

## Rapport ARN/ADN et évaluation de l'état nutritionnel et de la croissance des larves de poissons marins: un essai de mise au point expérimentale chez la sole (*Solea solea* L.)

Jean-Pierre Bergeron, et Michel Boulhic

Bergeron, J.-P., et Boulhic, M. 1994. Rapport ARN/ADN et évaluation de l'état nutritionnel et de la croissance des larves de poissons marins: un essai de mise au point expérimentale chez la sole (*Solea solea* L.). - ICES J. mar. Sci., 51: 181-190.

Parmi les diverses propositions d'applications des mesures d'acides nucléiques, et plus spécialement du rapport ARN/ADN, en biologie marine, certaines n'ont pas encore produit des résultats véritablement convaincants: l'examen de quelques travaux publiés sur le sujet révèle une variabilité selon différents aspects qui semble peu propice à une application fiable de ce rapport à des organismes issus de leur milieu naturel. Les résultats d'un essai de mise au point expérimentale sont présentés ici. Cinq élevages de larves de sole (*Solea solea* L.) ont été menés, trois dans les mêmes conditions standard à 19°C et les deux autres soumis à des températures plus proches de celles du milieu naturel (12 et 13°C). L'effet de la température sur la croissance s'est révélé conforme aux schémas classiques. Cependant, au cours de l'ontogénèse larvaire, le rapport ARN/ADN présente une très forte variabilité qui, de plus, n'est pas reproductible d'un élevage à l'autre, même conduits dans des conditions identiques. Il en découle, comme principale conséquence, qu'il n'existe pas de relation entre ce rapport et les taux de croissance instantanée mesurés. Chez les larves privées de nourriture, le rapport ARN/ADN atteint rapidement de plus faibles valeurs, dépendantes de la température et de l'âge, mais peu différentes de celles mesurées chez les larves nourries au cours des premiers jours suivant l'éclosion. Ces résultats sont discutés en relation avec la littérature prônant l'usage de ce rapport pour l'étude de la nutrition ou de la croissance de larves de poissons. Une analyse argumentée de travaux ayant conduit à une interprétation probablement hâtive de leurs résultats est proposée. L'accent est mis en conclusion sur la nécessité de n'utiliser qu'avec discernement le rapport ARN/ADN, qui ne peut pas actuellement être considéré comme un bon indicateur du processus de croissance proprement dit; il est tout au moins démontré ici qu'il ne l'est pas pour la larve de sole.

Mots clés: acides nucléiques, rapport ARN/ADN, croissance, nutrition, larve de poisson, sole.

Much work has been and is still devoted to applications of nucleic acid measurements, and especially the RNA/DNA ratio, in marine biology, but several papers show a variability that makes this ratio probably unsuitable to some field applications. Five rearing experiments were carried out with Dover sole (*Solea solea* L.) larvae, three of them in the same standard conditions at 19°C and two others at temperatures closer to those found under field conditions (12 and 13°C). The temperature effect on growth is in accordance with general patterns. However, during ontogenetic development, the RNA/DNA ratio exhibits a very strong variability which is not reproducible in different experiments performed under the same conditions. The main consequence is that no relationship is found between this ratio and observed instantaneous growth rates. In starved larvae, the RNA/DNA ratio rapidly reaches low values, which are dependent on temperature and age, but in the same range as in fed larvae during the first days after hatching. These results are discussed in relation to the literature that advocates the use of this ratio as an index of nutritional status or growth of fish larvae. It is suggested that great care should be taken in using the RNA/DNA ratio, which cannot be considered as a reliable index of growth.

Key words: nucleic acids, RNA/DNA ratio, growth, nutrition, fish larva, Dover sole.

Received 20 May 1993; accepted 14 December 1993.

J.-P. Bergeron: IFREMER, Direction des Ressources Vivantes, Laboratoire ECOHAL, BP 1049, F-44037 Nantes Cedex 01, France. Michel Boulhic: IFREMER, Direction des Ressources Vivantes, Laboratoire Pêche, BP 70, F-29280 Plouzané, France.

## Introduction

Tour à tour considéré comme un indice de croissance potentiel (Bulow, 1970), voire quasi universel (Buckley, 1984), puis comme indice de jeûne ou "d'état nutritionnel" (Buckley, 1979, 1980; Clemmesen, 1987), le rapport ARN/ADN a été l'objet d'une persévérante attention et le sujet de nombre de publications en biologie marine (revue dans Bulow, 1987). Les espoirs à l'origine des travaux menés dans cette voie reposent sur des fondements conceptuels simples et désormais devenus classiques (Bulow, 1970; Ceccaldi, 1981): la concentration cellulaire de l'acide désoxyribonucléique (ADN), détenteur du patrimoine génétique de l'individu, est constante et caractéristique de l'espèce considérée; les acides ribonucléiques (ARN) sont les molécules permettant l'élaboration de matière vivante conformément aux programmes inscrits dans les molécules d'ADN; le rapport ARN/ADN peut donc être légitimement considéré comme un indice de la quantité de "machinerie" (selon l'expression de Buckley, 1984) affectée à la biosynthèse protéique par cellule. Selon ces principes, des relations entre les valeurs de ce rapport et les taux de croissance d'organismes marins furent recherchées et c'est à Buckley (1984) que revint la primeur d'établir expérimentalement une telle relation pour des larves de poissons, instigation de premières applications *in situ* assez récentes (Buckley et Lough, 1987; Robinson et Ware, 1988; Hovenkamp, 1990; Hovenkamp et Witte, 1991; McGurk *et al.*, 1992). Mais simultanément d'autres essais de calibration expérimentale effectués sur des invertébrés marins ont conduit leurs auteurs à des conclusions beaucoup plus réservées quant à la validité du rapport ARN/ADN pour une estimation fiable et précise de la croissance (Clarke *et al.*, 1989; Anger et Hirche, 1990; Frantzis *et al.*, 1992).

