l'expression des gènes. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au groupe contrôle pour une même date (* : $P < 0.05$; *** : $P < 0.001$).

expérimentaux avaient également une activité spécifique de l'amylase plus élevée, ce qui reflétait leur retard de croissance.

Nous avons observé un effet des régimes et de leur période de distribution sur la morphogénèse des larves de bar et notamment sur le nombre de vertèbres. Il a été précédemment démontré chez la truite que le nombre de vertèbres peut être perturbé par d'autres facteurs que la nutrition, tels que la tétraploïdie (Kacem et al., 2004). Les larves nourries avec l'aliment RA pendant la période A présentaient surtout une perte de vertèbres (n=24) alors que celles nourries avec l'aliment PL pendant la même fenêtre de temps avaient une vertèbre surnuméraire (n=26) par rapport au groupe contrôle. Dans ces deux cas, l'expression de RXR α était stimulée à J18. Nous avons mis précédemment en évidence que dans des conditions normales ce récepteur était très exprimé pendant les stades précoces de la morphogénèse des larves de bar puis son expression chutait dans des stades plus avancés de développement lorsque les processus de différenciation sont terminés (Villeneuve et al., 2004). Les résultats présentés ici semblent indiquer que RXR α est en effet fortement exprimé très précocement puisque qu'il est aussi fort dans les lots RA-A et PL-A que dans le groupe contrôle jusqu'à une date antérieure à J18 ; par la suite, le niveau d'expression de RXR α est plus élevé que dans le groupe C ce qui indique que les deux aliments distribués entre J8 et J13 stimulent sa transcription.

Dans le cas de l'excès de vitamine A dans l'aliment, nous avons observé une stimulation de l'expression de RAR γ due à l'acide rétinoïque à J13, or de nombreuses données bibliographiques indiquent que les RAR et les RXR forment des hétérodimères et que la transcription des gènes de ces récepteurs peut être régulée par les récepteurs eux-mêmes (Balmer & Blomhoff, 2002 ; Ross et al., 2000). Il est donc envisageable que l'augmentation du nombre de RAR γ à J13 a conduit à une stimulation de l'expression de RXR α à J18. Nous avons d'ailleurs déjà démontré que dans le cas d'une hypervitaminose A, RAR γ était l'isoforme principalement impliquée dans l'apparition des malformations. Le groupe RA-A présentait à la fois des malformations de la région céphalique (comme cela avait observé lors d'un excès de vitamine A) et aussi des malformations de la colonne vertébrale (entraînant une baisse du nombre de vertèbre). A J13, l'expression de BMP4 était aussi stimulée ; or nous savons qu'une synergie d'action de BMP4 et de la voie des rétinoïdes (Glozak & Rogers, 1998) peut conduire à des apoptoses cellulaires. Ce phénomène d'apoptose a été observé dans le cas de cellules cancéreuses embryonnaires : en présence de BMP4 la mort cellulaire n'intervenait que lors d'un ajout d'acide rétinoïque 9-cis dans le milieu de culture qui entraînait une activation de l'expression de RAR α ou de RAR γ (Glozak & Rogers, 1998). De

plus, il a été mis en évidence que les BMP et la voie de signalisation de l'acide rétinoïque pouvaient également coopérer afin d'induire la différenciation des préadipocytes de la moelle osseuse en ostéoblastes. Ces deux types cellulaires semblent avoir un précurseur commun, précurseur isolé dans la moelle osseuse car dans des cas de perte osseuse tels que l'ostéoporose, il a été montré que la chute du nombre des ostéoblastes était corrélée à une augmentation de la différenciation des adipocytes (Skillington et al., 2002).

La différenciation en ostéoblastes s'accompagne d'une stimulation de la phosphatase alcaline (Skillington et al., 2002). Dans notre étude nous n'avons pas observé d'augmentation de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline certainement car les larves RA-A présentaient un retard de développement, révélé par le retard de maturation intestinale et une activité spécifique élevée de l'amylase qui, normalement, doit chuter au cours du développement (Cahu & Zambonino Infante, 2001). Au vu de ces données bibliographiques, il est raisonnable d'envisager que l'augmentation de l'expression de BMP4 et RAR γ a entraîné une apoptose qui eu pour conséquence une perte du nombre d'ostéoblastes disponibles pour la constitution du tissu osseux qui n'a pas pu être contrebalancé par la différenciation des préadipocytes en cellules osseuses induite par l'acide rétinoïque et BMP4. ces effets ont certainement interféré avec le processus normal de différenciation de ce tissu en le retardant. Cette hypothèse est confortée par le maintien d'une expression élevée de RXR α à J18, ce récepteur étant nécessaire pour achever le processus de différenciation des ostéoblastes. Néanmoins, la perte des cellules osseuses a certainement conduit d'une part, à la perte d'une vertèbre au niveau de la colonne vertébrale et, d'autre part, à des malformations au niveau de la boîte crânienne. Nous pouvons remarquer que la transcription de RXR α restait fortement modulable chez les larves nourries avec l'aliment RA pendant la période B mais seule la morphogénèse de la région céphalique était affectée. Cela semble donc indiquer que pendant cette fenêtre temporelle du développement les gènes cibles de RXR α dans la région vertébrale ne sont plus influençables par ce récepteur révélant certainement la fin des processus de morphogénèse de cette région.

Dans le cas des larves nourries avec l'aliment PL, l'augmentation de l'expression de RXR α à J18 ne peut pas être reliée à une stimulation de RAR γ , l'aliment PL contenant une quantité de vitamine A identique à celle du contrôle. Par contre, l'aliment PL contenait un taux élevé de phospholipides marins avec un fort pourcentage de AGPI, en particulier d'EPA et de DHA (4.8%). Cette forme d'apport des lipides est digérée très efficacement par les larves de bar (Cahu et al., 2003b) conduisant à la libération dans l'organisme d'une forte proportion d'acides gras polyinsaturés. Ces acides gras sont les ligands naturels des PPAR et

leur présence en excès a très certainement conduit à une forte stimulation de l'expression des PPAR qui se lient facilement aux RXR α pour former des hétérodimères agissant sur certains gènes. Cette possible association pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de RXR α . De plus, le DHA est un ligand pour RXR α ; l'association directe acide gras/RXR pourrait donc être aussi à l'origine de la forte transcription des RXR α constatée chez les larves nourries avec le régime PL (Mata de Urquiza et al., 2000). A J13, la stimulation de la transcription de BMP4 peut amplifier le processus de différenciation des ostéoblastes, et ainsi expliquer l'apparition d'un segment supplémentaire au niveau de la colonne vertébrale. A J18, la faible expression de BMP4 indiquerait la fin du processus de maturation des ostéoblastes; en effet, il a été rapporté que la baisse de l'expression de ce gène dans les tissus signifie, dans les conditions normales, que le processus de différenciation est en cours de finalisation (Solheim, 1998). Les indicateurs du développement pris au niveau du pancréas vont dans le même sens: le fort taux de sécrétion pancréatique (à la fois pour la trypsine et l'amylase) révèlent en effet que la maturation du pancréas exocrine dans le groupe PL-A est à un niveau comparable de celle du groupe témoin, et à un stade plus avancé que dans le groupe RA-A et même PL-B (où il n'y a pas eu de stimulation de la transcription de BMP4); de plus l'activité spécifique de l'amylase est significativement plus basse dans le groupe PL-A que dans le groupe RA-A.