Les premiers travaux (Bulow, 1970) ayant consisté en l'induction de variations de croissance de poissons par l'administration de rations alimentaires quantitativement différentes, y compris des privations totales de nourriture, grande devint la tentation d'appliquer ce rapport ARN/ADN non plus seulement à l'évaluation de la croissance, mais aussi à la détection de l'effet du jeûne sur les organismes. Depuis que Hjort (1914) en a formulé l'hypothèse, le manque de nourriture disponible dans le milieu naturel est considéré comme une cause virtuelle majeure de mortalité des premiers stades larvaires de poissons marins et par conséquent responsable de fluctuations du recrutement de certaines populations. Ce concept, toujours d'actualité soixante ans plus tard (May, 1974), reste le moteur d'importantes investigations; des diverses méthodes proposées pour évaluer ce processus, la détermination du rapport ARN/ADN est actuellement encore parmi les plus souvent recommandées. La question est considérée comme d'importance puisque le Northeast Fisheries Center

(National Marine Fisheries Service, Woods Hole, Massachusetts, USA) a engagé, sur la foi des premiers travaux de Buckley (1979), un suivi des variations du rapport ARN/ADN caractérisant les larves de poissons récoltées dans leur milieu naturel (Sissenwine, 1984). Cependant la littérature parue sur ce sujet au cours des dix dernières années est loin d'être toujours convaincante: de nombreux travaux laissent soupçonner une forte variabilité du rapport (Clemmesen, 1987, 1988, 1989), des zones d'ombre subsistent (Buckley, 1984; Wright et Martin, 1985), des contradictions peuvent même apparaître parfois (Ota et Landry, 1984); enfin, et surtout, aucune publication n'a à ce jour fourni les résultats explicites d'essais de calibration expérimentale de la méthode sur plusieurs élevages de larves d'une même espèce dans des conditions standard identiques.

Une mise au point en la matière s'avérait donc nécessaire et des travaux récents (Bergeron *et al.*, 1991) nous en ont offert l'opportunité. En effet, bien que fondée sur une démarche quelque peu différente de celle des précédents auteurs, la recherche d'une méthode biochimique de détection de l'effet du jeûne chez la larve de sole (*Solea solea* L.) nous a conduit à retenir cependant le même terme de référence, c'est-à-dire la teneur en ADN de l'individu (Bergeron *et al.*, 1991). Il est dès lors apparu essentiel de tester simultanément, sur le même matériel biologique, les qualités respectives de fiabilité de notre indice et du rapport ARN/ADN; il fallait pour cela: (1) déterminer les caractéristiques de l'évolution du rapport ARN/ADN au cours du développement de larves nourries; et (2) examiner l'incidence de la privation de nourriture sur les valeurs de ce rapport; en outre, une vérification rigoureuse du modèle de Buckley (1984) semblait d'actualité et réalisable dans le même contexte expérimental. Cinq élevages de larves de sole ont été menés, trois dans des conditions standard à 19°C et deux à de plus basses températures proches de celles du milieu naturel.

## Matériel et méthodes

Les élevages expérimentaux ont été menés au Centre de Brest de l'IFREMER, dans les installations du Département Ressources Aquacoles spécialement affectées à l'élevage de larves de poissons. Les pontes naturelles d'un stock de géniteurs, maintenus en captivité dans les conditions décrites par Girin (1978), ont assuré l'approvisionnement en oeufs de sole pour nos expériences qui se sont déroulées à partir du début du printemps de 1987: du 25 mars au 17 avril, cinq élevages de larves, provenant chacun d'une ponte unique, ont été mis en oeuvre.

Trois expériences (1.1, 1.2 et 1.3) ont été menées à la température standard de 19°C pour tenter de révéler l'essentiel des phénomènes. Expérience 1.1: privation de nourriture totale, dès l'ouverture de la bouche à J2, ou

différée, c'est-à-dire à J5, après résorption complète de la vésicule vitelline, ou J10, au moment du début de la métamorphose, chacun de ces traitements étant imposé simultanément à deux lots de larves élevées en bacs séparés (réplicats); deux bacs complémentaires servirent de témoins, les larves y ont été nourries, dans les conditions standard, par des nauplii d'*Artemia*. Expériences 1.2 et 1.3: privation totale de nourriture, dès J2, ou alimentation standard; ici encore, chaque traitement fut appliqué à deux lots élevés en deux bacs séparés (réplicats).

Deux expériences (2 et 3) ont été menées à des températures plus proches de celles du milieu naturel (respectivement 13 et 12°C): privation totale de nourriture dès l'ouverture de la bouche (J3 à 13°C, J4 à 12°C) ou alimentation standard; le principe de deux réplicats pour chaque traitement fut également maintenu pour ces deux expériences.

La conduite des élevages de larves fut conforme aux conditions générales habituellement respectées par le laboratoire et éprouvées depuis de nombreuses années. Mises au point initialement par Girin (1978), les méthodes ont été l'objet de divers perfectionnements successifs grâce aux travaux de Fuchs (1979), de Person-Le Ruyet *et al.* (1981) et de Devauchelle *et al.* (1986); les détails spécifiques des expériences dont les résultats sont présentés ici sont précisés par Boulhic (1991).

Les modes de prélèvements et de préparation des échantillons sont décrits par Bergeron *et al.* (1991); il importe néanmoins de souligner que les analyses biochimiques ont été réalisées sur des homogénats constitués de 15 à 20 larves.

La croissance des larves est caractérisée par l'évolution de leur masse protéique P. Le taux de croissance spécifique, exprimé en pourcentage d'accroissement quotidien, est calculé selon la formule classique (Ricker, 1979), notamment utilisée par Buckley (1984):

$$TCS = \frac{\ln P_{t_2} - \ln P_{t_1}}{t_2 - t_1} \times 100.$$

Par ailleurs, la croissance de larves de poissons marins peut être estimée, selon Buckley (1984), en fonction du rapport ARN/ADN et de la température T (en °C) du milieu par l'équation suivante:

$$G_{pt} = 0.93 T + 4.75 \text{ ARN/ADN} - 18.18.$$

Le dosage des acides nucléiques a été effectué selon la méthode fluorimétrique initialement proposée par Le Pecq et Paoletti (1966), modifiée par Karsten et Wollenberger (1972, 1977). Précisons ici que, comme d'autres auteurs (Clemmesen, 1988; Clarke *et al.*, 1989), nous avons été tentés par la solution séduisante d'utiliser le bisbenzimidazole (Hoechst 33258) pour doser spécifiquement l'ADN (Brunk *et al.*, 1979; Cesarone *et al.*,

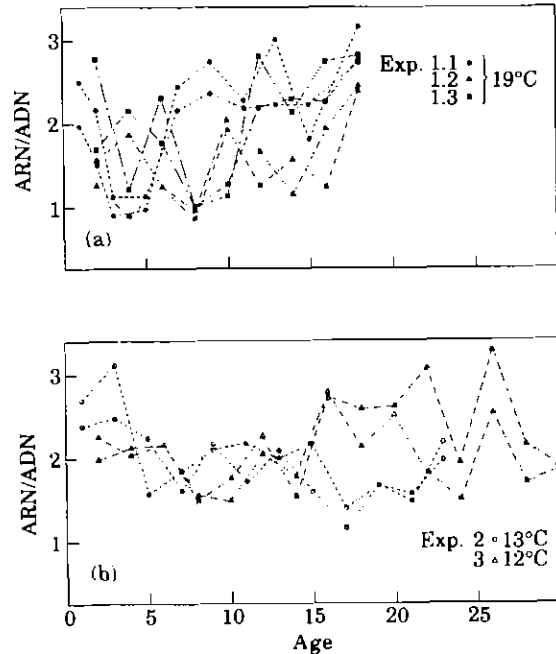


Figure 1. Evolution du rapport ARN/ADN au cours du développement ontogénique (âge exprimé en nombre de jours après l'éclosion) de la larve de sole en élevage à 19°C (a), 13 et 12°C (b).

1979); les résultats ont été décevants en raison des mêmes inconvénients que ceux décrits par Clemmesen (1990). Divers tests de la fiabilité de la méthode de Karsten et Wollenberger (1972, 1977) ont été effectués selon des modalités analogues à celles mises en oeuvre par Clemmesen (1990) et le strict respect des conditions de leur protocole analytique donne toute satisfaction. La seule restriction, par rapport à leurs recommandations de 1977, a consisté à conserver comme standard, au lieu de la rhodamine B, l'ADN type I de thymus de veau (Sigma).

Le dosage des protéines a été réalisé sur le même homogénat à l'aide d'un auto-analyseur Technicon dans les conditions mises au point par Samain *et al.* (1977) pour l'adaptation de la méthode de Lowry *et al.* (1951).

## Résultats

Evolution du rapport ARN/ADN au cours du développement ontogénique des larves témoins nourries

Le rapport ARN/ADN oscille globalement entre 1 et 3 chez la larve de sole au cours de son développement (Fig. 1). L'amplitude des variations apparaît plus forte dans les trois élevages menés à 19°C que dans les deux autres. L'aspect le plus frappant de ces résultats réside en l'absence totale de reproductibilité de l'évolution

Tableau 1. Coïncidences des variations du rapport ARN/ADN mesuré chez les réplicats: test de l'ajustement des valeurs par régression linéaire.

Exp.	n	r	p
1.1	10	0.805	<0.01
1.2	9	0.506	n.s.
	8*	0.724	<0.05
1.3	9	0.658	<0.10
	8*	0.812	<0.02
2	12	0.706	<0.01
3	15	0.646	<0.01

\*Calcul effectué en supprimant les valeurs obtenues à J4

temporelle du rapport d'un élevage à l'autre. En revanche on observe une bonne concordance des valeurs obtenues de deux lots d'animaux élevés simultanément et dans des conditions rigoureusement identiques: hormis une certaine disparité se manifestant au début des expériences 1.2 et 1.3 (2ème et 4ème jour), les valeurs du rapport sont souvent très proches ou montrent des tendances d'évolution similaires; ceci peut être testé simplement par la méthode de régression linéaire, qui donne des coefficients de corrélation significatifs au seuil de 1% dans trois des cinq expériences (1.1, 2 et 3), significatifs aux seuils de 5 et 2% respectivement pour les expériences 1.2 et 1.3 si l'on ne prend pas en compte les valeurs mesurées à J4 (Tableau 1).

La stabilité des teneurs relatives en ADN ayant été démontrée précédemment (Bergeron *et al.*, 1991), la variabilité du rapport ARN/ADN ne peut être attribuée qu'à celle des ARN (Fig. 2).

#### ARN/ADN et croissance des larves

Dans les conditions d'élevage pratiquées au laboratoire, la croissance pondérale de la larve de sole se caractérise, très classiquement, par trois phases principales (Fig. 3): au temps nécessaire à la résorption complète des réserves vitellines (3 jours à 19°C, 6 jours à 12°C) correspond une première phase "de latence" au cours de laquelle le poids de protéines individuel, d'environ 50 µg, demeure stable, ou peut tendre à diminuer, surtout à basse température; puis vient une phase de croissance exponentielle durant 6 à 7 jours (J4 à J10-11) à 19°C, une dizaine de jours (J10 à J20 environ) à 12°C; enfin une phase de ralentissement de la croissance révèle la métamorphose pleuronecte. L'effet de la température sur la croissance des larves apparaît très net. On remarque cependant pour les trois élevages menés à 19°C que les courbes de croissance diffèrent quelque peu; notamment l'expérience n° 1.2 se singularise par deux aspects: la pente de la phase exponentielle est sensiblement plus forte et le poids protéique des animaux métamorphosés à J18 est plus élevé que dans les autres élevages, approximativement du double.

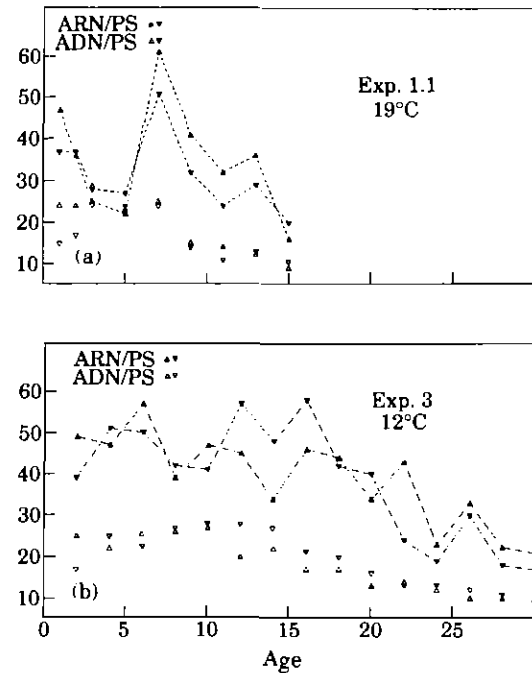


Figure 2. Comparaison des variations des teneurs relatives en ARN et ADN (exprimées en µg/mg de poids sec) au cours du développement ontogénique (âge exprimé en nombre de jours après l'éclosion) de la larve de sole en élevage à 19°C (a) et 12°C (b).

Cette observation mérite d'être confrontée aux niveaux du rapport ARN/ADN mesurés pour cette expérience, qui sont globalement les plus bas. Il est dès lors intéressant de rechercher la portée de cette contradiction et d'appliquer le modèle proposé par Buckley (1984) aux données fournies par nos cinq expériences. On constate (Fig. 4) qu'il n'y a pas de relation simple entre les taux de croissance spécifique observés et ceux prédits par ce modèle. Un examen plus détaillé de la distribution des couples de valeurs fait même apparaître, pour certaines expériences, une tendance générale inverse, ce que confirme le calcul (Tableau 2); pour l'expérience 2, on détermine en effet un coefficient de corrélation négatif, théoriquement significatif au seuil de 1%.