Le profil d'expression des gènes étudiés dans des conditions normales d'élevage a été décrit par Villeneuve et al. en 2004. Il se traduit par une augmentation de l'expression des isoformes RAR et une baisse de RXR α . Dans notre expérience, à J23 et J40, nous constatons que les niveaux d'expression des deux isoformes des RAR étaient globalement plus élevés dans les lots expérimentaux par rapport au groupe témoin, alors que les niveaux d'expression de RXR α et de BMP4 étaient plus faibles que dans le groupe C. Ces résultats semblent indiquer que les tendances normales d'expression, bien qu'accentuées par rapport au groupe témoin, étaient observées à nouveau à partir de J23 tout en restant modulables par les régimes testés sur les larves de bar. Ces modulations de l'expression de gènes impliqués dans la voie des rétinoïdes n'avaient néanmoins aucune répercussion sur le taux de malformation car les processus de différenciation cellulaire et de morphogénèse n'étaient plus influençables à ces dates.

En conclusion, la morphogénèse des larves de bar est extrêmement sensible aux doses de vitamine A et de phospholipides marins (apport élevé en AGPI) dans l'aliment pendant les très jeunes stades du développement. Les gènes impliqués dans ces processus sont donc très modulables entre J8 et J13 et les résultats obtenus ici indiquent que la vitamine A et les AGPI

mettent en jeu des voies géniques différentes; en effet, des teneurs inadaptées en vitamine A et AGPI dans l'aliment induisent des malformations distinctes. Une hypervitaminose A retarde le développement ce qui réduit le nombre de segments de la colonne vertébrale et perturbe fortement l'ossification de la région céphalique alors que un apport élevé en AGPI accélère la différenciation des ostéoblastes et fait apparaître une vertèbre supplémentaire.

D'un point de vue pratique, cette étude révèle la nécessité de distinguer deux phases dans le développement des larves, avant et après J13, ce qui pourra avoir des implications en terme de formulation d'aliment.

CHAPITRE VII

DISCUSSION

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'impact de deux nutriments, la vitamine A et les phospholipides marins, sur le développement des larves de bar afin de comprendre comment ces nutriments influençaient les processus de différenciation et de morphogenèse. Nous avons également voulu déterminer les doses optimales de ces deux nutriments dans l'aliment pour larves de bar afin d'optimiser sa formulation.

1. Expression de gènes impliqués dans la voie des rétinoïdes au cours du développement des larves de bar.

Le profil et les lieux d'expression de nos gènes d'intérêt au cours du développement des larves de bar a été déterminé avec des larves nourries avec un aliment breveté (brevet WO0064273, 2 novembre 2000). Cet aliment, considéré actuellement comme optimal, assure une bonne croissance et survie des larves. Il contient le mélange vitaminique 762 recommandé par le NRC pour les poissons marins avec une dose de 0.08 g/kg de matière sèche de vitamine A et 116 g/kg MS de phospholipides dont 15 g/kg MS d'EPA + DHA.

Le développement des larves s'accompagne de changements morphologiques, tels que l'apparition des nageoires et l'allongement de la gueule, qui font acquérir à la larve sa physiologie adulte. Ces changements se terminent vers le jour 40 (Barnabé et al., 1976). Au niveau physiologique, le développement normal des larves de bar se caractérise par la maturation du pancréas et des entérocytes dont les activités enzymatiques au niveau de la bordure en brosse augmentent, ces phénomènes de maturation s'achèvent globalement vers le jour 30 (Zambonino Infante & Cahu, 2001). Ces critères ont été utilisés pour s'assurer que la description de l'expression des gènes correspond donc bien à un développement normal du bar.

A J10, le récepteur nucléaire RXR α de la vitamine A était très exprimé dans les larves de bar puis son expression chutait de façon très significative entre cette date et J42. A J37, nous avons révélé sa présence dans le pancréas exocrine, le foie, la thyroïde, les reins, les mâchoires et les dents. Le pancréas exocrine connaît pendant cette période un processus de différenciation. Cela se traduit en particulier par une augmentation du processus de sécrétion des enzymes (amylase et trypsine) et une baisse de l'expression de l'amylase. Les données bibliographiques indiquent que le processus de différenciation et maturation du pancréas est contrôlé par la formation de dimères entre le récepteur RXR α et certains récepteurs des

hormones thyroïdiennes (Kobayashi et al., 2002). La détection de RXR α dans le pancréas et la baisse de son expression au cours du développement de cet organe chez les larves de bar suggère donc que ce RXR α est un récepteur nucléaire actif pendant les premières phases de différenciation des tissus.

Il a été également mis en évidence que, chez les mammifères (Ross et al, 2000), RXR α était impliqué dans le développement du cœur et des yeux, ceci semble être aussi le cas chez le bar puisque le messager codant pour ce récepteur y est exprimé à J37. Dans le cas du foie, la détection de messagers RXR α et RAR α reflète certainement plus le fait que cet organe est un lieu de stockage de la vitamine A, donc lieu d'intenses processus métaboliques (Giguère, 1994), qu'un éventuel processus de différenciation. L'expression de RAR α et de RAR γ augmentait entre J10 et J42. L'isoforme α était présente au niveau de la mâchoire à J5 et à J37. A J37, elle était également exprimée dans les vertèbres, le foie, les nageoires pectorales, le cerveau, le tissu neuronal, les yeux et les arcs branchiaux. RAR γ s'exprimait au niveau du cartilage, des yeux et de l'opercule. Ces résultats indiquent que l'isoforme α est beaucoup plus ubiquitaire que la forme γ , elle pourrait donc être impliquée dans la morphogenèse d'un nombre plus important de tissus et régions corporelles. La présence des deux RAR dans les yeux peut principalement être reliée à la présence de vitamine A dans cet organe où elle est transformée en rétinol nécessaire à l'absorption de la lumière (Duester, 2000).

Il est également à noter qu'au cours d'un développement normal de larves de bar, nous n'avons pas enregistré de variations dans l'expression de BMP4 et d'IGF-I.

2. Influence des nutriments sur le développement des larves de bar.

2.1 Effet de la vitamine A.

Lors d'une carence ou d'un excès en vitamine A dans l'aliment distribué dès la première alimentation et jusqu'à la sixième semaine de vie, la croissance des larves était ralentie au niveau de la prise de poids. Ce retard de croissance s'accompagnait également par des perturbations du processus de maturation des fonctions digestives; en particulier, nous avons relevé chez la larve, âgée de plus de trente jours et nourrie avec des aliments à forte teneur en vitamine A, que la sécrétion de trypsine et l'activité spécifique des enzymes de la bordure en brosse des entérocytes restaient à des niveaux faibles. Ces données caractérisent un retard de la maturation de tractus gastro-intestinal; il apparaît donc, comme chez le poulet ou le rat, que la vitamine A, à des doses inadaptées, perturbe le développement normal de la muqueuse intestinale en affectant la prolifération et les maturation des entérocytes (Reifen et

al., 1998 ; Uni et al., 2000). Au niveau du pancréas, cette vitamine affecte également le développement normal du pancréas, certainement par l'intermédiaire de ces récepteurs. Il est intéressant de noter que l'expression des récepteurs nucléaires RXR α augmentait de façon significative chez les larves nourries avec les aliments expérimentaux par rapport aux larves élevées en condition standard. Cette forte expression des messagers RXR α apparaît après une ou deux semaines d'alimentation avec les aliments expérimentaux, soit entre le 12^{ème} et 19^{ème} jour de développement des larves, période au cours de laquelle l'expression de ce messager doit normalement baisser. Ce résultat traduit certainement une perturbation de la voie des rétinoïdes et, par conséquent, de la différenciation des tissus où le récepteur RXR α s'exprime. Il est donc probable que la vitamine A de l'aliment, par l'intermédiaire des récepteurs RXR α , affecte la maturation de la fonction de sécrétion du pancréas.

Les larves ayant été nourries avec un fort taux de vitamine A présentaient une forte accumulation de rétinol, forme circulante de la vitamine A, et de rétinol palmitate, forme de stockage de la vitamine A dans les tissus. L'incorporation de rétinol acétate dans les tissus atteignait un plateau vers la sixième semaine de vie des larves. Ce phénomène de saturation a précédemment été décrit chez le bar (*Dicentrarchus labrax*) pour d'autres vitamines telles que la vitamine C (Fournier et al., 2000). Nous avons aussi mis en évidence qu'il existait une corrélation linéaire entre le taux alimentaire de vitamine A et le taux de malformations affectant la région céphalique des larves. En effet, plus le taux de vitamine A dans l'aliment était élevé et plus les larves présentaient des déformations de cette zone. L'apparition de ces malformations était associée à une augmentation très importante de l'expression du récepteur RAR γ pendant les très jeunes stades du développement. Ceci semble donc indiquer qu'une hypervitaminose A stimule l'expression de ce récepteur, qui possède dans la région régulatrice de son gène une zone RARE, Retinoic Acid Response Element (Balmer & Blomhoff, 2002); la zone RARE permet une modulation du nombre des récepteurs par la vitamine elle-même. L'isoforme RAR γ paraît donc être celle qui est principalement impliquée dans la morphogenèse de la région céphalique.

Recommandations nutritionnelles.

Notre étude a permis, à la lumière des données de survie, croissance, maturation du système digestif et taux de malformations, de proposer 31 mg/kg MS comme dose optimale de vitamine A dans l'aliment des larves de bar .

2.2 Effets de l'EPA et du DHA.

De façon générale, la croissance des larves ayant reçu l'EPA et le DHA dans la fraction phospholipidique (PL) de l'aliment était meilleure que celle des larves ayant reçu ces acides gras dans la fraction lipide neutre (NL); ce résultat conforte l'idée que les larves de poissons marins utilisent beaucoup plus efficacement les lipides alimentaires s'ils sont sous forme phospholipides (Cahu & Zambonino Infante, 2001). Les meilleures croissances et survies étaient obtenues avec un aliment contenant 2.3% d'EPA et de DHA dans la fraction PL alors qu'une dose comparable dans la fraction NL était létale pour les larves de bar. Les larves ayant reçu ces AGPI dans la fraction NL présentaient également une accumulation anormale de graisse (stéatose) dans les hépatocytes et dans les entérocytes de l'intestin postérieur (Gisbert et al., en soumission). Une forte accumulation de vacuoles lipidiques intercellulaires et de gouttelettes lipidiques était observée au niveau des entérocytes de l'intestin antérieur (site privilégié pour l'absorption des lipides). Nous pouvons donc en déduire que l'absorption des lipides neutres chez les larves peut intervenir au niveau de l'intestin antérieur et de l'intestin postérieur lorsque l'aliment contient de trop fortes quantités de lipides neutres; néanmoins, ce fort afflux en triglycérides ne peut pas être métabolisé par les cellules, ce qui conduit à des accumulations de lipides dans leurs lieux d'absorption ou de stockage. De plus, la vessie natatoire des larves nourries avec de fortes teneurs en AGPI apportés par les lipides neutres n'était pas fonctionnelle car envahie par des cellules (Gisbert et al., en soumission). Nous avons aussi mesuré chez ces larves, nourries avec de fortes teneurs en AGPI apportés par les lipides neutres, une perturbation de l'expression de RAR α , RAR γ , RXR α et nous avons mis en évidence une modification de l'expression de BMP4 au cours du développement (Villeneuve et al. en soumission). Ces éléments contribuent à renforcer l'idée d'un dérèglement total chez ces larves pouvant expliquer leur mort prématurée.

Une forte quantité d'EPA et de DHA (4.8%) dans la fraction PL perturbait la croissance et la survie des larves de bar. Les larves présentaient une stéatose (Gisbert et al., en soumission) principalement localisée au niveau de l'intestin postérieur, ce qui pourrait signifier que les phospholipides sont absorbés préférentiellement dans cette zone de l'intestin. Il est intéressant de noter que cette stéatose apparaît principalement avec de fortes teneurs de phospholipides d'origine marine; les AGPI qui en résultaient, ne pouvant pas être tous utilisés, étaient stockés sur place. De plus, cette stéatose ne peut pas être considérée comme pathologique car nous n'avons pas observé de phénomènes d'abrasion cellulaire, de nécrose ni de réaction inflammatoire le long de l'intestin. L'excès d'AGPI dans la fraction PL induisait

chez quasiment la moitié des larves des malformations squelettiques affectant la région de la colonne vertébrale, avec une forte prévalence de scoliozes. L'apparition de ces malformations s'accompagnait d'une baisse anormale de l'expression de $RAR\alpha$, $RXR\alpha$ et IGF-I après 10 jours de nourrissage avec l'aliment expérimental. Nous avons pu établir que la variation de l'expression de $RXR\alpha$ était corrélée à l'apparition de ces malformations, qui affectaient principalement la colonne vertébrale. Parmi les AGPI, le DHA est un ligand connu de $RXR\alpha$; l'excès en cet acide gras, indifféremment de son mode d'apport, pourrait donc perturber la voie de signalisation des rétinoïdes et donc la morphogénèse.

Recommandations nutritionnelles.

Au vu des données de croissance, survie, maturation intestinale et absorption des lipides, la dose la plus appropriée d'EPA et de DHA est de 2.3% dans la fraction phospholipidique de l'aliment, avec un ratio DHA/EPA de 2.2 :1. Si l'on prend en compte le taux de malformations squelettiques, la quantité la plus adéquate d'EPA et de DHA dans la fraction phospholipidique serait alors de 1.1% et le ratio DHA/EPA de 1.9 :1. Afin d'obtenir une bonne croissance tout en minimisant le nombre de poissons malformés, l'aliment pour larves de bar pourrait donc contenir des phospholipides apportant une dose d'EPA et de DHA intermédiaire entre les deux citées ci-dessus. D'autre part, le ratio DHA/EPA devrait avoir une valeur comprise entre 1.9 :1 et 2.2 :1.

3. Influence de la composition de l'aliment sur le développement des larves en fonction de la fenêtre temporelle de distribution.

Nous avons voulu savoir pendant quelle période du développement un aliment était susceptible d'influencer le processus de morphogénèse des larves de bar. Nous avons testé deux aliments contenant un fort taux en vitamine A ou en acide gras polyinsaturés (apportés par des phospholipides d'origine marine), ces forts taux agissant sur le développement de la larve. Nous avons aussi considéré trois fenêtres de distribution des aliments. La fenêtre A (J8-J13) commençait le premier jour d'alimentation mixte (endogène et exogène) et s'étalait jusqu'au jour 13 où les réserves vitellines de la larves sont quasiment épuisées. La fenêtre B allait du jour 13 au jour 18, date à laquelle la maturation du pancréas est pratiquement achevée, la larve a alors une alimentation uniquement exogène. La troisième fenêtre (C) s'étalait du jour 18 au jour 23, période pendant laquelle la maturation de l'intestin débute, les larves passant à un mode de digestion de type adulte. Cette période correspond aussi à la fin

du processus de segmentation avec la mise en place des vertèbres, se terminant vers le jour 20 (Barnabé et al., 1976).