#### Effet de la privation de nourriture sur le rapport ARN/ADN des larves

Chez les larves privées de nourriture dès l'ouverture de la bouche (J2 à 19°C, J4 à 12°C), le rapport ARN/ADN décroît rapidement (Fig. 5). A 19°C, il est inférieur à 1 dès J3 et le reste jusqu'à la mort par inanition; mais il se distingue difficilement de celui mesuré chez les témoins nourris, qui lui aussi tend à diminuer durant les premiers jours: les valeurs demeurent très proches jusqu'à J5 pour l'expérience n° 1.1, elles le sont encore à J8 pour les expériences n° 1.2 et 1.3. Le test non paramétrique de

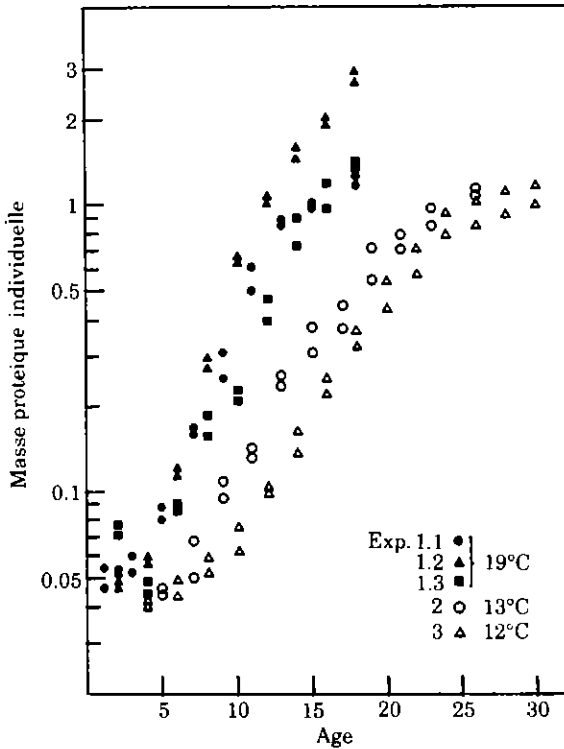


Figure 3. Croissance de la larve de sole en élevage, exprimée par l'évolution de sa masse protéique individuelle (en mg) selon une échelle logarithmique au cours de son développement ontogénique (jusqu'à l'accomplissement de la métamorphose pleuronecte).

Mann et Whitney, qui peut s'appliquer à certains des résultats de ces trois expériences menées à 19°C (Fig. 5a), permet d'estimer des différences significatives au seuil de 5% à J4 et de 1% à J6, mais que l'on se doit de considérer avec prudence étant donné la variabilité du rapport mesuré chez les témoins nourris, encore très bas par exemple à J8 dans deux expériences (1.2 et 1.3). A 13 et

Tableau 2. Régression linéaire appliquée aux relations entre les taux de croissance spécifique observés (x), calculés à l'aide des valeurs de masse protéique individuelles, et ceux prédits (y) en fonction des valeurs du rapport ARN/ADN et de la température du milieu selon le modèle de Buckley (1984).

Exp.	Equation	n	r	p
1.1	$y = -0.08x + 10.66$	20	-0.321	n.s.
1.2	$y = -0.09x + 8.75$	18	-0.533	<0.05
1.3	$y = -0.04x + 9.78$	18	-0.249	n.s.
2	$y = -0.10x + 4.52$	24	-0.579	<0.01
3	$y = 0.02x + 3.12$	26	0.064	n.s.

12°C, la décroissance est moins rapide, mais plus apparente par rapport aux témoins (Fig. 5b): pour ces derniers en effet le rapport ne descend guère au-dessous de 1.5, alors que les larves à jeun présentent des valeurs oscillant autour de 1.

L'effet de mises à jeun différées a également été recherché (Fig. 6). Si elle est imposée à J5, le rapport ARN/ADN se maintient près de 1, ou peu inférieur; la différence vis-à-vis des valeurs mesurées chez les témoins est nette du fait que celles-ci montrent une très forte augmentation entre J5 et J7, mais il est à noter que cette différence devient très faible, voire inexistante, si l'on considère les témoins des deux autres expériences menées à la même température. En revanche, chez les larves privées de nourriture à J10, la discrimination n'apparaît possible que vers J16, l'effet est moins patent et l'on peut s'interroger notamment à propos des écarts considérables observés à J14 et J18 entre les deux lots soumis au même traitement: ce pourrait être imputé soit à des erreurs analytiques, soit à des biais d'échantillonnage, qui, à ce stade de l'évolution de l'élevage (métamorphose en voie d'achèvement), peuvent être importants du fait de l'hétérogénéité en tailles et comportements individuels.

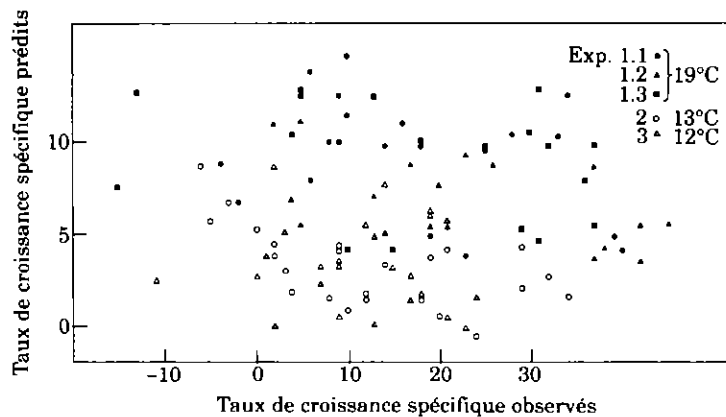


Figure 4. Relations entre les taux de croissance spécifique observés et ceux prédits en fonction des valeurs du rapport ARN/ADN et de la température du milieu selon le modèle de Buckley (1984).

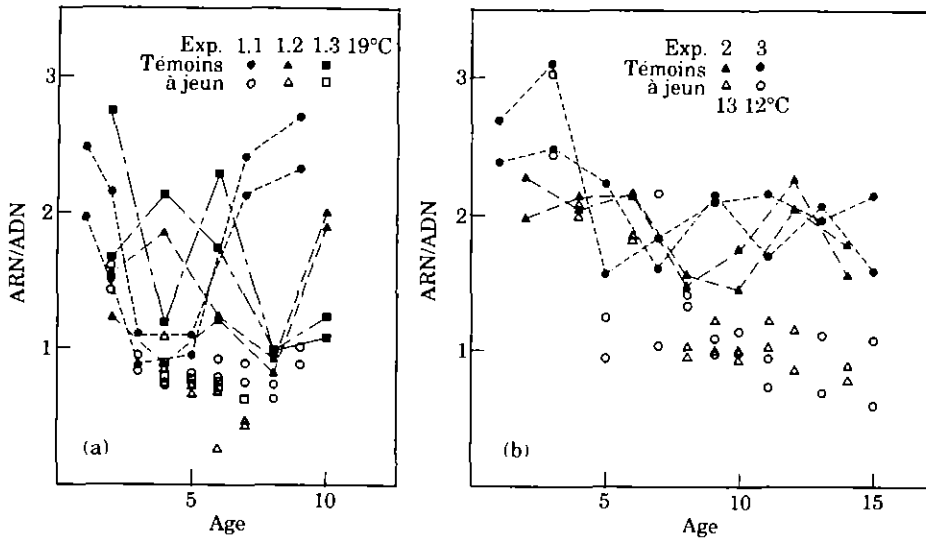


Figure 5. Effet de la privation totale de nourriture (dès l'ouverture de la bouche à J2) sur le rapport ARN/ADN de larves de sole élevées à 19°C (a), 13 et 12°C (b).