L'ingestion pendant la période A d'un aliment contenant une forte teneur en vitamine A ou en acides gras polyinsaturés induisait un retard de croissance et affectait les processus de développement des larves. Nous avons en particulier noté, dans le cas d'un aliment riche en vitamine A, un retard de la maturation du système digestif, révélé par un mauvais développement de la bordure en brosse des enterocytes et un faible niveau de sécrétion des enzymes du pancréas. Le processus de maturation du pancréas n'était pas achevé à J18, cinq jours après la fin de la période de nourrissage, date à laquelle était mesurée une transcription anormalement élevée du récepteur RXR α . Il pourrait donc exister une relation entre l'augmentation de la transcription de ce récepteur, due à un excès dans l'aliment de vitamine A, et la perturbation du processus de maturation de pancréas. L'ingestion pendant la période A d'un aliment contenant une forte teneur en vitamine A ou en acides gras polyinsaturés induisait aussi une anomalie du nombre de vertèbres des larves. Les larves de bar comportent en moyenne 25 vertèbres. Lorsque l'aliment contenait un excès de vitamine A, un pourcentage significatif des larves présentait la perte d'une vertèbre et, lorsque l'aliment contenait un excès d'AGPI, un nombre significatif de larves avait une vertèbre surnuméraire. Un fort taux de vitamine A dans l'aliment entraînait une forte expression de RAR γ et de BMP4 à la fin de la période de nourrissage. Cette hausse simultanée de ces deux gènes peut induire une apoptose cellulaire, comme cela a été montré pour des cellules cancéreuses humaines (Glozak & Rogers, 1998), mais également à une induction de la différenciation de cellules présentes dans la moelle osseuse (les préadipocytes) en ostéoblastes (Skillington et al., 2002). Bien que ces deux phénomènes puissent paraître contradictoires, nous pouvons imaginer que la stimulation de l'expression de RAR γ corrélée à celle de BMP4 ait induit un mécanisme d'apoptose chez les ostéoblastes disponibles pour la constitution du tissu osseux qui n'a pas pu être compensé par la différenciation des préadipocytes en ostéoblastes. Cela a donc perturbé le processus normal de différenciation du tissu osseux en le retardant et en réduisant le nombre d'ostéoblastes disponibles, ce qui a conduit à la perte d'une vertèbre ainsi qu'à des malformations de la boîte crânienne. Cette hypothèse était également confortée par l'expression élevée de RXR α à J18, ce récepteur étant nécessaire pour finaliser la différenciation des cellules osseuses. Il est à noter que lorsque cet aliment contenant un excès de vitamine A était appliqué pendant la période B, l'expression de RXR α restait modulable mais des malformations n'apparaissaient qu'au niveau de la région céphalique, ce qui pourrait

indiquer qu'à cette date seuls les gènes effecteurs de ce récepteur impliqués dans la morphogenèse de la tête étaient encore influençables.

Dans le cas d'un aliment contenant un fort taux d'AGPI, seule une expression anormalement forte de BMP4 était observée chez les larves à la fin de la fenêtre temporelle A, suivie quelques jours après par une chute de l'expression de ce gène. Ce processus a déjà été décrit chez l'homme (Solheim, 1998), et indique la maturation du tissu osseux. Cela aurait pu induire une amplification du processus de différenciation des ostéoblastes, se traduisant par une augmentation du nombre d'ostéoblastes disponibles, pouvant ainsi expliquer l'apparition d'une vertèbre surnuméraire. Les indicateurs de la maturation du pancréas exocrine révèlent que le nourrissage des larves pendant la période A avec l'aliment riche en AGPI induit un meilleur développement de la fonction de sécrétion du pancréas, par comparaison à l'aliment riche en vitamine A. Cet effet sur la maturation du pancréas n'est pas observé lorsque l'aliment riche en AGPI est utilisé pendant la période B, de même que n'était pas mesurée de stimulation de la transcription de BMP4.

Il apparaît donc que les larves sont extrêmement sensibles aux conditions nutritionnelles entre le jour 8 et le jour 13, ce qui correspond aux premiers jours d'alimentation exogène.

4. Perspectives.

4.1 Considérations techniques.

Au cours de ce travail, nous avons tenté de cloner plusieurs gènes en utilisant la plupart du temps des séquences nucléotidiques et protéiques hétérologues. Ceci a représenté une part importante du temps consacré à cette étude mais n'a pas toujours permis d'isoler et de cloner les gènes auxquels nous nous intéressions, tels que les gènes Hox ou shh ; parmi les nombreuses raisons pouvant expliquer ces difficultés à obtenir des gènes qui ont pourtant des séquences très conservées au cours de l'évolution, nous privilégierions en premier le choix limité de séquences chez les espèces de poissons phylogénétiquement proches du bar ; cette limitation ne nous a certainement pas permis de dessiner les meilleures amorces possibles. A cette difficulté, s'ajoute certainement un faible niveau d'expression des gènes que nous voulions étudier dans nos larves. De ce fait, certains gènes utilisés dans cette étude ne sont pas forcément les plus pertinents : ainsi, BMP4 et IGF-I ne semblent pas être de bons marqueurs du développement au vu de nos résultats car leur expression est peu modulable

dans les conditions expérimentales testées ici ; l'obtention de séquences de gènes Hox ou shh aurait pu nous fournir des indicateurs plus sensibles à nos conditions expérimentales et donc plus facilement modulables et exploitables par la PCR en temps réel. De plus, l'obtention de séquences des récepteurs des acides gras, les PPAR, et l'étude de leur expression auraient été nécessaires pour valider les hypothèses émises sur l'interaction de la voie des acides gras et de la voie des rétinoïdes. Ces gènes sont actuellement en cours de clonage au sein de notre laboratoire. Ce type d'étude sur le développement révèle nettement les limites d'une approche par gène candidat : une approche utilisant les puces à ADN aurait certainement facilité l'identification de marqueurs pertinents parmi tous les gènes impliqués dans le développement.

Il est également à noter que les études par PCR (classique ou en temps réel) ont été réalisées sur des larves entières car leur dissection aurait nécessité un investissement humain et un temps de travail considérables qui aurait pu compromettre la qualité des ARNm extraits. Néanmoins, il aurait été intéressant de travailler sur des tissus isolés afin de localiser très finement les lieux d'expression de nos gènes d'intérêt (les hybridations nous ont en effet permis de le faire partiellement mais l'épaisseur des tissus a pu masquer une partie du signal) et cela aurait également pu permettre de connaître les tissus affectés par les différents traitements et donc de suivre les variations d'expression des gènes dans ces tissus.

4.2 Elargissement de cette approche à d'autres nutriments.

Au cours de ce travail, nous nous sommes focalisés sur la vitamine A et les lipides mais d'autres nutriments, tels que les peptides courts, ont aussi une influence sur la morphogénèse des larves de bar (Zambonino Infante et al., 1997). Il a en effet été démontré que la substitution partielle des protéines par des di ou tripeptides améliorait la croissance et la qualité des larves (très peu de malformations apparentes). Ce résultat, reconfirmé par d'autres auteurs (Cahu et al., 1999) est toujours resté inexplicé. Les peptides sont absorbés au niveau de l'intestin postérieur où ils favorisent la maturation des entérocytes, se traduisant en particulier par la mise en place d'enzymes membranaires au niveau des bordures en brosse. Ces peptides courts agissent donc très certainement sur l'expression de gènes codant pour des enzymes ou impliqués dans la morphogénèse. Or, dans l'intestin, sont exprimés des gènes à homéoboîte, les Cdx, impliqués dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur au niveau de l'intestin (Freund et al., 1998). Il a été également démontré qu'un traitement à l'acide rétinoïque pouvait accélérer la différenciation de cellules fœtales intestinales non

différenciées et que cela était corrélé à une augmentation de la transcription de Cdx-1. Nous pouvons donc supposer qu'après leur absorption au niveau de l'intestin, les peptides influenceraient directement ou indirectement des facteurs de transcription agissant au niveau de certains gènes du développement. Les Cdx pourraient donc faire partie de cette cascade. Etant donné que les Cdx peuvent être modulés par les rétinoïdes, il se pourrait donc que les dérivés de la vitamine A interagissent avec la voie de signalisation des peptides. Si cette hypothèse était vérifiée, elle constituerait la première démonstration de l'influence des peptides sur les mécanismes de morphogenèse. Les peptides ne sont qu'un exemple parmi tous les nutriments ayant une influence sur le développement. Un autre exemple possible serait celui des vitamines, telles que la vitamine C ou E qui ont des actions anti-oxydantes et qui par conséquent peuvent agir sur les acides gras, en les protégeant de ces mécanismes d'oxydation. Une action de ces vitamines antioxydantes sur la voie des PPARs puis par ricochet sur la voie des rétinoïdes est donc tout à fait possible, ces voies de signalisation étant imbriquées. La vitamine D interagit également avec la voie de l'acide rétinoïque puisque ses récepteurs peuvent former des dimères avec ceux de cet acide. L'exemple des peptides peut donc être élargi à de nombreux nutriments entrant dans la composition des aliment pour larves de poissons marins.

4.3 Intérêt du modèle animal utilisé.

Le bar représente un modèle animal très intéressant car il offre la possibilité d'étudier l'influence de la nutrition sur les processus de morphogenèse du fait qu'il éclot à un stade pendant lequel il est encore possible d'agir sur ces processus. Par exemple, le poisson-zèbre, modèle très prisé pour les études sur le développement, éclot à un stade moins précoce que le bar ce qui limite la période d'étude de l'action des nutriment sur la morphogenèse. Le bar représente donc un modèle d'étude de choix pour ces phénomènes et les résultats obtenus pourraient fournir des indications pour tous les vertébrés.

BIBLIOGRAPHIE

- Andrades, J.A., Becerra, J. & Fernandez-Llebrez, P.** (1994). Skeletal deformities of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): study of the subcommisural organ (SCO) and Reissner's fiber (RF). *Anat. Anz.* 174, 381-383.
- Allan, G.J., Zannoni, A, McKinnel, I, Otto, W.R., Hozenberger, M., Flint, D.J. & Patel, K.** (2003). Major components of the insulin-like growth factor axis are expressed early in chicken embryogenesis, with IGF binding protein (IGFBP) –5 expression subject to regulation by Sonic Hedgehog. *Anat Embryol* 207, 73-84.
- Balmer, J.E. & Blomhoff, R.** (2002). Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43, 1773-1808.
- Barnabé, G., Boulineau-Coatanea, F. & Rene, F.** (1976). Chronologie de la morphogenèse chez le loup ou bar *Dicentrarchus labrax* (L.) (Pisces, Serranidae) obtenu par reproduction artificielle. *Aquaculture* 8, 351-363.
- Barnabé, G. & Paris, J.** (1984). Ponte avancée et ponte normale du loup *Dicentrarchus labrax* L. à la station de Biologie Marine et Lagunaire de Sète. In Actes de Colloque "L'aquaculture du bar et des Sparidés", (Barnabé, G. & Billard, R.), pp. 63-72, INRA Publ., Paris.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H. & Brock, M.J.** (1946). Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164: 321-329.
- Boglione, C., Gagliardi, F., Scardi, M. & Cataudella, S.** (2001). Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture* 192, 1-22.
- Bonilla, S., Redonnet, A., Noël-Suberville, C., Pallet, V., Garcin, H. & Higuere, P.** (2000). High-fat diets affect the expression of nuclear retinoic acid receptor in rat liver. *Br J Nutr.* 83, 665-671.
- Bouhlic, M. & Gabaudan, J.** (1992). Histological study of the organogenesis of digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus 1758). *Aquaculture* 102, 373-396.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brinkmeyer, R. & Holt, G. J.** (1998). Highly unsaturated fatty acids in diets for Red drum (*Scianops ocellatus*) larvae. *Aquaculture* 161, 253-268.
- Buddington, R.K.** (1985). Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fluvescens*, during early development. *J. Fish Biol.* 26, 715-723.

- Caballero, M. J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F.J., Izquierdo, M. S. & Fernández, A.J.** (1999). Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 179, 277-290.
- Caballero, M. J., Obach, A., Roselund, G., Montero, D., Gisvold, M. & Izquierdo, M. S.** (2002). Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 214, 253-271.
- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjorsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A. J. & Roselund, G.** (2003). Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* 225, 325-340.
- Cahu, C.L. & Zambonino Infante, J.L.** (1994). Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp Biochem Physiol* 109A, 213-222.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P. & Le Gall, M.M.** (1999). Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171, 109-119.
- Cahu, C.L. & Zambonino Infante, J.L.** (2001). Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161-180.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J.L. & Takeuchi, T.** (2003a). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227, 245-258.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L. & Barbosa, V.** (2003b). Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *Br J Nutr* 90, 21-8..
- Chatain, N.** (1986) La vessie natatoire chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus auratus*. I. Aspects morphologiques du développement. *Aquaculture* 53, 303-311.
- Chatain, B. & Ounais-Guschemann, N.** (1990). Improved rate of initial swimbladder inflation in intensively reared *Sparus auratus*. *Aquaculture* 84, 345-353.
- Clark, J., Murray, K.R. & Starck, J.R.** (1986). Protease development in Dover sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 53, 253-262.
- Cohlan, S.Q.** (1953). Excessive intakes of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117, 535-536.
- Conlon, R.A.** (1995). Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends Genet* 11, 314-319.

- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P. & Sorgeloos, P.** (1997). Review of the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155, 14-164.
- Crane, R.K., Boge, G. & Rigal, A.** (1979). Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Biochim. Biophys. Acta* 554: 264-267.
- Dabrowski, K. & Guderley, H.** (2002). Intermediary Metabolism. In *Fish Nutrition*, third edition (ed. J.E. Halver & R.W. Hardy), pp. 310-367. San Diego: Academic Press.
- Dagnelie, P.** (1975). Les méthodes de l'inférence statistique. In *Théorie et méthodes statistiques* (Ducolot, J., ed.), vol. 2, pp. 1-463. Les Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgium.
- Dahlqvist, A.** (1970). Assay of intestinal disaccharidase. *Enzym. Biol. Clin.* 11, 52-56.
- Dedi, J., Takeuchi, T., Seikai, T., Watanabe, T. & Hosaya, K.** (1997). Hypervitaminosis A during vertebral morphogenesis in larval Japanese flounder. *Fish Sci* 63, 466-473.
- Deplano, M., Connes, R., Diaz, J. P. & Barnabé, G.** (1991) Variation in the absorption of macromolecular proteins in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to exotrophic phase. *Mar. Biol.* 110, 29-36.
- Diaz, J.P., Guyot, E., Vigier, S. & Connes, R.** (1997). First events in lipid absorption during post-embryonic development of the anterior intestine in gilt-head sea bream. *J. Fish Biol.* 51: 180-192.
- Douglas, S.E., Mandla, S. & Gallant, J.W.** (2000). Molecular analysis of the amylase gene and its expression during the development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture* 190, 247-260.
- Duester, G.** (2000). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267, 4315-4324.
- Egea, P. F., Rochel, N., Birck, C., Vachette, P., Timmins, P. A. & Moras D.** (2001). Effects of ligand binding on the association and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR. *J. Mol. Biol.* 307, 557-576.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G.H.** (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Fontagné, S., Geurden, I., Escaffre, A.M. & Bergot, P.** (1998). Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 161, 213-223.