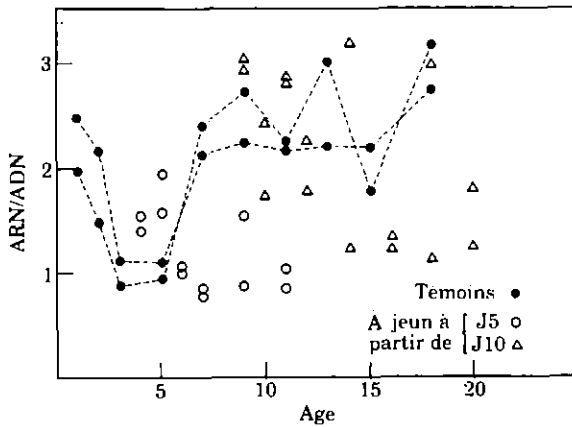


Figure 6. Effet de la privation de nourriture imposée à partir de J5 et J10 sur le rapport ARN/ADN de larves de sole élevées à 19°C.

## Discussion

L'innovation essentielle contenue dans ces résultats consiste en la forte variabilité des valeurs du rapport ARN/ADN pour un même stade de développement de la larve de sole. Les travaux publiés à ce jour sur le sujet ne font pas état de mesures effectuées au cours de plusieurs élevages d'une même espèce et dans les mêmes conditions. Parfois cependant, les comparaisons de données présentées séparément permettent de déceler de telles dissemblances: ainsi Clemmesen (1987, 1989, 1992) obtient pour *Clupea harengus* trois courbes d'évolution en fonction de l'âge sensiblement différentes. Il existe, entre les résultats obtenus par Clemmesen (1987, 1989, 1992) chez la larve de hareng et ceux présentés ici concernant la sole, une analogie générale telle qu'il est

essentiel que l'on s'y attarde quelque peu. Rappelons tout d'abord que ces résultats sont issus de mesures effectuées chez deux espèces notablement dissemblables, en particulier du point de vue éthologique ou phylogénétique, dans deux laboratoires usant de techniques d'élevage différentes et pratiquant des méthodes analytiques pas toujours identiques. En dépit de ces différences, les variations du rapport ARN/ADN chez les larves de sole et de hareng présentent des similitudes frappantes selon trois critères principaux.

1. Une forte variabilité se manifeste au cours du développement ontogénique de la larve: chez la sole, l'amplitude des variations, considérable à 19°C, apparaît encore importante à des températures proches de celles du milieu naturel (Fig. 1) et se trouve tout à fait comparable à celle observée par Clemmesen (1987, 1989, 1992) chez la larve de hareng élevée à des températures voisines.
2. L'évolution des fluctuations du rapport durant la vie larvaire n'est pas reproductible d'un élevage à l'autre.
3. Mais ces fluctuations ne semblent pas aléatoires ainsi que le suggèrent deux observations qui se corroborent mutuellement: il s'agit, pour la sole, de la concordance satisfaisante pour la majorité des mesures effectuées sur les lots de larves élevés parallèlement en réplicats (Fig. 1) et, pour le hareng, la faiblesse des écarts-types associés aux valeurs du rapport qui ont été évaluées au niveau individuel dans deux des trois expériences menées par Clemmesen (1989, 1992). Ces deux constatations traduisent chez les deux espèces une faible variabilité du rapport ARN/ADN à un instant donné au sein d'un lot de larves issues d'une même éclosion. Il semble bien, après examen approfondi de la littérature, que ce soit dans cette unique

circonstance que puisse être observée une homogénéité des valeurs mesurées; un élevage expérimental de larves du hareng du Pacifique, mené par Fukuda *et al.* (1986), en a fourni un bon exemple. Mais il apparaît également probable qu'il ne s'agisse pas d'une loi générale: en effet Raae *et al.* (1988), chez des larves de morue, mettent en évidence de sensibles différences entre échantillons constitués de 25 individus prélevés dans un même lot et à un même instant; de la même façon, Clemmesen (1988) note une forte variabilité de valeurs individuelles du rapport chez des larves de turbot.

Un quatrième aspect ressortant de la comparaison de ces travaux doit être brièvement évoqué: le rapport ARN/ADN montre une tendance générale à la diminution au cours des 5 à 10 premiers jours de la vie de larves nourries. C'est un inconvénient majeur pour les applications comme indice d'état nutritionnel des premiers stades larvaires de poissons, communément considérés comme les plus critiques (Hjort, 1914; May, 1974; Hewitt *et al.*, 1985; Boulhic, 1991). L'effet attendu du jeûne consistant en une diminution du rapport, il peut dès lors être difficile, voire impossible, au cours des premiers jours, de discriminer les larves souffrant de dénutrition de celles convenablement nourries, Clemmesen (1987, 1992) l'a très clairement démontré expérimentalement pour la période d'une dizaine de jours suivant l'éclosion chez le hareng.

Notons enfin un dernier point d'accord au sujet de la variabilité globale du rapport ARN/ADN: c'est bien la teneur en ARN qui intrinsèquement est variable, ainsi que l'avait suggéré Clemmesen (1988) et que l'ont indirectement confirmé Bergeron *et al.* (1991) par la mise en évidence de la stabilité des teneurs en ADN au cours de l'ontogénèse larvaire. Il faut souligner que les travaux qui viennent d'être cités présentent au moins l'intérêt de fournir des valeurs de l'évolution du rapport suffisamment détaillées pour pouvoir juger de cette variabilité, ce qui n'est pas le cas lorsque les données sont excessivement lissées (Buckley *et al.*, 1984; Wright et Martin, 1985; Martin et Wright, 1987).