- Fournier, V., Guillou-Coustans, M.F. & Kaushik, S.J.** (2000). Hepatic ascorbic acid saturation is the most stringent response criterion for determining the vitamin C requirement of juvenile european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Nutr.* 130, 617-620.
- Freund, J.N., Domon-Dell, C., Kedinger, M. & Duluc, I.** (1998). The *Cdx-1* and *Cdx-2* homeobox genes in the intestine. *Biochem. Cell Biol.* 76, 957-969.
- Fu, Z., Noguchi, T. & Kato, H.** (2001). Vitamin A deficiency reduces insulin-like growth factor (IGF)-I gene expression and increases IGF-I receptor and insulin receptor gene expression in tissues of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Nutr* 131, 1189-1194.
- Gabbitas, B. & Canalis, E.** (1997). Retinoic acid regulates the expression of insulin-like growth factors I and II in osteoblasts. *J Cell Physiol* 172, 253-264.
- García-Hernández, M. P., Lozano, M. T., Elbal, M. T. & Agulleiro, B.** (2001). Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Light and electron microscopic studies. *Anat. Embryol.* 204, 39-57.
- Gause, W.C. & Adamovicz, J.** (1994). The use of the PCR to quantitate gene expression. *PCR Methods Appl.* 3: 123-135.
- Geurden, I., Charlon, N., Marion, D., Bergot, P.** (1997). Influence of purified soybean phospholipids on early development of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquacult. Int.* 5, 137-149.
- Giguère, V.** (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr. Rev.* 15(1), 61-79.
- Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P. & Cahu, C.L.** (en soumission). Nature and level of dietary phospholipids affect the digestive physiology of fish larvae.
- Glozak M. A. & Rogers M. B.** (1998). BMP4 and RA-induced apoptosis is mediated through the activation of retinoic acid receptors α and γ in P19 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 242, 165-173.
- Goldstein, J.T., Dobrzyn, A., Clagett-Dame, M., Pike, J.W. & DeLuca H.F.** (2003). Isolation and characterization of unsaturated fatty acids as natural ligands for the retinoid-X receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 420: 185-193.
- Guillou-Coustans, M.F., Bergot, P. & Kaushik, S.J.** (1998). Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture* 161: 453-461.
- Guillou-Coustans, M.F. & Guillaume, J.** (2001). Vitamin nutrition. In *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*, (Guillaume, J., Kaushik, S. J., Bergot, P. & Metallier, R., eds.), pp. 145-166. Springer-Praxis Books, Chichester, UK.

- Grammatopoulos, G.A., Bell, E., Toole, L., Lumsden, A. & Tucker, A.S.** (2000). Homeotic transformation of branchial arch identity after *Hoxa2* overexpression. *Development* 127, 5355-5365.
- Green, S. & Chambon, P.** (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* 4(11), 309-314.
- Grolier, P., Agoudavi, S. & Azais- Braesco, V.** (1995). Comparative bioavailability of diet-, oil- and emulsion-based preparations of vitamin A and b-carotene in rat. *Nutrition Res* 15, 1507-1516.
- Haga, Y., Suzuki, T. & Takeuchi, T.** (2002). Retinoic acid isomers produce malformations in postembryonic development of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zool Sci* 19, 1105-1112.
- Haga, Y., Suzuki, T., Kagechika, H. & Takeuchi, T.** (2003). A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 221, 381-392.
- Helms, J.A., Kim, C.H., Hu, D., Minkoff, R., Thaller, C. & Eichele, G.** (1997). Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. *Dev Biol* 187, 25-35.
- Henning, S.J.** (1987). Functional development of the gastrointestinal tract. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, pp. 285-300 (L. R. Johnson, editor). New York: Raven Press.
- Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., Stein, R.B., Eichele, G., Evans, R.M. & Thaller, C.** (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397-406.
- Hoehne-Reitan, K. & Kjorsvik, E.** (2004). Functional development of the liver and exocrine pancreas. *Am. Fish. Soc.* 40, 9-36.
- Hogan, B.L.** (1996). Bone morphogenic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Gene Dev* 10, 1580-1594.
- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A. & Florholmen, J.** (1988). High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. *J Nutr* 118, 515-520.
- Hunt, P. & Krumlauf, R.** (1992). Hox codes and positional specification in vertebrate embryonic axes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 227-256.
- Iijima, N., Tanaka, S. & Ota, Y.** (1998). Purification and characterization of bile-salt activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 18, 59-69.

- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., & Hernández-Cruz, C.M.** (2000). Recent advances in nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 97-107.
- James, S.Y., Lin, F., Kolluri, S.K., Dawson, M.I. & Zhang, X.K.** (2003). Regulation of retinoic acid receptor β expression by peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands in cancer cells. *Cancer Res.* 63, 3531-3538.
- Jones, B.B., Ohno, C.K., Allenby, G., Boffa, M.B., Levin, A.A., Grippo, J.F. & Petrovich, M.** (1995). New retinoid X receptor subtypes in zebra fish (*Danio Rerio*) differentially modulate transcription and do not bind 9-cis retinoic acid. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5226-5234.
- Joore, J., Van Der Lans, G.B.L.J., Lanser, P.H., Vervaar, J.M.A, Zivkovic, D., Speksnijder, J.E. & Kruijer, W.** (1994). Effects of retinoic acid on the expression of retinoic acid receptors during zebrafish embryogenesis. *Mech Dev* 46, 137-150.
- Juaneda, P. & Roquelin, G.** (1985). Rapid and convenient separation of phospholipid and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* 20, 40-41.
- Kacem, A., Meunier, F.J., Aubin, J. & Haffray, P.** (2004). A histo-morphological characterization of malformations in the vertebral skeleton of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after various triploidization treatments. *CYBIUM* 28 (1), 15-23.
- Kanazawa, A.** (1993). Essential phospholipids of fish and crustaceans. In: *Fish Nutrition in Practice, Les Colloques, No. 61*, (eds. S.J. Kaushik. and P. Luquet), pp. 519-530. Paris: Ed. INRA.
- Kanazawa, A.** (2003). Nutrition of marine fish larvae. *J. Appl. Aquacult.* 13, 103-143.
- Karasov, W.H. & Hume, I.D.** (1997). Vertebrate gastrointestinal system. In: *Handbook of Physiology, Section 13: Comparative Physiology Vol. 1* (ed. W.H. Dantzler), pp. 409-480. New York, NY: Oxford University Press.
- Kaushik, S.J., Guillou-Coustans, M.F. & Cho, C.Y.** (1998). Application of the recommendations on vitamin requirements of finfish by NRC (1993) to salmonids and sea bass using practical and purified diets. *Aquaculture* 161, 463-474.
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K. & Wahli, W.** (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2160-2164.
- Kersten, S., Reczek, P.R. & Noy, N.** (1997). The tetramerization region of the retinoid X receptor is important for transcriptional activation by the receptor. *J. Biol. Chem.* 272 (47), 29759-29768.

- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullman, B. & Schilling, T.F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310.
- Kliwer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A. Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M. & Lehman, J.M.** (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 4318-4323.
- Kobayashi, H., Spilde, T.L., Bhatia, A.M., Buckingham, R.B., Hembree, M.J., Prasad, K., Preuett, B.L., Imamura, M. & Gittes, G.K.** (2002). Retinoid signaling controls mouse pancreatic exocrine lineage selection through epithelial-mesenchymal interactions. *Gastroenterology* 123, 1331-40.
- Korc, M., Owerbach, D., Quinto, C. & Rutter, W.J.** (1981). Pancreatic islet-acinar cell interaction: amylase messenger RNA levels are determined by insulin. *Science* 213, 351-353.
- Koven., W.M., Kolkowski, S., Tandler, A., Kissil., G.W. & Sklan, D.** (1993). The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 357-364.
- Krumlauf, R.** (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.
- Lee, S.H., Fu, K.K., Hui, J.N. & Richman, J.M.** (2001). Noggin and retinoic acid transform the identity of avian facial prominences. *Nature* 414, 909-912.
- Lemberger, T., Saladin, R., Vásquez, M., Assimacopoulos, F., Staels, B., Desvergne, B., Wahli, W. & Auwerx, J.** (1996). Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor α gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J. Biol. Chem.* 271, 1764-1769.
- Levin, M.S.** (1994). Intestinal absorption and metabolism of vitamin A. *In* *Physiology of the Gastrointestinal Tract* 3rd edition, edited by L.R. Johnson, Raven Press, New York. Pp. 1957-1978.
- Li, H., Bartold, P.M., Zhang, C.Z., Clarkson, R.W., Young, W.G. & Waters, M.J.** (1998). Growth hormone and insulin-like growth factor I induce bone morphogenetic proteins 2 and 4: a mediator role in bone and tooth formation? *Endocrinology* 139, 3855-3862.
- Malpel, S., Mendelsohn, C. & Cardoso, W.V.** (2000). Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 127, 3057-3067.
- Mambrini, M.** (1996). Besoins en acides aminés des poissons: détermination des besoins en acides aminés souffrés pour l'entretien et l'accrétion protéique. *In* *Journées des poissons INRA-IFREMER, Recueil des communications*, 4 p., Saint Pée sur Nivelle.