La comparaison des valeurs obtenues à différentes températures constitue le deuxième aspect de ces résultats méritant considération. A 19°C, bien que la croissance de la larve de sole soit assez bien contrôlée et reproductible dans des conditions standard d'élevage strictement respectées, les faibles écarts observés entre les trois expériences sont à l'opposé de ce qu'aurait laissé supposer le rapport ARN/ADN. Par ailleurs, la durée de l'ontogénèse, de l'éclosion à l'accomplissement de la métamorphose pleuronecte (18 jours à 19°C), varie du simple au double pour l'élevage mené à 12°C (Bergeron *et al.*, 1991; Boulhic, 1991); or il apparaît manifeste que les valeurs du rapport ARN/ADN, notamment pendant les premiers jours des élevages, sont en moyenne plus

grandes chez les deux populations élevées à basse température, dont la croissance est plus lente, et inversement. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Ota et Landry (1984), qui ont été parmi les premiers, après Buckley (1982), à faire intervenir la température du milieu d'élevage pour induire des variations de croissance, de copépodes en l'occurrence. Ce phénomène s'expliquerait, d'après Goolish *et al.* (1984), par la nécessité, pour maintenir un même potentiel de synthèse protéique, de compenser la diminution de l'activité métabolique de l'ARN à basse température par une augmentation de sa concentration cellulaire et donc du rapport ARN/ADN. Malgré la vraisemblance de cette interprétation, on ne connaît pas suffisamment les lois régissant ce type de régulation (Miglavs et Jobling, 1989) et l'on peut se joindre à Ota et Landry (1984) pour y voir un sérieux obstacle à l'application de la méthode, sinon une contradiction avec un certain nombre de travaux qui ont prôné l'utilisation du rapport ARN/ADN pour caractériser la croissance de poissons (Wilder et Stanley, 1983; Buckley, 1984; Wright et Martin, 1985).

Selon Buckley (1984), la contradiction n'est qu'apparente: en introduisant la température en seconde variable indépendante, l'auteur réussit à établir une relation d'une remarquable étroitesse. Les moyens d'y parvenir sont drastiques et, parmi ceux-ci, deux retiennent particulièrement l'attention. Le premier consiste à utiliser les valeurs moyennes établies à partir de mesures hebdomadaires, qui ne sont pas précisées, sur les 3 à 17 premières semaines de la vie de larves de poissons appartenant à huit espèces: la variabilité du rapport ARN/ADN au cours du développement de la larve de sole (Fig. 1) montre de façon tout à fait claire que des valeurs ainsi calculées seraient hautement dépendantes du choix de la date d'échantillonnage et du lot de larves considéré (3 expériences menées à 19°C); or une variabilité de cet ordre, ou même très supérieure, existe, elle a été mise en évidence par d'autres auteurs, chez les larves d'espèces considérées par Buckley (1984) pour l'établissement de sa relation (Clemmesen, 1987, 1989 et 1992, pour *Clupea harengus*; Raae *et al.*, 1988, pour *Gadus morhua*). Dans ces conditions, il est permis de concevoir quelque réserve sur les conclusions de certains travaux comportant la détermination des taux de croissance de larves prélevées dans leur milieu naturel à partir de mesures des teneurs en acides nucléiques (Buckley et Lough, 1987; Robinson et Ware, 1988; Hovenkamp, 1990; Hovenkamp et Witte, 1991). L'exercice apparaît manifestement hasardeux lorsque l'on considère la forte variabilité individuelle également démontrée, par deux études menées par des auteurs différents, chez les larves du hareng du Pacifique (Robinson et Ware, 1988; McGurk et Kusser, 1992); pourtant, Robinson et Ware (1988) sont persuadés que "la résolution de la méthode (Buckley, 1984) permet de suivre des modifications de taux de croissance sur de fines échelles de temps"; quant

à McGurk et Kusser (1992), dans une tentative de comparaison des performances respectives de trois méthodes d'analyse des acides nucléiques réalisée sur des individus issus de leur milieu naturel, ils fondent une grande part de l'interprétation de leurs résultats sur la plausibilité des valeurs du rapport ARN/ADN et leur cohérence vis-à-vis des estimations de croissance fournies par le modèle de Buckley (1984): compte tenu des questions soulevées quelques lignes plus haut à propos de ce modèle, la démarche apparaît discutable et il est plus simple d'imputer la variabilité qu'ils observent dans les conditions de leur étude à une variabilité individuelle intrinsèque.

Deux déterminants majeurs de la croissance des larves sont la nutrition et la température du milieu. Buckley (1984) donne la prépondérance à ce dernier facteur dans l'équation qu'il propose et attribue *ipso facto* la variabilité résiduelle des taux de croissance à celle des teneurs relatives en acides nucléiques. Ceci amène à considérer un second point très critiquable de la démarche usuellement admise par de nombreux auteurs: les variations du rapport ARN/ADN sont confrontées par Buckley (1984) aux conditions de croissance au cours de la période ayant précédé la mesure; du point de vue conceptuel, cette dernière proposition apparaît difficilement recevable: en effet, si les ARN sont considérés comme indicateurs à un instant donné de la "machinerie" cellulaire affectée à la biosynthèse protéique, ce n'est pas la phase de croissance passée que leur quantité devrait traduire, mais précisément l'activité de croissance en cours ou à venir à court terme, par conséquent susceptible d'être caractérisée ultérieurement au niveau pondéral. En réalité, l'apparente cohérence des résultats ainsi obtenus doit très vraisemblablement être attribuée à un processus moléculaire élémentaire démontré de la façon la plus simple et éclatante par Lied *et al.* (1983) au niveau du muscle de morue: il s'agit de l'influence majeure des conditions de nutrition sur la concentration cellulaire en ARN ribosomique, qui constitue environ 80% des ARN (Miglav et Jobling, 1989), voire plus de 90% (Westerman et Holt, 1988). Les résultats des travaux de Lied *et al.* (1983), confirmés ensuite par d'autres également consacrés au muscle de poissons (Loughna et Goldspink, 1984; Black et Love, 1986; Miglav et Jobling, 1989; Mathers *et al.*, 1992), permettent d'expliquer logiquement que des variations de croissance induites par différentes conditions de nutrition ne soient révélées qu'après par les teneurs en ARN, ils justifient également les résultats originaux de Bulow (1970) obtenus sur des poissons éviscérés. Là réside sans doute le point crucial de la question: concernant le processus de croissance, le rapport ARN/ADN est, et pourrait n'être qu'exclusivement, un "indice de la croissance contrôlée par les conditions de nutrition", c'est-à-dire, à plus proprement parler, un bon révélateur de l'état nutritionnel de l'animal avec les conséquences