- Mangelsdorf, D.J.** (1994). Vitamin A receptors. *Nutrition Reviews* 52 (2), s32-s44.
- Maroux, S., Louvard, D. & Baratti, J.** (1973). The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321, 282-295.
- Martinez, I., Moyano, F.J., Fernandez-Diaz, C. & Yufera, M.** (1999). Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem.* 21, 317-323.
- Mata de Urquiza, A., Liu, S., Sjöberg, M., Zetterström, R.H., Griffiths, W., Sjöval, J. & Perlmann, T.** (2000) Docosaehaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290, 2140-2144.
- Metais, P. & Bieth, J.** (1968). Détermination de l' α -amilase par une microtechnique (Determination of the α -amilase by a microtechnique). *Annal Biol. Clin. (Paris)* 26, 133-142.
- Minucci, S., Saint-Jeannet, J.P., Toyama, R., Scita, G., DeLuca, L.M., Taira, M., Levin, A.A., Ozato, K. & Dawid, I.B.** (1996). Retinoic X receptor-selective ligands produce malformations in *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 1803-1807.
- Monsoro-Burq, A-H., Duprez, D., Watanabe, Y., Bontoux, M., Vincent, C., Brickell, P. & Le Douarin, N.** (1996). The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Development* 122, 3607-3616.
- Morais, S., Cahu, C., Zambonino-Infante, J.L., Robin, J., Rønnestad, I., Dinis, M.T. & Conceição, L.E.C.** (2004). Dietary TAG source and level affect performance and lipase expression in larval sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids* 39, 449-458.
- National Research Council** (1985). Guide for the care and use of the laboratory animals. Publication no 85-23 (rev.), National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- National Research Council (NRC)** (1993). Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington, DC.
- Nicholson, J.A. & Kim, Y.S.** (1975). A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 63: 110-117.
- Ogura, T. & Evans, R.M.** (1995). A retinoic acid-triggered cascade of HOXB1 gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci* 92, 387-391.
- Olsen, R. E., Myklebust, R., Kaino, T. & Ringo, E.** (1999). Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiol. Biochem.* 21, 35-44.
- Olsen, R. E., Myklebust, R., Ringo, E. & Mayhew, T.M.** (2000). The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 207-216.

- Ørnsrud, R., Graff, I.E., Hoie, S., Totland, G.K. & Hemre, G.I.** (2002). Hypervitaminosis A in first-feeding fry of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac Nutr* 8, 7-13.
- Ostrowski, J., Roalsvig, T., Hammer, L., Marinier, A., Starrett, J.E., Yu, K.L. & Reczek, P.R.** (1998). Serine 232 and methionine 272 define the ligand binding pocket in retinoic acid receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* 273(6), 3490-3495.
- Pansérat, S., Plagens-Juan, E. & Kaushik, S.** (2001). Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol.* 204(Pt 13), 2351-2360.
- Péres, A., Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., Legall, M.M. & Quazuguel, P.** (1996). Amylase and trypsin response to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the development stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 237-242.
- Péres, A., Zambonino Infante, J.L. & Cahu, C.** (1998). Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 145-152.
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 2002-2007.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30: 9-36.
- Prince, V.E., Joly, L., Ekker, M. & Ho, R.K.** (1998). Zebrafish hox genes: genomic organization and modified colinear expression patterns in the trunk. *Development* 125, 407-420.
- Qin, P., Cimildoro, R., Kochhar, D.M., Soprano, K.J. & Robert Soprano, D.** (2002). PBX, MEIS, and IGF-I are potential mediators of retinoic acid-induced proximodistal limb reduction defects. *Teratology* 66, 224-234.
- Rachez, C., Sautières, P., Formstecher, P. & Lefebvre, P.** (1996). Identification of amino acids critical for the DNA binding and dimerization properties of the human retinoic acid receptor α . *J. Biol. Chem.* 271(30), 17996-18006.
- Rainuzzo, J.R., Farestveit, R. & Jorgensen, L.** (1993). Fatty acid and aminoacid composition during embryonic and larval development in plaice (*Pleuronectes platessa*). In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development* (ed. B.T. Walther and H.J. Fhyn), pp. 290-295. Bergen, Norway: Bergen University.

- Raul, F., Noriega, R., Doffoel, M., Grenier, J.F. & Haffen, K.** (1982). Modifications of brush border enzyme activities during starvation in the jejunum and ileum of adult rats. *Enzyme* 28, 328-335.
- Rausch, U., Vasiloudes, P., Rüdiger, K. & Kern, H.F.** (1985). In vivo stimulation of rat pancreatic acinar cells by infusion of secretin. *Cell Tissue Res.* 242, 641-644.
- Reifen, R., Zaiger, G. & Uni, Z.** (1998). Effect of vitamin A on small intestinal brush border enzymes in a rat. *Int J Vitam Nutr Res* 68, 281-286.
- Ribeiro, L., zambonino Infante, J.L., Cahu, C. & Dinis, M.T.** (1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture* 179, 465-473.
- Rodriguez, C., Perez, J. A., Badia, P., Izquierdo, M. S., Fernández-Palacios, H. & Hernández, A. L.** (1998). The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate ratio in the diet. *Aquaculture* 169, 9-23.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C. & De Luca, L.M.** (2000). Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80, 1021-1054.
- Russell, R.M.** (2000). The vitamin A spectrum : from deficiency to toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 878-884.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernández-Cruz, C.M., Bessonart, M. & Fernández-Palacios, H.** (1999). Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in polar lipids on the gut and liver histological structure of seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 179, 253-264.
- Sargent, J. R., McEvoy, L. A. & Bell, J. G.** (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine larval fish. *Aquaculture* 155, 117-127.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. & Tocher, D.** (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179: 217-229.
- Sargent, J. R., Tocher, D. R. & Bell, J. G.** (2002). The lipids, Third edition. In *Fish Nutrition* (Halver, J. E. & Hardy, R. W., eds), , pp. 182-259. Academic Press, London.
- Sasagawa, S., Takabatake, T., Takabatake, Y., Muramatsu, T. & Takeshima, K.** (2002). Axes establishment during eye morphogenesis in *Xenopus* by coordinate and antagonistic actions of BMP4, shh, and RA. *Genesis* 33, 86-96.
- Segner, H. & Juario, J.V.** (1986). Histological observations on the rearing of milkfish, *Chanos chanos*, fry using different diets. *J. Appl. Ichthyol.* 4, 162-173.

- Segner, H., Rösch, R., Verreth, J. & Witt, U.** (1993). Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. J. World Aquacult. Soc. 24, 121-134.
- Skillington, J., Choy, L. & Derynck, R.** (2002). Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. J Cell Biol. 159(1), 135-46.
- Smith, L. S.** (1989). Digestive functions in teleost fishes. In: Fish Nutrition, 2nd edition (Harver, J. E., ed.), pp. 331-421. San Diego: Academic Press.
- Solheim, E.** (1998). Growth factors in bone. Int Orthop. 22, 410-416.
- Solomon, T.E.** (1987). Control of the exocrine pancreatic secretion. In Physiology of Gastrointestinal Tract, 2nd Ed. Edited by L.R. Johnson, Raven Press, New-York. Pp. 1173-1207.
- Steineger, H.H., Arnsten, B.M., Spydevold, Ø. & Sørensen, H.N.** (1998). gene transcription of the retinoid X receptor α (RXR α) is regulated by fatty acids and hormones in rat hepatic cells. J. Lipid Res. 39: 744-754.
- Storch, V., Stählin, W. & Juario, J.V.** (1983). Effect of different diets on the ultrastructure of hepatocytes of *Chanos chanos* fry (Chanidae: Teleostei): an electron microscopic and morphometric analysis. Mar. Biol. 74, 101-104.
- Suzuki, T., Oohara, I. & Kurokawa, T.** (1998). Hoxd-4 expression during pharyngeal arch development in flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos and effects of retinoic acid on expression. Zool Sci 15, 57-67.
- Suzuki, T., Oohara, I. & Kurokawa, T.** (1999). Retinoic acid given at late embryonic stage depresses sonic hedgehog and Hoxd-4 expression in the pharyngeal area and induces skeletal malformation in flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. Develop. Growth Differ. 41, 143-152.
- Suzuki, T., Srivastava, A.S. & Kurokawa, T.** (2000). Experimental induction of jaw, gill and pectoral fin malformations in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, larvae. Aquaculture 185, 175-187.
- Sweetman, J.** (2004). European aquaculture: recent developments in marine hatchery technologies. The second hatchery feeds and technology workshop, Sydney, september 30-october 1. Edited by S. Kolkovski, J. Heine & S. Clarke, pp. 34-42.
- Takeuchi, T., Dedi, J., Haga, Y., Seikai, T. & Watanabe, T.** (1998). Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 169, 155-165.

- Tan, N-S., Shaw, N.S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., Wahli, W. & Noy, N.** (2002). Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol. Cell. Biol.* 22 (14), 5114-5127.
- Tanenbaum, D.M., Wang, Y., Williams, S.P. & Sigler, P.B.** (1998). Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 5998-6003.
- Thompson, D. L., Gerlach-Banck, L. M., Barald, K. F. & Koenig, R. J.** (2003). Retinoic acid repression of bone morphogenetic protein 4 in inner ear development. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2277-2286.
- Uni, Z., Zaiger, G., Gal-Garber, O., Pines, M., Rozenboim, I. & Reifen, R.** (2000). Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chicken small intestine. *Br Poult Sci.* 41, 410-415.
- Villeneuve, L., Gisbert, E., Cahu, C.L., Le Gall, M.M. & Zambonino-Infante, J.L.** (2004). Expression and localization of some retinoid receptors during European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture* 242, 537-551..
- Villeneuve, L., Gisbert, E., Cahu, C. L., Le Delliou H. & Zambonino Infante, J.,** (soumis). Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Br. J. Nutr.*
- Vu, T.T.** (1976). Etude du développement du tube digestif des larves de bar *Dicentrarchus labrax* (L.). *Arch. Zool. Exp. Gen.* 117, 493-509.
- Walford, J. & Lam, T.J.** (1993). Development of the digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 109, 187-205.
- Watanabe, Y. & Le Douarin, N.M.** (1996). A role for BMP4 in the development of subcutaneous cartilage. *Mech. Dev.* 57, 69-78.
- Wedden, S., Thaller, C. & Eichele, G.** (1990). Targeted slow-release of retinoids into chick embryos. *Methods Enzymol.* 190, 201-209.
- Wicker, C., Puigserver, A., Rausch, U., Scheele, G. & Kern, H.** (1985). Multiple-level caerulein control of the gene expression of secretory proteins in the rat pancreas. *Eur. J. Biochem.* 151, 461-466.
- White, J.C., Highland, M., Kaiser, M. & Clagett-Dame, M.** (2000). Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of the anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo. *Dev. Biol.* 220, 263-284.
- Wolf, G.** (1984). Multiple functions of vitamin A. *Physiological reviews* 64 (3), 873-937.

- Yates, K.E., Troulis, M.J., Kaban, L.B. & Glowacki, J.** (2002) IGF-I, TGF- β , and BMP-4 are expressed during distraction osteogenesis of the pig mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31, 173-178.
- Yu, V.C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J.M., Devary, O.V., Näär, A.M., Kim, S.Y., Boutin, J.M., Glass, C.K. & Rosenfeld M.G.** (1991). RXR β : a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67, 1251-1266.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L. & Péres, A.** (1997). Partial substitution of di- and tripeptides for native protein in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J Nutr* 127, 604-614.
- Zambonino Infante, J.L. & Cahu, C.L.** (1999). High dietary lipids levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J Nutr* 129, 1195-1200.
- Zambonino Infante, J. & Cahu, C. L.** (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 130(4), 477-487.
- Zhang, Y., Zhang, Z., Zhao, X., Yu, X., Hu, Y., Geronimo, B., Fromm, S.H. & Chen, Y.** (2000). A new function of BMP4 : dual role for BMP4 in regulation of Sonic hedgehog expression in the mouse tooth germ. *Development* 127, 1431-1443.
- Zizola, C.F., Balaña, M.E., Sandoval, M. & Calvo, J.C.** (2002). Changes in IGF-I receptor and IGF-I mRNA during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Biochimie* 84, 975-980.

RESUME

Le but de ce travail était de tester l'effet nutritionnel de la vitamine A et des AGPI (dont l'EPA et le DHA) sur le développement des larves de bar. Un excès de vitamine A dans l'aliment provoquait des malformations au niveau de la tête reliées à une hausse de la transcription de $RAR\gamma$ et la perte d'une vertèbre lorsque les larves étaient nourries avec cet aliment de J8 à J13. Un aliment contenant un excès d'AGPI perturbait le développement de la colonne vertébrale des bars, les malformations étaient corrélées à une chute de l'expression de $RAR\alpha$, $RAR\gamma$, $RXR\alpha$ et BMP4 et une vertèbre surnuméraire apparaissait sur les larves nourries de J8 à J13 avec cet aliment. Un aliment contenant 31 mg/kg de matière sèche de vitamine A et entre 1.1 et 2.3% d'EPA + DHA permet un développement harmonieux des larves. Il apparaît que la période J8-J13 est cruciale pour le développement, période pendant laquelle les larves sont très sensibles à la nature et à la teneur des nutriments.

Larves, bar *Dicentrarchus labrax*, vitamine A, AGPI, gènes du développement, malformations.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the nutritional effects of vitamin A and PUFA (including EPA and DHA) on sea bass larvae development. An excess of vitamin A in the diet led to malformations affecting the cephalic region linked to an increase of $RAR\gamma$ transcription and the loss of a vertebra when larvae were fed this diet from 8 days post hatch (dph) to 13 dph. A diet containing an excess of PUFA disrupted the development of larvae vertebral column, deformities were correlated to a decrease of $RAR\alpha$, $RAR\gamma$, $RXR\alpha$ and BMP4 transcription and an additional vertebra appeared when larvae were fed this diet from 8 dph to 13 dph. A diet containing 31 mg/kg of dry matter of vitamin A and between 1.1 and 2.3% of EPA + DHA allows larvae to develop harmoniously. The period 8-13 dph is crucial for the development as sea bass larvae are very sensible to the level and the nature of nutrients during this interval of time.

Larvae, sea bass *Dicentrarchus labrax*, vitamin A, PUFA, genes of development, malformations.