classiques que, dans des conditions normales, cela implique sur la croissance; il s'avère ainsi d'un grand intérêt au niveau du muscle de poisson (également de tissus d'invertébrés, ainsi que le suggèrent Wright et Hetzel (1985) chez un mollusque lamellibranche ou Wang et Stickle (1986) chez un crustacé décapode), beaucoup plus incertain sur des larves entières en raison d'une forte variabilité dont actuellement le déterminisme demeure obscur. Une régulation par la nutrition des teneurs en ARN ribosomique s'opère probablement aussi chez la larve selon des mécanismes analogues. d'ailleurs il est clair que la privation de nourriture provoque une sensible diminution du rapport ARN/ADN, les résultats présentés ici confirment tout à fait ceux des travaux de Clemmesen (1987, 1989, 1992); mais la mise en place progressive des différents organes, divers remaniements tissulaires et anatomiques, des taux de renouvellement cellulaire variables peuvent être responsables de fluctuations naturelles du rapport ARN/ADN et par conséquent empêcher une perception fine et précise de l'effet du jeûne au niveau global de l'organisme. De ce point de vue, la nouvelle approche proposée récemment par Bergeron *et al.* (1991) ouvre des perspectives d'applications plus prometteuses, avec deux avantages principaux: la stabilité des valeurs mesurées chez les témoins nourris permet de déterminer des seuils quantitatifs significatifs; la privation de nourriture est décelable très rapidement et sur les tout premiers stades de développement. L'indice semble cependant moins performant pour des stades plus avancés, lorsque la métamorphose est engagée. Le rapport ARN/ADN redeviendrait-il alors plus approprié? Cela pourrait s'envisager du fait que, la masse musculaire étant devenue plus importante, le processus métabolique évoqué plus haut pourrait prendre une prédominance perceptible au niveau de l'organisme entier; nos résultats ne l'indiquent pas clairement, mais ceux de Clemmesen (1992) semblent étayer cette hypothèse.

Depuis l'impulsion initiale de Sutcliffe (1965), la recherche d'applications des teneurs relatives en acides nucléiques à l'évaluation de la croissance d'organismes marins n'a pas abouti à des résultats tangibles et indiscutables. D'accord avec Miglav et Jobling (1989), il semble bien que le rapport ARN/ADN ne soit pas un indice fiable de l'activité de croissance proprement dite, surtout à l'échelle du développement ontogénique d'une larve de poisson. En tout état de cause, il ne l'est pas pour la larve de sole, comme le montrent nos résultats. La forte variabilité des ARN, démontrée ci-dessus et décelable dans nombre d'autres travaux, en limite l'utilisation pour une détection précoce et vraiment fiable du jeûne chez des individus issus de leur milieu naturel. Dans l'attente d'une meilleure connaissance des facteurs de régulation des quantités respectives des différents types d'ARN aux différents niveaux



d'organisation de la matière vivante, d'un tissu, d'un organe ou d'un individu, une grande prudence s'impose quant à l'utilisation du rapport ARN/ADN à ces différentes échelles. Le promoteur de ce fameux rapport, Bulow (1970) lui-même, d'une revue encore récente (Bulow, 1987) tirait le même enseignement.

## Remerciements

La grande expérience de J. Person-Le Ruyet (IFREMER, Centre de Brest, Département Ressources Aquacoles) en matière d'élevage de larves de poissons nous fut précieuse, nous la remercions bien vivement pour sa disponibilité et ses conseils. Les commentaires et critiques de deux experts nous ont été très utiles pour apporter de sensibles améliorations à certains points d'une première version de notre manuscrit, nous leur en sommes extrêmement reconnaissants.

## Références

- Anger, K., et Hirche, H. J. 1990. Nucleic acids and growth of larval and early juvenile spider crab, *Hyas araneus*. *Marine Biology*, 105: 403-411.
- Bergeron, J. P., Boulhic, M., et Galois, R. 1991. Effet de la privation de nourriture sur la teneur en ADN de la larve de sole (*Solea solea* L.). *ICES Journal of Marine Science*, 48: 127-134.
- Black, D., et Love, R. M. 1986. The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *Journal of Comparative Physiology B*, 156: 469-479.
- Boulhic, M. 1991. Recherches d'indices de jeûne chez la larve de sole *Solea solea* (Linnaeus, 1758): approche expérimentale et application dans le Golfe de Gascogne. Thèse Doctorat d'Université. Université de Bretagne Occidentale, Brest. 129 pp., 41 planches.
- Brunk, C. F., Jones, K. C., et James, T. W. 1979. Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Analytical Biochemistry*, 92: 497-500.
- Buckley, L. J. 1979. Relationships between RNA-DNA ratio, prey density, and growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 36: 1497-1502.
- Buckley, L. J. 1980. Changes in ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid and protein content during ontogenesis in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, and effect of starvation. *Fishery Bulletin*, 77: 703-708.
- Buckley, L. J. 1982. Effects of temperature on growth and biochemical composition of larval winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Marine Ecology Progress Series*, 8: 181-186.
- Buckley, L. J. 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Marine Biology*, 80: 291-298.
- Buckley, L. J., Turner, S. I., Halavik, T. A., Smigielski, A. S., Drew, S. M., et Laurence, G. C. 1984. Effects of temperature and food availability on growth, survival, and RNA-DNA ratio of larval sand lance (*Ammodytes americanus*). *Marine Ecology Progress Series*, 15: 91-97.
- Buckley, L. J., et Lough, R. G. 1987. Recent growth, biochemical composition, and prey field of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) on Georges Bank. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44: 14-25.
- Bulow, F. J. 1970. RNA-DNA ratios as indicators of recent growth rates of a fish. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 27: 2343-2349.
- Bulow, F. J. 1987. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: a review. *In* The age and growth of fish. pp. 45-64. Ed. by R. C. Summerfelt and G. E. Hall. The Iowa State University Press, Ames, Iowa. 544 pp.
- Ceccaldi, H. J. 1981. Evolution des concepts concernant l'utilisation des méthodes de la physiologie et de la biochimie en océanographie et en biologie marine. *Oceanis*, 7: 489-509.
- Cesarone, C. F., Bolognesi, C., et Santi, L. 1979. Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Analytical Biochemistry*, 100: 188-197.
- Clarke, A., Rodhouse, P. G., Holmes, L. J., et Pascoe, Ph. L. 1989. Growth rate and nucleic acid ratio in cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 133: 229-240.
- Clemmesen, C. M. 1987. Laboratory studies on RNA/DNA ratios of starved and fed herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, 43: 122-128.
- Clemmesen, C. M. 1988. A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforschung*, 32: 134-143.
- Clemmesen, C. M. 1989. RNA/DNA ratios of laboratory-reared and wild herring larvae determined with a highly sensitive fluorescence method. *Journal of Fish Biology*, 35 (Suppl. A): 331-333.
- Clemmesen, C. M. 1990. Improvements in the fluorimetric determination of the RNA and DNA content in individual marine fish larvae. *ICES CM 1990/L*, 98, 14 pp.
- Clemmesen, C. M. 1992. The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of laboratory reared individually measured herring larvae. *ICES CM 1992/L*, 33, 13 pp.
- Devauchelle, N., Lety, Y., et Quere, M. 1986. Experimental units for incubation and larval rearing with special reference to four marine fish species. *Aquaculture*, 58: 297-304.
- Frantzis, A., Grémare, A., et Vétion, G. 1992. Growth rates and RNA/DNA ratios in *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed on benthic macrophytes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 156: 125-138.
- Fuchs, J. 1979. Techniques d'élevage larvaire et production intensive de juvéniles chez la sole (*Solea solea* L.). Thèse Doctorat de Spécialité. Université d'Aix-Marseille II. 238 pp.
- Fukuda, M., Nakano, H., et Yamamoto, K. 1986. Biochemical changes in Pacific herring during early developmental stages. *Bulletin of the Faculty of Fisheries of Hokkaido University*, 37: 30-37.
- Girin, M. 1978. Méthodes de production des juvéniles chez trois poissons marins: le bar (*Dicentrarchus labrax*), la sole (*Solea solea*) et le turbot (*Scophthalmus maximus*). Thèse Doctorat d'Etat. Université P. et M. Curie, Paris. 202 pp.
- Goolish, E. M., Barron, M. G., et Adelman, I. R. 1984. Thermoacclimatory response of nucleic acid and protein content of carp muscle tissue: influence of growth rate and relationship to glycine uptake by scales. *Canadian Journal of Zoology*, 62: 2164-2170.
- Hewitt, R. P., Theilacker, G. H., et Lo, N. C. H. 1985. Causes of mortality in young jack mackerel. *Marine Ecology Progress Series*, 26: 1-10.
- Hjort, J. 1914. Fluctuations in the great fisheries of northern Europe viewed in the light of biological research. *Rapports et Procès-Verbaux du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer*, 20: 1-228.
- Hovenkamp, F. 1990. Growth differences in larval plaice *Pleuronectes platessa* in the southern bight of the North Sea as indicated by otolith increments and RNA/DNA ratios. *Marine Ecology Progress Series*, 58: 205-215.

- Hovenkamp, F., et Witte, J. J. 1991. Growth, otolith growth and RNA/DNA ratios of larval plaice *Pleuronectes platessa* in the North Sea 1987 to 1989. *Marine Ecology Progress Series*, 70: 105-116.
- Karsten, U., et Wollenberger, A. 1972. Determination of DNA and RNA in homogenized cells and tissues by surface fluorometry. *Analytical Biochemistry*, 46: 135-148.
- Karsten, U., et Wollenberger, A. 1977. Improvements of the ethidium bromide method for direct fluorimetric estimation of DNA and RNA in cell and tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, 77: 464-470.
- Le Pecq, J. B., et Paoletti, C. 1966. A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Analytical Biochemistry*, 17: 100-107.
- Lied, E., Rosenlund, G., Lund, B., et von der Decken, A. 1983. Effect of starvation and refeeding on *in vitro* protein synthesis in white trunk muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 76 B: 777-781.
- Loughna, P. T., et Goldspink, G. 1984. The effects of starvation upon protein turnover in red and white myotomal muscle of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 25: 223-230.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Far, A. L., et Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Martin, F. D., et Wright, D. A. 1987. Nutritional state analysis and its use in predicting striped bass recruitment: laboratory calibration. *American Fisheries Society Symposium*, 2: 109-114.
- Mathers, E. M., Houlihan, D. F., et Cunningham, M. J. 1992. Nucleic acid concentrations and enzyme activities as correlates of growth rate of the saithe *Pollachius virens*: growth-rate estimates of open-sea fish. *Marine Biology*, 112: 363-369.
- May, R. C. 1974. Larval mortality in marine fishes and the critical period concept. *In* The early life history of fish, pp. 3-19. Ed. by J. H. S. Blaxter. Springer-Verlag, Berlin. 765 pp.
- McGurk, M. D., et Kusser, W. C. 1992. Comparison of three methods of measuring RNA and DNA concentrations of individual Pacific herring, *Clupea pallasii*, larvae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49: 967-974.
- McGurk, M. D., Warburton, H. D., Galbraith, M., et Kusser, W. C. 1992. RNA-DNA ratio of herring and sand lance larvae from Port Moller, Alaska: comparison with prey concentration and temperature. *Fisheries Oceanography*, 1: 193-207.
- Miglavs, I., et Jobling, M. 1989. Effects of feeding regime on food consumption, growth rates and tissue nucleic acids in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, with particular respect to compensatory growth. *Journal of Fish Biology*, 34: 947-957.
- Ota, A. Y., et Landry, M. R. 1984. Nucleic acids as growth rate indicators for early developmental stages of *Calanus pacificus* Brodsky. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 80: 147-160.
- Person-Le Ruyet, J., Alexandre, J. C., et Le Roux, A. 1981. Méthode de production de juvéniles de sole (*Solea solea* L.) sur un aliment composé sec et en eau de mer chauffée et recyclée. *In* Aquaculture in heated effluents and recirculation systems. Vol. 2, pp. 159-175. Ed. by K. Tiews. Heenemann Verlagsgesellschaft, Berlin. 666 pp.
- Raae, A. J., Opstad, I., Kvenseseth, P., et Walther, B. Th. 1988. RNA, DNA and protein during early development in feeding and starved cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*, 73: 247-259.
- Ricker, W. E. 1979. Growth rates and models. *In* Fish physiology, 8: Bioenergetics and growth, pp. 677-743. Ed. by W. S. Hoar, D. J. Randall, and J. R. Brett. Academic Press, New York. 786 pp.
- Robinson, S. M. C., et Ware, D. M. 1988. Ontogenetic development of growth rates in larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*, measured with RNA-DNA ratios in the Strait of Georgia, British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45: 1422-1429.
- Samain, J. F., Daniel, J. Y., et Le Coz, J. R. 1977. Trypsine, amylase et protéines du zooplancton: dosage automatique et manuel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 29: 279-289.
- Sissenwine, M. P. 1984. Why do fish populations vary? *In* Exploitation of marine communities, pp. 59-94. Ed. par R. M. May. Dahlem Konferenzen, Springer-Verlag, Berlin. 367 pp.
- Sutcliffe, W. H. Jr 1965. Growth estimates from ribonucleic acid content in some small organisms. *Limnology and Oceanography*, 10 (Suppl.): R253-R258.
- Wang, S. Y., et Stickle, W. B. 1986. Changes in nucleic acid concentration with starvation in the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. *Journal of Crustacean Biology*, 6: 49-56.
- Westerman, M. E., et Holt, G. J. 1988. The RNA-DNA ratio: measurement of nucleic acids in larval *Sciaenops ocellatus*. *Contributions in Marine Science*, 30 (Suppl.): 117-124.
- Wilder, I. B., et Stanley, J. G. 1983. RNA-DNA ratio as an index to growth in salmonid fishes in the laboratory and in streams contaminated by carbaryl. *Journal of Fish Biology*, 22: 165-172.
- Wright, D. A., et Hetzel, E. W. 1985. Use of RNA/DNA ratios as an indicator of nutritional stress in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, 25: 199-206.
- Wright, D. A., et Martin, F. D. 1985. The effect of starvation on RNA-DNA ratios and growth of larval striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of Fish Biology*, 27: 479-485.